

CAPÍTULO II

VARIABILIDAD GENÉTICA



Variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* y estudio epidemiológico molecular de clones involucrados en la infección transplacentaria en Chile.

Lic Alejandro P. García Carreño

Una gran gama de herramientas moleculares se han utilizado para el estudio epidemiológico de las parasitosis. Todas estas metodologías están basadas en la propiedad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación de segmentos específicos del DNA.

Mi experiencia en el ámbito de la epidemiología molecular parasitaria, se basa principalmente en estudio de clones circulantes en Chile de *Trypanosoma cruzi* en recién nacidos (RN) infectados transplacentariamente, en sus vectores biológicos *Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai* y en animales silvestres. Para tales fines, las herramientas moleculares utilizadas son: a) PCR, siendo el DNA blanco la región hipervariable de los minicírculos del DNA del kinetoplasto (kDNA), b) Dot blot, con sondas radiomarcadas específicas para la identificación de los clones TcI y TcII, las cuales hibridizan con los amplificados de 330 pb obtenidos por PCR y c) Dot blot, con sondas quimioluminiscentes para la identificación de DTUs específicos del parásito.

Diversos estudios han establecido que *T. cruzi* comprende un conjunto de poblaciones de cepas que circulan entre vectores, hombre y reservorios, ya sea domésticos o silvestres. Ha sido posible aislar el parásito de diferentes hospederos, pudiendo así demostrar que existe una gran variación intraespecífica en cuanto a diferencias morfológicas de los tripomastigotos, virulencia, patogenicidad, susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica y capacidad para infectar células del hospedero (54).

Se ha evidenciado que el comportamiento de ciertos grupos de parásitos, pueden ser influenciados por factores propios del hospedero o por condiciones ambientales a las que se encuentra expuesto. Estas observaciones han llevado a caracterizar las diferentes cepas de *T. cruzi*, desde varios puntos de vista. De este modo, uno de los principales problemas planteados en nuestros días, se refiere a la posibilidad de saber si las diferencias encontradas en los diversos cuadros clínicos y en la respuesta al tratamiento, pueden atribuirse de alguna manera, a las distintas características biológicas entre las cepas del parásito prevalentes en cada área geográfica, o a las diferencias genéticas existentes entre las poblaciones humanas susceptibles (55). Por otra parte, ha sido posible investigar por diversos métodos, la marcada heterogeneidad que presenta *T. cruzi*, a nivel biológico, bioquímico y molecular, para correlacionarlo con los hallazgos clínicos y epidemiológicos (56, 57).

Se han realizado diversos análisis genéticos de diferentes poblaciones del parásito, cuyos resultados sugieren que *T. cruzi* posee una estructura poblacional clonal, donde cada clón representaría un linaje independiente, debido por un lado, al tipo de reproducción que posee, asexual por fisión binaria y por otro, a su relación a mutaciones que pudieron producirse en el tiempo, a partir de un sólo pariente ancestral (Tibayrenc y cols, 1986, Zhang y cols, 1988).

En cuanto a la caracterización biológica, existe una gran cantidad de estudios que han permitido establecer, que tripomastigotos provenientes de diferentes vectores,



reservorios y zonas de un mismo país, tienen un comportamiento distinto al ser utilizados en animales de laboratorio. Estas diferencias se expresan en los niveles de parasitemia y tropismo por ciertos órganos, así como en el desarrollo de diversas patologías en los mamíferos infectados, incluyendo al ser humano, las que pueden ser, daños leves o hasta la muerte. Estas características tan variables, ha sido atribuidas a diversas causas, como factores ambientales, inmunidad, virulencia, patogenicidad, y el paso por diferentes vectores y hospederos (58,59).

Otra forma de estudiar la variabilidad genética de *T. cruzi*, es por medio de métodos bioquímicos, los cuales permiten observar los productos de la expresión génica. Uno de los métodos más utilizados para detectar diferencias entre enzimas con propiedades catalíticas similares pero con estructuras moleculares diferentes, es el análisis de variantes electroforéticas de enzimas, donde es posible agrupar cepas de acuerdo a sus perfiles isoenzimáticos idénticos, los cuales reciben el nombre de zimodemas.

Miles y cols., en el año 1981 introdujeron la técnica de perfiles isoenzimáticos en el estudio de *T. cruzi*, identificando tres zimodemas en cepas procedentes de Brasil. El zimodema 1 (Z1) es de origen selvático y circula entre animales, triatomas silvestres y es infectante para el hombre; el zimodema 2 (Z2) es de origen domiciliario y comprende cepas aisladas de individuos con Enfermedad de Chagas en etapa aguda o crónica y de animales domésticos; por último el zimodema 3 (Z3) comprende casos humanos autóctonos de Brasil y comparte el ciclo selvático, puesto que ha sido aislado de armadillos y de algunos casos humanos en fase aguda de la enfermedad (60-62).

La existencia del Z2, donde hay participación de hospederos silvestres y domiciliarios en el ciclo de transmisión del parásito, establece la posibilidad de que las isoenzimas pueden ser utilizadas para localizar o rastrear la transferencia de parásitos del ciclo enzootico al doméstico. Además, se ha obtenido heterogeneidad isoenzimática relacionada con la distribución geográfica de las cepas de *T. cruzi*.

La electroforesis isoenzimática también resulta útil para investigar subpoblaciones clonales de una cepa de *T. cruzi*, las cuales presentan diferencias en sus patrones isoenzimáticos respecto de la cepa patrón, demostrando que las cepas del parásito pueden ser heterogéneas en su composición (71).

Para la determinación de marcadores genotípicos de *T. cruzi*, se han utilizado otros métodos basados en el análisis del DNA, como el polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) de los minicírculos del kDNA. Esto ha permitido la identificación de poblaciones de parásitos, clasificándolos con el nombre de esquizodemas (3).

Existen otras investigaciones sobre caracterización molecular de *T. cruzi* en las cuales se utilizan los espaciadores no transcritos (ENT) del RNAr y los fragmentos de restricción de los maxicírculos del DNA del kinetoplasto para formar agrupaciones que coincidan filogenéticamente, estos fragmentos reciben el nombre de kinetodemas (63-66).

Otras investigaciones como las realizadas por Vago y cols. en 1996, estudiaron el polimorfismo del kDNA mediante LSSP-PCR y su relación con el tropismo de



tejidos. Análisis de RAPD – PCR también fueron utilizados para establecer genéticamente la relación de diversos aislados de *T. cruzi*. (Dias Neto y cols., Steindel y cols., Tibayrenc y cols., 1993, Oliveira y cols, 1997, Brisse y cols, 2000), los resultados indicaron un posible filtro de selección de subpoblaciones más adaptadas a un hospedero, lo que implica una relación en el establecimiento de una infección por un clon en particular.

Polimorfismo de mini exón (Borst y Greaves, 1986), polimorfismo de DNA ribosomal (18S) del *T. cruzi*, (León y cols, 1978, Hernandez y cols, 1990, Arruda y cols, 1990), cariotipificación mediante PFGE (Santos y cols, 1997), análisis de microsátélites (Oliveira y cols, 1998, Macedo, 2001), también han sido utilizadas para los estudios moleculares de estructura genética de población y su importancia en la patogénesis de la Enfermedad de Chagas.

La identificación de una estrecha correlación entre los resultados obtenidos con diferentes marcadores moleculares como, mini exón, DNAr, RAPD y microsátélites, generó un consenso sobre la existencia de 2 mayores linajes filogenéticos de *T. cruzi* (Tibayrenc 1995, Souto y cols. 1996, Nunes y cols., 1997 Zingales y cols., 1998). Posteriormente diversos autores correlacionaron esta dicotomía básica del parásito con la parte epidemiológica, bioquímica y biológica de la Enfermedad de Chagas. Sin embargo, la nomenclatura era confusa, por lo cual durante el Simposio Internacional en conmemoración de los 90 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas, realizado en abril de 1999 en Río de Janeiro, Brasil, se homogenizó esta nomenclatura, renombrando los dos mayores linajes como *T. cruzi* I (TcI) y *T. cruzi* II (TcII). Dentro de TcI se encuentran los equivalentes al Zimodema 1, Tipo III, Tipo 1, Linaje II, Grupo I y II, ZI chileno, clonet 19/20, Ribodema II/III, 1^{er} filum mayor, o similares, y en TcII aquellos equivalentes al Zimodema 2, Zimodema A, Tipo II, Tipo 2, Linaje 1, Grupo 2, Ribodema I, Z2a chileno, clonet 33 y 39, 2^{do} filum mayor, o similares (67 - 69).

Nuestros estudios realizados en Chile entre los años 1998 y 2001, en 21 recién nacidos (RN) con enfermedad de Chagas transplacentaria, determinaron que en una zona endémica chagásica, donde la incidencia era de un 13.7%, el clonet 39 (TcII) se presentó en el total de los casos (10/10), y en otra zona también endémica, con una incidencia de 28.2%, se observó el clonet 39 (TcII) en un 72,7% (8/11), seguido del clonet 19/20 (TcI) en un 27,3% (3/11), no encontrándose la presencia del clonet 32. Estos resultados indicarían que la presencia del clonet 19/20 podría ser uno de los factores involucrados con la alta incidencia de la infección por *T. cruzi* en una de las zonas estudiadas. (70)

En el año 2000, Bernabé C. y Brisse S., utilizando clones de *T. cruzi* representativos de los dos linajes mayores y procedentes de variadas áreas geográficas, caracterizaron mediante electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y RAPD, 5 subdivisiones dentro de TcII, designándolas 2a, 2b, 2c, 2d y 2e, y sin establecer subgrupos en TcI (71, 72). Esta subclasificación corresponde a linajes filogenéticos que poseen una divergencia predominante, mantenida a través de una evolución clonal ancestral (73). En el año 2003 Michel Tibayrenc, dentro de estas nuevas divisiones genéticas, incluye el concepto de Unidades de Tipificación Discreta (DTU), las cuales designan a un conjunto de parásitos que son genéticamente más similares entre cada uno de ellos que con otros grupos. El mismo autor, por medio de dendrogramas basados en el análisis de MLEE y RAPD distinguió 6 cluster genéticos o DTUs, correspondiendo el



DTU1 al primer linaje mayor de *T. cruzi* y encontrándose el segundo linaje mayor subdividido en 5 DTUs, (2a - 2e) (74). Estos 6 DTUs, proveen un excelente modelo para estudios evolutivos, haciendo posible la evaluación del impacto de la evolución clonal predominante de *T. cruzi* y su relación con las propiedades biomédicas de esta parasitosis.

Dentro de estos DTUs, el 2d y el 2e corresponden a linajes híbridos estabilizados por una propagación clonal subsecuente, siendo considerados subdivisiones genéticas verdaderas e identificables por un gran número de marcadores genéticos, moleculares e inmunológicos, llamados “tags”. (75)

Basándose en estas observaciones, los investigadores Telleria J. en el año 2003 (76) y Svoboda M. el 2004 (76 y 77), realizaron un análisis filogenético intraespecífico de *T. cruzi*. Para lo cual, secuenciaron las regiones hipervariables de los minicírculos del kDNA de una serie de linajes del parásito, encontrándose entre ciertos grupos, sectores que presentaban homología. Finalmente, a partir de estas secuencias se crearon sondas para la tipificación de este grupo, el 2d, denominándolas **Oli IId1**, **Oli IId2** y **Oli IId3**. Las cepas estudiadas para la secuencia **Oli IId1**, fueron TPK1 awmp268 (AJ748022.1), RN-PVR-0 (AJ748014.1 – AJ748016.1), RN-PCR-0 (AJ748012.1 y AJ748013.1) y MN cl2 (AJ748000.1, AJ748001.1 y AJ748003.1 – AJ748011.1), para **Oli IId2**, Sc43 cl1 (AJ748035.1, AJ748033.1, AJ748030.1, AJ748029.1 y AJ748027.1), TPK1 aislado awmp261, 269 – 272 (AJ748020.1, AJ748023.1 – AJ748026.1), RN-PVR-0 aislado awmp305 (AJ748019.1) y Bug2148 cl1 (AJ747997.1 – AJ747999.1) y para **Oli IId3**, Sc43 cl1 aislados JP702, 705, 706 y 708, (AJ748028.1, AJ748031.1, AJ748032.1 y AJ748034.1) (76, 77).

Entre los años 2004 y 2005, realizamos diversos estudios moleculares, utilizando sondas quimioluminiscentes para la caracterización del DTU 2d de *T. cruzi*, provenientes de individuos chagásicos crónicos, RN con Enfermedad de Chagas transplacentaria, *T. infestans* y animales silvestres (roedores). Los resultados mostraron que las sondas Oli IId1, Oli IId2 y Oli IId3, hibridizaron sólo con el 21,3% (27/127) del total de las muestras positivas por PCR. El DTU 2d en los *T. infestans* se detectó en un 6,6% (4/61) del total de insectos analizados, 5 veces menor que lo observado en los mamíferos estudiados, 34% (16/47). Tanto en humanos como en animales, el DTU 2d presentó una distribución homogénea, 34 (16/47) y 36,8% (7/19) respectivamente, no observándose ninguna diferencia en la distribución de este clon en las muestras de humanos en las regiones estudiadas.

La distribución de los subtipos del DTU 2d (2d1, 2d2 y 2d3) en individuos con Enfermedad de Chagas crónica y en los animales fue similar, a diferencia de lo observado en RN chagásicos en donde el subtipo 2d2 fue el único detectado. Además, los subtipos 2d1 y 2d3, fueron los únicos evidenciados en *T. infestans*, no existiendo diferencia en cuanto a su distribución. (tesis javier)

El posterior análisis de las muestras positivas de las especies de roedores capturados, hibridizados mediante sondas de ADN utilizadas para la identificación de los linajes clonales TcI y TcII, arrojó que el 100% de las muestras de la especie *Rattus rattus* (10/10) correspondieron al clon TcI (silvestre), sin embargo en la especie *Octodon degus*, se encontraron ambos clones, 28,57% (2/7) del TcI y 42,86 (3/7) del TcII. (tesis antonella)



Si se relacionan las distribuciones clonales de *T. cruzi* encontradas en ambas especies de roedores con el hallazgo previo de focos de *T. infestans* en los lugares de captura, una de las posibles respuestas a esta observación, podría ser que *R. rattus* al ser un animal sinantrópico, haya tenido por un lado mayor contacto con los insectos vectores domiciliarios parasitados o exposición mucho más antigua a la infección, logrando controlar inmunológicamente o genéticamente el clon TcII, eliminándolo de su circulación sanguínea selectivamente con respecto a TcI. En cambio *O. degus*, presentó ambos clones, lo que pudiera atribuirse a sus hábitos silvestres (Muñoz, 2000), que lo han mantenido alejado a la exposición de los triatomíneos domésticos y por lo tanto a la infección por *T. cruzi*. Además, si consideramos a lo anterior, la reciente colonización de estos sectores silvestres por parte de los triatomíneos domiciliarios (Bacigalupo *et al.*, 2006) y a un contacto ocasional con estos animales de esta especie, su selección clonal no sería específica dado al reciente contacto con el *T. cruzi*.

Estos resultados son preliminares, por tal motivo es importante seguir estudiando un mayor número de casos, como también ampliar las especies de hospederos involucrados en el ciclo y las zonas analizadas, y si es posible contar con nuevas sondas que detecten los demás DTUs, para así tener una visión general de la distribución de los genotipos clonales en Chile y su posible implicancia en la epidemiología de la Enfermedad de Chagas.

Para mayor información escribir a: agarcia@med.uchile.cl, fono: 56-2-6817911 fax: 56-2-6814499.

