
APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA NOVEDOSA EN LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Recchimuzzi Giannina, Carrillo Ileana, Carrasco Hernán
Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios
Instituto de Medicina Tropical (UCV)
hjcarrasco@yahoo.com

Resumen

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas y está subdividido en 6 genotipos o unidades discretas de tipificación (DTU). Esta enfermedad es endémica del continente Americano y afecta alrededor de 16 millones de habitantes. La determinación del genotipo es de vital importancia debido a su relación con los cuadros clínicos de la enfermedad que están asociados a cada uno de ellos, así como a su distribución geográfica en el continente Americano. En el presente estudio se logró establecer un protocolo de trabajo mediante la aplicación de la técnica PCR-RFLP, la cual consiste en la amplificación por PCR de regiones específicas del genoma de *T. cruzi* y su posterior digestión con enzimas de restricción, permitiendo la genotipificación completa de diferentes aislados de *T. cruzi*. Esta metodología también permitió evidenciar los caracteres recombinantes de varios eventos de hibridación ocurridos entre los genotipos parentales de la especie *T. cruzi*. El algoritmo desarrollado en este trabajo, permite determinar de una manera rápida, segura y sencilla el genotipo de cualquier aislado de *T. cruzi*, ubicándolo dentro de uno de los 6 genotipos actualmente reconocidos para el parásito. La determinación del genotipo es de gran importancia epidemiológica para el control y la prevención de la transmisión de cepas circulantes en una determinada región endémica, para la vigilancia en la movilización de formas clínicas más severas hacia zonas donde se consideraban ausentes, así como también a países donde la enfermedad de Chagas estaba ausente.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, epidemiología molecular, enfermedad de chagas, enfermedad endémica, genoma

Introducción

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado de la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida, y agente causal de la Tripanosomiasis Americana, conocida también como enfermedad de Chagas, la cual se encuentra ampliamente distribuida en el continente americano. En 2002, la Organización Mundial de la Salud reportó de 16 a 18 millones de personas infectadas por el parásito, 300 mil casos nuevos por año y 21 mil muertes, principalmente niños (WHO, 2002).

Diversos métodos han sido utilizados para la caracterización de los distintos grupos de *T. cruzi*, basándose en las características morfológicas, biológicas, bioquímicas y moleculares con el fin de agrupar a nivel fenotípico y genotípico las diferentes poblaciones de este parásito. Los resultados de estas investigaciones han sido utilizados en estudios clínicos y epidemiológicos para determinar la posible relación entre aislados del parásito y las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas (WHO, 2002). La diferencia en cuanto a la severidad de la enfermedad en el hospedador humano y en otros mamíferos, se ha atribuido a la diversidad genética que presentan los parásitos (Lammel *et al.*, 1985; Magalhaes *et al.*, 1996).

Los diferentes genotipos de *T. cruzi* muestran relación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, tal que, los genotipos *T. cruzi* II, V y VI (TcII, TcV, TcVI), se relacionan directamente con el desarrollo de megacolon o megaesófago, encontrándose con mayor incidencia en países de Suramérica, mientras que en Venezuela y en otros

países de Centroamérica, se presenta la cardiopatía chagásica como única manifestación clínica y se relaciona con el genotipo TcI (Higo *et al.*, 2004). La movilización de personas infectadas en Latinoamérica representa un riesgo de infección en regiones no endémicas de la enfermedad (Pena *et al.*, 2009), ya que esta enfermedad puede ser transmitida por transfusiones de sangre, trasplantes de órganos y transmisión congénita, por lo tanto, no se limita únicamente a los países donde es endémica (WHO, 2002). La diversidad genética de *T. cruzi* ha sido estudiada a través de muchas técnicas de biología molecular. El objetivo principal del presente trabajo fue la estandarización de un método de PCR-Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) para la identificación genotípica de aislados de *T. cruzi* pertenecientes a los genotipos TcI al VI.

Materiales y Métodos

Población y Muestra

Seis cepas de referencia internacional de los seis genotipos de *T. cruzi*. Cinco de ellas provenientes de Brasil, las cuáles proceden del banco criogénico del Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios del Instituto de Medicina Tropical. La sexta cepa de referencia internacional, procede Bolivia y fue donada por la Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón.

Extracción del ADN de *T. cruzi*

Los diferentes aislados fueron crecidos y mantenidos en cultivos en medio RPMI. Cuando el cultivo llegó a 20×10^6 epimastigotes/ml, el ADN fue extraído siguiendo el protocolo de extracción y

purificación del kit NUCLEON según las instrucciones del fabricante. La pureza y la concentración del ADN se determinaron midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

Genotipificación de los distintos aislados mediante la técnica de PCR-RFLP

Para la amplificación del gen *gp72* se utilizaron los iniciadores *gp72(f)* (5'-GCG GAC AGT GCC AAC AAC CT-3') y *gp72(r)* (5'-CGC CGA ACT TCC AAC CAT CAG-3') bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguida por 33 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 65°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos, y una última extensión de 8 minutos a 72°C (Rozas *et al.*, 2007). La amplificación de la región intergénica HSP60 se llevó a cabo utilizando los iniciadores HSP60(f) (5'-GTG GTA TGG GTG ACA TGT AC-3') y HSP60(r) (5'-CGA GCA GCA GAG CGA AAC AT-3'), y para el gen que codifica la enzima Glucosa Fosfato Isomerasa (GPI) se emplearon los iniciadores GPI(f) (5'-GGC ATG TGA AGC TTT GAG GCC TTT TTC AG-3') y GPI(r) (5'-TGT AAG GGC CCA GTG AGA GCG TTG GTT TGA ATA GC-3'), utilizando para ambos genes el siguiente protocolo: desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 65°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, y una última extensión de 10 minutos a 72°C (Westenberger *et al.*, 2005). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µl conteniendo buffer 10%, 2 mM MgCl₂,

0,4 mM de dNTPs, 1 U de la enzima *Taq* polimerasa (Invitrogen, Brazil), 10 pg de cada iniciador y 10 ng del ADN molde.

Para la digestión de los fragmentos obtenidos se utilizaron endonucleasas de restricción específicas para cada uno de los genes. El gen *gp72* fue digerido con la enzima *TaqI* de acuerdo con Rozas *et al.* (2007), por otra parte, para la región intergénica HSP60 y para el gen GPI se utilizaron las enzimas *EcoRV* y *HhaI*, respectivamente, de acuerdo con el protocolo establecido por Westenberger *et al.*, (2005).

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y los perfiles de restricción en agarosa a una concentración de 2,5-3%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados con un transiluminador UV. Los marcadores moleculares para estimar el tamaño de cada fragmento fueron Hyperladder I para la región intergénica HSP60 y el gen GPI, y para el gen *gp72*, el Hyperladder V (ambos de la casa comercial BIOLINE).

Resultados y Discusión

T. cruzi muestra un elevado nivel de diversidad genética y es por esto, que una gran cantidad de marcadores genéticos han sido utilizados para la estratificación de la especie en varias subdivisiones, con mayor o menor nivel de resolución dependiendo de los marcadores utilizados, pero aún no existe un consenso de cuáles deben usarse para lograr la resolución de todos los genotipos (Lewis *et al.*, 2009). La técnica PCR-RFLP ha sido utilizada por algunos investigadores para tipificar los distintos genotipos de *T. cruzi* (Westenberger *et al.*, 2005); Rozas

et al., 2007) obteniendo resultados satisfactorios.

En el presente trabajo se realizó, inicialmente, una PCR-RFLP del gen GPI a las 6 cepas de referencia, para así establecer diferencias entre los perfiles de bandas de cada una. Tal como se observa en la Figura 1, se pueden identificar los pares de genotipos I/III, II/IV y V/VI, originando para cada par, perfiles idénticos entre sí. Estos

resultados muestran una gran similitud a los reportados en otro estudio (Lewis *et al.*, 2009). Se observa que los aislados de genotipo TcI y TcIII presentan como producto digerido un par de fragmentos de ≈ 780 y 460 pb, a diferencia de los genotipos TcII y TcIV que generaron un duplete de bandas de ≈ 560 pb y 460 pb. Mientras que los productos de digestión de los genotipos TcV y TcVI muestran 4 fragmentos de ≈ 780 , 560 , 460 y 220 pb.

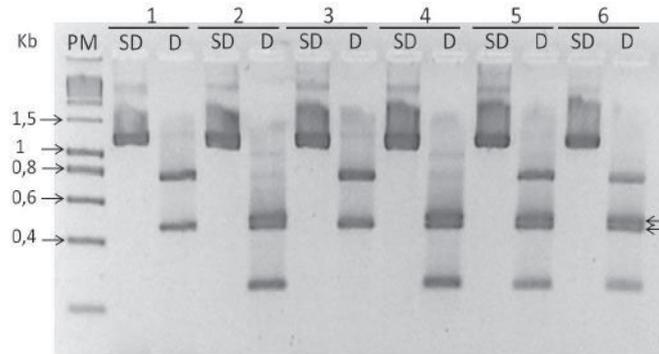


Figura 1. Productos de digestión del gen GPI obtenidos con la enzima HhaI. PM: Hyperladder I; Cepas de referencia: 1: TcI; 2: TcII; 3: TcIII; 4: TcIV; 5: TcV; 6: TcVI. SD: Producto sin digerir; D: Producto digerido. Agarosa 3%, 80V.

Si bien *T. cruzi* presenta una forma de replicación clonal, con este resultado también podemos evidenciar que los genotipos TcIII y TcIV son, posiblemente, productos de la recombinación ancestral de los DTUs I y II, mostrando los alelos de cada parental, lo que quiere decir que TcIII hereda los dos alelos del genotipo TcI, mientras que el genotipo TcIV hereda los dos alelos de TcII, representando así, el primer evento de hibridación dando lugar a dos genotipos homocigotos. Por otro lado, los genotipos TcV y TcVI son heterocigotos y son producto de la recombinación de los genotipos TcII y

TcIII, evidenciando el segundo evento de hibridación (Brisse *et al.*, 2003), Westenberger *et al.*, 2005).

Posteriormente, para la diferenciación entre los pares obtenidos, se utilizaron otros genes y enzimas de restricción. En las Figuras 2 y 3, se presentan los patrones de bandas obtenidos de los productos digeridos de la región intergénica HSP60 con la enzima de restricción *EcoRV* y el gen *gp72* con la enzima *TaqI*, respectivamente.

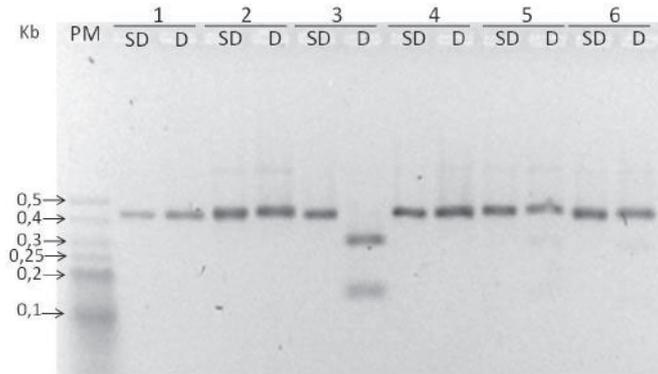


Figura 2. Productos de digestión de la región intergénica HSP60 obtenidos con la enzima *EcoRV*. PM: Hyperladder V; Cepas de referencia: 1: TcI; 2: TcII; 3: TcIII; 4: TcIV; 5: TcV; 6: TcVI. TcVI. SD: Producto sin digerir; D: Producto digerido. Agarosa 2,5%, 80V.

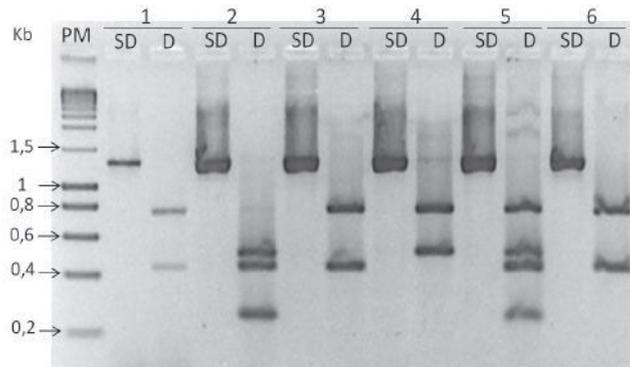


Figura 3. Productos de digestión del gen *gp72* obtenidos con la enzima *TaqI*. PM: Hyperladder I; Cepas de referencia: (1: TcI; 2: TcII; 3: TcIII; 4: TcIV; 5: TcV; 6: TcVI. SD: Producto sin digerir; D: Producto digerido. Agarosa 2,5%, 80V.

En la Figura 2, se logró discriminar a TcIII del resto de los DTUs, ya que este genotipo generó un par de fragmentos de ≈ 300 y 150 pb como productos de digestión, mientras que el genotipo TcI no presenta el sitio de restricción para la enzima *EcoRV*. Por otro lado, con la digestión del gen *gp72* (Figura 3) se

obtuvo que, a excepción de las cepas TcI y TcIII, los otros genotipos presentan perfiles distintos, permitiendo entonces la identificación de cuatro de los seis DTUs de *T. cruzi*.

Para TcII se obtuvieron 3 bandas de ≈ 500 , 420 y 260 pb, a diferencia del TcIV que sólo generó dos fragmentos de ≈ 720

y 500 pb. El genotipo TcV, por su parte, mostró 4 fragmentos de ≈ 720 , 500, 420 y 260 pb, a diferencia del genotipo TcVI a partir del cual sólo se generó un par de bandas de ≈ 720 y 420pb. Los fragmentos generados en este estudio se corresponden con los obtenidos por Rozas *et al.*, (2007), y así mismo muestran concordancia con la clasificación de *T. cruzi* en 6 DTUs obtenida por RAPD y MLEE, corroborando la validez de este

procedimiento para la identificación genotípica de este parásito.

En base a estos resultados, se elaboró un flujograma o algoritmo que sirve para la genotipificación de cualquier aislado de *T. cruzi* (Figura 4), independientemente de su procedencia, dentro de uno de los 6 genotipos principales propuestos por el comité de expertos internacionales (Zingales *et al.*, 2009).

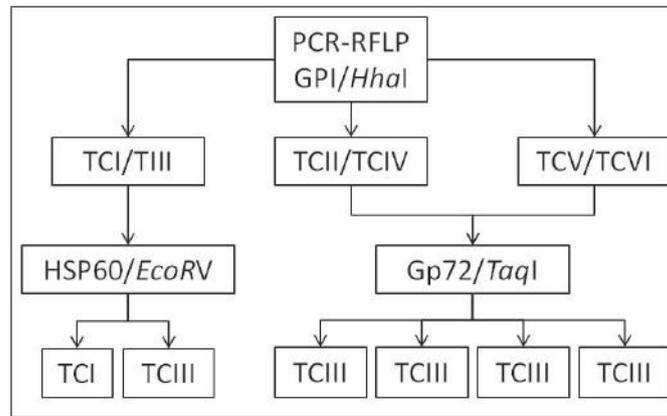


Figura 4. Algoritmo para la genotipificación de aislados de *T. cruzi*.

La identificación de los diferentes DTUs es de gran importancia para los estudios clínicos y epidemiológicos de la enfermedad. Por otro lado, permite la exploración de la posible relación entre la diversidad genética de *T. cruzi* y el pleomorfismo en la severidad y síntomas de la enfermedad que se observa en diferentes regiones del continente (Rozas *et al.*, 2007). Actualmente, es de gran importancia evaluar la distribución de los genotipos de *T. cruzi*, ya que de esta forma se podría evidenciar la dinámica de desplazamiento de los mismos en Latinoamérica, existiendo la posibilidad de que puedan movilizarse de una

zona geográfica a otra, y dando pie a la dispersión de los genotipos relacionados con las formas clínicas más severas de la enfermedad. Por ejemplo, en los países ubicados hacia el Sur de Latinoamérica es posible encontrar megasíndromes chagásicos (Miles, 1981), los cuáles se encuentran ausentes hacia el norte de América del Sur (Di Noia *et al.*, 2002).

Conclusiones

Se estandarizó un método basado en la técnica PCR-RFLP que permite la genotipificación de aislados de *T. cruzi* provenientes de cualquier localidad, ubicándolos dentro de uno de los 6

genotipos actualmente reconocidos para el parásito.

La técnica PCR-RFLP permitió la obtención de perfiles de restricción diferentes, los cuales evidenciaron los eventos de hibridación ocurridos entre los genotipos TcI y TcII y entre TcII y TcIII.

Los tres ensayos de esta técnica utilizados en este trabajo, mostraron un elevado potencial para la resolución de los 6 DTUs de *T. cruzi*, incluso sobre los DTUs V y VI, que anteriormente la mayoría de los estudios realizados basados en PCR-RFLP no lograban diferenciar (Lewis *et al.*, 2009).

El algoritmo de tipificación demostró ser rápido, fácil de aplicar, reproducible y económico, en comparación con otros métodos más laboriosos y complicados.

Agradecimiento

Este estudio fue realizado con apoyo financiero a través del proyecto de Grupo FONACIT G-2005000827.

Referencias Bibliográficas

Brisse, S.; Henriksson, J.; Barnabe, C.; Douzery, E.; Berkvens, D.; Serrano, M. (2003). Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Genet. Evol.* 2: 173-183.

Di Noia, J.; Buscaglia, C.; De Marchi, C.; Almeida, I.; Frasch, A. (2002). A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas disease is due to a single parasite lineages. *J. Exp. Med.* 195: 401-413.

Higo, H.; Miura, S.; Horio, M.; Mimori, T. (2004). Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitol. Int.* 53: 337-344.

Lammel, E.; Muller, L.; Isola, L.; González, S. (1985). Effect of vector on infectivity of *T. cruzi*. *Acta Trópica.* 42: 149-55.

Lewis, M.; Matthew, J.; Carrasco, H.; Llewellyn, M.; Miles, M. (2009). Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 1041-1049.

Magalhaes, J.; Andrade, S.; Sherlock, Y. (1996). *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomine (biological and biochemical patterns). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paul.* 38: 23-28.

Miles, M. (1981). Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strain (Zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease. *Lancet.* 1:1338-1340.

Pena, S.; Machado, C.; Macedo, A. (2009). *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 108-114.

Rozas, M.; De Doncker, S.; Adai, V.; Coronado, X. (2007). Multilocus Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment-Length Polymorphism Genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): Taxonomic and clinical applications. *JID.* 195: 1-8.

Westenberger, S.; Bernabé, C.; Campbel, D.; Sturm, N. (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetic society of*

America. 171: 527-543.
World Health Organization. (2002). Chagas Disease. Special program for research and training in Tropical Diseases. Geneva.
Zingales, B.; Andrade, S.; Briones, M.; Campbell, D.; Chiari, E. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104: 1051-1054.