

Títol del Treball:

Diversitat genètica de *Trypanosoma cruzi* a Espanya

Estudiant: Andreea Ionela Moldovan

Correu electrònic: andreamoldovan2110@gmail.com

Grau en: Biologia

Tutora: Alba Abras Feliu

Correu electrònic: alba.abras@udg.edu

ÍNDEX

RESUM	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
REFLEXIONS SOBRE ÈTICA, SOSTENIBILITAT I PERSPECTIVA DE GÈNERE	iv
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Aspectes generals i breu perspectiva històrica	1
1.2. El paràsit <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2.1. Morfologia i cicle biològic	1
1.2.2. Diversitat genètica	3
1.2.3. Transmissió	4
1.3. La malaltia de Chagas	4
1.3.1. Simptomatologia	4
1.3.2. Diagnòstic i tractament	5
1.3.3. Distribució geogràfica	5
1.3.3.1. Distribució epidemiològica a Espanya	6
2. AIM	6
3. MATERIAL I MÈTODES	6
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	7
4.1. Resultats de la cerca	7
4.2. Anàlisi dels articles seleccionats	7
4.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> en hostes humans a Espanya	10
4.4. Infeccions mixtes	11
4.5. Caracterització de les UDTs post-tractament	12
4.6. Distribució geogràfica de les UDTs	13

4.6.1. Segons país d'origen	13
4.6.2. Segons lloc de residència	14
4.7. El cas de TcV a Espanya	14
4.8. Problemàtica de la caracterització	15
4.9. Consideracions finals	17
5. CONCLUSIONS	17
6. AGRAÏMENTS	18
7. BIBLIOGRAFIA	19

RESUM

La malaltia de Chagas o Tripanosomiasi Americana, endèmica a Llatinoamèrica, és una zoonosi provocada pel protozou hemàtic i flagel·lat *Trypanosoma cruzi* que afecta entre sis i set milions de persones arreu del món. El principal mecanisme de transmissió a Amèrica Llatina és el vectorial a través d'insectes de la subfamília *Triatominae*. En els països no endèmics, on no hi ha presència del vector, com és el cas d'Espanya, les vies de transmissió es basen principalment en transfusions sanguínies, transplantaments d'òrgans i la via congènita de la mare al nadó durant l'embaràs o el part. Com a conseqüència de la globalització, s'ha produït un augment dels fluxos migratoris procedents d'Amèrica Llatina cap Europa i sobretot a Espanya, el que ha fet incrementar els casos de malaltia de Chagas.

Trypanosoma cruzi té una elevada diversitat genètica intraespecífica, la que es classifica en les anomenades Unitats Discretas de Tipificació (UDTs): TcI-TcVI i TcBat (aïllat en ratpenats). Les UDTs tenen diferents distribucions geogràfiques en els països endèmics i circulen en tres cicles de transmissió interrelacionats. La informació sobre les diferents UDTs presents a Espanya és molt escassa pel que l'objectiu d'aquest Treball Final de Grau és aprofundir en la diversitat genètica de *T. cruzi* a Espanya, el país europeu amb la major càrrega de Chagas, i les seves implicacions en l'aplicació de mesures de salut pública efectives per fer front a la malaltia.

A partir de la cerca bibliografia a la pàgina *Web of Science* mitjançant la combinació de diferents paraules clau i la posterior lectura dels títols i els resums dels resultats obtinguts, s'han seleccionat un total de cinc articles. Per tant, el nombre d'estudis que estudia la diversitat genètica de *T. cruzi* a Espanya es confirma com a molt limitat. En aquestes publicacions s'han estudiat un total de 303 pacients amb malaltia de Chagas, dels que s'han pogut caracteritzar les UDTs en el 80,2% (243/303). El 87% dels pacients inclosos a l'estudi són bolivians i són atesos en les grans ciutats espanyoles, Barcelona i Madrid. TcV és la UDT més identificada, el que és coherent ja que és el llinatge més comú a Bolívia i predominant en sang perifèrica. Aquesta informació s'ha de tenir en compte a l'aplicar plans de gestió per fer front a la malaltia a Espanya. Fan falta més estudis enfocats a millorar la resolució dels mètodes de caracterització de les UDTs de *T. cruzi*.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, endémica en Latinoamérica, es una zoonosis provocada por el protozoo hemático y flagelado *Trypanosoma cruzi* que afecta entre seis y siete millones de personas en todo el mundo. El principal mecanismo de transmisión en Latinoamérica es el vectorial a través de insectos de la subfamilia *Triatominae*. En los países no endémicos donde no hay presencia del vector, como es el caso de España, las vías de transmisión se basan principalmente en transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos y la vía congénita de la madre al bebé durante el embarazo o el parto. Como consecuencia de la globalización, se ha producido un aumento de los flujos migratorios procedentes de América Latina hacia Europa y sobre todo a España, lo que ha incrementado los casos de enfermedad de Chagas.

Trypanosoma cruzi tiene una elevada diversidad genética intraespecífica, que se clasifica en las llamadas Unidades Discretas de Tipificación (UDTs): TcI-TcVI y TcBat (aislado en murciélagos). Las UDTs tienen distintas distribuciones geográficas en los países endémicos y circulan en tres ciclos de transmisión interrelacionados. La información sobre las diferentes UDTs presentes en España es muy escasa por lo que el objetivo de este Trabajo Final de Grado es profundizar en la diversidad genética de *T. cruzi* en España, el país europeo con la mayor carga de Chagas, y sus implicaciones en la aplicación de medidas de salud pública efectivas para hacer frente a la enfermedad.

A partir de la búsqueda bibliográfica en la página *Web of Science* mediante la combinación de diferentes palabras clave y la posterior lectura de los títulos y resúmenes de los resultados obtenidos, se han seleccionado un total de cinco artículos. Por tanto, el número de estudios que estudia la diversidad genética de *T. cruzi* en España se confirma como muy limitado. En estas publicaciones se han estudiado un total de 303 pacientes con enfermedad de Chagas, de los que se han podido caracterizar las UDTs en el 80,2% (243/303). El 87% de los pacientes incluidos en el estudio son bolivianos y fueron atendidos en las grandes ciudades españolas, Barcelona y Madrid. TcV es la UDT más identificada, lo que es coherente ya que es el linaje más común en Bolivia y predominante en sangre periférica. Esta información debe tenerse en cuenta al aplicar planes de gestión para hacer frente a la enfermedad en España. Se necesitan más estudios enfocados a mejorar la resolución de los métodos de caracterización de las UDTs de *T. cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease or American Trypanosomiasis, endemic in Latin America, is a zoonosis caused by the hematic and flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, affecting between six and seven million people worldwide. The main transmission mechanism in Latin America is vector transmission by insects of the subfamily *Triatominae*. In non-endemic countries, where the vector is absent, as in the case of Spain, transmission routes are mainly based on blood transfusions, organ transplants and the congenital route from mother to child during pregnancy or childbirth. As a result of globalisation, there has been an increase in migration from Latin America to Europe, particularly in Spain, which has led to an increase in the number of cases of Chagas disease.

Trypanosoma cruzi has a high intraspecific genetic diversity, which is classified into so-called discrete typing units (DTUs): TcI-TcVI and TcBat (isolated from bats). DTUs have different geographical distributions in endemic countries and circulate in three interrelated transmission cycles. Information on the different DTUs present in Spain is very scarce, so the aim of this Bachelor's Thesis is to study the genetic diversity of *T. cruzi* in Spain, the European country with the highest Chagas burden, and its implications for the implementation of effective public health measures to control the disease.

A total of five articles were selected by searching bibliography on the *Web of Science* site using a combination of keywords, followed by reading the titles and abstracts of the results obtained. The limited number of studies investigating the genetic diversity of *T. cruzi* in Spain is confirmed. A total of 303 patients with Chagas disease were studied in these publications, of whom 80.2% (243/303) had DTUs characterised. The 87% of the patients included in the study are Bolivian and were attended in the major Spanish cities, i.e., Barcelona and Madrid. TcV is the most frequently identified DTU, which is logical as it is the most common strain in Bolivia and predominates in peripheral blood. This information must be considered when applying management plans to control the disease in Spain. Further studies are needed to improve the resolution of methods for characterising *T. cruzi* DTUs.

REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA

Totes les fonts d'informació utilitzades per l'elaboració d'aquest treball han estat degudament citades respectant els drets de propietat intel·lectual dels/les autors/es, d'aquesta manera s'ha evitat el plagi.

La malaltia de Chagas es troba majoritàriament a països d'Amèrica Llatina i forma part de les 20 malalties considerades com a desateses per la Organització Mundial de la Salut (OMS, 2023). La malaltia es transmet principalment a través d'insectes triatomins que actuen com a vector, veient-se afavorits en les comunitats rurals pobres degut a la falta d'infraestructures adequades (Erazo & Cordovez, 2016; Rey, 2021). A més, l'accés a la sanitat pública sovint és complicat en les zones més remotes i el baix nivell socioeconòmic fa augmentar la propensió a adquirir la malaltia degut a la desconexença. Per tant, ens trobem davant d'un cas clar de desigualtat i injustícia social, que posa en perill els drets humans.

REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT

Al tractar-se d'un treball bibliogràfic, no s'ha fet ús de material de laboratori i no s'ha generat cap mena de residu. Pel que fa la bibliografia, s'ha consultat en format digital evitant la impressió innecessària dels articles. Finalment, s'han combinat les reunions presencials amb les virtuals per a estalviar desplaçaments innecessaris.

REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE

Segons dades del Ministeri de Ciència i Innovació (2023) el percentatge d'investigadores a Espanya és del 42%, amb només una quarta part de dones en càrrecs de presa de decisions; 25% com a rectores i 24% de directores d'instituts de recerca.

Aquestes xifres es veuen influenciades pel fenomen de terra enganxós que dificulta l'accés a determinats esglaons laborals per qüestions de conciliació maternitat-feina. Aquest fenomen porta a les grans empreses a escollir homes per realitzar les mateixes labors.

A Espanya la llei de la Ciència (17/22) a reconeix la necessitat de promoure la investigació amb perspectiva de gènere com un component essencial per abordar les desigualtats i promoure la diversitat en l'àmbit científic.

En quant als sis articles inclosos dins d'aquest Treball Final de Grau, n' hi ha dos en els que la primera autora és una dona. Aproximadament el 33% són dones i el 67% homes. Cal tenir en compte que aquestes dades no són representatives que ja és necessita una major mostra per a saber-ho amb exactitud.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Aspectes generals i breu perspectiva històrica

La malaltia de Chagas o Tripanosomiasi Americana és causada pel paràsit protozou *Trypanosoma cruzi*, descobert pel metge brasiler Carlos Chagas l'any 1909 i denominat *cruzi* en honor al seu mentor, Oswaldo Cruz (Rassi *et al.*, 2010). Els vectors naturals de *T. cruzi* són insectes hematòfags de la subfamília *Triatominae*, coneguts com a triatòmins, i es troben principalment a Llatinoamèrica on la malaltia és considerada endèmica (Stevens *et al.*, 2011). El paràsit afecta a més de 70 gèneres de mamífers hostes, incloent els humans (Zingales, 2018).

La primera documentació d'una infecció humana per *T. cruzi* va ser obtinguda d'una mòmia de 9000 anys d'antiguitat de la civilització "Chinchorro" que va habitar les costes de Xile i Perú (Aufderheide *et al.*, 2004). El primer cas descrit de malaltia de Chagas en humans va ser el de Berenice l'any 1909, una nena de dos anys d'edat que presentava febre i edema palpebral (signe de Romana), entre d'altres manifestacions clíniques (Chagas, 1916).

Al 2005 l'Organització mundial de la Salut (OMS) va reconèixer la malaltia de Chagas com una malaltia tropical desatesa. L'afluència massiva de migrants llatinoamericans a Europa registrada des dels anys noranta es va associar amb un augment sobtat dels casos de Chagas diagnosticats en països no endèmics. L'expansió de la malaltia de Chagas, antigament restringida a Amèrica Llatina, ara té importants implicacions per a la salut pública mundial (Schmunis, 2007).

1.2. El paràsit *Trypanosoma cruzi*

1.2.1. Morfologia i cicle biològic

Trypanosoma cruzi és un paràsit eucariota unicel·lular de l'ordre Kinetoplastida i de la família *Trypanosomatidae*. Aquest grup d'organismes es caracteritza per la presència d'un únic mitocondri localitzat a la base del flagel (kinetoplast) i que conté l'ADN extranuclear (ADN del kinetoplast, ADNk) (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2023; Lidani *et al.*, 2019).

El paràsit presenta tres estadis morfològics principals durant el seu cicle de vida: amastigot, epimastigot i tripomastigot (Rassi *et al.*, 2010) (Figura 1). L'amastigot manca de flagel i conseqüentment de moviment, posseeix un gran nucli i presenta divisió binària simple. L'epimastigot és fusiforme amb flagel mitjà i reproducció per divisió binària longitudinal. El tripomastigot metacíclic és el que es troba a l'intestí del hoste i a les seves deposicions, té un flagel allargat i una capacitat gairebé nul·la de reproducció, sent la forma infectiva amb la que penetra dins l'hoste vertebrat. El tripomastigot sanguini té un llarg flagel i no té capacitat per dividir-se però sí per infectar les cèl·lules del hoste (Tyler & Engman, 2001).

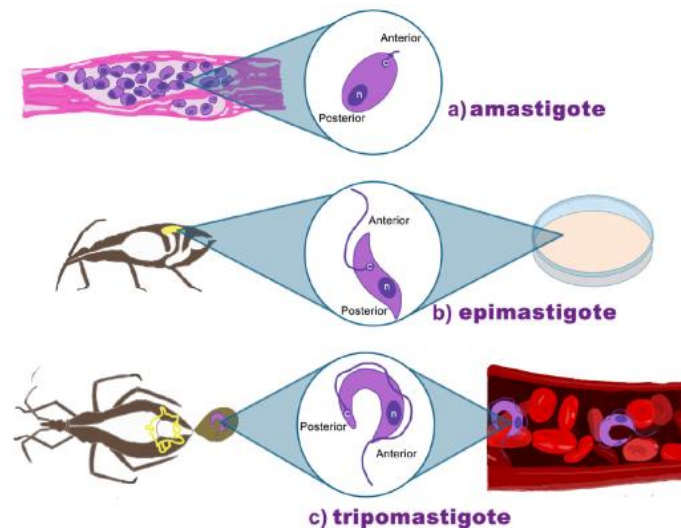


Figura 1. Estadis morfològics de *T. cruzi*. a) Amastigots en teixits de l'hoste vertebrat: quinetoplast petit i en posició anterior al nucli. b) Epimastigots en l'intestí del vector i en cultiu: quinetoplast en posició anterior al nucli. c) Tripomastigots metacíclics en la femta del vector i tripomastigots sanguinis en el torrent circulatori de l'hoste: quinetoplast en posició posterior al nucli. n: nucli, c: quinetoplast (Peña-Callejas *et al.*, 2022).

El cicle de *T. cruzi* comença amb la succió dels tripomastigots del torrent sanguini dels vertebrats infectats pel triatomí. La majoria dels tripomastigots ingerits es descomponen a l'estómac de l'insecte mentre que els supervivents es transformen en epimastigots pocs dies després. Els epimastigots es desplacen a l'intestí on es divideixen intensament i s'expulsen en forma de tripomastigots metacíclics juntament amb les femtes. La transmissió es dona a través de deposicions infectades dels insectes que penetren la pell o les membranes mucoses de l'humà (o altre hoste vertebrat) (Antinori *et al.*, 2017) (Figura 2). Els tripomastigots envaeixen les cèl·lules pròximes a la picada i es transformen en amastigots que es multipliquen activament fins que, després d'aproximadament nou cicles de divisió intracel·lular, els paràsits lisen la cèl·lula i són alliberats al torrent circulatori. A partir d'aquí envaeixen noves cèl·lules amb predilecció pels teixits cardíac i digestiu (Onyekwelu, 2019).



Figura 2. Triatomí, vector de *T. cruzi* infectant a un hoste humà mitjançant la deposició de femta a la ferida produïda a la pell a través de la picada (CDC - DPDx - American Trypanosomiasis, 2021).

1.2.2. Diversitat genètica

Una de les característiques més importants de *T. cruzi* és la seva alta diversitat genètica (Dvorak *et al.*, 1982). La nomenclatura intraespecífica per *T. cruzi* va ser proposada al 2009 per un comitè d'experts i consisteix en sis llinatges genètics o unitats discretes de tipificació (UDTs) classificades de TcI a TcVI (Zingales *et al.*, 2009). Les UDTs es defineixen com a "grups genètics o conjunts de soques que es troben genèticament més relacionades entre si que amb qualsevol altre grup existent i que són identificables per marcadors genètics, moleculars o immunològics comuns" (Tibayrenc, 1998). De manera posterior, estudis basats en múltiples marcadors moleculars van considerar una setena UDT restringida als ratpenats (TcBat) (Marcili *et al.*, 2009; Lima, *et al.*, 2015).

Les diferents UDTs estan associades a diversos cicles biològics de transmissió i varien segons la distribució geogràfica (Zingales *et al.*, 2012) (Figura 3). Hi ha una distribució diferencial dels aïllats de TcI, que són freqüents en pacients d'Amèrica del Nord (Mèxic i Estats Units); països d'Amèrica Central i del nord d'Amèrica del Sud (Colòmbia i Veneçuela). En altres països d'Amèrica del Sud, hi ha una major heterogeneïtat de les UDTs trobades en humans. Al Perú, Bolívia i el nord de Xile, la majoria dels pacients estan infectats amb TcV, mentre que TcI i TcII són abundants a Xile. Al centre i l'est del Brasil, la TcII és freqüent, mentre que TcI i la TcIV es detecten en casos aguts de malaltia de Chagas de l'Amazònia brasilera. A l'Argentina, predominen TcV i TcVI i al Paraguai, TcII i TcV són els llinatges més aïllats en humans (Zingales, 2018). TcIII està majoritàriament associat a cicles selvàtics a Brasil i als països adjacents i les infeccions humanes són rares. Aquest llinatge s'ha trobat principalment en gossos domèstics (Zingales *et al.*, 2012).

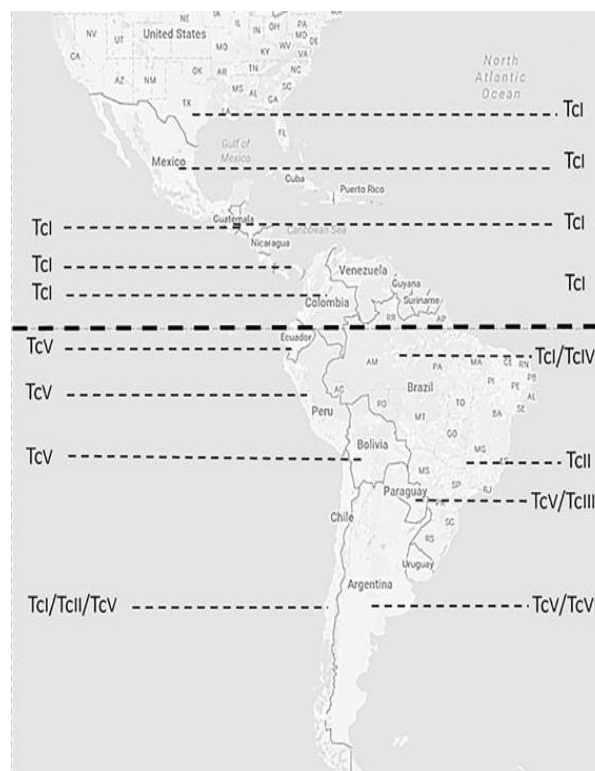


Figura 3. Distribució aproximada de les UDTs de *T. cruzi* al continent americà (Zingales, 2018).

Tot i que encara no s'ha determinat exactament la relació entre les UDTs i les formes clíniques específiques de la malaltia de Chagas, s'ha observat que certs genotips presenten propensió a augmentar el risc de patologies específiques. És important tenir en compte que en les interaccions hoste-patogen existeixen múltiples factors influent en el resultat de la infecció, inclosa la resposta immune de l'hoste i les estratègies utilitzades pel paràsit per envair-lo. Aquests factors estan íntimament relacionats amb les seves característiques genètiques (Zingales & Macedo, 2023).

1.2.3. Transmissió

Trypanosoma cruzi es transmet de forma natural a través de la picada de més de 150 espècies d'insectes vectors de la subfamília *Triatominae*, que es troben principalment a Amèrica Central i del Sud i on hi ha més de 70 gèneres de mamífers que actuen com a hostes (Stevens *et al.*, 2011). Els gèneres de vectors més rellevants són *Triatoma*, *Rhodnius* i *Panstrongylus* (Zingales, 2018).

Es coneixen tres cicles de transmissió de la infecció per *T. cruzi* que es troben interrelacionats entre ells: domèstic, peridomèstic i selvàtic, i inclouen tant animals domèstics com a salvatges. En el cicle domèstic, la infecció es transmet dels animals domèstics (gossos, gats, entre d'altres) als humans o també entre humans. El cicle selvàtic és enzoòtic i es dona entre animals salvatges. Finalment, el peridomèstic s'origina a partir de l'anterior i manté la infecció entre els animals domèstics (Coura & Dias, 2009).

Els programes de control vectorial implantats entre els anys 1980 i 1990 van reduir l'impacte d'aquest tipus de transmissió però va haver un augment de la transmissió no vectorial de forma exponencial (Moncayo, 2003). Aquest segon tipus de transmissió no implica la presència del vector i, per tant, es pot donar tant en zones endèmiques com en no endèmiques. Es diferencien quatre vies diferents, les transfusions de sang, la via congènita o vertical de la mare al fetus, el trasplantament d'òrgans i els accidents de laboratori (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2023). D'aquestes, la transmissió congènita adquireix cada cop més importància als països no endèmics (Antinori *et al.*, 2017).

1.3. La malaltia de Chagas

1.3.1. Simptomatologia

La malaltia de Chagas té dues fases, l'aguda i la crònica. La fase aguda està caracteritzada per la presència del paràsit circulant en sang (parasitèmia). Sol ser asimptomàtica, però si apareixen símptomes són en forma de febre prolongada o indisposició general (Rassi *et al.*, 2010). La fase crònica de la malaltia comença quan el número de paràsits disminueix en via sanguínia, aproximadament de quatre a vuit setmanes després de la infecció i els paràsits es troben replicant-se de manera clínicament silenciosa a l'interior dels teixits, sobretot cardíac i digestiu (Nunes *et al.*, 2013).

En el 70% dels casos, els pacients infectats no presentaran símptomes, mentre que en el 30% restant les manifestacions clíniques poden aparèixer entre 10-30 anys després de la infecció. La fase crònica asimptomàtica s'anomena fase crònica indeterminada (Pérez-Molina & Molina, 2018). En el cas dels pacients amb complicacions, aquestes són principalment cardíques i digestives (i en menys mesura neurològiques), i poden portar a la mort (Álvarez-Hernández *et al.*, 2018).

1.3.2. Diagnòstic i tractament

En la fase aguda hi ha presència de paràsits circulants en sang pel que el diagnòstic es sol basar en mètodes parasitològics directes, com la visualització al microscopi de *T. cruzi* en sang. Aquests es poden complementar amb tècniques de concentració del paràsit i/o mètodes parasitològics indirectes com l'hemocultiu o el xenodiagnòstic, aquest últim en desús (Peña-Callejas *et al.*, 2022). Les tècniques moleculars i sobretot la reacció en cadena de la polimerasa, de l'anglès *Polymerase Chain Reaction* (PCR), són especialment útils per a confirmar el diagnòstic de la infecció ja que són més sensibles que les tècniques parasitològiques i no requereixen de personal entrenat en la visualització de les formes del paràsit al microscopi (Rassi *et al.*, 2010). Per altra banda, en la fase crònica la parasitemia és molt baixa o gairebé nul·la, per tant, el diagnòstic serològic basat en la detecció d'anticossos IgG anti-*T. cruzi* és el més adient (Abrás *et al.*, 2022).

Actualment, els medicaments utilitzats per fer front a la malaltia de Chagas són el benznidazol i el nifurtimox (Pérez-Molina & Molina, 2018). Aquests medicaments presenten elevada eficàcia en fase aguda arribant a xifres properes al 100% de curació en infants menors d'un any (Fabbro *et al.*, 2014). La seva efectivitat, però, disminueix en picat en la fase crònica i sol provocar nombrosos efectes secundaris (Fabbro *et al.*, 2014).

1.3.3. Distribució geogràfica

La malaltia de Chagas està àmpliament distribuïda en els 21 països d'Amèrica Llatina i actualment afecta entre sis i set milions de persones arreu del món amb una incidència de gairebé 12.000 morts anuals i de 30.000 a 40.000 nous casos cada any (OMS, 2023).

Tot i que el triatomí vector no es present en països no endèmics, el flux migratori està provocant un ràpid augment de casos en països que reben immigrants llatinoamericans; Estats Units i Europa són els principals receptors. A Europa la majoria de migrants és concentren a Espanya, Itàlia, França, Gran Bretanya i Suïssa amb una prevalença total del 4.2% i amb el major percentatge d'infecció en individus provinents de Bolívia (18.1%) (Antinori *et al.*, 2017).

1.3.3.1. Distribució epidemiològica a Espanya

Actualment, el número de llatinoamericans a Espanya ronda els 1,1 milions segons l'observatori permanent de la immigració (OPI, 2022). Destaquen els colombians (185.789), els veneçolans (182.340) i els equatorians (138.204).

Espanya és el país europeu amb un índex més elevat de migració procedent d'Amèrica Llatina, ja que acull la meitat dels migrants procedents del continent. Això és degut principalment als vincles postcoloniaus, la llengua i les afinitats culturals i religioses amb la majoria dels països de Llatinoamèrica (Bayona i Carrasco & Avila-Tàpies, 2020). Es calcula que a Espanya hi viuen unes 52.000 persones amb malaltia de Chagas tot i que només el 10% han estat diagnosticades (Basile *et al.*, 2011; Romay-Barja *et al.*, 2019).

A Espanya, la malaltia es detecta normalment en la fase crònica i majoritàriament són casos d'infecció importada des del país d'origen (Flores-Chávez *et al.*, 2022).

2. AIM

The objective of this Bachelor's Thesis is to study the genetic diversity of *T. cruzi* in Spain, the European country with the highest Chagas disease burden, and its implications in the application of effective public health measures to confront the disease.

3. MATERIAL I MÈTODES

La cerca bibliogràfica per a poder reunir la informació necessària per realitzar aquest treball es va portar a terme a finals del mes d'octubre del 2023 mitjançant la web de recerca *Web of Science (WOS)*, dins del portal de la *Fundación española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT)*. Es van realitzar un total de sis cerques, la primera amb les següents paraules clau "*Trypanosoma cruzi* AND Spain" seguidament de "*Trypanosoma cruzi* AND gen* diversity AND Spain", "*Trypanosoma cruzi* AND gen* diversity AND Spain AND DTU" "Chagas disease AND gen* diversity AND Spain AND DTU", "*Trypanosoma cruzi* AND Spain AND DTU" i "Chagas disease AND Spain AND discrete typing unit". Es van incloure tots els resultats fins a la data de cerca i tots els articles o articles de revisió dins de la categoria *Document Types*. El mes de gener del 2024 es va realitzar una segona selecció per si es trobaven d'altres articles recents.

Un cop recopilats els articles, es va realitzar una lectura dels títols, resums i conclusions per a acotar més la cerca i descartar en cas de necessitat. Els motius d'exclusió van ser deguts a la falta de referència específica a la diversitat genètica, la no caracterització de les UDTs de forma concreta i al fet de no referir-se a Espanya com a lloc d'estudi. Finalment es va procedir a la lectura de les publicacions seleccionades per tal d'obtenir-ne la informació necessària.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Resultats de la cerca

La primera cerca va ser “*Trypanosoma cruzi* AND Spain” de la qual es van obtenir un total de 168 resultats, d’aquests només quatre parlaven de la diversitat genètica a Espanya i, per tant, tota la resta de resultats es van descartar degut a la informació poc precisa que donaven; per això es va realitzar la següent cerca: “*Trypanosoma cruzi* AND gen* diversity AND Spain” obtenint el resultat de només quatre articles dels 168 anteriors. A continuació, es va intentar aprofundir més canviant les paraules claus i d’aquí les següents tres cerques: “*Trypanosoma cruzi* AND gen* diversity AND Spain AND DTU”, “Chagas disease AND gen* diversity AND Spain AND DTU”, “*Trypanosoma cruzi* AND Spain AND DTU” tot i així els resultats van ser els quatre articles anteriorment esmentats.

Al realitzar la cerca “Chagas disease AND Spain AND discrete typing units” es va obtenir un resultat més, donant un número de cinc articles fins aquell moment. L’última cerca va ser “Chagas disease AND Spain AND discrete typing unit”: donant set resultats totals, fent servir totes les paraules claus menys diversitat genètica. En una posterior tutoria aquests dos últims resultats es van descartar per aportar informació sobre d’altres temes i no incloure la diversitat genètica de *T. cruzi* a Espanya. Per tant, la llista final va ser de cinc articles. Per altra banda, es van revisar altres articles per a proporcionar tota la informació actualitzada de la malaltia i del paràsit, els que estan degudament exposats en el document i citats a l’apartat de la bibliografia.

4.2. Anàlisi dels articles seleccionats

Els cinc articles seleccionats es troben classificats en quatre categories segons el cercador de la base de dades WOS. A la Figura 4 es poden observar els articles classificats en cadascuna de les categories corresponents: *Parasitology*, *Infectious Diseases*, *Tropical Medicine* i *Cardiac Cardiovascular Systems*.

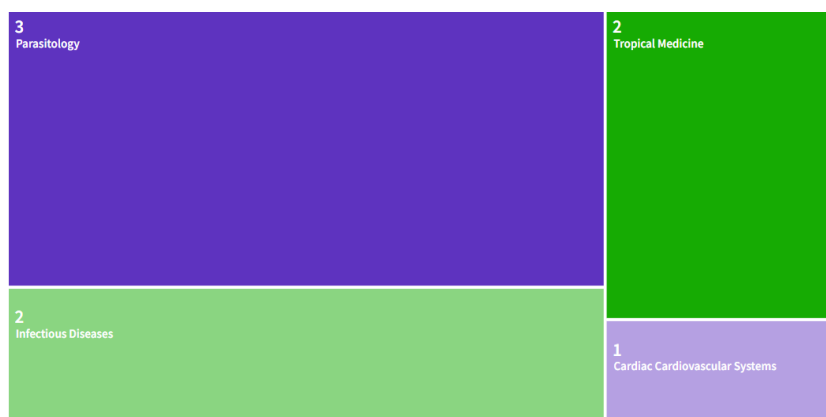


Figura 4. Nombre d’articles englobats en cadascuna de les quatre categories en les que el portal WOS classifica els articles seleccionats.

Cal esmentar que un mateix article pot estar inclòs en varies categories. Això queda reflectit a la Taula 1 on es poden veure els cinc articles i les categories on es troben classificats cadascun d'ells de manera individual.

Taula 1. Els cinc articles seleccionats mitjançant la recerca amb WOS classificats en diferents categories. Llegenda de colors a la part inferior.

Article	Referència	Categories			
Distribution of <i>Trypanosoma cruzi</i> discrete typing units in Bolivia migrants in Spain	Pérez-Molina <i>et al.</i> (2014)				
Prevalence of <i>Trypanosoma cruzi</i> 's Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain	Martínez-Pérez <i>et al.</i> (2016)				
Identification of <i>Trypanosoma cruzi</i> Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain)	Abras <i>et al.</i> (2017)				
Quantification of parasite burden of <i>Trypanosoma cruzi</i> and identification of Discrete Typing Units (DTUs) in blood samples of Latin American immigrants residing in Barcelona, Spain	Tavares de Oliveira <i>et al.</i> (2020)				
Intra-Discrete Typing Unit TcV Genetic Variability of <i>Trypanosoma cruzi</i> in Chronic Chagas' Disease Bolivian Immigrant Patients in Barcelona, Spain	de Oliveira <i>et al.</i> (2021)				

	<i>Parasitology</i>
	<i>Infectious Diseases</i>
	<i>Tropical Medicine Microbiology</i>
	<i>Cardiac Cardiovascular Systems</i>

En referència a l'any de publicació dels articles, tal i com s'observa a la Figura 5 es tracta d'articles relativament recents. El més antic data de l'any 2014 i el més recent de l'any 2021. Es pot observar que cada article ha estat publicat en un any diferent a la resta, per tant hi ha una única publicació els anys 2014, 2016, 2017, 2020 i 2021.

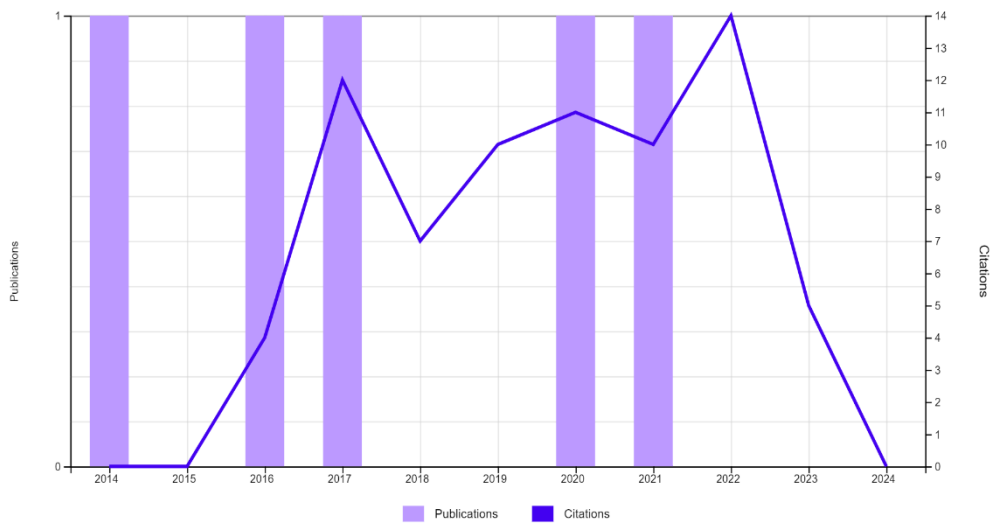


Figura 5. Número de publicacions (barres) i nombre de citacions totals (línia blava contínua) segons l'any. Dades fins al gener de 2024.

Pel que fa l'impacte dels articles seleccionats per separat, a la Figura 6 s'observa com hi ha un article que destaca per sobre dels altres: Martínez-Pérez *et al.*, (2016) que treballa amb un ampli grup de pacients descrivint les seves UDTs a Madrid. Per darrere de l'anterior esmentat amb 17 citacions trobem l'article d'Abras *et al.* (2017), publicació que inclou per primera vegada nadons i nens en un estudi a Barcelona. S'aprecia una tendència a major nombre de citacions en els articles que porten més anys publicats, tot i que amb excepcions (Pérez-Molina *et al.*, 2014), fet esperable ja que porten més temps publicats i han tingut més oportunitats.

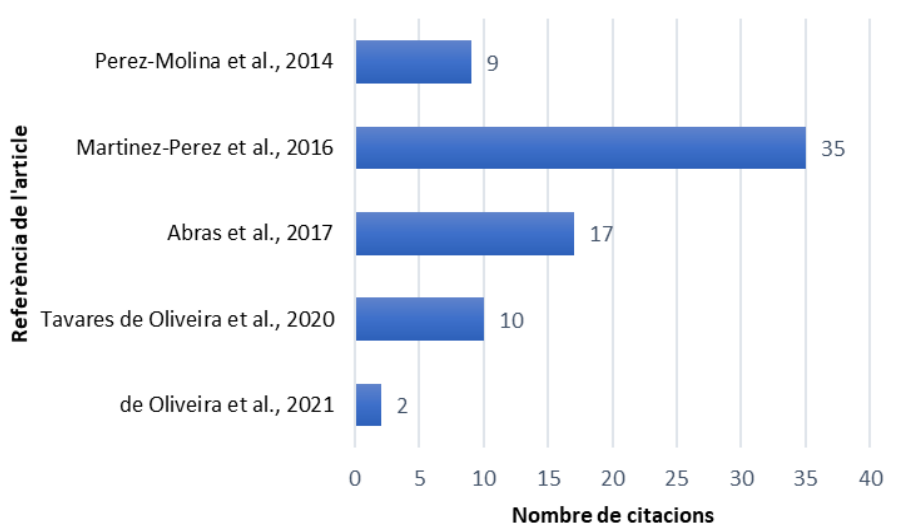


Figura 6. Nombre de cites totals per a cada article seleccionat. Dades fins al gener de 2024.

Tota la informació continguda en els cinc articles analitzats en aquest punt es presenta a continuació en els propers apartats.

4.3. *Trypanosoma cruzi* en hostes humans a Espanya

En el conjunt d'articles seleccionats amb un total de 303 pacients, només 243 tenen la seva UDT caracteritzada (80,2%) (Taula 2). S'observa que en la seva majoria la nacionalitat dels malalts és boliviana, tenen una edat mitjana de 41 anys i són en la seva majoria dones. Com s'ha comentat anteriorment, Abras *et al.*, (2017) també treballa amb cinc mostres de nadons i nens d'entre 21 dies i 10 anys que no s'han tingut en compte pel càlcul de la mitjana d'edat.

La parasitemia fluctuant i el tropisme cel·lular sovint dificulten l'establiment de les UDTs amb exactitud. La parasitemia és més elevada en fase aguda pel que en els infants sol ser més fàcil de detectar el paràsit ja que es tracta de casos d'infecció congènita (Martínez-Pérez *et al.*, 2016). Cal tenir en compte que en tots els articles estudiats, la caracterització de les UDTs presents es va realitzar a partir de mostres de sang.

Taula 2. Conjunt de dades recopilades en els cinc articles seleccionats (Abras *et al.*, 2017; Martínez-Pérez *et al.*, 2016; Pérez-Molina *et al.*, 2014; Tavares de Oliveira *et al.*, 2020).

Article	Nacionalitat	Nombre total de pacients	Nombre de pacients caracteritzats	Edat mitjana	Sexe	Clínica	Temps a Espanya
Pérez-Molina <i>et al.</i> (2014)	Bolívia	33	27	36a (IQR: 31-43.3)	23 D 10 H	4 C	60 mesos (IQR: 43-81)
Martínez-Pérez <i>et al.</i> (2016)	93,3 % Bolívia	149	105	36a (IQR: 29-45)	70 D 35 H	28C 5 D	5 anys (IQR: 3-5)
Abras <i>et al.</i> (2017)	Bolívia	20	10	1m-45a	3 D 7 H	ND	ND
Tavares de Oliveira <i>et al.</i> (2020)*	76% Bolívia	101	101	48,2a (24-80)	67 D 43 H	53 IND 48 C	ND

a: anys, m: mesos, D: dona, H: home, C: cardíaca, D: digestiva, IND: fase crònica indeterminada, ND: no determinat/da, IQR: rang interquartílic.

*de Oliveira *et al.* (2021) no ha estat inclòs a la Taula 2 degut a que té en consideració els resultats del seu estudi anterior (Tavares de Oliveira *et al.*, 2020) i avalua la existència de la variabilitat genètica de TcV explicada al punt 4.7.

En general, no hi ha prou dades sobre el temps de residència dels pacients però articles com el de Pérez-Molina *et al.*, (2014) i Martínez-Pérez *et al.*, (2016) van tractar amb malalts que porten residint al país aproximadament cinc anys. El nombre de pacients amb una única UDT és de 219, el que representa el 90,1% (219/243) del total de pacients amb caracteritzats. La caracterització de les UDTs sense tenir en compte les infeccions mixtes es troben a continuació a la Taula 3.

Taula 3. Recopilació de pacients amb UDTs caracteritzades exceptuant les infeccions mixtes (n=219) (Abrás *et al.*, 2017; Martínez-Pérez *et al.*, 2016; Pérez-Molina *et al.*, 2014; Tavares de Oliveira *et al.*, 2020).

UDTs	Nombre de pacients	Percentatge de pacients (%)
TcI	5	2,28
TcII	10	4,57
TcIII	-	-
TcIV	22	10,05
TcV	106	48,40
TcVI	2	0,91
TcII/V/VI	33	15,07
TcII/TcVI	41	18,72
TOTAL	219	100

Del total de pacients caracteritzats, sense tenir en compte les infeccions mixtes, s'observa que gairebé el 50% presenten TcV. El gran nombre de pacients bolivians corrobora el gran nombre de pacients caracteritzats amb TcV ja que es tracta de la UDT més comú al país i també la més comú en sang perifèrica, mostra a partir de la que s'ha fet la caracterització (Abrás *et al.*, 2017).

4.4. Infeccions mixtes

Diverses UDTs poden infectar de forma simultània a un mateix hoste humà (Pérez-Molina *et al.* 2014). En els estudis seleccionats s'han trobat un total 24 infeccions mixtes, el que correspon al 9,9% del total de pacients caracteritzats (Taula 4). Pérez-Molina *et al.* (2014) va descriure infeccions mixtes en sis dels 33 pacients d'origen bolivià a Madrid (18%). Aquests presentaven combinacions de diferents UDTs: dos pacients amb TcI + TcIV, dos amb TcIV + TcV, un amb TcI + TcV i un últim pacient amb TcII + TcVI. A l'article Martínez-Pérez *et al.* (2016), 16 dels 105 pacients caracteritzats (15,2%) van presentar infeccions mixtes: quatre TcI + TcIV, set TcI + TcV i cinc amb TcIV + TcV. La majoria dels pacients amb UDT caracteritzada provenen de Bolívia (98; 93,3%). Abrás *et al.* (2017) va detectar dos pacients d'entre els 10 totals amb infeccions mixtes: un pacient amb TcV + TcII/V i va reportar el primer cas d'infecció mixta TcV + TcII observat en migrants bolivians. A més, l'estudi inclou per primera vegada la caracterització de les UDTs de *T. cruzi* en nadons a Espanya. En els treballs més recents, Tavares de Oliveira *et al.* (2020) i de Oliveira *et al.* (2021), no es van descriure infeccions mixtes.

Taula 4. Recopilació de pacients amb infeccions mixtes (Abrás *et al.*, 2017; Martínez-Pérez *et al.*, 2016; Pérez-Molina *et al.*, 2014; Tavares de Oliveira *et al.*, 2020).

UDTs	Nombre de pacients	Percentatge de pacients (%)
TcI + TcIV	6	25
TcI + TcV	8	33,33
TcIV + TcV	7	29,17
TcII + TcVI	1	4,17
TcV + TcII/V	1	4,17
TcV + TcII	1	4,17
TOTAL	24	100

D'entre tots els estudis, TcII + TcVI només va ser present en una persona, resultat coherent ja que aquestes dues UDTs són rarament reportades a Bolívia (Pérez-Molina *et al.*, 2014).

4.5. Caracterització de les UDTs post-tractament

Martínez-Pérez *et al.* (2016) va realitzar una segona determinació de la UDT en 19 pacients dels 105 caracteritzats després del tractament amb benznidazol 5mg/kg durant 60 dies o nifurtimox 10mg/kg durant 90 dies (Taula 5).

Taula 5. Canvis de la UDT post-tractament en 19 pacients. ND: No detectat. Extret de Martínez-Pérez *et. al* (2016).

Pacient	UDT abans de tractament	UDT després de tractament
1	V	I
2	V	II
3	V	II
4	V	III
5	V	IV
6	I + IV	IV
7	V	IV
8	IV	V
9	V	V
10	V	V
11	I + V	V
12	V	V
13	V	V
14	IV	V
15	ND	IV
16	V	ND
17	IV	ND
18	V	ND
19	V	ND

En el cas del pacient número 15 no es va poder determinar la UDT abans del tractament i en quatre individus més (pacients 16, 17, 18 i 19) no es va detectar cap UDT després del tractament. En el cas dels 14 pacients restants es van poder determinar les UDTs pre i post tractament amb èxit. Es van donar dos casos d'infeccions mixtes determinades pre-tractament (pacients 6 i 11), en els quals després del tractament una de les UDTs va persistir en sang mentre que l'altra no es va detectar més. En vuit pacients hi va haver un canvi en la UDT (Martínez-Pérez *et al.*, 2016).

Aquest fet deriva de que *T. cruzi* pot infectar una àmplia varietat de cèl·lules i determinades UDTs mostren preferència per teixits específics. Factors com la parasitemia intermitent o el tropisme cel·lular poden afectar a la determinació de les UDTs ja que s'ha observat l'emascament d'un llinatge per la presència d'un altre (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2019; Sánchez *et al.*, 2013). Per tant, l'absència o baixa presència d'algunes UDTs de *T. cruzi* a les mostres pot ser deguda a la seva localització als teixits o a una baixa parasitemia en sang (Abrás *et al.*, 2017).

4.6. Distribució geogràfica de les UDTs

4.6.1. Segons país d'origen

Segons els estudis treballats (Abrás *et al.*, 2017; de Oliveira *et al.*, 2021; Martínez-Pérez *et al.*, 2016; Pérez-Molina *et al.*, 2014; Tavares de Oliveira *et al.*, 2020), el 87% de malalts de Chagas a Espanya dels que s'ha pogut determinar la/les UDT tenen nacionalitat boliviana (212/243) (Figura 7). Dels 212 pacients que provenen de Bolívia, dos són nascuts a Espanya de pares bolivians i 106 manifesten la UDT TcV, la més predominant a Bolívia (Zingales *et al.*, 2012).

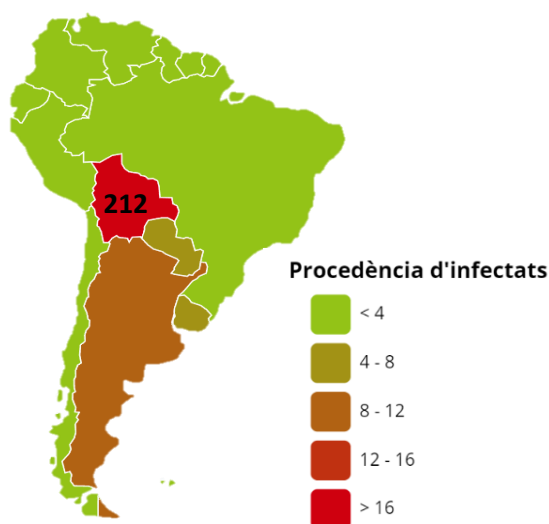


Figura 7. País d'origen dels 243 pacients dels que s'han pogut caracteritzar les UDTs (Abrás *et al.*, 2017; de Oliveira *et al.*, 2021; Martínez-Pérez *et al.*, 2016; Pérez-Molina *et al.*, 2014; Tavares de Oliveira *et al.*, 2020).

4.6.2. Segons lloc de residència

Tots els articles seleccionats van treballar amb individus atesos a hospitals de Barcelona (majoritàriament Hospital Universitari Vall d'Hebron, Hospital Clínic i Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) i Madrid (Hospital Universitari Ramón y Cajal) (Figura 8) (Abrás *et al.*, 2017; de Oliveira *et al.*, 2021; Martínez-Pérez *et al.*, 2016; Pérez-Molina *et al.*, 2014; Tavares de Oliveira *et al.*, 2020). Això és possiblement degut a dos motius, a la preferència de les grans ciutats per la migració llatinoamericana i a la centralització dels estudis de caracterització realitzats a Espanya. Les dades de l'OPI corroboren aquesta informació ja que indiquen que la majoria de bolivians tenen la seva residència a grans ciutats com Madrid (14.842) i Barcelona (17.732).



Figura 8. Província de residència dels pacients amb Chagas dels que s'ha pogut caracteritzar les UDTs (Abrás *et al.*, 2017; de Oliveira *et al.*, 2021; Martínez-Pérez *et al.*, 2016; Pérez-Molina *et al.*, 2014; Tavares de Oliveira *et al.*, 2020).

4.7. El cas de TcV a Espanya

Segons tota la informació recollida, es pot observar que el llinatge genètic TcV és el que presenta la major incidència de casos importats de Chagas a Espanya (Abrás *et al.*, 2017; de Oliveira *et al.*, 2021; Martínez-Pérez *et al.*, 2016; Pérez-Molina *et al.*, 2014; Tavares de Oliveira *et al.*, 2020). Per aquesta raó l'estudi realitzat per de Oliveira *et al.* (2021) va descriure la variabilitat genètica dins de la UDT TcV en 27 pacients bolivians amb malaltia de Chagas crònica atesos a Barcelona. D'aquests, vuit eren homes i 19 dones, 17 d'ells classificats amb la forma indeterminada de la malaltia i 10 amb miocardiopatia chagàsica (de Oliveira *et al.*, 2021).

L'estudi mitjançant LSSP-PCR (de l'anglès, *low stringency single primer-polymerase chain reaction*), va demostrar l'existència d'una taxa de variabilitat intra-UDT de TcV d'alta a

moderada. Breument, la tècnica es basa en la modificació de les condicions de la PCR tradicional per permetre que els encebadors es puguin unir a múltiples llocs de l'ADN, incloent regions amb petites variacions de seqüència. De Oliveira *et al.* (2021) va fer l'associació entre la presència de certs al·lels de *T. cruzi* amb l'absència de manifestacions clíniques en pacients amb la forma indeterminada de Chagas. Aquest fet, tot i que s'ha de comprovar en mostres més grans, sembla indicar que hi podria haver regions específiques en el genoma de *T. cruzi* que es podrien correlacionar amb les característiques clíniques de la malaltia de Chagas en pacients en fase crònica (de Oliveira *et al.*, 2021).

4.8. Problemàtica de la caracterització

Els factors limitants per a la caracterització de les UDTs de *T. cruzi* són: (i) la baixa parasitèmia en la fase crònica de la malaltia ja que la sensibilitat disminueix de manera notable i amb ella la probabilitat de caracteritzar la diversitat intraespecífica del paràsit; (ii) Utilitzar mostres clíniques de sang perifèrica degut a la dificultat de realitzar una biòpsia de teixit cardíac o digestiu (Abrás *et al.*, 2017). Tal i com s'ha esmentat anteriorment, algunes UDTs presenten tropisme tissular, és a dir, tenen preferència per uns determinats teixits. El fet d'utilitzar la sang com a mostra per caracteritzar fa que es puguin detectar les UDTs amb més tendència a trobar-se circulant en sang però que altres llinatges que poden estar presents en teixits passin desapercebuts (Zingales, 2018).

Un altre fet a tenir en compte són les dianes moleculars utilitzades per a la caracterització de les UDTs de *T. cruzi*. Els marcadors moleculars utilitzats habitualment per a la identificació de les UDTs es troben en un baix nombre de còpies per genoma parasitari pel que moltes vegades no permeten la caracterització directa de les mostres amb baixa càrrega de paràsits i cal utilitzar mètodes indirectes com el cultiu (Silvestrini *et al.*, 2024). Aquest fet també pot comportar un biaix en els resultats de caracterització perquè se sap que hi ha certes UDTs que creixen millor en cultiu que d'altres i que, per tant, també podrien emmascarar la presència de certs llinatges a la mostra (Abrás *et al.*, 2017).

Algunes de les dianes moleculars més utilitzades són les regions intergèniques del miniexó (*spliced leader intergenic region*, SL-IR), l'ADN ribosomal 24S α (ADNr 24S α), el fragment nuclear A10 (A10) i la citocrom oxidasa II (CO-II). Pel que fa a les tècniques de caracterització, aquestes es solen basar en PCR convencional o PCR a temps real (Figures 9 i 10).

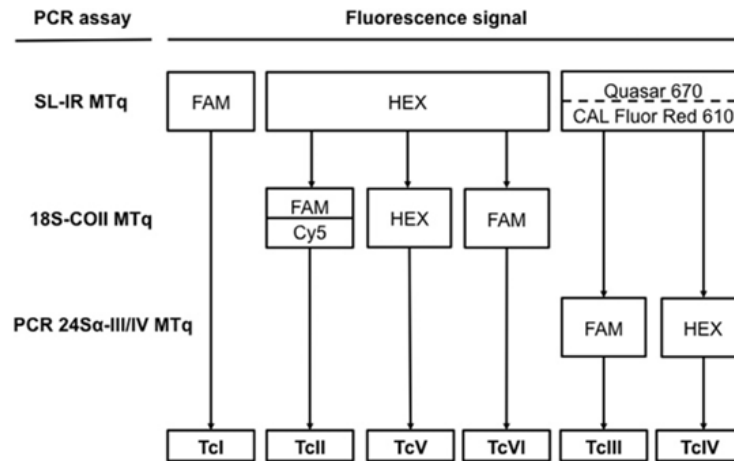


Figura 9. Algoritme de caracterització de *T. cruzi* basat en PCR a temps real (Abrás *et al.*, 2017). FAM, HEX, Cy5, Quasar 670 i CAL Fluor Red 610: marcadors de fluorescència per a sondes. La línia contínua indica la necessitat de reactivitat tant en senyals de fluorescència FAM com Cy5. La línia de punts indica la necessitat de reactivitat en almenys un dels dos senyals (Quasar 670 i CAL Fluor Red 610).

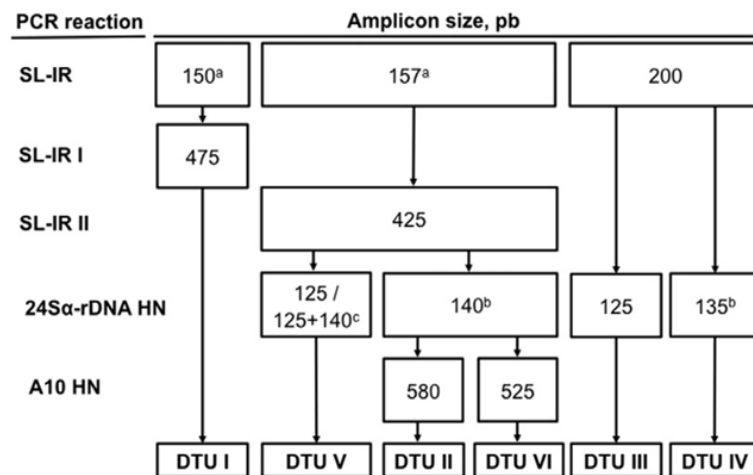


Figura 10. Algoritme de caracterització de *T. cruzi* basat en PCR convencional. La mida de l'amplicó s'indica en parells de bases (Abrás *et al.*, 2017).

Per solucionar el problema de la caracterització, Ramírez *et al.* (2017) va proposar l'ús de l'ADN satèl·lit del paràsit (ADN nuclear altament repetitiu utilitzat com a diana diagnòstica), per caracteritzar les UDTs. Degut a l'elevat nombre de còpies d'ADN satèl·lit (10^5) presents al genoma del paràsit utilitzar aquest diana podria fer augmentar notablement la taxa d'èxit en la caracterització de *T. cruzi*. De fet, les PCRs diagnòstiques dirigides a l'amplificació de l'ADN satèl·lit presenten molt bona sensibilitat (Duffy *et al.*, 2013). Tanmateix, tot i que Ramírez *et al.* (2017) van trobar alguns polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs) propis de cada UDT, amb aquest mètode de moment no es pot arribar a caracteritzar a nivell d'única UDT en la majoria de casos.

4.9. Consideracions finals

La presència de diferents UDTs en el mateix hoste indiquen la necessitat de realitzar estudis amb mostres de teixit i sang de pacients malalts per comparar tots els genotips de *T. cruzi* presents en un mateix individu, ja que probablement no seran els mateixos (Silvestrini *et al.*, 2024). No obstant, aquesta comparativa es sol fer post-mortem degut al caràcter invasiu de l'obtenció d'una mostra de teixits cardíac o digestiu. L'ús de seqüències altament repetitives com l'ADN satèl·lit tenen un impacte significatiu en estudis clínics i epidemiològics ja que poden ser aplicats a mostres amb una baixa càrrega parasitària. Tanmateix, es requereix més investigació per optimitzar la resolució de les tècniques de genotipatge (Silvestrini *et al.*, 2024).

La UDT present amb més freqüència a les mostres estudiades és TcV, la que està associada a malaltia cardíaca lleu i a formes digestives de megaesòfag o megacòlon. També s'associa a un major risc d'infecció congènita (Zingales i Macedo, 2023). Aquestes dades s'han de tenir en compte per la gestió de la malaltia a Espanya. Per altra banda, sembla que la diversitat intra-UDT també té un paper clau en el desenvolupament clínic de la malaltia de Chagas pel que cal tenir-la en compte (de Oliveira *et al.*, 2021).

5. CONCLUSIONS

The conclusions of this Bachelor's Thesis are:

- Studies analyzing the genetic diversity of *T. cruzi* in Spain, as well as in Europe, are extremely limited. There is a clear knowledge gap in this field.
- DTUs were successfully characterized in the 80.2% of the patients included in the studies. Parasite load was a limiting factor for characterization.
- After treatment, other DTUs, that were probably previously hidden in the tissues, appeared in the blood. Characterization from peripheral blood could have an effect of masking the presence of some DTUs.
- The 87% of Chagas patients included in the five studies analyzed are Bolivians and most of them were attended in Barcelona and Madrid.
- The most identified DTU was TcV, one of the most common genotypes in Bolivia and predominant in peripheral blood samples.
- TcV is related to cardiac and digestive symptoms and to an increased risk of congenital infection.
- The 9.9 % of the samples analyzed showed mixed infections. This information should be considered in Chagas disease control programs in Spain.
- Intra-DTU diversity plays a key role in the clinical features in patients with chronic Chagas disease.
- The molecular characterization of *T. cruzi* based on highly repetitive targets such as satellite DNA has the benefit that it can be applied with low parasitic loads but has the limitation that it cannot classify *T. cruzi* populations at the level of a single DTU.
- More resolute methods for *T. cruzi* DTUs characterization are needed, and future studies should go in this direction.

6. AGRAÏMENTS

Aquest treball no s'hagués pogut realitzar sense l'ajuda de la meva tutora la Dra. Alba Abras, que m'ha proporcionat des de la seva experiència tota la informació i m'ha guiat en aquest món tan nou i fascinant per mi com és la malaltia de Chagas.

Agrair també a tota la resta de docents que han anat acompanyant-me durant aquest camí, gràcies per fer-me estimar el món de la biologia. Gràcies a la meva família i parella per creure més en mi que jo mateixa.

Finalment, gràcies Andrea, per esforçar-te sempre a donar el millor de tu.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abras, A., Ballart, C., Fernández-Arévalo, A., Pinazo, M.-J., Gascón, J., Muñoz, C., & Gállego, M. (2022). Worldwide Control and Management of Chagas Disease in a New Era of Globalization: A Close Look at Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 35(2), e00152-21, <https://doi.org/10.1128/cmr.00152-21>.
- Abras, A., Gallego, M., Muñoz, C., Juiz, N. A., Carlos Ramírez, J., Cura, C. I., Tebar, S., Fernández-Arévalo, A., Pinazo, M.-J., de la Torre, L., Posada, E., Navarro, F., Espinal, P., Ballart, C., Portús, M., Gascón, J., & Schijman, A. G. (2017). Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain). *Parasitology International*, 66(2), 83-88, <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.12.003>.
- Álvarez-Hernández, D.-A., Franyuti-Kelly, G.-A., Díaz-López-Silva, R., González-Chávez, A.-M., González-Hermosillo-Cornejo, D., & Vázquez-López, R. (2018). Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Revista Médica del Hospital General de México*, 81(3), 154-164, <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.010>.
- Antinori, S., Galimberti, L., Bianco, R., Grande, R., Galli, M., & Corbellino, M. (2017). Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *European Journal of Internal Medicine*, 43, 6-15, <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.05.001>.
- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers, L. E., Fornaciari, G., & Allison, M. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 2034-2039, <https://doi.org/10.1073/pnas.0307312101>.
- Basile, L., Jansá, J. M., Carlier, Y., Salamanca, D. D., Angheben, A., Bartoloni, A., Seixas, J., Gool, T. V., Cañavate, C., Flores-Chávez, M., Jackson, Y., Chiodini, P. L., Albajar-Viñas, P., & Disease, W. G. on C. (2011). Chagas disease in European countries: The challenge of a surveillance system. *Eurosurveillance*, 16(37), 19968, <https://doi.org/10.2807/ese.16.37.19968-en>.
- Bayona-Carrasco, J., & Avila-Tàpies, R. (2020). Latin Americans and Caribbeans in Europe: A Cross-Country Analysis. *International Migration*, 58(1), 198-218, <https://doi.org/10.1111/imig.12565>.
- Bern, C. (2015). Chagas Disease. *The New England Journal of Medicine*, 373(5), 456-466, DOI: [10.1056/NEJMra1410150](https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150).
- CDC - DPDx— American Trypanosomiasis. (2021, junio 14), <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1, 159-218, <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>.
- Chagas, C. (1916). Tripanosomíase americana: Forma aguda da molestia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 8, 37-60, <https://doi.org/10.1590/S0074-02761916000200003>.
- Coura, J. R., & Dias, J. C. P. (2009). Epidemiology, control, and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 31-40, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900006>.
- De Fuentes-Vicente, J. A., Santos-Hernández, N. G., Ruiz-Castillejos, C., Espinoza-Medinilla, E. E., Flores-Villegas, A. L., de Alba-Alvarado, M., Cabrera-Bravo, M., Moreno-Rodríguez, A., & Vidal-López, D. G. (2023). What Do You Need to Know before Studying Chagas Disease? A Beginner's Guide. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(7), Article 7, <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8070360>.

- De Fuentes-Vicente, J. A., Vidal-López, D. G., Flores-Villegas, A. L., Moreno-Rodríguez, A., De Alba-Alvarado, M. C., Salazar-Schettino, Paz. M., Rodríguez-López, M. H., & Gutiérrez-Cabrera, A. E. (2019). *Trypanosoma cruzi*: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. *Acta Trópica*, 195, 51-57, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.024>.
- De Oliveira, M. T., Sulleiro, E., da Silva, M. C., Silgado, A., de Lana, M., da Silva, J. S., Molina, I., & Antonio Marin-Neto, J. (2021). Intra-Discrete Typing Unit TcV Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi* in Chronic Chagas' Disease Bolivian Immigrant Patients in Barcelona, Spain. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 665624, <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.665624>.
- Duffy, T., Cura, C. I., Ramírez, J. C., Abate, T., Cayo, N. M., Parrado, R., Bello, Z. D., Velázquez, E., Muñoz-Calderón, A., Juiz, N. A., Basile, J., Garcia, L., Riarte, A., Nasser, J. R., Ocampo, S. B., Yadon, Z. E., Torrico, F., de Noya, B. A., Ribeiro, I., & Schijman, A. G. (2013). Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1), e2000, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002000>.
- Dvorak, J. A., Hall, T. E., Crane, M. St. J., Engel, J. C., Mcdaniel, J. P., & Uriegas, R. (1982). *Trypanosoma cruzi*: Flow Cytometric Analysis. I. Analysis of Total DNA/Organism by Means of Mithramycin-Induced Fluorescence. *The Journal of Protozoology*, 29(3), 430-437, <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1982.tb05427.x>.
- Erazo, D., & Cordovez, J. (2016). Modeling the effects of palm-house proximity on the theoretical risk of Chagas disease transmission in a rural locality of the Orinoco basin, Colombia. *Parasites & Vectors*, 9(1), 592, <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1884-8>.
- Fabbro, D. L., Danesi, E., Olivera, V., Codebó, M. O., Denner, S., Heredia, C., Streiger, M., & Sosa-Estani, S. (2014). Trypanocide Treatment of Women Infected with *Trypanosoma cruzi* and Its Effect on Preventing Congenital Chagas. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(11), e3312, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003312>.
- Flores-Chávez, M. D., Abras, A., Ballart, C., Ibáñez-Pérez, I., Pérez-Gordillo, P., Gallego, M., Muñoz, C., Moure, Z., Sulleiro, E., Nieto, J., García Diez, E., Simón, L., Cruz, I., & Picado, A. (2022). Parasitemia Levels in *Trypanosoma cruzi* Infection in Spain, an Area Where the Disease Is Not Endemic: Trends by Different Molecular Approaches. *Microbiology Spectrum*, e02628-22, <https://doi.org/10.1128/spectrum.02628-22>.
- Infografías OPI. (s/f). Gob.es. Recuperat el 24 de febrer de 2024, de <https://www.inclusion.gob.es/documents/2178369/2907372/infografias.html?stock>.
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Frontiers in Public Health*, 7, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2019.00166>.
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P. A., Trejo-Varón, J. A., Carranza, J. C., Pinto, C. M., Serrano, M. G., Buck, G. A., Camargo, E. P., & Teixeira, M. M. G. (2015). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent UDT (discrete typing unit). *Acta Trópica*, 151(1), 166-177, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>.
- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana Jr., M., Junqueira, A. C. V., Veludo, H. H., Maia Da Silva, F., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V. L. B., & Teixeira, M. M. G. (2009). A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, 136(6), 641-655, <https://doi.org/10.1017/S0031182009005861>.
- Martínez-Pérez, A., Poveda, C., David Ramírez, J., Norman, F., Girones, N., Guhl, F., Monge-Maillo, B., Fresno, M., & López-Vélez, R. (2016). Prevalence of *Trypanosoma cruzi*'s Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain. *Acta Tropica*, 157, 145-150, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.032>.

Moncayo, A. (2003). Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 577-591, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000500001>.

Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., Ribeiro, A. L., & Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of Cardiology. (2013). Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767-776, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>.

Onyekwelu, K. C. (2019). Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Invertebrate and the Vertebrate Hosts. En *Biology of Trypanosoma cruzi*. IntechOpen, <https://doi.org/10.5772/intechopen.84639>.

Peña-Callejas, G., González, J., Jiménez-Cortés, J. G., Fuentes-Vicente, J. A. de, Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., Flores-Villegas, A. L., Peña-Callejas, G., González, J., Jiménez-Cortés, J. G., Fuentes-Vicente, J. A. de, Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., & Flores-Villegas, A. L. (2022). Enfermedad de Chagas: Biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 25, <https://doi.org/10.22201/fez.23958723e.2022.449>.

Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82-94, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).

Pérez-Molina, J. A., Poveda, C., Martínez-Pérez, A., Guhl, F., Monge-Maillo, B., Fresno, M., López-Vélez, R., Ramírez, J. D., & Gironés, N. (2014). Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain. *Infection genetics and evolution*, 21, 440-442, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.018>.

Ramírez, J. C., Torres, C., Curto, M. de los A., & Schijman, A. G. (2017). New insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006139, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006139>.

Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).

Rey León, J. A. (2021). La justicia social en salud y su relación con la enfermedad de Chagas. *Revista Cubana de Salud Pública*, 46, e1264, <https://www.scielo.org/article/rcsp/2020.v46n4/e1264/#>.

Romay-Barja, M., Boquete, T., Martínez, O., González, M., Arco, D. Á.-D., Benito, A., Blasco-Hernández, T. (2019). Chagas screening and treatment among Bolivians living in Madrid, Spain: The need for an official protocol. *PLOS ONE*, 14(3), e0213577, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213577>.

Sánchez, L. V., Bautista, D. C., Corredor, A. F., Herrera, V. M., Martínez, L. X., Villar, J. C., & Ramírez, J. D. (2013). Temporal variation of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in asymptomatic Chagas disease patients. *Microbes and Infection*, 15(10), 745-748, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.06.008>.

Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(SUPPL. 1), 75-85, <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000093>.

Silvestrini, M. M. A., Alessio, G. D., Frias, B. E. D., Sales Júnior, P. A., Araújo, M. S. S., Silvestrini, C. M. A., Brito Alvim de Melo, G. E., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., & Martins, H. R. (2024). New insights into *Trypanosoma cruzi* genetic diversity, and its influence on parasite biology and clinical outcomes. *Frontiers in Immunology*, 15, 1342431, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1342431>.

Stevens, L., Dorn, P. L., Schmidt, J. O., Klotz, J. H., Lucero, D., & Klotz, S. A. (2011). Chapter 8—Kissing Bugs. The Vectors of Chagas. En L. M. Weiss, H. B. Tanowitz, & L. V. Kirchhoff (Eds.), *Advances in Parasitology* (Vol. 75, pp. 169-192), <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00008-3>.

Tavares de Oliveira, M., Sulleiro, E., Silgado Giménez, A., de Lana, M., Zingales, B., Santana da Silva, J., Antonio Marín-Neto, J., & Molina, I. (2020). Quantification of parasite burden of *Trypanosoma cruzi* and

identification of Discrete Typing Units (UDTs) in blood samples of Latin American immigrants residing in Barcelona, Spain. *PLoS Neglected tropical diseases*, 14(6), e0008311, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008311>.

Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: The need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 85-104, [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(97\)00180-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00180-x).

Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5), 472-481, [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9).

Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trópica*, 184, 38-52, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M., & Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-1054, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>.

Zingales, B., & Macedo, A. (2023). Fifteen Years after the Definition of *Trypanosoma cruzi* UDTs: What Have We Learned? <https://doi.org/10.20944/preprints202311.0380.v1>.

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240-253, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>.