

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**“IDENTIFICACIÓN DE UNIDADES DISCRETAS DE TIPIFICACIÓN
(DTU’s) DE *Trypanosoma cruzi* EN MARSUPIALES (*Didelphis
marsupialis*, *Didelphis virginianus*, *Philander oposum*) PRESENTES EN
LA RESERVA ECOLÓGICA “EL ZAPOTAL” EN EL ESTADO DE
CHIAPAS.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

VIRIDIANA CAMACHO SIERRA

COMITÉ DE TUTORES

**Dr. José Guillermo Estrada Franco
Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán
Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau**

El cerrillo Piedras Blancas, Toluca Estado de México. Enero 2016

DEDICATORIAS

A mi Dios Jehová, por ser mi fuerza y mi temple y seguir siempre mostrándome infinito amor con todas bendiciones que me da.

**A las motivaciones más grandes de mi vida, mis padres Cristina Sierra y Felipe Camacho, porque con sus consejos, amor y paciencia han logrado que hoy llegue hasta aquí, esto es solo uno de los muchos frutos que hoy cosechan...
LOS AMO.**

A mi bella Familia Camacho Sierra, porque cada paso en mi vida me demuestran que hoy y siempre están ahí para mi Hermanos Delia,Cristina y Felipe, los amo Hasta el final unidos.

A mi Familia CIESA, que más que compañeros, somos Amigos. Los quiero

A mi Familia adoptiva Yong Macias, Dr, Gil, Pati, Patita y Gilito,por su apoyo cariño y amistad,

A mi Familia ZooMaT, David y Alberto e Irene, por hacerme sentir en casa y apoyarme y convertir el trabajo en amistad

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una zoonosis producida por el parásito protozooario flagelado denominado *Trypanosoma cruzi*, su principal vector es un insecto hematófago de la subfamilia Triatominae, principalmente los géneros *Rhodnius* (*R. prolixus*), *Triatoma* (*T. infestans*), y *Panstrongylus* (*P. megistus*). De las 40 especies de triatominos reconocidos como vectores de la enfermedad, 28 especies se encuentran exclusivamente en México, y 8 son compartidos con los EE.UU. (Ibarra Cárdenas et al., 2009), además de contar con un gran número de reservorios domésticos y silvestres sinantrópicos, dentro de los cuales se encuentra las especies del género *Didelphis*, desempeñando un papel importante en la transmisión de la enfermedad en hábitats peridomésticos, debido a que pueden actuar simultáneamente como reservorios y vector de *Trypanosoma* y ser considerados junto con los armadillos y osos hormigueros, como los reservorios más antiguos del parásito. La determinación de la prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en marsupiales de una región determinada, permite tener una aproximación del riesgo que corren otras especies de mamíferos de ser infectadas por este parásito en dicha región. Por otro lado, dado que el genotipo de los parásitos ha sido asociado a la presentación de variaciones en la virulencia y patogenicidad del parásito, la identificación de los linajes de *T. cruzi* en los marsupiales de la región en estudio, contribuye a conocer los riesgos de salud que corren las especies susceptibles de ser infectadas con las cepas parasitarias circulantes. Se determinó la prevalencia puntual de *T. cruzi* en las especies de marsupiales presentes en la reserva ecológica El Zapotal e identificar los linajes del parásito circulantes en estos animales. Se hizo un estudio estratificado dentro de la reserva ecológica “El Zapotal”, ubicada en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Se muestrearon 60 marsupiales en un período comprendido de junio a septiembre del 2014. Para determinar la prevalencia se utilizó el gen miniexón para amplificar una secuencia de 197 pb (ref). La identificación de los linajes se realizó amplificando un fragmento de 832pb del gen TcSC5D y se secuenció. El análisis de las secuencias se realizó con el Software Mega 6.06 mediante cálculos de distancia por el método Maximum Likelihood, con el algoritmo de Tamura de tres parámetros y

máxima verosimilitud, con un bootstrapping de 500 repeticiones. Para calcular la correlación entre dos matrices de proximidad, se generó una matriz de identidad/similitud utilizando el software MatGAT (Matrix Global Alignment Tool) v2.01 y se realizó un análisis de Mantel. La prevalencia puntual de infección por *T. cruzi* para el conjunto de los marsupiales presentes en El Zapotal, Tuxtla Gutiérrez en Chiapas, fue de 40%. La prevalencia fue mayor para *Philander oposum* (57.10%), seguido de *Didelphis marsupialis* (39.5%) y *Didelphis virginiana* (30%). Se determinó la presencia del Linaje TCI del *Trypanosoma cruzi* en 16 de los 60 marsupiales muestreados.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo mediante la beca de estudios de posgrado

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) por permitirme realizar mis análisis de muestras en sus instalaciones.

Al Proyecto IRES (ID UAEM 3836/2014/CIA proyecto 3072). Por el apoyo en el financiamiento de este proyecto.

A mis asesores Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán, Guillermo Estrada Franco y Daniel Piñero Dalmau por el apoyo académico y moral en la realización de este proyecto y por todo el tiempo invertido en el.

Al Zoológico Miguel Álvarez del Toro, al departamento de Patología Clínica por permitirme realizar mi trabajo de campo, y por todo el apoyo y facilidades

INDICE

REVISION BIBLIOGRÁFICA	10
Agente etiológico	10
Ciclo de vida	10
Origen del Trypanosoma	12
Vías de transmisión	12
Origen de las DTU's de <i>T. cruzi</i>	14
Patogénesis de la enfermedad de Chagas y su relación con las DTU's.....	15
<i>Trypanosoma cruzi</i> en marsupiales.....	15
Marsupiales.....	16
Didelphis marsupialis (D. marsupialis)	17
<i>Didelphis viginiana (D. virginiana)</i>	19
<i>Philander opossum (P. opossum)</i>	20
DEPREDADORES	21
RESERVA NATURAL EL ZAPOTAL	22
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
Muestreo.....	27
Toma de muestras.....	30
Extracción de DNA.....	31
Amplificación del fragmento del gen mini exón	31
Amplificación del fragmento del gen TcSC5D	31
Purificación del producto de PCR.....	32
Secuenciación del producto de PCR.....	32
Análisis filogenético.....	32
RESULTADOS	33
CONCLUSIONES	59
DISCUSIÓN.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	63

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una zoonosis producida por el parásito protozoario flagelado denominado *Trypanosoma cruzi*, su principal vector es un insecto hematófago de la subfamilia Triatominae, principalmente los géneros *Rhodnius* (*R. prolixus*), *Triatoma* (*T. infestans*), y *Panstrongylus* (*P. megistus*). Se han reconocido alrededor de 40 especies capaces de transmitir la enfermedad, siendo importantes desde el punto de vista epidemiológico (OMS, 1991). La transmisión ocurre por medio de las heces de insectos, aunque también existen otras formas de transmisión como la transfusional, transplacentaria, trasplantes de órganos, accidentes de laboratorio, vía oral y jeringas infectadas (Apt *et al.*, 2008).

Es una enfermedad crónica que puede ser mortal, y conduce a menudo a lesiones muy debilitantes del corazón y tracto intestinal. Está íntimamente relacionada al desarrollo socioeconómico de la población, colocándola como una de las enfermedades parasitarias principales del continente americano, representando uno de los problemas de salud pública más importantes de América Latina. Afecta cerca de 6 y 7 millones de personas y 90 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la infección (OMS 2015) Tiene una prevalencia del 1,5%, con 8 millones de personas infectadas y 28 millones en riesgo de infección, generando anualmente 12 mil muertes. Se ubica cómo la tercera enfermedad infecciosa de mayor importancia y se considera como una enfermedad endémica en 21 países de América Latina incluido México, desde el sur de EEUU (42°N) hasta el norte de la Patagonia (43°S), sin embargo, en algunos países como España, Italia, Portugal, etc., en donde la enfermedad no es endémica, la enfermedad de Chagas se considera una infección emergente debido al creciente número de inmigrantes procedentes de América Latina (Carabarihn *et at.*, 2012).

Aproximadamente 200 especies o subespecies domésticas y de fauna silvestres se han identificado con la infección por *T. cruzi* (Barretto y Ribeiro, 1979), desempeñando así, el papel de reservorios de la enfermedad. Muchas de estas especies al ser sinantrópicas, especialmente los roedores y los marsupiales (Marsupialia, Didelphidae), se vuelven susceptibles a ser infectados con el parásito por el vector, al construir sus nidos, el vector se alberga ahí y se alimenta, involucrándolos así, en el ciclo de transmisión de la enfermedad (Noireau *et al.*, 2009).

En México en 1940 se hace el primer reporte de caso de la enfermedad en el Estado de Oaxaca (Salazar *et al.*, 1979). Actualmente se tienen un total de 18 áreas determinadas como endémicas de la enfermedad en nuestro país, ubicadas en el Sureste, estas áreas incluyen los estados de Oaxaca, Jalisco, Yucatán, Chiapas, Veracruz, Puebla, Guerrero, Hidalgo y Morelos, principalmente en las zonas rurales (Dumonteil, 1999), con prevalencias mayores al 10% (Reyes y Pickering, 2006).

De las 40 especies de triatominos reconocidos como vectores de la enfermedad, 28 especies se encuentran exclusivamente en México, y 8 son compartidos con los EE.UU. (Ibarra Cárdenas *et al.*, 2009), además de contar con un gran número de reservorios domésticos y silvestres sinantrópicos, dentro de los cuales se encuentran las especies del género *Didelphis*, desempeñando un papel importante en la transmisión de la enfermedad en hábitats peridomésticos, debido a que pueden actuar simultáneamente como reservorios y vector de *Trypanosoma* y ser considerados junto con los armadillos y osos hormigueros, como los reservorios más antiguos del parásito.

Se ha descrito la elevada diversidad genética del *Trypanosoma cruzi*, en el 2009 se acordó un consenso para la clasificación de las cepas de *T. cruzi* teniendo en cuenta los estudios filogenéticos, obteniendo como resultado la clasificación en 6 unidades discretas de tipificación (DTU's) TcI-TcVI (Zingales y col., 2009, 2012).

Se han realizado estudios comparativos para evaluar la asociación entre la diversidad genética y las propiedades biológicas del parásito, incluyendo el

comportamiento en cultivos de células de mamíferos y axénicos, la transmisibilidad a través del insecto vector, la presentación clínica de la enfermedad, la patogenicidad y virulencia y la sensibilidad a los fármacos in vitro (Laurent y col., 1997; de Lana y col., 1998).

Se ha referido la presencia de diferentes DTU's en los diferentes vectores y hospederos, siendo el linaje TcI el linaje predominante en los marsupiales (Yeo. Et al., 2005), sin embargo se han reportado la presencia de linajes TcII. En México se tienen antecedentes de predominancia del linaje TcI (Bosseno *et al.*, 2002) aunque recientemente se ha reportado la presencia de TcII, TcIII, TcIV, TcV en triatomíneos (Ligonio, *et.al.*, 2012).

En el estado de Chiapas se presenta de manera endémica la enfermedad, con una prevalencia estimadas en un 12.75%, con alrededor de 611,564 personas diagnosticadas con la infección (Carabarin *et at.*,2012). En este estado, en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, se encuentra ubicada la Reserva Ecológica "el Zapotal", en donde convergen las 3 principales especies de mamíferos marsupiales (*Philander oposum*, *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana*) conviviendo en sinantropía con las residencias humanas, siendo su presencia abundante en la región, jugando así un papel importante en la infección peridoméstica de la enfermedad. Es por esto que la identificación de las DTU's de *Trypanosoma cruzi* circulantes en la región resulta de importancia eco-epidemiológicas.

REVISION BIBLIOGRÁFICA

Agente etiológico

El *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas y se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Sub-phylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

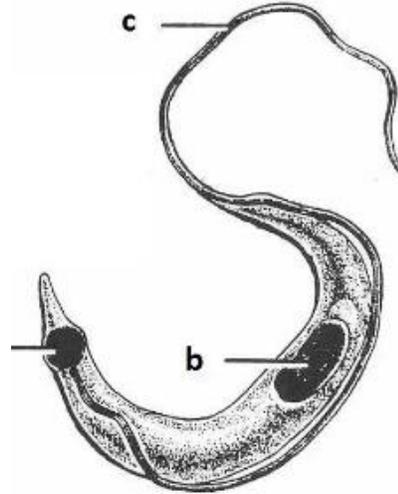
Orden: Kinetoplastida

Sub-orden: Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

Género: Trypanosoma

Especie: Trypanosoma cruzi



Trypanosoma cruzi pertenece al orden de los kinetoplástidos, posee uno o dos flagelos. Poseen una estructura paraflagelar conocida como cinetoplasto que los distingue, corresponde a una condensación de ADN (ADNk), localizado en el interior de la mitocondria. Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género Trypanosoma es uno de los más importantes debido a que muchas de sus especies de Trypanosomas producen enfermedades en humanos (*T. cruzi*, *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*).

Ciclo de vida

Trypanosoma cruzi desarrolla su ciclo de vida dentro de dos hospedadores, uno invertebrado y otro vertebrado. En base a la morfología celular (esférica, piriforme o alargada), la posición entre el núcleo y el cinetoplasto (anterior, lateral o posterior), y la forma de salida del flagelo (central o lateral), se definen tres formas evolutivas para el parásito:

- Epimastigote: posee una forma elongada (20 - 40 x 2 μm), y el origen del flagelo próximo y el núcleo por delante. En este estadio se desarrolla en el vector y en de forma in vitro, es una de las formas proliferativas del parásito siendo esta la forma en la que más fácilmente se puede cultivar “in vitro” (Figura 1).
- Tripomastigote: en esta etapa el parasito presenta una forma elongada (20 - 25 μm), con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo y el flagelo emerge por un costado del cuerpo liberándose por el extremo anterior, creando la imagen de una membrana ondulante. En este estadio es cuando se presenta la forma infectiva y no posee capacidad replicativa. En esta forma es cuando ya se puede encontrar en la circulación del mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico).
- Amastigote: Con una forma esférica u ovalada (2 - 4 μm), aquí el parasito ya carece de flagelo libre. Es el estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero (Figura 1). (Toso. et.al.,2011)

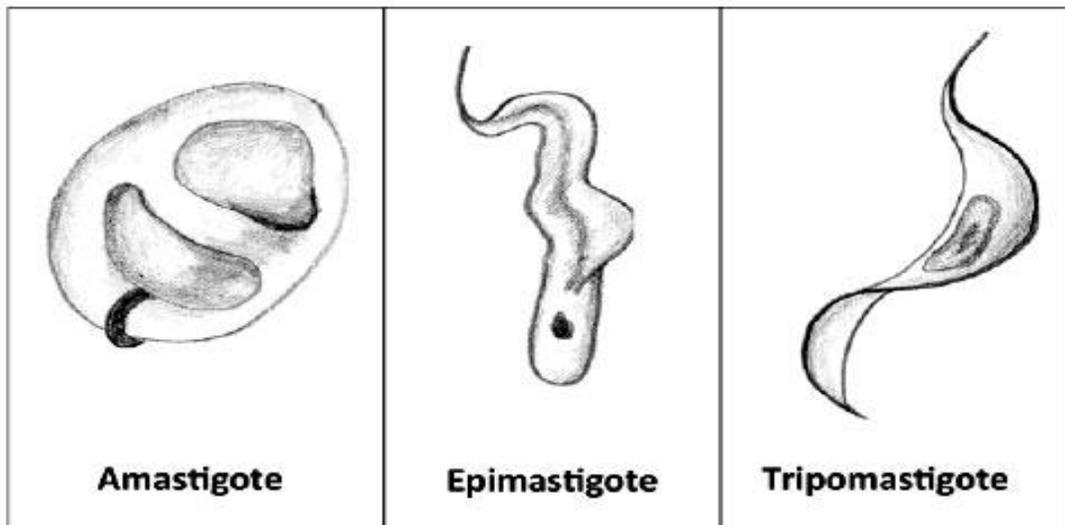


FIGURA 1. Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*. (Toso. et.al.,2011)

Origen del Trypanosoma

Mucho se ha investigado acerca del origen del *Trypanosoma*, y generado diferentes hipótesis apoyadas por el análisis filogenético de diferentes genes del parásito (por ejemplo; gen ribosomal 18S), en donde se sugiere que al ser un parásito se supone que tiene un origen monofilético, es decir, que descienden de un mismo ancestro común, sugiriendo que esta forma ancestral del parásito surgió antes de la separación de los continentes en la era Mesozoica (230 millones de años atrás) dando origen a los diferentes tripanosomas que hasta ahora conocemos. Se tiene una hipótesis sobre el surgimiento del *Trypanosoma cruzi*, planteando que esta ocurrió antes de la separación del supercontinente (Gondwana) en la era Cenozoica, evolucionando con los de los marsupiales, aproximadamente, 40 millones de años atrás y estos a su vez, comenzaron con la dispersión del parásito, pasando a ser transmitidos entre los marsupiales a través de las secreciones de las glándulas anales y/o urinarias, relacionando desde entonces al parásito con los marsupiales (Yeo y col., 2005).

Vías de transmisión

Existen diferentes vías de transmisión de la infección por *T. cruzi*. Aunque la vectorial continúa siendo la principal vía de transmisión, muchas de ellas se ven influenciadas por las acciones del hombre sobre el medio ambiente, las condiciones de vida, y la migración. Todas estas acciones se encuentran íntimamente relacionadas a las regiones geográficas, y la endemicidad de la enfermedad. A causa de ello, otras formas de transmisión, como la oral (alimentos contaminados con heces de triatomíneos o ingestión de carne cruda de hospedadores mamíferos infectados), congénita y por trasplante de órganos, han cobrado mayor importancia. Se han establecido diferentes medidas de control del vector y de bioseguridad en las transfusiones de sangre, todas con el fin de reducir los riesgos de infección de la enfermedad.

En la transmisión vectorial los parásitos presentes en las heces del insecto hematófago penetran por la herida que causa la picadura, por lesiones en la piel o por las mucosas de ojos, boca o nariz. Los insectos capaces de infectarse, y por lo

tanto, capaces de transmitir la enfermedad, pertenecen a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (más de 130 especies).(Figura 2).

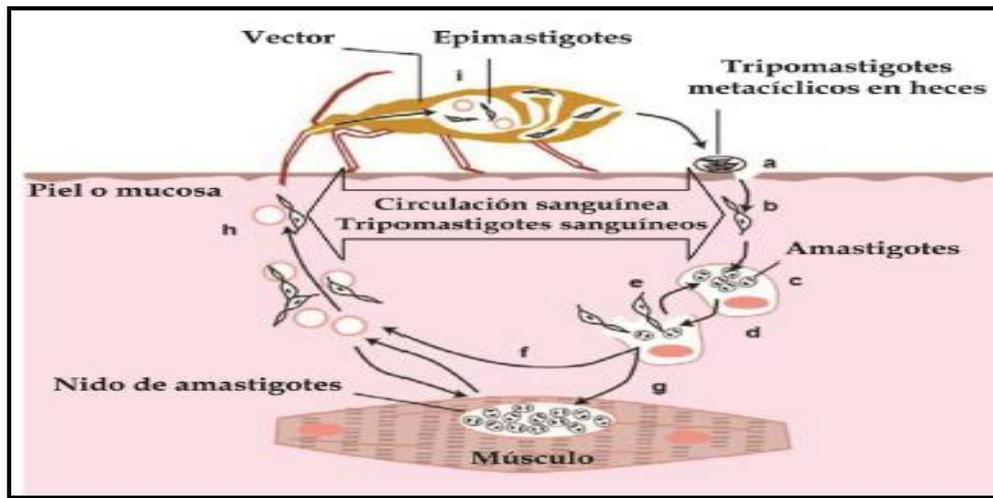


FIGURA 2: Representación esquemática de ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*: (a). Las mismas penetran por heridas (b), infectan a la célula hospedera, se diferencian a formas amastigotes y se multiplican (c). Posteriormente, se diferencian a formas tripomastigotes, que se vuelcan al torrente sanguíneo (e, f), que pueden formar nidos en los tejidos (g, re-diferenciándose a amastigotes replicativos) o ser succionados durante la alimentación de un nuevo vector, cerrando el ciclo de vida (h). Adaptado de Macedo. *et.al.*,2002.

Dentro de los ciclos de transmisión del *T.cruzi* , se pueden diferenciar tres ciclos con intervención del vector. Uno de ellos es el ciclo silvestre, considerado como el ciclo más primitivo, en este, el parasito circula entre los insectos vectores y los reservorios silvestres (mamíferos pequeños y medianos). Se han descrito más de 200 especies de mamíferos silvestres reservorios del parasito, entre ellas los marsupiales ,xenartros, murciélagos, carnívoros, lagomorfos, roedores y primates no humanos (Coura y Pinto Dias,2009). Dentro de este ciclo la infección se puede presentar en ecótopos muy diversos, encontrándose en los desiertos norteamericanos, los altiplanos andinos y las selvas amazónica y atlántica, teniendo una preferencia por ambientes ecológicamente cerrados o semiabiertos, puede tener una variación entre los hospederos y los vectores.

El segundo ciclo es llamado ciclo doméstico y este comprende la infección del hombre y en consecuencia la enfermedad de Chagas, y está determinada por factores antroponóticos (hombre-vector-hombre), siendo el hombre uno de los últimos reservorios naturales del parasito. Y el último ciclo, llamado ciclo peridoméstico, este interviene a los mamíferos sinantrópicos (roedores domésticos,

marsupiales, gatos, perros), que habitan el peridomicilio y por tanto ,se encuentran en estrecho contacto con el hombre y sus viviendas; y a los vectores silvestres, que son atraídos por el alimento y las luces de las viviendas.

Todos estos ciclos no se presentan de manera particular o específica, pueden sobreponerse o desarrollarse al mismo tiempo con frecuencia, y esto dependerá de las características eco-epidemiológicas de cada lugar, como por ejemplo, cuando el hombre se introduce en territorios o áreas silvestres, en donde el ciclo de transmisión es silvestre, promoviendo la incursión de vectores silvestres dentro del domicilio.

Origen de las DTU's de *T. cruzi*

Se ha planteado la hipótesis de que la historia evolutiva de *T. cruzi* estaría relacionada con la de sus hospedadores vertebrados (Briones y col., 1999). La fauna de mamíferos de América del Sur en el periodo Cretáceo estaba formada principalmente de marsupiales y placentarios ancestrales del orden *Xenarthra* (armadillos, osos hormigueros y perezosos). Algunos miembros de estos dos grandes grupos de mamíferos habrían sido los reservorios naturales del parásito en desde entonces. Los distintos ecotópos en los cuales se encontraban estos dos grupos de hospedadores facilitaron la evolución por propagación clonal de dos grupos de parásitos, que dieron origen a las DTU's ancestrales TcI y TcII. Se ha sugerido que TcI evoluciono en asociación a los mamíferos marsupiales del genero *Didelphis* (comadreja); y TcII, en relación a los mamíferos terrestres, como los armadillos (Miles y col. 1981; Gaunt y Miles, 2000; Yeo y col., 2005; Marcili y col., 2009b, c). A diferencia del origen por propagación clonal para Tc I y Tc II, para los otros cuatro DTU's se propone que estos fueron originados como consecuencia de eventos aislados de hibridación y después se realizó la propagación de las clonal. En 1999 se realizó la Primera Reunión Satélite donde se decidió dividir a *T. cruzi* en dos linajes, denominados Tc I y Tc II, y 4 años más tarde (2003) con el desarrollo de nuevos marcadores moleculares, se realiza un nuevo consenso para su nomenclatura, en donde se propone dividir a *T. cruzi* en 6 Unidades de Tipificación Discretas (DTU's),manteniendo al TcI original y subdividiendo al linaje TcII en 5 DTU's (TcIIa-TcIIe).En 2009 se realiza un segundo consenso en donde se establece

la nomenclatura que hasta hoy se utiliza , en donde se separan las subdivisiones de TcIIa-TcIIe, quedando clasificadas como 6 DTU's (TcI- TcVI). Existen varios reportes que muestran algoritmos que permiten caracterizar las diferentes DTU's utilizando RAPDs, PCRRFLPs, qPCR, MLST, MLMT y secuenciación de ADN, pero hasta el momento no se cuenta con un método consenso para la identificación de estos linajes (Guhl, 2013).

Patogénesis de la enfermedad de Chagas y su relación con las DTU's

Una de las principales áreas de interés en el estudio y caracterización molecular de las DTU's presentes en reservorios y vectores del *Trypanosoma cruzi*, es su asociación al desarrollo clínico y patogénesis de la enfermedad , además de contribuir al establecimiento de los diferentes ciclos de transmisión (Guhl, 2013). Ya se han hecho reportes sobre la presencia de diferentes poblaciones de *T. cruzi* en la sangre y en el tejido cardíaco de pacientes con enfermedad de Chagas, sugiriendo que los genotipos de *T. cruzi* que causan el daño celular son diferentes a los que se encuentran en sangre. Otro hallazgo dentro de los estudios ha sido el que individuos que sufrían cardiomiopatía chagásica se encontraron diferentes poblaciones del parásito, que las encontradas en pacientes sin cardiomiopatía. Se habían identificado a los linajes TcII, TcV y TcVI para las formas cardíacas, ubicadas en países sur americanos, pero, estudios recientes han mostrado que el linaje TcI también juega un papel importante en las formas cardíacas severas de la enfermedad.

***Trypanosoma cruzi* en marsupiales**

Son considerados como los reservorios más ancestrales del *Trypanosoma*, las especies del género *Didelphis* son capaces de mantener simultáneamente amastigotes y epimastigotes ,realizando la diferenciación en glándulas anales, otorgándole así, la característica de actuar como reservorio y vector del parásito, sugiriendo así, el posible mecanismo de transmisión antigua del parásito, antes de la intervención del triatomino en sus hábitos hematófagos.

Se considera a los marsupiales como excelentes reservorios de la enfermedad, pues tiene la capacidad de mantener las infecciones de larga duración, y debido a

su comportamiento sinantrópicos siempre deben considerarse de mayor importancia epidemiológica en el ciclo peridoméstico de la enfermedad.

En México se tienen antecedentes de predominancia del linaje TCI (Bosseno *et al.*, 2002) aunque recientemente se ha reportado la presencia de TCII, TCIII, TCIV ,TCV en triatomíneos (Ligonio, *et.al.*,2012).

Marsupiales

Los marsupiales son mamíferos pertenecientes a la infraclase Metatheria, teniendo como característica principal que poseen un marsupio o bolsa, y cuyas crías nacen semidesarrolladas, completando su formación dentro del marsupio.

Se considera a los miembros del orden Didelphimorfia como mamíferos primitivos más antiguos que todavía habitan la tierra, esta incluye marsupiales de hábitos carnívoros u omnívoros.

Ocupan hábitats tanto terrestres, como arbóreos. El orden contienen solamente una familia (*Didelphidae*) con 63 especies, dentro de las cuales se encuentran *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana* y *Philander opossum*. Se encuentran distribuidos de manera natural, desde el sureste de Canadá, hasta aproximadamente la Patagonia (Gardner, 2005).. Pese a que la gran parte de estos marsupiales vive en ambientes húmedos como junglas y bosques templados, se pueden adaptar a prácticamente cualquier bioma, desde hábitats muy fríos hasta otros característicos por su aridez (Leria, 2013).

Los didélfidos tienen su mayor actividad nocturna; son generalistas en su dieta y oportunistas. Algunos cuando no encuentran su presa preferida como *Philander opossum*, pueden alimentarse de ranas y alguna otra presa acuática.

Las hembras tienen de 5 a 25 crías, el periodo de gestación dentro del útero es relativamente corto, y el desarrollo es largo, aun después de soltar la glándula de la madre, pueden seguir amantándose durante varias semanas, quedándose dentro de la madriguera mientras la madre sale en busca de alimento. Algunos alcanzan a reproducirse al menos 3 veces al año.

Flores (2007), reporta la reproducción precoz en algunas especies de didélfidos, en donde encuentran que jóvenes y sub adultos son sexualmente maduros de acuerdo a su dentición. El autor relaciona este suceso con una estrategia para maximizar el número de camadas durante la estación de mayor productividad. Teniendo como conclusión que hembras que habitan áreas con condiciones óptimas continuas a través del año, como es el caso de selvas de bajas latitudes, maximizan la capacidad reproductiva, no solo con un período reproductivo continuo sino con una madurez sexual precoz. Y menciona “la importancia de la correcta determinación de la edad reproductiva de las hembras y de las variaciones de los patrones reproductivos en diferentes ambientes, con el fin de analizar parámetros poblacionales esenciales en estudios ecológicos y de conservación.

Algunas de las especies más representativas que habitan en el territorio mexicano son el tlacuache común (*Didelphis marsupialis*), que es la especie mejor adaptada a la presencia humana y por tanto, presenta una mayor abundancia en comparación a otras especies. Otras especies presentes son: El tlacuache de cuatro ojos (*Philander opossum*), el tlacuache ratón (*Marmosa mexicana*), que es el más pequeño de la familia mexicana; el tlacuachillo acuático (*Chironectes minimus*), que habita cerca de corrientes o depósitos de agua y está adaptado para nadar, y el tlacuachillo dorado (*Caluremys derbianus*), también conocido como tlacuache platanero, porque su principal alimento son los plátanos y hace su madriguera con las hojas de esta planta.

Didelphis marsupialis (D. marsupialis)

El tlacuache común o zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*) es una especie de marsupial didelfimorfo propia del sureste de Norteamérica (sureste de México, América Central y el norte de Sudamérica (Perú, Bolivia y Brasil), puede estar desde el nivel del mar hasta unos 2000 msnm. Posee una coloración negra o gris, mejillas blancas, a amarillentas, nariz rosada y orejas largas, desnudas y de color negro y patas negras. Poseen una cola desnuda, negra y con la punta blanca, casi siempre, más grande que la parte negra, es larga, generalmente más larga que el cuerpo y cabeza. El macho es generalmente más grande que la hembra.



Didelphis marsupialis

Habitán en bosques primarios y secundarios, también en áreas cultivadas y zonas suburbanas y urbanas. *D. marsupialis* ha desarrollado la capacidad de poder convivir en el mismo lugar en donde habita el hombre, de ahí, el alto éxito de supervivencia que presentan. Se alimenta de pequeños vertebrados, invertebrados, frutas y de desechos orgánicos generados por el humano. Es solitario, arborícola y de hábitos nocturnos, pudiendo desplazarse grandes distancias y alimentarse en el suelo. En general son muy comunes, debido a su alta prolificidad. En México su distribución es desde algunos estados del Norte, y mucho más abundante en el sureste (Ceballos et al.,2006) (Figura 3)

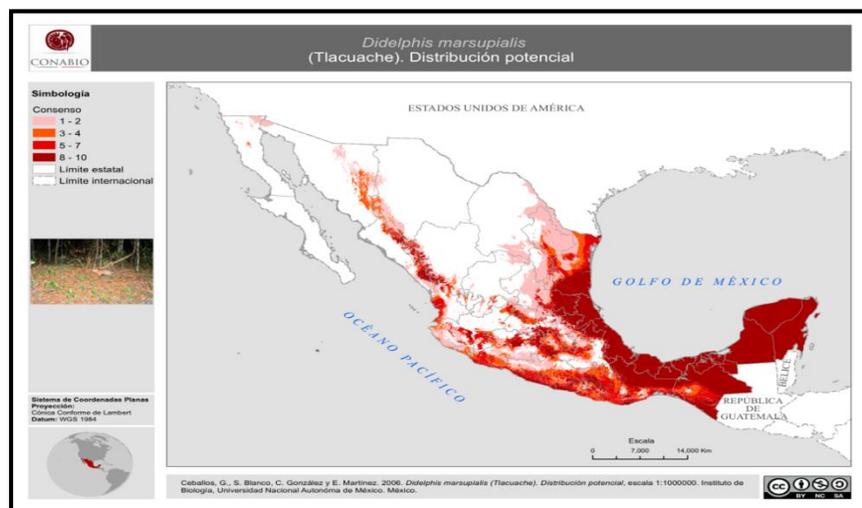


Figura 3: Distribución de la especie *Didelphis marsupialis* en México (Ceballos 2006)

Didelphis virginiana (D. virginiana)

Es de origen norteamericano, teniendo una distribución desde el sur de Canadá, hasta Costa Rica, pudiéndose encontrar desde el nivel del mar, hasta 3000 msnm. Es un marsupial relativamente grande (del tamaño de un gato doméstico), es muy parecido al *D. marsupialis*, en cuanto a morfología, hábitos y comportamiento. La característica que los distingue es que *D. virginiana* posee unas mejillas blancas que contrastan con el resto de la cabeza y con un pelaje denso, tiene una cola prensil larga y negra, desnuda y con escamas.



Didelphis virginiana

Comúnmente se desplaza y se alimenta en el suelo, su alimento consiste en cualquier cosa que sea digerible de origen animal y vegetal. La hembra puede llegar a tener de 2 a 3 camadas con 7 crías en promedio por año. Esta especie se encuentra distribuida por casi todos los estados de la República Mexicana, teniendo una gran distribución en muchos de los estados (Figura 4) (Ceballos et al., 2006)

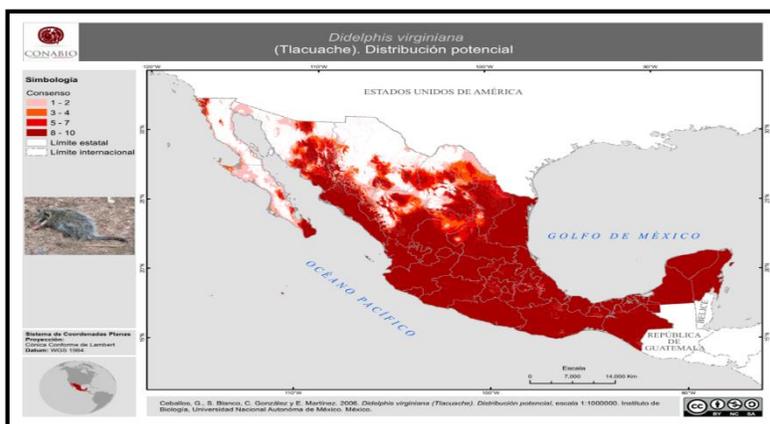


Figura 4. Distribución de la especie *Didelphis virginiana* en México

Philander opossum (P. opossum)

Se distribuye desde el centro-este de México, hasta Paraguay y el noroeste de Argentina, desde nivel del mar, hasta 1600 msnm. Posee una cola larga, desnuda, bicolor y prensil, parecida a los otros marsupiales del mismo género, con la diferencia que su pelaje que es más fino, sus patas son de color más claro y principalmente por un patrón de manchas blancas que tiene sobre los ojos, de ahí su nombre común tlacuache de cuatro ojos. La coloración que presentan los individuos juveniles es igual a la presenta por individuos adultos.



Philander opossum

Esta especie es común en diferentes tipos de bosque (deciduo, siempre verde, de crecimiento secundario) y de acuerdo a algunos reportes, se le puede encontrar en jardines o huertos (Reid 1997). Es una especie omnívora y se alimenta de invertebrados, vertebrados pequeños y consume una alta cantidad de frutos, dieta similar a la observada en las zarigüeyas del género *Didelphis* (Jackson 1994). puede llegar a cazar pequeños anfibios en el agua o cerca, pues posee una habilidad para nadar.

Es un marsupial terrestre y arborícola, y se le encuentra mayormente en lugares en donde el hábitat aún no ha sido alterado drásticamente, ni tan perturbado por la presencia humana, posiblemente debido a su preferencia por realizar sus madrigueras en perchas altas (8-10 mts de altura). Su distribución en México es más abundante en los estados del sur como Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Tabasco y Chiapas.

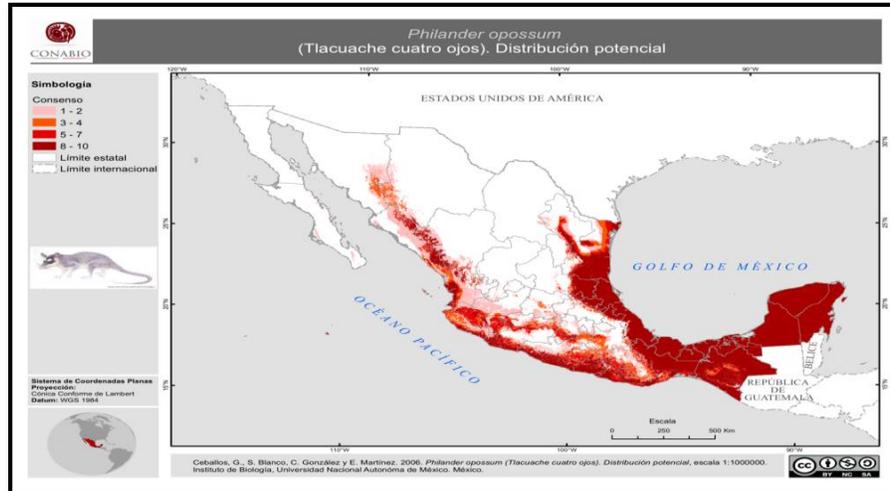


Figura 5. Distribución de la especie *Philander opossum* en México (Ceballos 2006)

DEPREDADORES

Los enemigos naturales del tlacuache son algunas aves de rapiña, especies de serpientes, los felinos que viven en las selvas tropicales y los cánidos, pero el tlacuache tiene un mecanismo de defensa antidepredatorio muy efectivo contra estos animales simulando su muerte; cuando ya no tiene escapatoria y se da cuenta de que el peligro es inminente, se tira sobre su cuerpo, pone los ojos en blanco, contrae los labios y cuelga la lengua como si en realidad estuviera muerto.

Cuadro 1. Características generales de las especies didélfidos

Especie	Peso en adultos (g)	Medidas promedio cm		Edad reproductiva (meses)	Estacionalidad reproductiva	Camadas por año	Intervalo entre camadas (días)	Crias por camada	Longevidad natural (años)
		Cola	largo						
<i>Didelphis marsupialis</i>	Hembra 1120g	37	80	6	estacional variable	1-3	110	2-9	2-6
	Macho 1120g			6-8					
<i>Didelphis virginiana</i>	Hembra 2350g	35.7	71.9	5	Estacional variable	1-3	110	6-9	2- 5
	Macho 2350g			/					
<i>Philander opossum</i>	Macho 263/1400g	35	69	6	Estacional variable	1-3	110	2-7	/
	Hembra 263/1400g			6					

RESERVA NATURAL EL ZAPOTAL

La reserva se encuentra ubicada dentro de los límites de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Cuenta con 113 Ha de distribución. Se localiza en la depresión central entre los 16° 45' de latitud norte y 93° 07' de latitud oeste. Colinda al oeste con Cerro Hueco y el resto está rodeado por vegetación secundaria y terrenos privados, en el municipio de Tuxtla Gutiérrez.

El clima que se presenta en esta pequeña zona es cálido subhúmedo, con lluvias en verano, sin una estación invernal bien marcada y con una larga temporada de secas de 4 a 5 meses del año; la altitud es de 630 msnm, con una precipitación media anual cercana a los 1000 mm, y temperatura de 24° C.



Figura 6. Reserva ecológica “el Zapotal”, 114 hectáreas de superficie total

En El Zapotal concurren dos tipos de vegetación relacionados: selva altas o medianas subperennifolias y subcaducifolias, que se caracterizan por mantener cierto verdor a causa de la conservación de su follaje, aun en los meses más secos del año, y por la altura media de sus árboles, que en general es de 20 a 25 metros, algunos pueden alcanzar los 30 m. con troncos que oscilan alrededor de 1 metro de diámetro, ejemplo de ello son: Zapote Negro (*Diospyros digyna*), Chicozapote (*Manilkara achras*), Zapote Colorado (*Pouteria sapota*), Mojú (*Brsimum alicastrum*), Chucamay (*Styrax argenteus*), Amates o Matapalos (*Ficus spp.*), entre otras especies características.

El segundo tipo de vegetación en la Reserva es la selva baja caducifolia, que es la más dominante en esta meseta; son frecuentes los Nangañales o aguacatonales (*Gymnopodium floribundum* var. *ntigonoides*), Higo (*Ficus cookii*), Cinco Negritos (*Comocladia englerinana*), Copal (*Bursera* spp.), Pomposhuti (*Cochlospermum vitifolium*), Brasil (*Haematoxylon brasiletto*).

Dentro de las 113 ha de la reserva se encuentra el Zoológico Miguel Alvarez del Toro (ZooMAT) que ocupa unas 30 hectáreas. El bosque restante funciona como una pequeña reserva en la que viven libres varias especies de animales tropicales, tales como el mono Saraguato Pardo (*Alouatta palliata*), Guaqueque Negro (*Dasyprocta mexicana*), Ocofaisan (*Crax rubra*), tlacuaches (*Didelphis virginiana*, *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum*), Pavita (*Openelope purpurascens*), iguanas (), armadillo (*Cabassous centralis*) mapache (*Procyon lotor*), ocelote (*Leopardus pardalis*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) entre otras muchas más.

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, su agente causal es un parasito protozooario flagelado denominado *Trypanosoma cruzi*, es transmitido por vectores hematófagos de la subfamilia Triatomina , aunque también existen otras formas de transmisión como la transfusional, transplacentaria, trasplantes de órganos, accidentes de laboratorio, vía oral y jeringas de drogadictos (Apt et al., 2008).

Actualmente en México no se cuenta con la información necesaria sobre estudios en mamíferos silvestres huéspedes de *Trypanosoma cruzi*, no teniendo la información necesaria para entender el papel que juegan estos hospederos dentro del ciclo de transmisión de esta enfermedad.

Varios trabajos han reportado la predominancia del linaje TClen México y recientemente se ha reportado la presencias de otros linajes en especies triatominas (TCII, TCIII, TCIV ,TCV),(Bosseno *et al.*, 2002; Ligonio, et.al.,2012) y Bosseno en el 2002 reporta la presencia de linaje

El estado de Chiapas se presenta de manera endémica la enfermedad, en donde convergen las 3 principales especies de mamíferos marsupiales (Philander oposum,

Didelphis marsupialis y *Didelphis virginiana*) conviviendo en sinatropía con las residencias humanas, siendo su presencia abundante en la región y al ser considerados de los reservorios más importantes del parásito jugando así un papel importante en la infección peridoméstica de la enfermedad representando así un problema de salud pública.

Es por esto que los datos generados en esta investigación aportara información sobre la dinámica de transmisión de los diferentes DTU's presentes en la reserva ecológica "el Zapotal" en la especies marsupiales, debido a su capacidad de actuar simultáneamente como reservorio y vector del *Trypanosoma*.

HIPÓTESIS

Existe la presencia de diferentes Unidades discretas de Tipificación (DTU's) de *Trypanosoma cruzi* en las especies marsupiales *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana* y *Philander opossum* presentes en la reserva ecológica "el Zapotal" , en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar lo DTU'S de aislados de *Trypanosoma cruzi* en las especies de marsupiales *Philander oposum*, *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginianus*. , por medio de la caracterización molecular

Objetivos específicos

1. Realizar el aislamiento de DNA de *Trypanosoma cruzi* en las diferentes especies de marsupiales.
2. Amplificar un fragmento de la secuencia del gen C-5 esterol desaturasa (TcSC5D) por técnica de PCR para identificación de *Trypanosoma cruzi* de los aislados de marsupiales.
3. Secuenciar los fragmentos obtenidos del fragmento del gen C-5 esterol desaturasa
4. Realizar análisis filogenético de las secuencias obtenidas y determinar la diversidad genética y genoapropiación de los aislados de marsupiales.

5. Determinar porcentajes de prevalencia puntual de *Trypanosoma cruzi* en las especies marsupiales presentes en la reserva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Para la obtención de las muestras para este trabajo, se realizó un muestreo dentro de la reserva ecológica “El Zapotal”, ubicada en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. El muestreo se llevó a cabo en un periodo comprendido de junio a septiembre del 2014.

Para seleccionar las zonas de muestreo, se hizo un marcaje de cuadrantes de acuerdo al mapa de la reserva establecido con un Sistema de Posicionamiento Global (GPS) de la reserva (Figura 7).

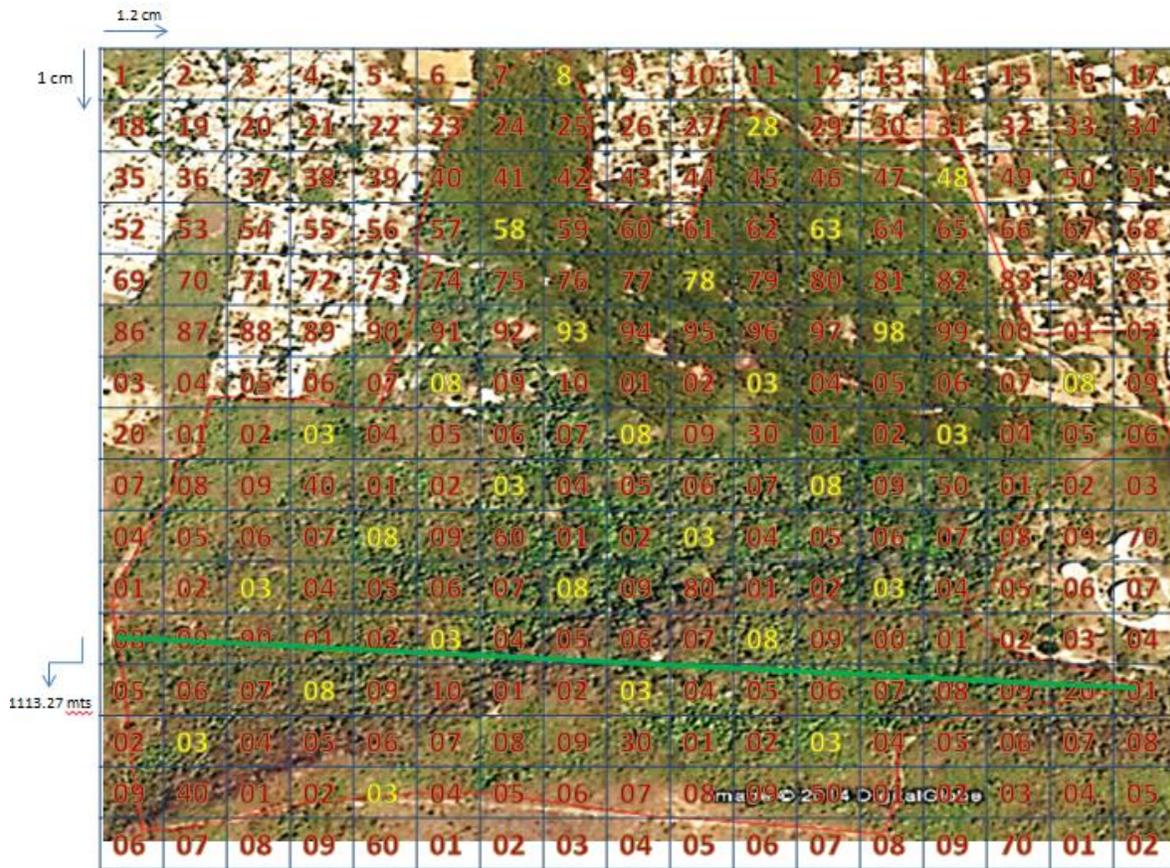


Figura 7. Distribución de los cuadrantes en el área de muestreo

Se determinó un total de 272 cuadrantes de 4289 m² cada uno. Se realizó un muestreo estratificado, seleccionando un total de 28 cuadrantes, utilizando una tabla de números aleatorios, abarcando el 10% de la superficie total de la reserva. Dentro de los cuadrantes, se realizó transectos lineales, respetando una distancia de 60 mts entre cada punto de colecta.

Los criterios de exclusión para el muestreo fueron:

- Animales menores a 200 gr de peso
- Cuadrantes que se encontraran en los bordes del área de muestreo

Se utilizaron trampas tipo Tomahamk para pequeños y medianos mamíferos. Se utilizó como cebo una mezcla de sardina/atún. Las trampas se colocaron por la tarde y se revisan por las mañanas.

Se determinaron las coordenadas de los sitios de captura de los marsupiales utilizando un GPS de mano (figura 8).

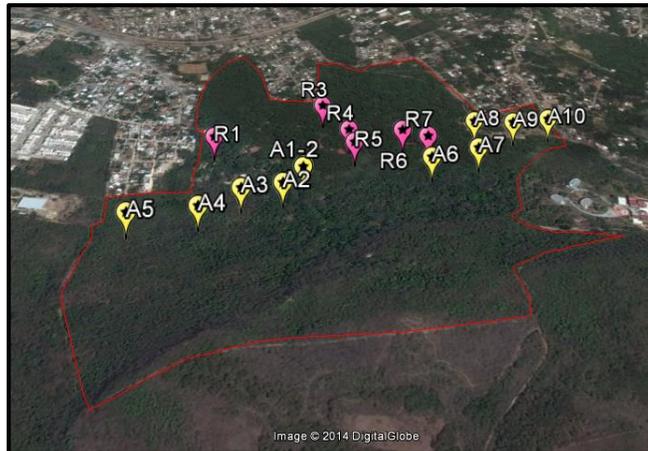
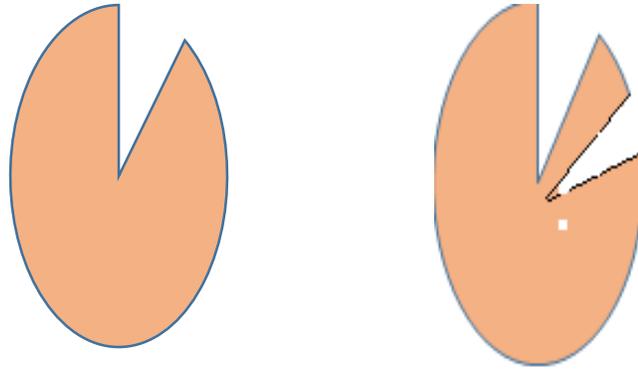


Figura 8. Mapa de ubicación de sitios de colecta por GPS

Los ejemplares capturados fueron identificados y clasificados taxonómicamente mediante estudios antropométricos y por identificación por pelo, registrando datos sobre peso, tamaño y sexo. Para las hembras capturadas, se determinó su condición reproductiva mediante la búsqueda de embriones dentro de la bolsa marsupial.

Para el marcaje de los marsupiales capturados de primera vez, se utilizó un patrón de muesqueo en la oreja derecha (Figura 9 a). Se realizó un manejo aséptico de la zona a identificar, utilizando yodo 50%, alcohol 70% como protocolo de asepsia y se utilizaron tijeras de disección para realizar el corte, aplicando un cicatrizante en aerosol para proteger la zona. Para la identificación de los ejemplares recapturados, se utilizó un patrón de doble muesqueo en oreja derecha (Figura 9 b).



(a)

(b)

Figura.9. Patrón de identificación de animales capturas por muesqueo

Se calculó la densidad media poblacional de las especies presentes en la reserva en base a la fórmula (Krebs,2009) :

$$\frac{\text{\#individuos colectados}}{\text{\# de cuadrantes muestreados}} = \text{\# individuos por cuadrante}$$

\# Individuos colectados = a los individuos capturados en los diferentes cuadrantes seleccionados.

\# de cuadrantes muestreados = los cuadrantes seleccionados dentro del área de muestreo por aleatoriedad.

Para calcular el porcentaje de prevalencia puntual del muestro, se aplicó la fórmula:

$$\text{Prevalencia Puntual} = \text{Ct} / \text{Nt}$$

Ct = número de casos existentes (prevalentes) en un momento o edad determinado.

Nt = número total de individuos en un momento determinado.

Toma de muestras

Las muestras consistieron en sangre completa con EDTA (Ácido Etildiaminotetracético) obtenidas mediante venopunción en vena caudal, utilizando un protocolo de limpieza de la zona con alcohol al 70%.

Se colectó una muestra de 1000 µl aproximadamente, estas se conservaron a -20°C hasta su uso en el presente trabajo.

Extracción de DNA

La extracción de DNA genómico se realizó con kit comercial illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit ®, siguiendo las especificaciones del fabricante y se visualizó en un gel de agarosa al .2% teñido con bromuro de etidio.

Amplificación del fragmento del gen mini exón

Para la amplificación se tomaron 2 µl de DNA total se utilizaron los primers reportados por Souto, *et,al* , 1996, TCI(5´GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC 3´) Y TCIR (5´CCCCCTCCCAGGCCACACTG 3´) se realizó un mix en un vial de 200 µl y se colocó 12.5 µl GoTaq® qPCR Master Mix, 31.5 µl agua libre de nucleasas, 2µl de primers, obteniendo un volumen final de 50µl de reacción. Para la PCR se ocuparon las siguientes condiciones de amplificación, desnaturalización 94°C, extensión 72 °C, y una alineación: 61.3 °C , con 30 ciclos.

Amplificación del fragmento del gen TcSC5D

Para la identificación de las DTU´s ,se ocuparon 5 µl del DNA genómico total para la PCR, para esta técnica se utilizaron los iniciadores TcSC5DF (5´-GGACGTGGCGTTTGATTTAT-3´), TcSC5DR (5´TCCCATCTTCTTCGTTGACT-3´) con un tamaño de 832pb reportados por Cosentino y col. en el año 2012 .

Para la PCR se colocaron en un vial de 200 µl los siguientes componentes: 25 µl de GoTaq Green Master Mix (Promega), 1 µl de cada uno de los iniciadores correspondientes y 18 µl de agua libre de nucleasas, con un volumen final de reacción de 50 µl.

Las condiciones de la PCR que se utilizaron fueron : desnaturalización a 94° por 4.5 min, un ciclado térmico de 35 ciclos a 94° durante 30 seg, seguido por 30 seg a 53.3°, seguido por 72° por 30 seg; terminando con una incubación de 5 min a 72°. Obtenidos los productos de PCR, fueron visualizados en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Purificación del producto de PCR

De los productos de PCR obtenidos, se hizo una purificación directa del amplicon, con un kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (promega). Siguiendo las especificaciones del fabricante. Esto con el fin de eliminar cualquier componente que pudiera interferir con la secuenciación

Secuenciación del producto de PCR

Se utilizaron 2 µl de cada uno de los purificados se utilizaron para la secuenciación automática, esta se realizó para la hebra sentido, como la antisentido.

Análisis filogenético

Para el análisis de las secuencias obtenidas, estas primero fueron comparadas en el programa Nucleotide BLAST , esto con el fin de comprobar si se trataban de secuencias correspondientes a *Trypanosoma cruzi* (anexo)

Se realizó una comparación múltiple de la secuencias con el programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation).

El Software Mega 6.06 se utilizó para el análisis, alineación y construcción de árboles filogenéticos de las secuencias, mediante cálculos de distancia por el método Maximum Likelihood, con el algoritmo de Tamura de tres parámetros y máxima verosimilitud, con un bootstrapping de 500 repetidos.

Con el fin de para calcular la correlación entre dos matrices de proximidad, se generó una matriz de identidad/similitud utilizando el software MatGAT (Matrix Global Alignment Tool) v2.01 (Campanella et al., 2003). Con las secuencias obtenidas, y una matriz de distancias geográficas con los puntos georreferenciados de captura. Se usó el software XLSTAT para determinar los patrones de aislamiento por distancia aplicando una prueba de Mantel.

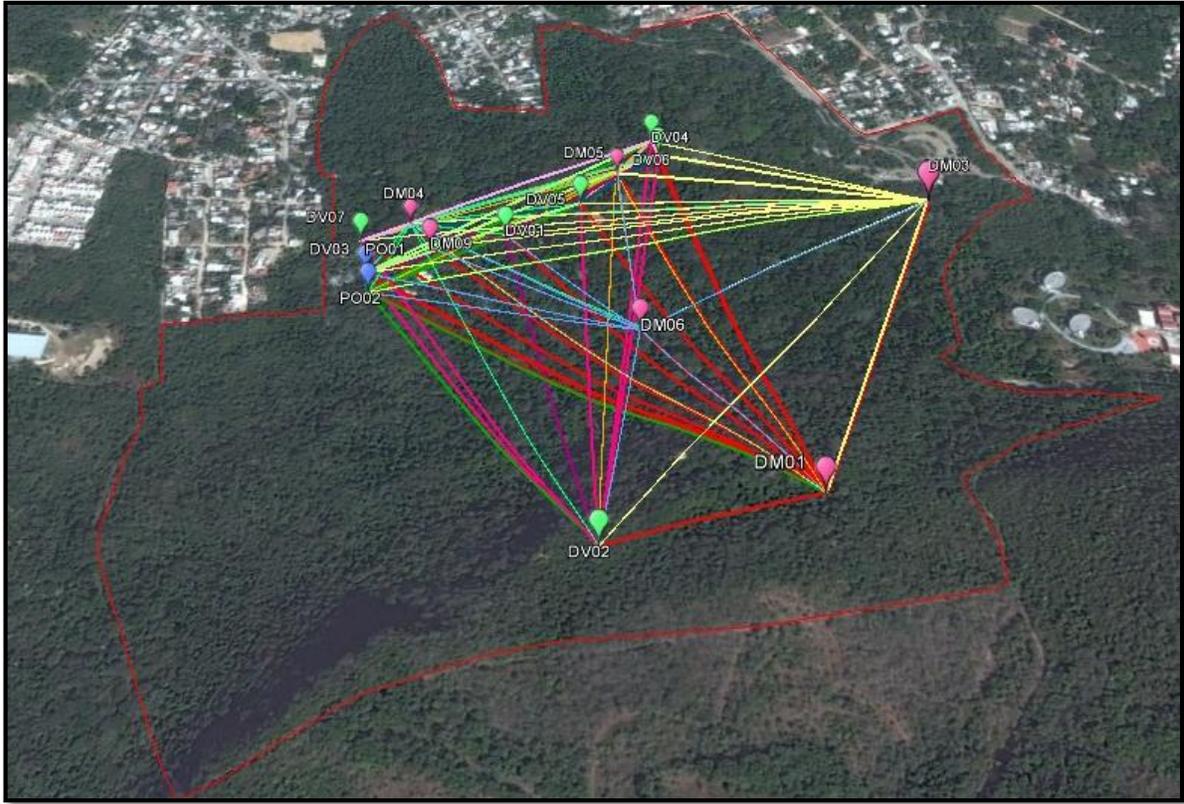


Figura 10 : distancias geográficas con los puntos georreferenciados de captura

RESULTADOS

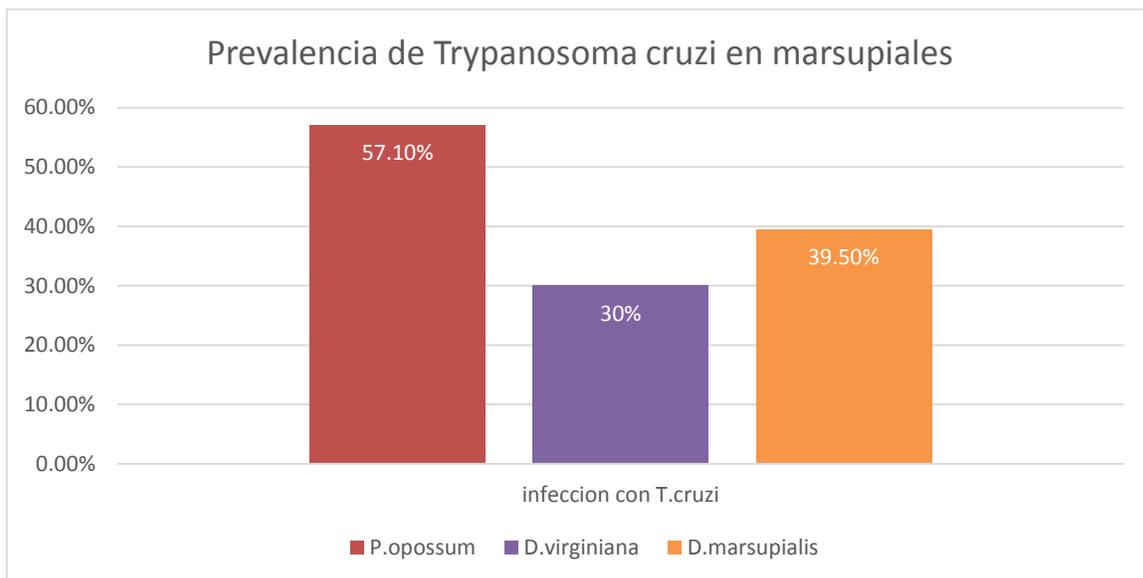
Muestreo

Durante el periodo de colecta, se colocaron un total de 1440 jaulas, obteniendo un total de 60 capturas de marsupiales, de los cuales 43 correspondían a la especie *Didelphis marsupialis*, 10 a la especie *Didelphis virginiana* y 7 a la especie *Philander opossum*.

Para el cálculo de densidad media se aplicó la fórmula de acuerdo a Krebs 2009. Obteniendo como resultado; .25 individuos /cuadrante para *Philander opossum*, 1.6 individuos/cuadrante para *Didelphis marsupialis* y .42 individuos/cuadrante. *Didelphis virginiana*.

Para el cálculo de la Prevalencia puntual de la enfermedad, se utilizaron las amplificaciones de gen mini exón, obteniendo una prevalencia estimada mayor para *Philander opossum* y menor para *Didelphis virginiana*.

Se obtuvo un 40% de prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en las especies marsupiales presentes en la reserva y porcentajes mayores al 50% en la especie *Philander opossum* (57.1%), un 39.5% para la especie *Didelphis marsupialis* y un 30% para la especie *Didelphis virginiana*



Grafica 1: Porcentajes de prevalencia de Trypanosoma cruzi por especie de marsupial en la reserva ecológica El Zapotal.

Extracción de DNA

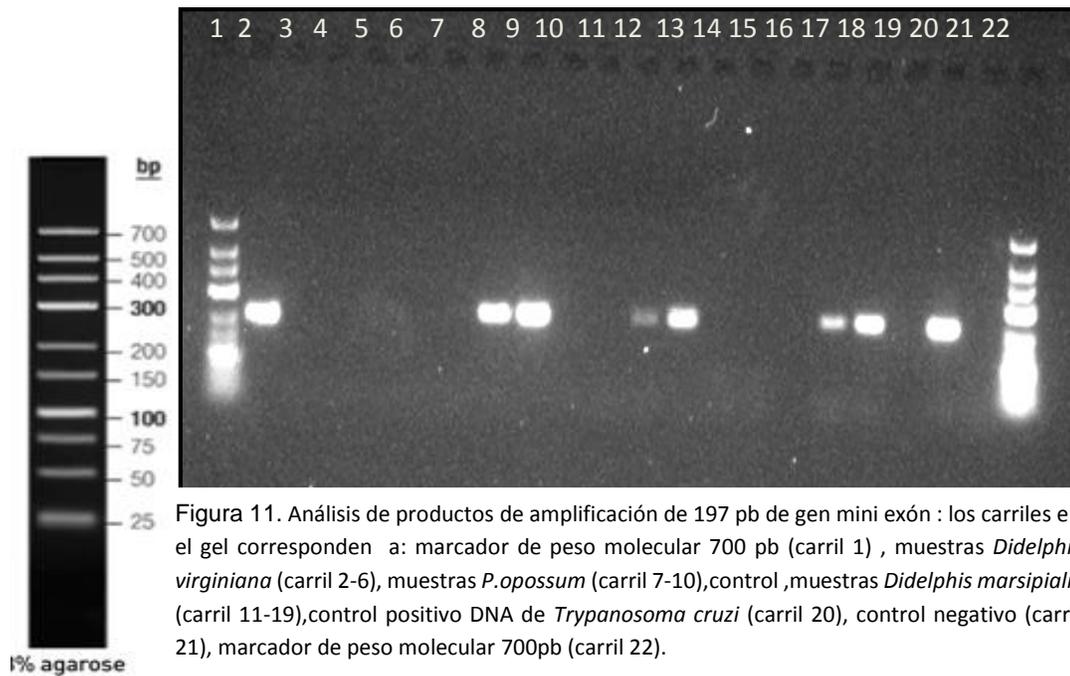
Las muestras recolectadas fueron identificadas de la siguiente manera:

DM: *Didelphis marsupialis*, PO: *Philander opossum*, DV: *Didelphis Virginiana*

Los productos obtenidos de la extracción de DNA de muestras sanguíneas, fueron visualizados en un gel de agarosa al .6%.

Amplificación del gen mini exón

Para la amplificación del gen mini exón se obtuvieron 4 amplificados para la especie *P.opossum*, 17 para *D.marsupialis*, y 3 para *D.Virginiana*.(Figura 11).



Amplificación del fragmento del gen TcSC5D

Se obtuvieron 16 amplificaciones del tamaño esperado (832pb), de las cuales 7 correspondían a la especie *Didelphis marsupialis*, 7 a la especie *Didelphis virginiana* y 2 a la especie *Philander opossum* a la se visualizaron en un gel de agarosa al .6% teñida con bromuro de etidio. (Figura 12).

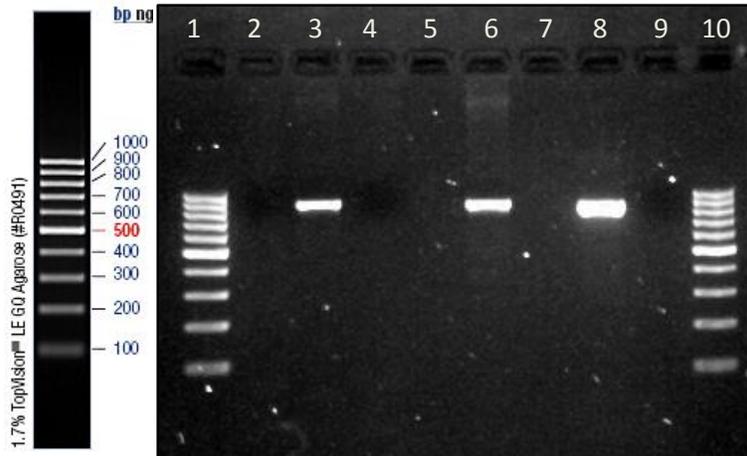
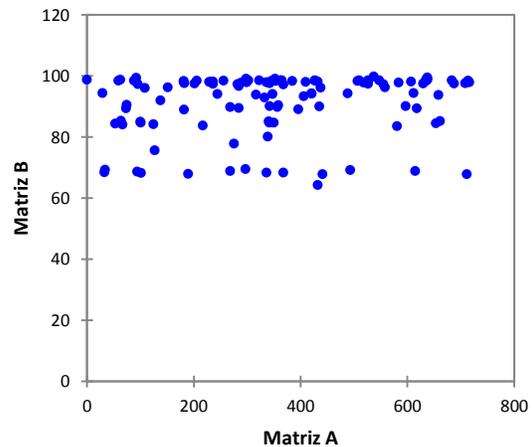
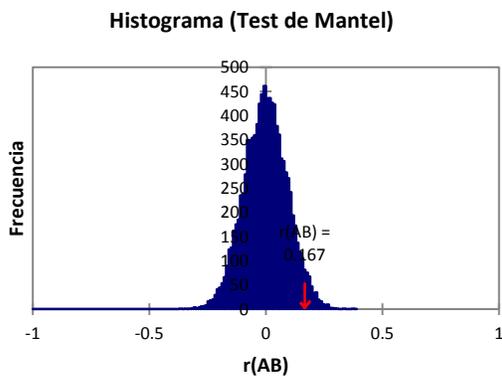


Figura 12: Análisis de productos de amplificación de 832pb de gen TcSC5D : los carriles en el gel corresponden a : marcador de peso molecular 1 Kb (carril 1) , DNA de *Trypanosoma cruzi* de *Didelphis marsupialis* (carril 2-6), control positivo DNA de *Trypanosoma cruzi* (carril 8), control negativo (carril 9), marcador de peso molecular 1Kb (carril 10).

Prueba de mantel para aislamiento por distancia

Para la prueba de mantel se utilizó una correlación de pearson con un nivel de significancia de 5%, obteniendo como resultado que las matrices no están correladas con la matriz de distancias geográficas con los puntos georreferenciados de captura.



Análisis filogenético

De la secuenciación de los fragmentos se obtuvo una secuencia de 800 pb para todas las 16 amplificaciones obtenidas. El árbol filogenético obtenido mediante Maximum Likelihood muestra un agrupamiento de las secuencias dentro del clado correspondiente a las secuencias del linaje TcI de *Trypanosoma cruzi* previamente reportadas por Cosentino en 2012, el cual forma un clado claramente separado al correspondiente a las cepas reportadas para los otros linajes (TcII-TcVI Y TcBat).

Los individuos identificados como DM01,DM02,DM03,DM06,DM09,DV01,DV02,DV03,DV04,DV05,DV06,DV07 Y PO01 se genoagruparon dentro del mismo clado, mientras que el individuo DM05 se agrupó dentro del mismo clado se mostró alejado solo un poco del resto. Los individuos DM04 y PO02 se genoagruparon en un clado apartado al resto de los demás individuos. (Figura 13).

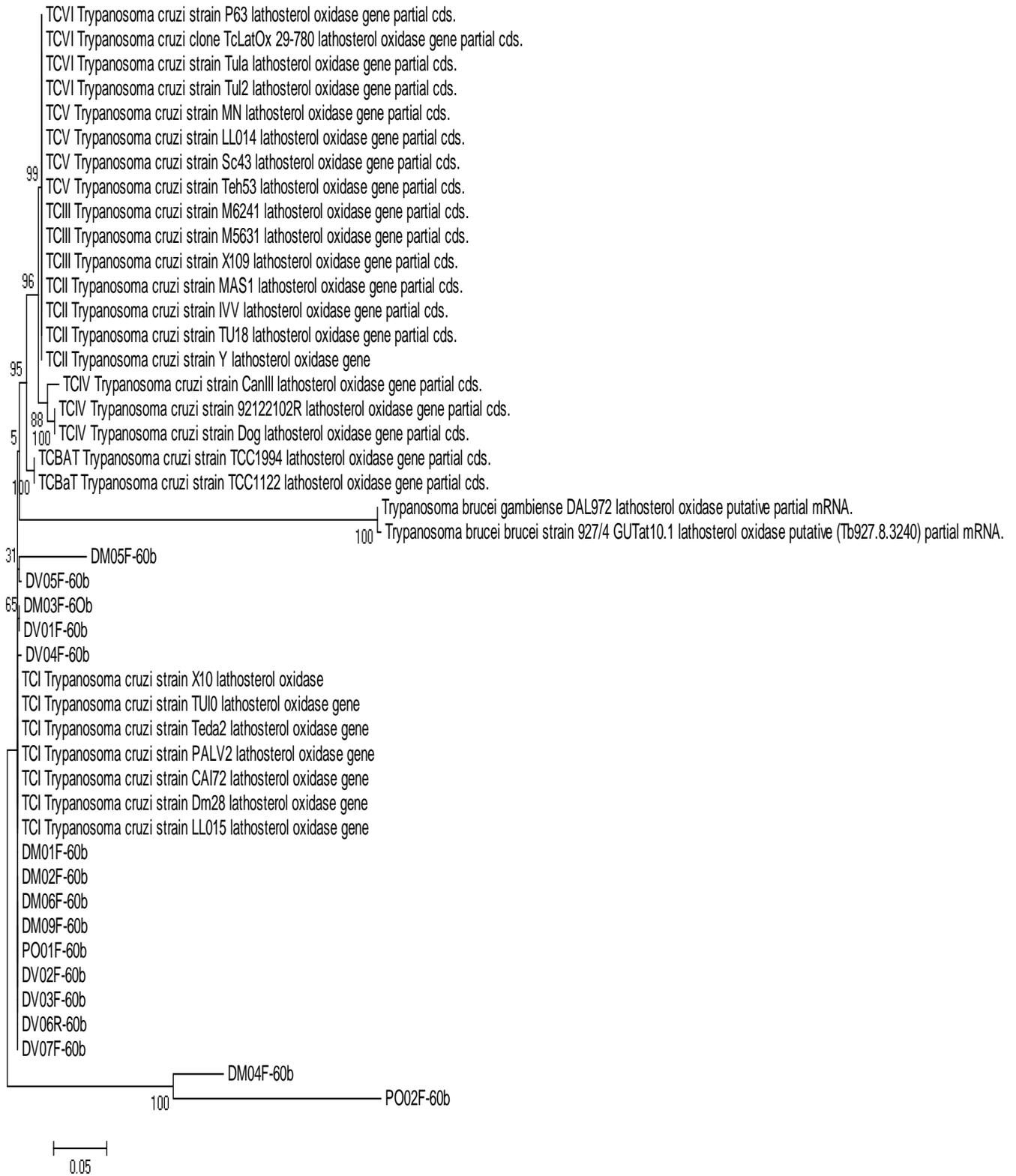


Figura 13: Árbol filogenético de las secuencias del gen TcSC5D de *Trypanosoma cruzi* en marsupiales. creado mediante mediante Maximum Likelihood con un bootstrapping de 500.

Se generó un segundo árbol filogenético en donde solo se incluyeron las secuencias obtenidas de los marsupiales, se observó una variación genética del *Trypanosoma* entre los diferentes aislados en las especies marsupiales, mostrando 2 clados en donde los individuos DM04F y PO02F se agrupan en clados separados al resto de los individuos, y un tercer clado en donde se agrupan el resto de los individuos se observa que el individuo DM05 se agrupa alejado del resto de los individuos (Figura 14). Pudiendo observar que esta diversidad no se encuentra asociada a las diferentes especies de marsupiales muestreadas.

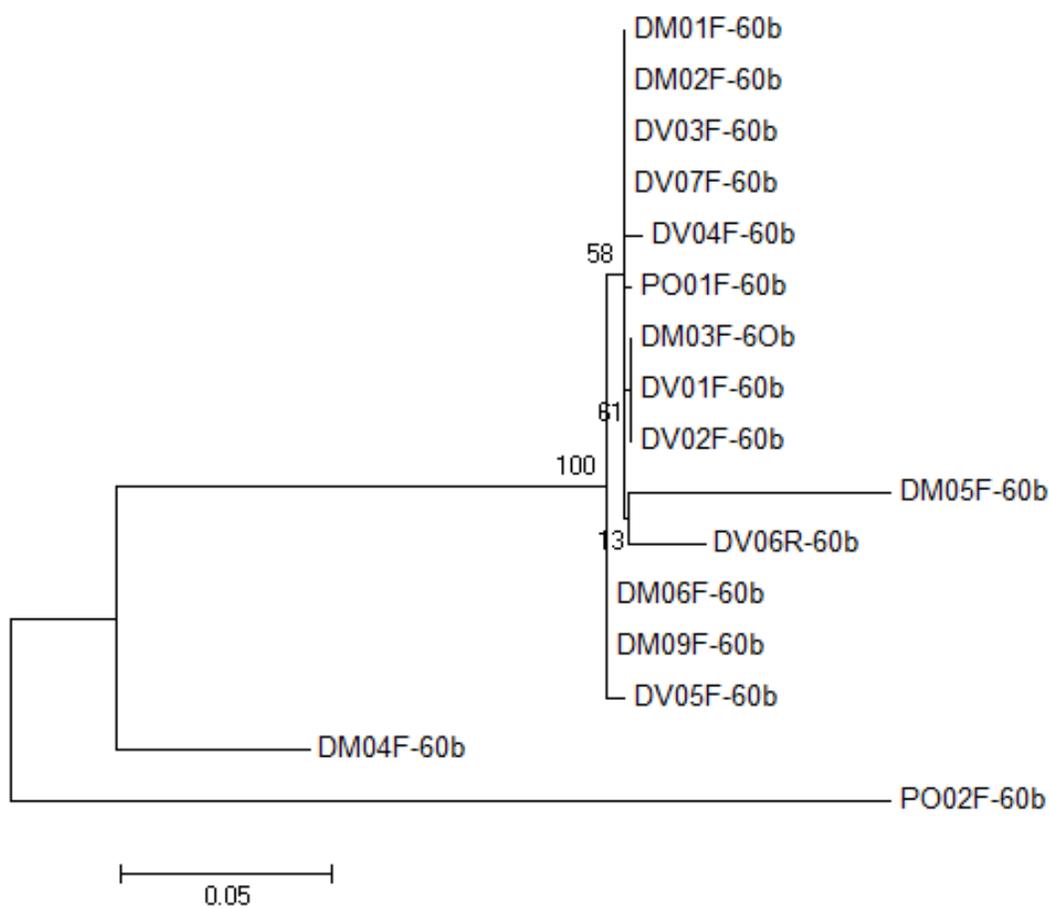


Figura 14: secuencias de Marsupiales, árbol filogenético creado mediante Maximum Likelihood con un bootstrapping de 500.

ENVIO DE ARTÍCULO CIENTIFICO

Como resultado de este trabajo se hizo envío de artículo científico a la revista BIOMEDICA COLOMBIA

Envíos activos

<http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/author/index>



[Inicio](#) [Acerca de](#) [Área personal](#) [Buscar](#) [Último número](#) [Números anteriores](#) [Avisos](#) [Publicación anticipada](#)

[Inicio](#) > [Usuario/a](#) > [Autor/a](#) > **Envíos activos**

Envíos activos

Activo/a [Archivar](#)

ID.	DD-MM ENVIAR	SECC	AUTORES/AS	TÍTULO	ESTADO
3220	01-12	ARTI	Borroto	IDENTIFICACIÓN DE LA PREVALENCIA PUNTUAL Y LOS LINAJES DE...	Asignación en espera

Elementos 1 - 1 de 1

Empezar un nuevo envío

[HAGA CLIC AQUÍ](#) para ir al primer paso del proceso de envío en cinco pasos.

Revista Biomédica
ISSN 0120-4157
Instituto Nacional de Salud
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Avenida Calle 26 No. 51-20
Apartado aéreo 80334 y 80080
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.
Teléfono: 05712207700 Ext. 1386
Correo electrónico: biomedica@ins.gov.co



Información para **AUTORES**



CONTENIDO DE LA REVISTA

Buscar

Ámbito de la búsqueda

Todo

Buscar

Examinar

- [Por número](#)
- [Por autor/a](#)
- [Por título](#)

IDIOMA

Seleccionar idioma

Español (España)

Entregar

NOTIFICACIONES

- [Vista](#)
- [Gestionar](#)

USUARIO/A

Ha iniciado sesión como...

esvieta

- [Mi perfil](#)
- [Cerrar sesión](#)

PALABRAS CLAVE

[Colombia](#) [Leishmania](#)
[Mycobacterium tuberculosis](#) [PCR](#)
[Plasmodium falciparum](#)
[Plasmodium vivax](#) [Triatominae](#)
[Trypanosoma cruzi](#) [dengue](#)
[diagnóstico](#) [enfermedad de](#)

Identificación de la prevalencia puntual y los linajes de *Trypanosoma cruzi* en marsupiales de la reserva el Zapotal en Chiapas.

Viridiana Camacho-Sierra¹, Juan Carlos Vázquez Chagoyán¹, Angel David Alvarado Diaz², Claudia Giovanna Peñuelas Rivas¹, Mirna Aguilar Faz¹ Esvieta Tenorio-Borroto¹, José Antonio Zepeda Escobar¹, José Esteban Aparicio Burgos¹, José Guillermo Estrada Franco^{1*}.

1. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados de Salud Animal, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México, México.

2. Laboratorio de Patología Clínica del Zoológico Miguel Álvarez del Toro, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Introducción. La determinación de la prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en marsupiales de una región determinada, permite tener una aproximación del riesgo que corren otras especies de mamíferos de ser infectadas por este parásito en dicha región. Por otro lado, dado que el genotipo de los parásitos ha sido asociado a la presentación de variaciones en la virulencia y patogenicidad del parásito, la identificación de los linajes de *T. cruzi* en los marsupiales de la región en estudio, contribuye a conocer los riesgos de salud que corren las especies susceptibles de ser infectadas con las cepas parasitarias circulantes.

Objetivo. Determinar la prevalencia puntual de *T. cruzi* en las especies de marsupiales presentes en la reserva ecológica El Zapotal e identificar los linajes del parásito circulantes en estos animales.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio estratificado dentro de la reserva ecológica “El Zapotal”, ubicada en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Se muestrearon 60 marsupiales en un período comprendido de junio a septiembre del 2014. Para determinar la prevalencia se utilizó el gen miniexón para amplificar una secuencia de 197 pb (ref). La identificación de los linajes se realizó amplificando un fragmento de 832pb del gen TcSC5D y se secuenció. El análisis de las secuencias se realizó con el Software Mega 6.06 mediante cálculos de distancia por el método Maximum Likelihood, con el algoritmo de Tamura de tres parámetros y máxima verosimilitud, con un bootstrapping de 500 repeticiones. Para calcular la correlación entre dos matrices de proximidad, se generó una matriz de identidad/similitud

utilizando el software MatGAT (Matrix Global Alignment Tool) v2.01 y se realizó un análisis de Mantel.

Resultados. La prevalencia puntual de infección por *T. cruzi* para el conjunto de los marsupiales presentes en El Zapotal, Tuxtla Gutiérrez en Chiapas, fue de 40%. La prevalencia fue mayor para *Philander oposum* (57.10%), seguido de *Didelphis marsupialis* (39.5%) y *Didelphis virginiana* (30%). Se determinó la presencia del Linaje TCI del *Trypanosoma cruzi* en 16 de los 60 marsupiales muestreados.

Conclusión. Existe circulación de *T. cruzi* del linaje 1 en tres especies de marsupiales habitantes de la reserva ecológica El Zapotal, con una prevalencia promedio del 40%.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, linajes, marsupiales, prevalencia,

Identification of the prevalence point and lineages of *Trypanosoma cruzi* in marsupial species booking the Zapotal animal reserve in Chiapas, Mexico.

Introduction. The identification of the *Trypanosoma cruzi* lineages can determine the degree of knowledge for reservoirs that transmit Chagas disease in Mexican population, as well as attitudes and practices that contribute to transmission.

Objective. Identify the lineages of *Trypanosoma cruzi* in opossums as transmitter reservoir of Chagas disease in Mexico.

Materials and methods. A study stratified within the ecological reserve "El Zapotal" located in Tuxtla Gutierrez city, Chiapas was made. 60 marsupials were sampled in period from June to September 2014. TcSC5D amplified gene fragment was performed with a size of 832pb and sequenced to determine the lineages of *Trypanosoma cruzi*. The analysis was performed in Mega Software version 6.06 by distance calculations using the Maximum Likelihood method, with three Tamura algorithm parameters and maximum likelihood, with 500 bootstrapping repeated. In order to calculate the correlation between two proximity matrices, a matrix of identity/similarity was generated using the MatGAT (Matrix Global Alignment Tool) software v2.01 and Mantel analysis was performed.

Results. The prevalence point for the disease was 40% for *Trypanosoma cruzi* in all marsupial species in Zapotal reserve of Tuxtla Gutierrez in Chiapas. The distribution of the prevalence of this parasite in 3 different species of marsupials are included. This was higher for *Philander opossum* with 57.10% and lower for *Virginia Opossum* with 30%. Lineage dominance demonstrated TCL *Trypanosoma cruzi* I identified 16 of 60 sampled marsupials using the TcSC5D gene with 800 bp.

Conclusion. *T. cruzi* circulation exists of the 1st lineage in three habitant marsupial species in the Zapotal ecological reserve with an average prevalence of 40%

The limited knowledge of *Trypanosoma cruzi* lineages in Mexico, its vector as marsupials and their interaction within the population of Tuxtla Gutierrez, ,prevention and control protocols should be accomplished in order to reduce the incidence of Chagas disease

Key words: *Trypanosoma cruzi*, marsupials, TcSC5D gene

Introduction

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una zoonosis producida por el parásito protozario flagelado denominado *Trypanosoma cruzi*, su principal vector es un insecto hematófago de la subfamilia Triatominae, principalmente los géneros *Rhodnius* (*R. prolixus*), *Triatoma* (*T. infestans*), y *Panstrongylus* (*P. megistus*). Se han reconocido alrededor de 40 especies capaces de transmitir la enfermedad, y que son importantes desde el punto de vista epidemiológico según la OMS (organización mundial de salud) en el reporte del 2015. Dentro del ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*, además del vector, intervienen diferentes hospederos dentro de los cuales se han reportado aproximadamente 200 especies o subespecies de mamíferos domésticos y de fauna silvestre y que desempeñan el papel de reservorios de la enfermedad. Muchas de estas especies, especialmente los roedores y los marsupiales (*Marsupialia*, *Didelphidae*), al ser animales sinantrópicos pueden involucrarse en el ciclo de transmisión de la enfermedad en los humanos, lo que hace a estas especies especialmente importantes en estudios epidemiológicos para el control de la enfermedad (3). Además de la transmisión vectorial, existen otras formas de transmisión como la transfusional, transplacentaria, trasplantes de órganos, accidentes de laboratorio, vía oral y jeringas infectadas (accidental) (1).

Chagas es una enfermedad crónica que puede ser mortal, y conduce a menudo a lesiones muy debilitantes del corazón y tracto intestinal. Está íntimamente relacionada al desarrollo socioeconómico de la población, colocándola como una de las enfermedades parasitarias principales del continente americano, representando uno de los problemas de salud pública más importantes de América Latina. Afecta cerca de 6 y 7 millones de personas y 28 millones en riesgo de infección, generando anualmente 12 mil muertes. Se ubica cómo la tercera enfermedad infecciosa de mayor importancia y se considera como una enfermedad endémica en 21 países de América Latina incluido México, desde el sur de EEUU (42°N) hasta el norte de la Patagonia (43°S), sin embargo, en algunos países como España, Italia, Portugal, etc, en donde la enfermedad no es endémica, la enfermedad de Chagas se considera una infección emergente debido al creciente número de inmigrantes procedentes de América Latina (2).

El *T. cruzi* tiene una elevada diversidad genética y ha sido clasificado en 6 unidades discretas de tipificación (DTU's) TcI-TcVI (7, 8). Estudios comparativos han permitido evaluar la asociación entre la diversidad genética y las propiedades biológicas del parásito, incluyendo el comportamiento en cultivos de células de mamíferos y axénicos, la transmisibilidad a través del insecto vector, la presentación clínica de la enfermedad, la patogenicidad, la virulencia y la sensibilidad a los fármacos in vitro (9-11).

Se ha referido la presencia de diferentes DTU's en los diferentes vectores y hospederos, siendo el linaje TcI el linaje predominante en los marsupiales, sin embargo se ha reportado la presencia de linajes TcII. En México se tienen antecedentes de predominancia del linaje TcI (12-15) aunque recientemente se ha encontrado la presencia de TcII, TcIII, TcIV, TcV en triatomos (16). En el caso de marsupiales, aun no existen estudios publicados a este respecto.

Aunque muchos estudios han identificado la presencia de otros linajes en las especies marsupiales (TcII-TcIV), existen varias hipótesis sobre la distribución de los grupos en las que se muestra que los reservorios que pertenecen a los ecotopos arbóreos pueden ser infectados por linajes TcI, TcII, TcIII y TcIV de *T. cruzi* mientras que en los ecotopos terrestres los marsupiales son infectados con linajes TcII y TcVI. (Ghul, 2013 REF, Ramirez et al., 2011). Hasta hace poco tiempo, el único linaje reportado en México era el

TCI, pero recientemente se han encontrado linajes del TCII al TCVI, todos ellos en triatomíneos, no así en infecciones de animales en los que solo se ha reportado el TCI.

La reserva ecológica El Zapotal, Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México, ofrece un ecosistema muy interesante porque en él, cohabitan tres especies de marsupiales, una arborícola (*Didelphis marsupialis*), una terrestre (*Didelphis virginiana*) y una que abarca ambos ecotopos (*Philander opossum*). Por lo que resultaría interesante investigar si todas ellas pudieran estar infectadas únicamente por *T. cruzi* del linaje TCI o si existen animales infectados con otros linajes y si estos pudieran estar asociados a las especies en cuestión. Algunas de estas especies conviven en sinantropía, siendo su presencia abundante en la región, juegan un papel importante en el ciclo peridoméstico de la infección, por lo que la determinación de la prevalencia parasitaria y la identificación de las DTU's circulantes de *Trypanosoma cruzi* en marsupiales de esta región es el propósito principal de este trabajo.

Material y Métodos

Área de estudio

El muestreo se llevó a cabo en un periodo comprendido de junio a septiembre del 2014. El área seleccionada para el muestreo fue la reserva ecológica "El Zapotal", ubicada en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Las coordenadas de los sitios de captura de los marsupiales se determinaron utilizando un GPS de mano (figura 1). La reserva se encuentra ubicada dentro de los límites de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Cuenta con 113 Ha de distribución. Se localiza en la depresión central entre los 16° 45' de latitud norte y 93° 07' de latitud oeste. Colinda al oeste con Cerro Hueco y el resto está rodeado por vegetación secundaria y terrenos privados, en el municipio de Tuxtla Gutiérrez. El clima es cálido subhúmedo, con lluvias en verano, sin una estación invernal bien marcada y con una larga temporada de secas de 4 a 5 meses del año; la altitud es de 630 msnm, con una precipitación media anual cercana a los 1000 mm, y temperatura de 24° C.

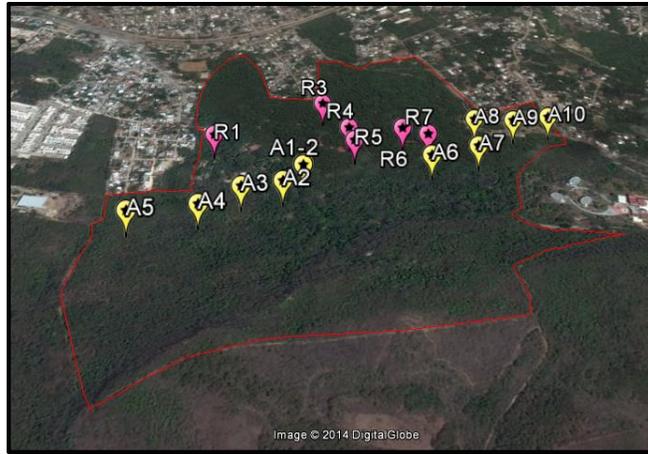


Figura 1. Mapa de ubicación de los sitios de colecta por GPS

Diseño del muestreo

Las zonas de muestreo se seleccionaron a través de un marcaje de cuadrantes de acuerdo al mapa de la reserva establecido con un Sistema de Posicionamiento Global (GPS) de la reserva (Figura2).

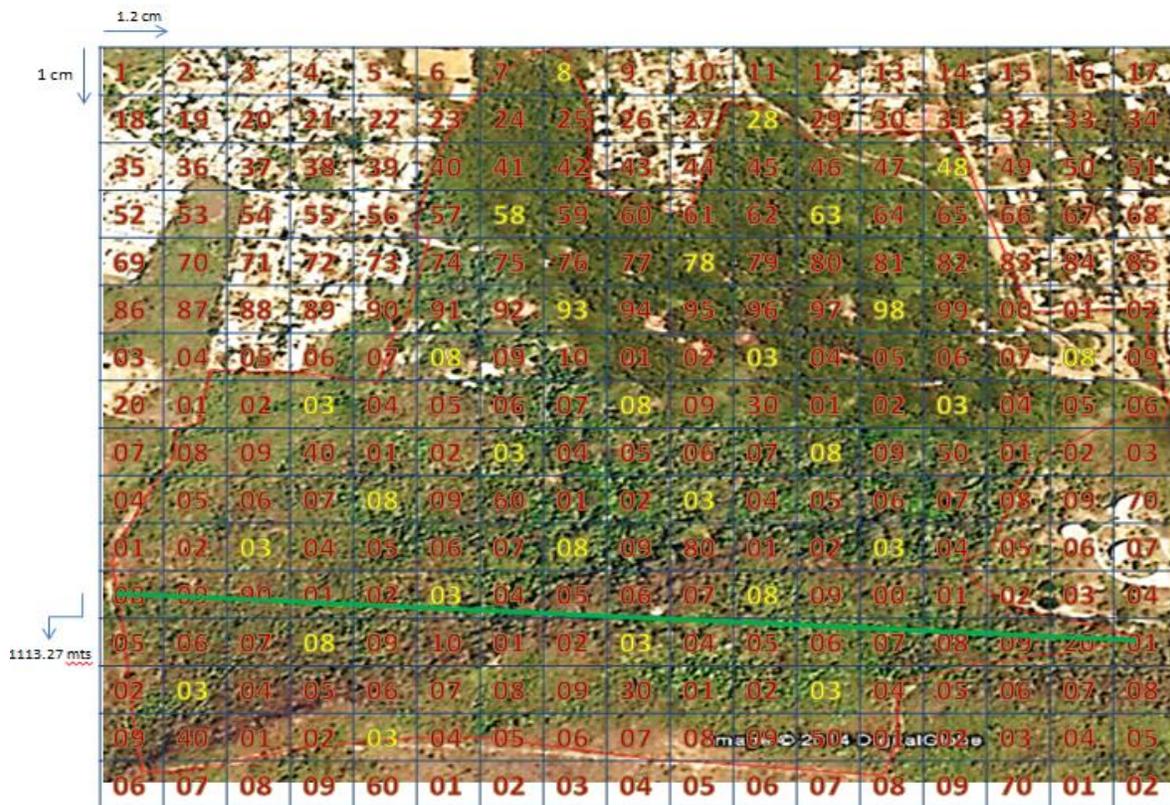


Figura 2. Distribución de los cuadrantes en el área de muestreo

Se determinó un total de 272 cuadrantes de 4289 m² cada uno. Se realizó un muestreo estratificado, seleccionando un total de 28 cuadrantes, utilizando una tabla de números aleatorios, abarcando el 10% de la superficie total de la reserva. Dentro de los cuadrantes, se realizó transectos lineales, respetando una distancia de 60 mts entre cada punto de colecta.

Tamaño de muestra.

El muestreo para la obtención del ADN del *Trypanosoma cruzi* en 60 marsupiales se realizó a conveniencia. Los criterios de exclusión para el muestreo fueron:

- Animales menores a 200 gr de peso
- Cuadrantes que se encontrarán en los bordes del área de muestreo

Los marsupiales fueron capturados en trampas tipo Tomahamk para pequeños y medianos mamíferos colocadas en la tarde y revisadas en la mañana. Añadiendo como cebo una mezcla de sardina/atún. Los ejemplares capturados fueron identificados y clasificados taxonómicamente mediante estudios antropométricos e identificación del pelo. Las variables registradas fueron peso, tamaño y sexo. A las hembras capturadas, se les determinó su condición reproductiva mediante la búsqueda de embriones dentro de la bolsa marsupial.

Para el marcaje de los animales capturados de primera vez, se utilizó un patrón de muescas en la oreja derecha (Figura 3 a). Se realizó un manejo aséptico de la zona a identificar, utilizando iodo 50%, alcohol 70% como protocolo de asepsia y se utilizaron tijeras de disección para realizar el corte, aplicando un cicatrizante en aerosol para proteger la zona.

Para la identificación de los ejemplares recapturados, se utilizó un patrón de doble muescas en oreja derecha (Figura 3 b).

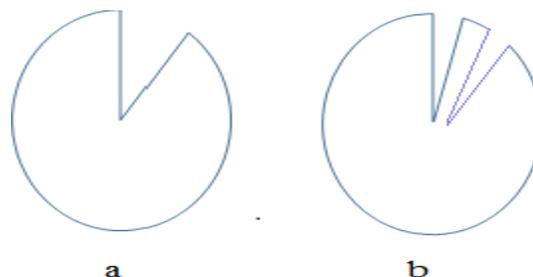


Figura.3. Patrón de identificación de animales capturas por muesqueo

Análisis de la Densidad Poblacional

Se calculó la densidad media poblacional de las especies presentes en la reserva en base a la fórmula de Krebs et al 2009.

#individuos colectados/ # de cuadrantes muestreados = # individuos por cuadrante

Individuos colectados = a los individuos capturados en los diferentes cuadrantes seleccionados.

De cuadrantes muestreados = los cuadrantes seleccionados dentro del área de muestreo por aleatoriedad.

Para calcular el porcentaje de prevalencia puntual del muestro, se aplicó la fórmula:

Prevalencia Puntual = C_t / N_t

C_t = número de casos existentes (prevalentes) en un momento o edad determinado.

N_t = número total de individuos en un momento determinado.

Toma de muestras

Las muestras consistieron en 1000 μ l de sangre completa con EDTA (Ácido Etildiaminotetracético) obtenidas mediante venopunción en vena caudal, utilizando un protocolo de limpieza de la zona con alcohol al 70%. Estas se conservaron a -20°C.

Extracción de DNA

Se realizó con kit comercial illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit ®, siguiendo las especificaciones del fabricante y se visualizó en un gel de agarosa al .2% teñido con bromuro de etidio.

Amplificación del fragmento del gen mini exón

Se tomaron 2 μ l de DNA total y los primers reportados por Souto en el 1996, TCI (5'GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC 3') (ref)

Y TCIR (5'CCCCCTCCCAGGCCACACTG 3') se realizó un mix en un vial de 200 µl y se colocó 12.5 µl GoTaq® qPCR Master Mix, 31.5 µl agua libre de nucleasas, 2µl de primers, obteniendo un volumen final de 50µl de reacción. Para la PCR se ocuparon las siguientes condiciones de amplificación, desnaturalización 94°C, extensión 72°C, y una alineación : 61.3°C, con 30 ciclos.

Amplificación del fragmento del gen TcSC5D

Se tomaron 5 µl del DNA y los iniciadores TcSC5DF (5'-GGACGTGGCGTTTGATTTAT-3'), TcSC5DR (5'TCCCATCTTCTTCGTTGACT-3') con un tamaño de 832pb reportados por Cosentino y col. en el año 2012.

Se colocaron 200 µl de los siguientes componentes: 25 µl de GoTaq Green Master Mix (Promega), 1 µl de cada uno de los iniciadores correspondientes y 18 µl de agua libre de nucleasas, con un volumen final de reacción de 50 µl.

Las desnaturalización fue a 94° por 4.5 min, un ciclado térmico de 35 ciclos a 94°C durante 30 seg, seguido por 30 seg a 53.3°C, seguido por 72°C por 30 seg; terminando con una incubación de 5 min a 72°C. Se empleo gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Purificación del producto de PCR y secuenciación

Se realizó una purificación directa del amplicón, con un kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (promega). Siguiendo las especificaciones del fabricante. Esto con el fin de eliminar cualquier componente que pudiera interferir con la secuenciación. Se enviaron para su secuenciación (sentido y contrasentido) en la empresa GenScript 2 µl de cada uno de los purificados.

Análisis de datos

Se emplea el software Nucleotide BLAST, para la verificación de las secuencias de *Trypanosoma cruzi*. Además de una comparación múltiple de las secuencias MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation). Para el análisis, alineación y construcción de árboles filogenéticos de las secuencias, se empleo el Software Mega 6.06 aplicando el método Maximum Likelihood, con el algoritmo de Tamura de tres parámetros y máxima verosimilitud, con un bootstrapping de 500 repeticiones. Se generó una matriz de datos para ser usada en el software Network para crear las redes filogenéticas y calcular la correlación entre dos matrices de proximidad, se generó una matriz de identidad/similitud

utilizando el software MatGAT (Matrix Global Alignment Tool) v2.01 (Campanella et al., 2003). Con las secuencias obtenidas, y una matriz de distancias geográficas con los puntos georreferenciados de captura (figura 4). Se usó el software XLSTAT para determinar los patrones de aislamiento por distancia aplicando una prueba de Mantel.

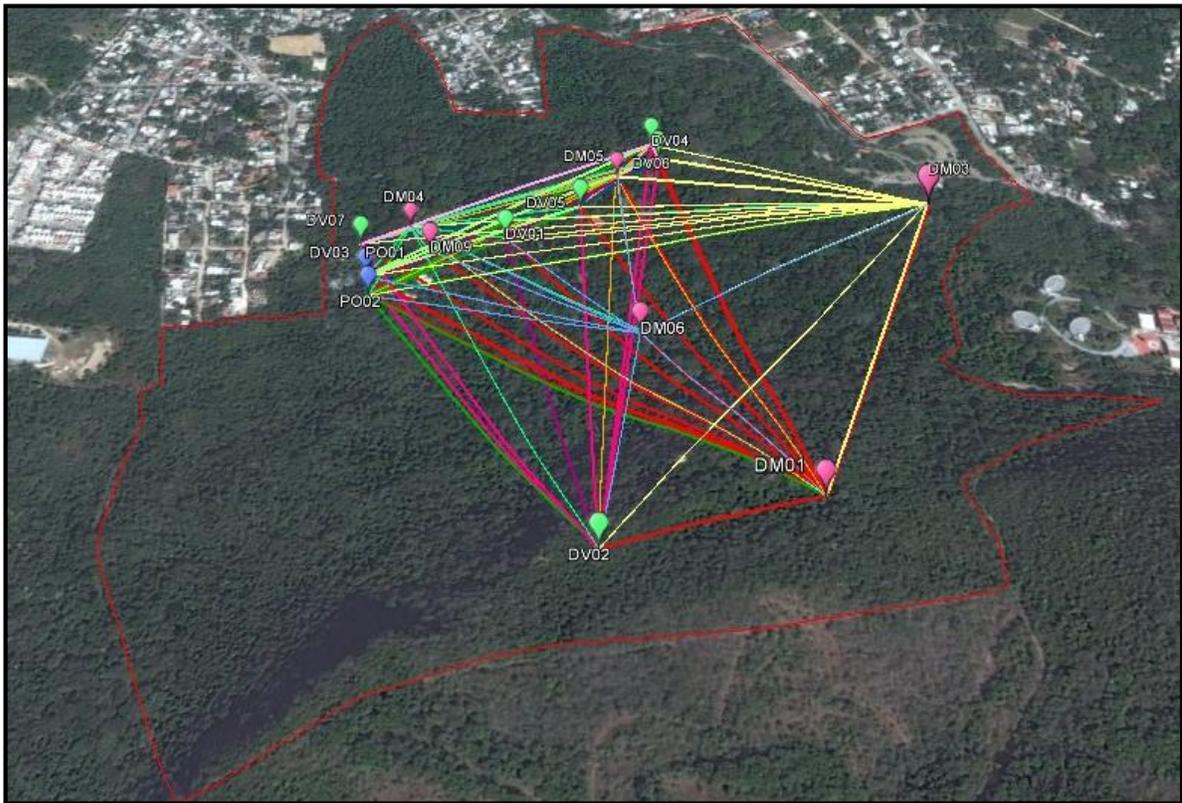


Figura 4: Matriz de distancias geográficas con los puntos georreferenciados de captura

Resultados

Durante el periodo de junio a septiembre del 2014, se colocaron un total de 1440 jaulas, obteniendo un total de 60 capturas de marsupiales, de los cuales 43 correspondían a la especie *Didelphis marsupialis*, 10 a la especie *Didelphis virginiana* y 7 a la especie *Philander opossum*. Se calculó la densidad media 0.25 individuos /cuadrante para *Philander opossum*, 1.6 individuos/cuadrante para *Didelphis marsupialis* y 0.42 individuos/cuadrante. *Didelphis virginiana*

Por otra parte como resultado significativo se determinó la prevalencia puntual para la enfermedad que fue de 40% de *Trypanosoma cruzi* para las tres especies marsupiales

presentes en la reserva en su conjunto. En la figura 5 se muestra la distribución de la prevalencia del este parásito en las 3 especies de marsupiales. Esta fue mayor para *Philander oposum* con un 57.10% y menor para *Didelphis virginiana* con un 30%

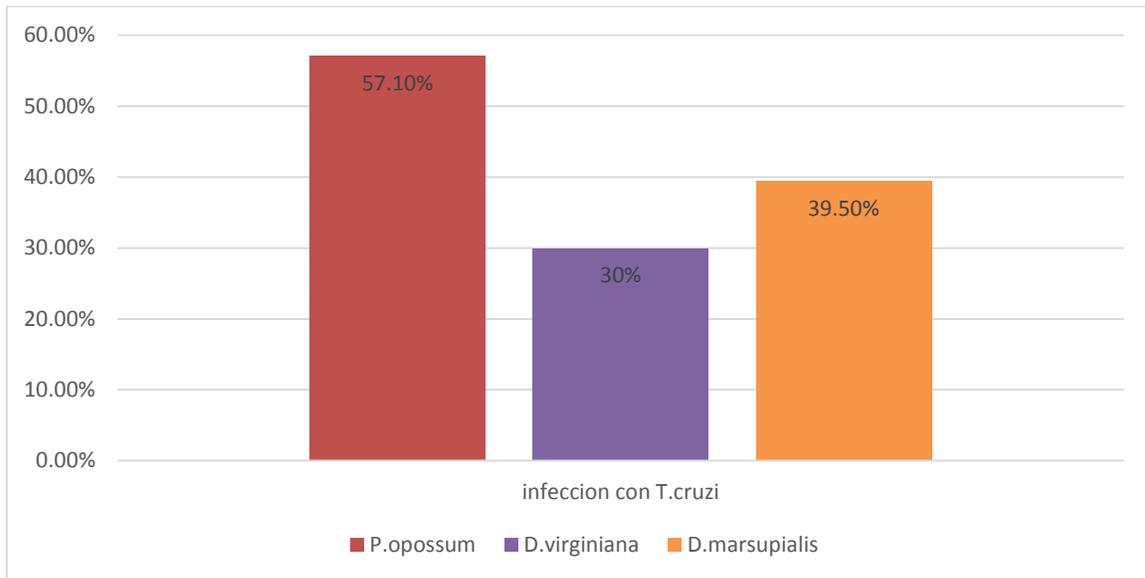


Figura 5 Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en varias especies de marsupiales de la reserva el Zapotal. Chiapas

En la figura 6 se muestra la amplificación de *Trypanosoma cruzi* empleando el mini exón en tres especies de marsupiales DM: *Didelphis marsupialis*, PO: *Philander oposum*, DV: *Didelphis Virginiana* el cual fue empleado para el calculo de la prevalencia.

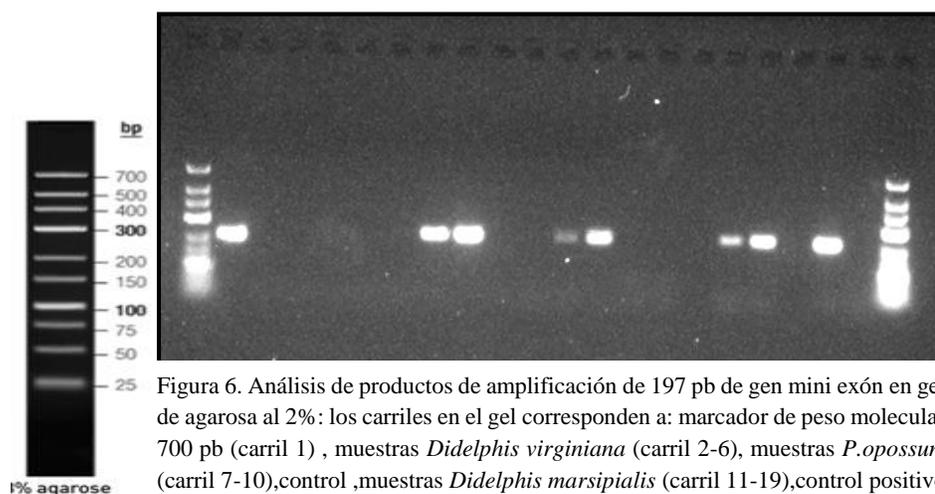


Figura 6. Análisis de productos de amplificación de 197 pb de gen mini exón en gel de agarosa al 2%: los carriles en el gel corresponden a: marcador de peso molecular 700 pb (carril 1) , muestras *Didelphis virginiana* (carril 2-6), muestras *P. oposum* (carril 7-10), control ,muestras *Didelphis marsupialis* (carril 11-19), control positivo DNA de *Trypanosoma cruzi* (carril 20), control negativo (carril 21), marcador de peso molecular 700pb (carril 22).

La figura 7 muestra ampliaciones del tamaño esperado (832pb), del fragmento del gen TcSC5D de las cuales, 7 correspondían a la especie *Didelphis marsupialis*, 7 a la especie *Didelphis virginiana* y 2 a la especie *Philander opossum* y se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio.

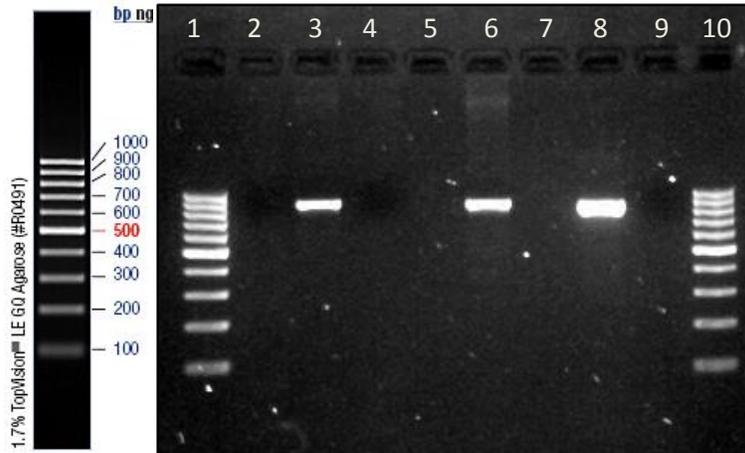


Figura 7: Análisis de productos de amplificación de 832pb de gen TcSC5D en gel de agarosa al 1.6% : los carriles en el gel corresponden a : marcador de peso molecular 1 Kb (carril 1) , DNA de *Trypanosoma cruzi* de *Didelphis marsupialis* (carril 2-6), control positivo DNA de *Trypanosoma cruzi* (carril 8), control negativo (carril 9), marcador de peso molecular 1Kb (carril 10).

De los fragmentos se obtuvo una secuencia de 800 pb para todas las 16 ampliaciones obtenidas. El árbol filogenético (figura 8) obtenido mediante Maximum Likelihood muestra un agrupamiento de las secuencias dentro del clado correspondiente a las secuencias del linaje TCI de *Trypanosoma cruzi* previamente reportadas por Cosentino en 2012, el cual forma un clado claramente separado al correspondiente a las cepas reportadas para los otros linajes (TCII-TCVI Y TcBat).

Los individuos identificados como DM01, DM02, DM03, DM06, DM09, DV01, DV02, DV03, DV04, DV05, DV06, DV07 Y PO01 se genoagruparon dentro del mismo clado, mientras que el individuo DM05 que aunque se agrupo dentro del mismo clado, se mostró alejado solo un poco del resto. Los individuos DM04 y PO02 se genoagruparon en un clado apartado al resto de los individuos.

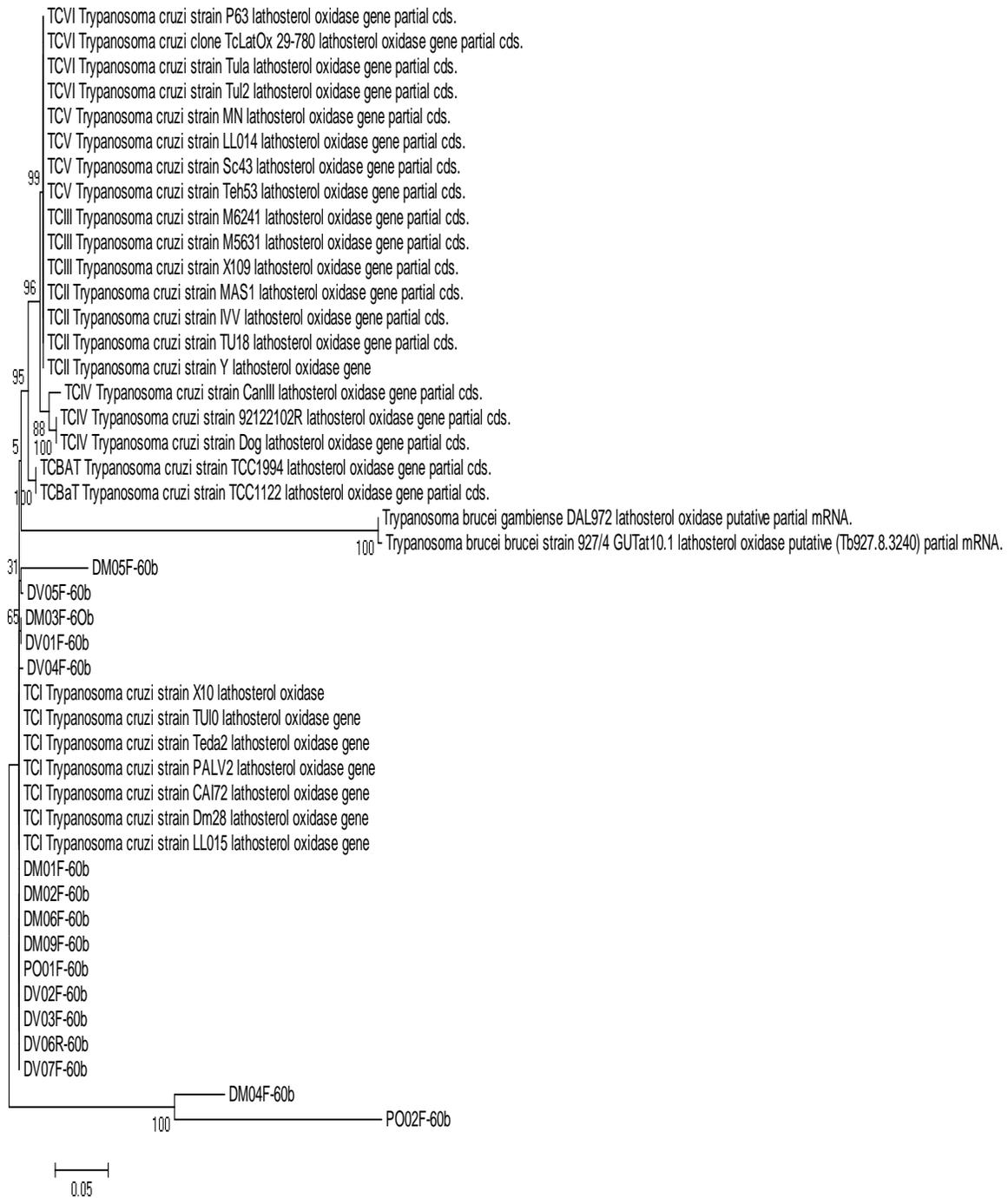


Figura 8: Árbol filogenético de las secuencias del gen TcSC5D de *Trypanosoma cruzi* en marsupiales, creado mediante mediante Maximum Likelihood con un bootstrapping de 500.

En la figura 9 se muestra un segundo árbol filogenético en donde solo se incluyeron las secuencias obtenidas de los marsupiales, mostrando 2 clados en donde los individuos DM04F y PO02F se agrupan en clados separados al resto de los individuos, y un tercer clado en donde se agrupan el resto de los individuos. Hay que destacar que el individuo DM05 se agrupa alejado del resto de los individuos

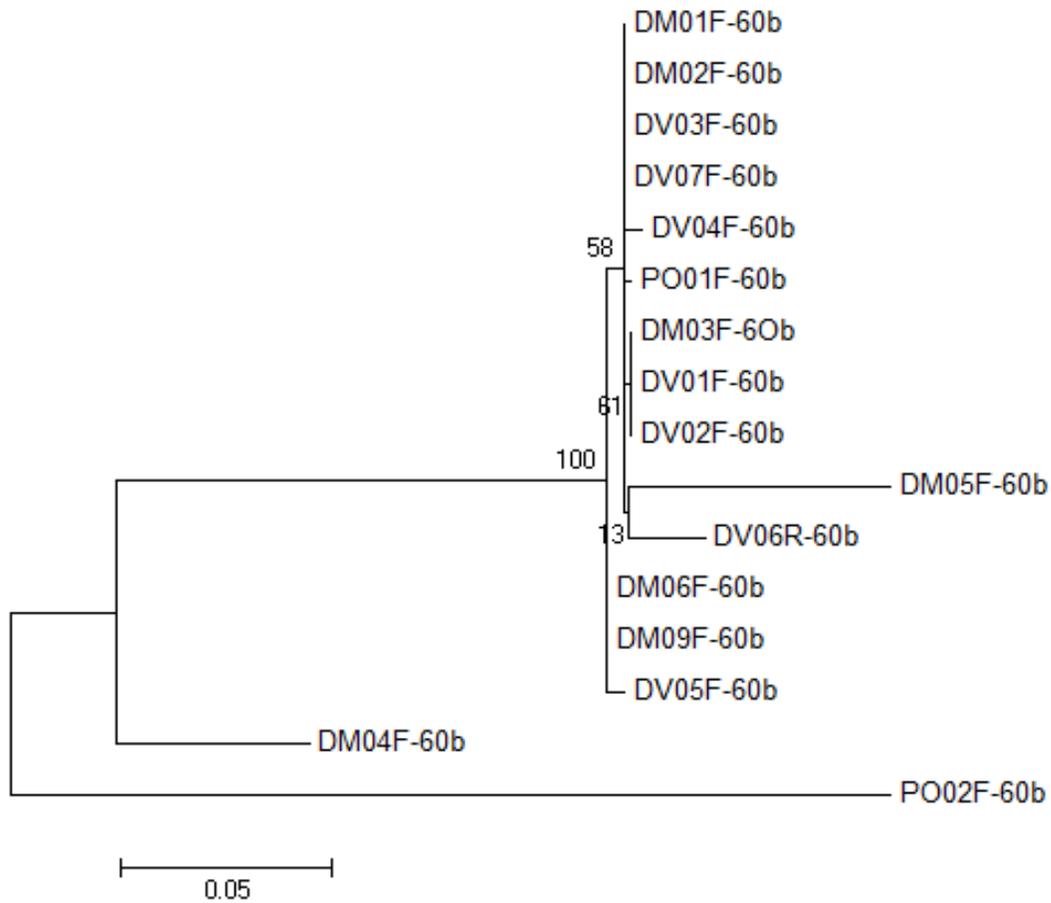


Figura 9: Secuencias de Marsupiales árbol filogenético creado mediante Maximum Likelihood con un bootstrapping de 500.

Discusión

Uno de los principales hallazgos del estudio fue en cuanto a los indicadores de prevalencia puntual para el reservorio marsupiales en México. Se determinó una prevalencia del 40% para el total de las especies de marsupiales presentes en la reserva. Además se determinó la prevalencia del este parásito en las tres especies de marsupiales. Esta fue mayor para *Philander oposum* con un 57.10% y menor para *Didelphis virginiana* con un 30%. Esto coincide con los estudios realizados en Yucatán donde se reporta una prevalencia de 53.9% para *Didelphis virginiana*. En reportes realizados sobre la prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en sueros de humanos se reporta un total de 5.88% en 288,684 casos, particularmente en Chiapas se reportó una prevalencia del 12.75% una de las más altas del país, aunque en relación con la reportada en nuestro trabajo para marsupiales es mucho menor (4). México es un país con una enorme variedad climática y gran biodiversidad, proporcionando una oportunidad para el desarrollo de agentes etiológicos de todo tipo, *T. cruzi* y no es una excepción.

Según los informes de los 15 estados en México, hay dos grandes reservorios de la fauna salvaje (principalmente sinantrópicas), tres especies de zarigüeyas (*Didelphis virginiana*, *D. marsupialis*, y *Philander oposum*); y uno interno, el perro (*Canis familiaris*). Recientemente se realizaron reportes de la prevalencia de *Didelphis virginiana* en Yucatán (17-19).

Las condiciones socioeconómicas en muchas partes del país son susceptibles de transmisión natural. Varios autores han publicado estudios que han sugerido aspectos sociológicos y antropológicos que no se tienen en cuenta en la prevención de la infección por *T. cruzi* y la enfermedad de Chagas. (20, 21). Esto es válido para México si tenemos en cuenta que nuestro estudio se realizó en Chiapas uno de los estados más pobres del país.

Se realizó un estudio de los linajes de *T. cruzi* en los marsupiales donde el TCI fue el único linaje encontrado. Este es el linaje con mayor distribución, encontrándose desde el sur de EEUU hasta el centro de Argentina, Chile y México.(3).

Con base en estudios filogenéticos se creó un modelo evolutivo de los diferentes linajes donde se sugiere que TcI y TcII son linajes ancestrales y los demás producto de hibridaciones entre estos linajes (7). En relación a los linajes ancestrales se postula que el linaje TcI era

autóctono de Sudamérica (en coevolución con hospederos marsupiales), mientras que TcII era autóctono de Norteamérica (en coevolución con hospederos placentados) (22).

Los reservorios del protozooario *Trypanosoma cruzi*, han existido en la naturaleza durante millones de años. Es conocido que este parásito infecta a los humanos provocando la llamada enfermedad de Chagas, que es un importante problema de salud pública en América Latina. *T. cruzi* es genéticamente muy diverso y la comprensión de la estructura de la población de este parásito es crítica debido a los enlaces a los ciclos de transmisión y enfermedad. En la actualidad se ha establecido su clasificación a partir de su diversidad, El *T. cruzi* se divide en seis unidades discretas de tipificación (DTU), TCI-TCI. (8)

Se confirmó que los linajes de *Trypanosoma cruzi* TcI, TcII, TcV y TcVI circulan ampliamente en triatomíneos silvestres de la zona endémica de Chile, con un claro predominio general de TcI tanto por localidad como por especie. Por primera vez, este estudio detectó una mayor diversidad de linajes y mayor presencia de infecciones mixtas en la especie *T. infestans* respecto a *M. spinolai*. Además, se detectó una asociación particular entre el linaje TcV y *T. infestans* de la localidad de Calera de Tango, lo cual podría estar relacionado a la cercanía de esa especie a ambientes domésticos, donde TcV es más frecuente, o a alguna asociación de *T. infestans* con el reservorio *O. degus* el cual tiene una alta proporción de TcV en esa localidad

En 2009, Llewellyn reporta 135 muestras identificadas con linaje TCI de varias regiones geográficas endémica para la enfermedad de Chagas en América Latina, demostrando una diversidad del linaje TCI [23]. En Ecuador se han llevado a cabo estudios para tratar de entender la estructura genética del TCI, encontrando dos genotipos asociados al ciclo doméstico / peridoméstico y el ciclo selvático de transmisión (24). En Brasil, se ha descrito un nuevo genotipo TCI denominado como TcBat debido a su relación con los murciélagos del género *Myotis* y *Noctilio* (25). Este genotipo está muy relacionado con la TCI y realizando un análisis concatenado se encontró relación con los DTU TcIII y TCIV. Esto sugiere una alta diversidad genética representada por TCI y podría mostrar pistas sobre la historia evolutiva de *T. cruzi* I y su relación con el hospedero.

Conclusiones

Dado el limitado conocimiento sobre los linajes del *Trypanosoma cruzi* en México, su vector los marsupiales y su interacción con la población de Tuxtla Gutiérrez, es necesario iniciar prácticas de prevención y control en las comunidades, y disminuir así la incidencia de la enfermedad Chagas. Mostrando que en las especies de los diferentes marsupiales predomina el linaje TcI.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no haber tenido ningún conflicto de intereses en ninguna de las fases de este estudio.

Financiación

Proyecto IRES(ID UAEM 3836/2014/CIA proyecto 3072

Referencias

1. Apt B, W., et al., [Part V. Laboratory diagnosis of Chagas disease]. Rev Chilena Infectol, 2008. **25**(5): p. 380-3.
2. Molina-Garza, Z.J., et al., Association of *Trypanosoma cruzi* infection with risk factors and electrocardiographic abnormalities in northeast Mexico. BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 117.
3. Noireau, F., P. Diosque, and A.M. Jansen, *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. Vet Res, 2009. **40**(2): p. 26.
4. Cruz-Reyes, A. and J.M. Pickering-López, Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006. **101**(4): p. 345-54.
5. Garza, M., et al., Projected future distributions of vectors of *Trypanosoma cruzi* in North America under climate change scenarios. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(5): p. e2818.
6. Ibarra-Cerdeña, C.N., et al., Ecology of North American Triatominae. Acta Trop, 2009. **110**(2-3): p. 178-86.
7. Zingales, B., et al., A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(7): p. 1051-4.
8. Zingales, B., et al., The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol, 2012. **12**(2): p. 240-53.

9. Laurent, J.P., et al., Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 1997. **114** (Pt 3): p. 213-8.
10. de Lana, M., et al., *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol*, 1998. **90**(1): p. 20-5.
11. Pinto, A.S., et al., Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Parasitol Res*, 1998. **84**(5): p. 348-53.
12. Bosseno, M.F., et al., Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(2): p. 627-32.
13. Bosseno, M.F., et al., Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 2006. **74**(2): p. 303-5.
14. Bosseno, M.F., et al., Wild ecotopes and food habits of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 2009. **80**(6): p. 988-91.
15. Brenière, S.F., et al., Peridomestic colonization of *Triatoma longipennis* (Hemiptera, Reduviidae) and *Triatoma barberi* (Hemiptera, Reduviidae) in a rural community with active transmission of *Trypanosoma cruzi* in jalisco state, Mexico. *Acta Trop*, 2007. **101**(3): p. 249-57.
16. Ramos-Ligonio, A., et al., Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infect Genet Evol*, 2012. **12**(7): p. 1341-3.
17. López-Cancino, S.A., et al., Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. *Acta Trop*, 2015. **151**: p. 58-72.
18. Parada-López, J., et al., *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis virginiana* in relation to population parameters and variables associated with presence in rural community dwellings in Yucatan, Mexico. *Ecohealth*, 2013. **10**(1): p. 31-5.
19. Ruiz-Pina, H.A. and A. Cruz-Reyes, The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002. **97**(5): p. 613-20.
20. Raghavan, R.K., et al., Geospatial Risk Factors of Canine American Trypanosomiasis (Chagas Disease) (42 Cases: 2000-2012). *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2015. **15**(10): p. 602-10.
21. Viotti, R., et al., The impact of socioeconomic conditions on chronic Chagas disease progression. *Rev Esp Cardiol*, 2009. **62**(11): p. 1224-32.
22. Macedo, A.M., et al., *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004. **99**(1): p. 1-12.
23. Llewellyn, M.S., et al., Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(5): p. e1000410.
24. Ocaña-Mayorga, S., et al., Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in southern Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010. **4**(12): p. e915.
25. Marcili, A., et al., Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol*, 2009. **9**(6): p. 1265-74.

CONCLUSIONES

En la reserva ecológica “el Zapotal” se identificó la predominancia de linaje TCI en las especies de marsupiales capturadas, concordando con lo ya reportado por diferentes autores en donde se determina la predominancia de linaje TCI para estas especies, sin embargo, encontramos una alta variación genética entre los diferentes aislados del parásito, sin que estas estuvieran relacionadas a las diferentes especies de marsupiales.

Para el estudio de prevalencia se encontró 40% de infección con *Trypanosoma cruzi* en marsupiales en la reserva ecológica, y porcentajes mayores al 50% en la especie *Philander opossum* (57.1%) , un 39.5% para la especie *Didelphis marsupialis* y un 30% para la especie *Didelphis virginiana*.

DISCUSIÓN

México es considerado como un país endémico para la enfermedad de Chagas (OMS 2015), con prevalencias mayores al 18% (Carabarin *et al.*,2012),siendo el estado de Chiapas, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Yucatán los estados más afectados (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006; Dumonteil, 1999).Considerándose así como un problema de salud pública. En este estudio se evaluó el porcentaje de prevalencia puntual en 3 de las especies de marsupiales más ampliamente distribuidos en el territorio mexicano *Didelphis* (*Didelphis Virginiana*,*Philander opossum*)(Ceballos 2009), en donde encontramos un 40% de prevaecía total, y valores por encima del 50% en la especie *Philander opossum*, en comparación con las otras dos especies, presentaron valores similares entre sí, con un 39.5% para para *D.marsupialis*, y un 30% para *D.virginiana*. Estudios anteriores reportan prevalencias similares a las encontradas en nuestro estudio, En Estados Unidos Yabsley y colaboradores en el 2010 reportan valores mayores al 50% en *D.virginiana* en el estado de Florida,y valores de entre 28% y 17% en otros estados. En Bolivia, Torroto en 2013, encontró prevalencias de 50% (3/6) en *D. marsupialis*.

En México, en 1947 se hace el primer reporte de infección en marsupiales y hasta 1990 y 1997 se hace el reporte de la presencia del parasito dentro de la reserva ecológica el zapotal, (Solis-Franco,1990, 1997). Pocos son los reportes de prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en marsupiales en nuestro país, sin embargo Ruiz Piña y Cruz Reyes, en el 2002 reportan un 53.9% de prevalencia en *D.marsupialis* en el estado de Yucatán. Con los datos generados en este trabajo se aporta información sobre la prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en nuestro país en estas especies de importancia en el ciclo de transmisión de la enfermedad.

Otra aportación de nuestro es generar datos recientes sobre la presencia de *Trypanosoma cruzi* en 3 especies de marsupiales presentes en la reserva ecológica “el Zapotal”. En el 1997 se hace el reporte de la presencia del parasito en la reserva en vectores y reservorios, realizando capturas de *D.marsupialis* y *D.virginiana*, pero este solo se logró evidenciar en *D. virginiana* (2/12, 16.6%) (Solis-Franco,1997),

este estudio ayudara a poder realizar estudios posteriores dentro y en los entornos de la reserva, pues al estar ubicada dentro de una zona rural, juega un papel importante desde el punto de vista epidemiológico.

Otro de los objetivos de esta investigación fue la identificación de las DTU's de *Trypanosoma* en los marsupiales, siendo estos los primeros reservorios ancestrales del parasito, sugiere que la evolución y propagación de este en estas especies, dio como resultado el origen a las DTU's ancestrales (TcI-TcII), proponiendo a las especies *Didelphis* como reservorios naturales del linaje TcI (Miles y col. 1981; Gaunt y Miles, 2000; Yeo y col., 2005; Marcili y col., 2009b,). Aunque muchos estudios han identificado la presencia de otros linajes en las especies marsupiales (TcII, TcIV). Existen varias hipótesis acerca de la distribución de los diferentes grupos genéticos de *T. cruzi*, en las que se sugiere que los reservorios que pertenecen a los ecotópos arbóreos son infectados preferencialmente con TcI, como lo encontrado en nuestro estudio en donde se observó la predominancia de TcI, mientras que los terrestres son infectados por TcII-TcVI (Guhl, 2013), sin embargo, otros autores han reportado que reservorios de ecotópos arbóreos como *Monodelphis brevicaudata*, *Philander frenata* y *Didelphis aurita* presentaban infecciones con linajes TcIII, TcIV y TcII (Llewellyn et al., 2009). Las asociaciones no parecen ser absolutas.

En el árbol filogenético que se generó con las secuencias obtenidas de *Trypanosoma cruzi*, en donde solo se incluyeron las secuencias obtenidas de los marsupiales, se observó una variación genética del linaje TcI entre los diferentes aislados, no asociada a las especies de marsupiales, correlacionado con los resultados publicados sobre la diversidad de linajes presentes en otras especies, indican que los agrupamientos posiblemente están más ligados a la distribución geográfica que a una asociación a los diferentes reservorios. (Guhl, 2013).

En relación a la diversidad de TcI encontradas en nuestras secuencias, podemos inferir que esta diversidad se encuentra relacionada a la diversidad genética que presente ese linaje en particular, como lo han propuesto, por ejemplo, en Colombia se ha encontrado la diversidad dentro del linaje TcI, proponiendo una la existencia de cuatro genotipos de este linaje, clasificándolos en TcIa, TcIb, TcIc y TcId (Falla,

et.al ., 2009) , en ese mismo país se encontró la presencias de linaje TCId en *D. marsupialis* TCId. Mostrando la asociación al ciclo selvático de transmisión, con estos reportes, creemos conveniente que se realicen muchos más estudios para la identificación de esta diversidad en los reservorios y vectores del *Trypanosoma* en nuestro país.

En los últimos años se ha establecido la necesidad de conocer el rol que desempeñan en la naturaleza los reservorios y vectores del *Trypanosoma cruzi* puesto que han existido desde hace millones de años (Zingales y col.,2009, 2012). La importancia del análisis filogenético de los diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi*, de los diferentes vectores y hospederos de la enfermedad, radica en la aportación de nuevos datos para el estudio de epidemiología molecular, los cuales pueden ser empleados para la identificación de diferentes presentaciones clínicas de la enfermedad, patogenicidad de las cepas y sensibilidad a los diferentes tratamientos (Laurent y col., 1997; de Lana y col., 1998).Es por esto que es necesario seguir realizando estudios filogenéticos del *Trypanosoma cruzi* en las diferentes zonas endémicas de la enfermedad de nuestro país, con el fin de seguir aportando conocimientos que colaboren a entender mejor la eco-epidemiología de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- Apt B, W., et al., [Part V. Laboratory diagnosis of Chagas disease]. Rev Chilena Infectol, 2008. **25**(5): p. 380-3.
- Molina-Garza, Z.J., et al., Association of *Trypanosoma cruzi* infection with risk factors and electrocardiographic abnormalities in northeast Mexico. BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 117.
- Noireau, F., P. Diosque, and A.M. Jansen, *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. Vet Res, 2009. **40**(2): p. 26.
- Cruz-Reyes, A. and J.M. Pickering-López, Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006. **101**(4): p. 345-54.
- Garza, M., et al., Projected future distributions of vectors of *Trypanosoma cruzi* in North America under climate change scenarios. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(5): p. e2818.
- Ibarra-Cerdeña, C.N., et al., Ecology of North American Triatominae. Acta Trop, 2009. **110**(2-3): p. 178-86.
- Zingales, B., et al., A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(7): p. 1051-4.
- Zingales, B., et al., The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol, 2012. **12**(2): p. 240-53.
- Laurent, J.P., et al., Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology, 1997. **114** (Pt 3): p. 213-8.
- de Lana, M., et al., *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. Exp Parasitol, 1998. **90**(1): p. 20-5.
- Pinto, A.S., et al., Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. Parasitol Res, 1998. **84**(5): p. 348-53.
- Coura JR, Pinto Dias JC (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz, 104: 31-40.
- Bosseno, M.F., et al., Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. J Clin Microbiol, 2002. **40**(2): p. 627-32.
- Bosseno, M.F., et al., Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg, 2006. **74**(2): p. 303-5.
- Bosseno, M.F., et al., Wild ecotopes and food habits of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in Mexico. Am J Trop Med Hyg, 2009. **80**(6): p. 988-91.
- Brenière, S.F., et al., Peridomestic colonization of *Triatoma longipennis* (Hemiptera, Reduviidae) and *Triatoma barberi* (Hemiptera, Reduviidae) in a rural community with active transmission of *Trypanosoma cruzi* in Jalisco state, Mexico. Acta Trop, 2007. **101**(3): p. 249-57.
- Ramos-Ligonio, A., et al., Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. Infect Genet Evol, 2012. **12**(7): p. 1341-3.

- López-Cancino, S.A., et al., Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. *Acta Trop*, 2015. **151**: p. 58-72.
- Parada-López, J., et al., *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis virginiana* in relation to population parameters and variables associated with presence in rural community dwellings in Yucatan, Mexico. *Ecohealth*, 2013. **10**(1): p. 31-5.
- Ruiz-Pina, H.A. and A. Cruz-Reyes, The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002. **97**(5): p. 613-20.
- Raghavan, R.K., et al., Geospatial Risk Factors of Canine American Trypanosomiasis (Chagas Disease) (42 Cases: 2000-2012). *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2015. **15**(10): p. 602-10.
- Viotti, R., et al., The impact of socioeconomic conditions on chronic Chagas disease progression. *Rev Esp Cardiol*, 2009. **62**(11): p. 1224-32.
- Macedo, A.M., et al., *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004. **99**(1): p. 1-12.
- Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sanchez, H., Adamson, S., Miles, G.A., Lopez, E., Gonzalez, N., Patterson, J.S., Gaunt, M.W., de Arias, A.R., Miles, M.A., 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol* 35, 225-233
- Didelphis marsupialis* (Tlacuache). Distribución potencial. Catálogo de metadatos geográficos. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad Autor: Ceballos, G., S. Blanco, C. González y E. Martínez (2006), Geoportal CONABIO
- Laurent JP, Barnabé C, Quesney V, Noel S, Tibayrenc M (1997). Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 114(3): 213–218.
- de Lana M, da Silveira Pinto A, Barnabé C, Quesney V, Noël S, Tibayrenc M (1998). *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol*, 90(1): 20–25.
- Miles MA, Pova MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS (1981). Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil., *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 75(5): 667-674.
- Llewellyn MS, Lewis MD, Acosta N, Yeo M, Carrasco HJ, et al. *Trypanosoma cruzi* IIc: Phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PloS Negl Trop Dis*. 2009; 3: e510.
- Guhl, Felipe, EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE TRYPANOSOMA CRUZI: Revista Española de Salud Pública, marzo, 2013, pp. 1-8 Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad
- Llewellyn, M.S., et al., Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(5): p. e1000410.
- Ocaña-Mayorga, S., et al., Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in southern Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010. **4**(12): p. e915.

Marcili, A., et al., Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol*, 2009. **9**(6): p. 1265-74.