

GENETICA DE LAS POBLACIONES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* : CONOCIMIENTOS ACTUALES

Brenière S.F. ¹, Bosseno M.F.¹ & Espinoza B. ²

El conocimiento de las enfermedades por transmisión vectorial se basa en varios aspectos de los cuales la variabilidad genética de los organismos puede jugar un papel preponderante en la epidemiología. A partir de los años 60 y gracias al desarrollo de la técnica de electroforesis de proteínas, se evidenció en los organismos una inmensa variabilidad genética que fue mucho más extensa de lo que se pensaba anteriormente. *Trypanosoma cruzi*, parásito unicelular causante del Mal de Chagas, no fue la excepción. En cambio, trabajos pioneros de la década de los 70 mostraron que este parásito presenta una gran heterogeneidad isoenzimática (Toyé, 1974; Miles *et al.*, 1977). De manera general, las proteínas son codificadas por genes muy polimorfos que existen bajo la forma de dos o varios alelos, los alelos de estos genes son generalmente codominantes expresándose los dos en los individuos heterocigotos. Así, la electroforesis de isoenzimas expresa indirectamente los genotipos de los genes correspondientes, por lo tanto es una herramienta muy útil para los genetistas de poblaciones. Desde hace varios años, se desarrollaron estudios sobre la variabilidad isoenzimática de cepas de *T. cruzi* aisladas de diversos huéspedes, en países de la mayoría del Cono Sur, incluyendo un amplio muestreo de cepas bolivianas (Tibayrenc *et al.*, 1983, 1984 & 1986; Tibayrenc & Miles, 1983). A partir de estos datos se analizó el modo de multiplicación de este parásito en la naturaleza y se concluyó que *T. cruzi* se multiplica de manera asexual generando así una estructura de las poblaciones esencialmente clonal (Tibayrenc *et al.*, 1981 & 1991a; Tibayrenc & Ayala, 1988). Esta estructura clonal implica la existencia de entidades independientes (clones), las cuales pueden presentar propiedades biológicas diferentes.

¹ IRD, calle Cicerón n° 609, Col. Los Morales, AP 11530, México DF.

² Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México DF.

Planteamiento del problema

Varias preguntas fundamentales justifican el estudio de la variabilidad genética de las poblaciones de *T. cruzi* :

¿Cuáles son las unidades taxonómicas biológicamente importantes? - La estructura de la variabilidad de un organismo y su interpretación están basados en el estudio de los intercambios genéticos entre los miembros de una población. Los efectos de estos intercambios permiten determinar a través de la genética de poblaciones y del análisis filogenético si una determinada “especie” puede considerarse como una unidad taxonómica genéticamente relevante o si está compuesta de subunidades correspondientes a especies crípticas, subpoblaciones o linajes de clones (en el caso de reproducción clonal). Estos subgrupos evolutivos son las unidades válidas para los estudios integrados de la biología, ecología y epidemiología de los organismos.

¿Cuáles son las relaciones evolutivas entre las diferentes unidades taxonómicas? - La genética de poblaciones permite medir los lazos genéticos entre grupos de organismos e individualizar grupos monofiléticos que pueden ser luego considerados como unidades taxonómicas para el estudio de otros factores. No todos los marcadores son forzosamente apropiados para este estudio. Los marcadores que evolucionan principalmente por mutaciones puntuales son los mejores para medir distancias evolutivas entre los organismos y las isoenzimas han sido ampliamente utilizadas para este propósito.

¿Cuáles son las implicaciones epidemiológicas de la variabilidad? - La detección de las unidades taxonómicas con utilidad en epidemiología de *T. cruzi* en los diferentes hospederos (vectores y mamíferos) y su repartición geográfica tienen varias consecuencias en el conocimiento de la enfermedad:

- identificación de las especies principales y secundarias de vectores,
- evaluación de las relaciones entre ciclos domésticos y silvestres,
- identificación de reservorios,
- relaciones con endemidad y patología humana.

***Trypanosoma cruzi* y clonalidad**

El estudio del modo de reproducción planteó el análisis de los intercambios de genes (flujo genético) entre cepas de *T. cruzi* a partir de los datos isoenzi-

máticos. Tibayrenc y colaboradores propusieron un análisis original basado sobre la hipótesis de poblaciones panmícticas porque es la única situación para la cual las probabilidades estadísticas están bien establecidas. En ninguna población los autores obtuvieron estadísticas en conformidad con la hipótesis de panmixia. Consecuentemente, propusieron la hipótesis clonal como modelo de reproducción de este parásito en la naturaleza (Tibayrenc *et al.*, 1981 & 1991a; Tibayrenc & Ayala, 1988; Tibayrenc, 1995).

Los análisis comparativos de varios marcadores polimórficos mostraron una alta correlación con los diferentes zimodemas identificados (Morel *et al.*, 1980; Tibayrenc & Ayala, 1987; Brenière *et al.*, 1991; Solari *et al.*, 1992). La correlación entre marcadores polimórficos independientes es consistente con la existencia de un desequilibrio de ligación en una población, concepto que apoya la estructura clonal (Tibayrenc *et al.*, 1991a). Un desequilibrio de ligación se puede observar en caso de estructuración geográfica para una especie, pero en este caso los genotipos multilocus más frecuentes tienden a localizarse en una misma área. En el caso de *T. cruzi* se observó que los genotipos más frecuentes tenían una repartición geográfica muy extensa, lo que confirmó una reproducción clonal (Tibayrenc *et al.*, 1991a; Tibayrenc 1995).

Algunos trabajos sugirieron la presencia de intercambios genéticos en este organismo (Bogliolo *et al.*, 1996; Carrasco *et al.* 1996). Así, Carrasco y colaboradores demostraron la existencia de intercambios genéticos entre cepas genéticamente muy relacionadas de la selva amazónica, de tal manera que la hipótesis de panmixia en esta población no pudo ser rechazada (Carrasco *et al.*, 1996). El modelo clonal no excluye los fenómenos de intercambios genéticos entre las cepas pero no son suficientemente frecuentes para que los genotipos actuales (o zimodemas) sean considerados como entidades inestables y transitorias.

Diversidad clonal del taxón *Trypanosoma cruzi*

Las isoenzimas son enzimas con la misma función pero de movilidad electroforética diferente. La movilidad depende de la carga de la proteína la cual está ligada esencialmente a su estructura primaria. La estructura primaria evoluciona por mutaciones puntuales, la selección interviene poco a este nivel. Así, las isoenzimas son marcadores evolutivos igual a un reloj molecular. El análisis isoenzimático permite estudiar el modo de reproducción de los organismos y medir distancias evolutivas entre organismos y luego construir filogenias.

Miles y colaboradores propusieron dividir el taxón *T. cruzi* en tres grupos de cepas identificables por su perfil isoenzimático, llamados zimodema Z1, Z2 y Z3 (Ready & Miles, 1980; Miles *et al.*, 1981). Inicialmente, cada zimodema era bastante homogéneo. Posteriormente, el estudio de 250 cepas brasileñas sobre la base de 6 a 18 loci enzimáticos mostró una mayor variabilidad pero cada cepa se podía fácilmente relacionar a uno de los zimodemas previamente descritos (Miles *et al.*, 1980). Luego, Tibayrenc & Ayala (1988) analizaron un gran número de cepas de origen geográfico más diverso identificando 43 perfiles isoenzimáticos diferentes sin poder delimitar grupos genéticos (análisis cladístico). Finalmente, podemos concluir que el taxón *T. cruzi* se caracteriza por un gran número de clones distribuidos sobre largas áreas geográficas con algunos clones más frecuentes llamados clones mayores (Tibayrenc & Brenière, 1988). Las distancias evolutivas, calculadas a partir de los análisis de similitudes de perfiles isoenzimáticos, pueden ser enormes entre pares de clones. Las divergencias genéticas observadas entre algunas cepas de *T. cruzi* son análogas a las observadas entre cepas de *Leishmania* pertenecientes a diferentes complejos y especies (Tibayrenc, 1998). Las leishmaniasis son enfermedades que presentan diversas patologías estrechamente relacionadas con la variabilidad genética de los agentes. La patología de la enfermedad de Chagas es también variable pero la relación con la variabilidad genética del parásito es hasta ahora una hipótesis de trabajo.

El número de clones identificados en el taxón *T. cruzi* no es limitado, el incremento de las cepas estudiadas y de la resolución de las técnicas utilizadas para el estudio del genoma (aumento de marcadores genéticos) nos permitira detectar mayor variabilidad.

En el Cono Sur, en numerosas situaciones se observó una mayor diversidad de clones de *T. cruzi* en los ciclos silvestres. Los ciclos silvestres presentan una importante complejidad, en una misma área intervienen varias especies de vectores y numerosos mamíferos. También, la intervención de intercambios genéticos ocasionales podría ser la fuente de esta mayor diversidad (Bogliolo *et al.*, 1996; Carrasco *et al.*, 1996).

Los clones de *Trypanosoma cruzi* se distribuyen en dos linajes principales

Datos isoenzimáticos (22 loci) y análisis recientes por RAPD de 24 y luego 50 cepas representativas de la diversidad del taxón, mostraron que las poblaciones de *T. cruzi* se reparten en dos principales linajes ("clade" o filum),

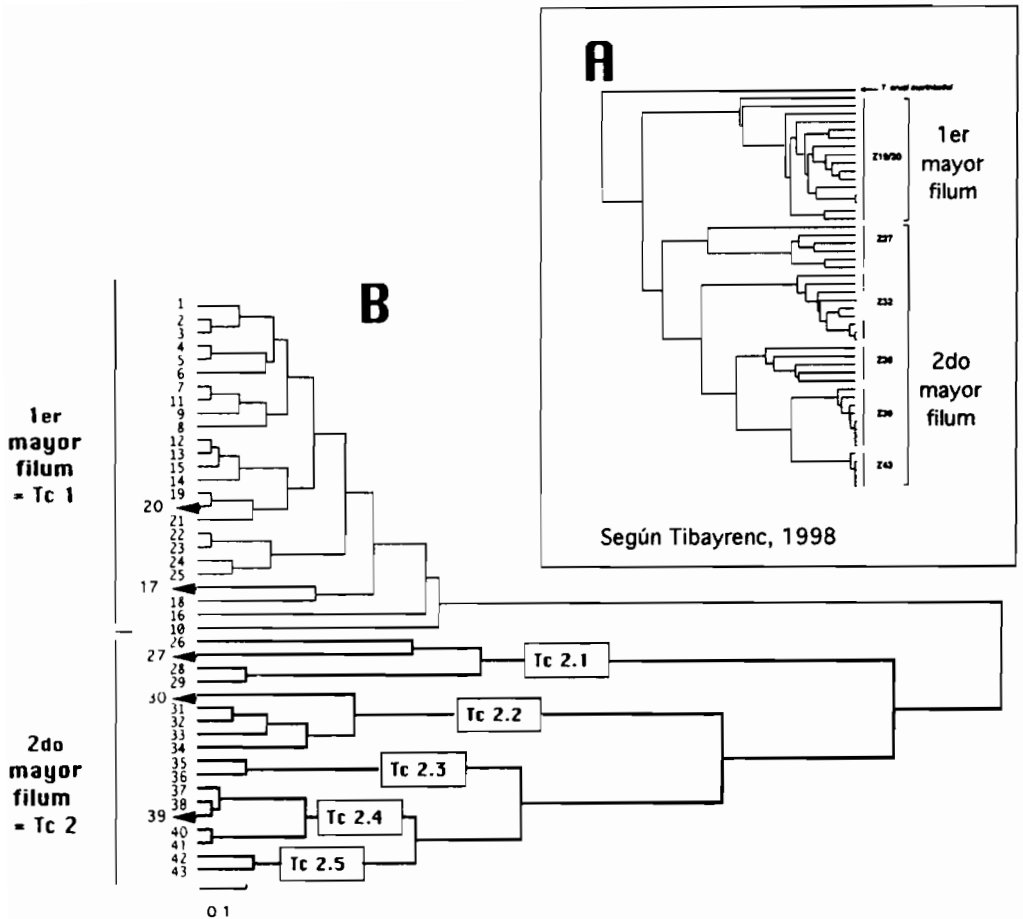


Figura 1. (A) Dendrograma (UPGMA, "Unweighted Pair-Group Method") construido a partir de los datos de un análisis RAPD de cepas de *T. cruzi* representativas de la diversidad del taxón según Tibayrenc (1998). (B) Dendrograma UPGMA construido a partir de la matriz de distancias de Nei según los datos de Tibayrenc y Ayala (1988). Los números identifican los diferentes zimodemas previamente descritos (1 a 43); los zimodemas 17, 30 y 27 corresponden respectivamente a las cepas de referencia Z1, Z2 y Z3 de Miles; los zimodemas 20 y 39 corresponden a los clones mayores 20 y 39 encontrados en Bolivia. La correspondancia entre la nueva nomenclatura y la propuesta en B es: Tc1=Z19/20, Tc2.1=Z27, Tc2.2=Z32, Tc2.3=Z36, Tc2.4=Z39 y Tc2.5=Z43.

cada uno muy polimorfo (Fig. 1A) (Tibayrenc, 1995 & 1998; Tibayrenc *et al.*, 1993; Brisse, 1997; Brisse *et al.*, 1998). Los dos principales linajes se pueden visualizar por la clasificación numérica de los datos de Tibayrenc & Ayala (1988) (15 loci) como lo ilustra el dendrograma de la Fig. 1B. La adición de marcadores isoenzimáticos y su comparación con un marcador independiente (RAPD) aportó una mayor certeza a la interpretación filogenética de los datos (Tibayrenc, 1998). Además, análisis de genes de mini exón y del ARN ribosomal 24Sa muestran un dimorfismo estrictamente concordante con los dos linajes de *T. cruzi* (Souto *et al.*, 1996); estos marcadores son asimilables a caracteres sinapomorfos y confirman la división filogenética del taxón *T. cruzi* en dos grandes grupos.

Varios índices de distancias fenéticas y genéticas se usan para establecer similitudes de caracteres entre cepas y construir dendrogramas para figurar las relaciones evolutivas entre las cepas (escuela de la taxonomía numérica o fenética). La escuela cladística propone un análisis diferente de los datos, donde la filogenia de cada carácter está tomada en cuenta. Elegimos un muestreo representativo de la diversidad del taxón y aplicamos estos diferentes análisis sobre datos isoenzimáticos (22 loci) y RAPD separadamente o acumulados. Siempre se evidenciaron los dos grandes linajes agrupando las mismas series de cepas (Brenière, resultados no publicados).

Las cepas previamente nombradas Z1 por Miles *et al.* (1977) y el clon 20, mayor en Bolivia, pertenecen al mismo linaje. Las cepas nombradas Z2 y Z3 por Miles y el clon 39, segundo clon mayor encontrado en Bolivia pertenecen al otro linaje (Miles *et al.*, 1977 & 1981; Ready & Miles, 1980; Tibayrenc *et al.*, 1986; Brenière *et al.*, 1989, 1991 & 1995).

¿Cual es la organización genética de los clones dentro de cada linaje?

Filogenias construidas a partir de análisis isoenzimáticos y RAPD - Recientemente, un análisis por RAPD de cepas representativas de la diversidad isoenzimática de *T. cruzi*, sugiere una estructuración de uno de los linajes en 5 subdivisiones o clades (Brisse, 1997; Tibayrenc, 1998; Brisse *et al.*, 1998)(Fig. 1). Los dos linajes como los subgrupos son todos identificables por varias bandas RAPD específicas (caracteres sinápomorfos; Brisse, 1997). La topología de las cepas, obtenida a partir de los datos RAPD, es notablemente similar a la del dendrograma construido a partir del análisis por 15 loci isoenzimáticos (Fig. 1A & B). Muchas de las cepas analizadas son comunes a estos dos estudios y sus

posiciones relativas son similares debido a la fuerte correlación entre los dos marcadores (Tibayrenc *et al.*, 1993; Steindel *et al.*, 1993). No se excluye una estructuración del otro linaje en grupos genéticamente distintos pero no son identificables con los análisis actuales. En este linaje, las divisiones observadas presentaron probabilidades de agrupamiento bajas (bajos valores de “bootstrap”) y no se observaron caracteres RAPD y isoenzimáticos sinapomorfos entre las diferentes divergencias del árbol (Brisse, 1997).

Sondas del ADN del cinetoplasto para caracterización de clones de T. cruzi

- En base a los estudios filogenéticos se estudiaron las homologías de las secuencias de las partes variables de los minicírculos del ADN del cinetoplasto (HVRm) entre las cepas de *T. cruzi*. Estas HVRm fueron fácilmente obtenidas de cualquier cepa del taxón *T. cruzi* por PCR, usando como cebadores secuencias de 20 pares de bases complementarias de las partes constantes de los minicírculos del cinetoplasto. Sondas preparadas a partir de los productos de amplificación (las HVRm) del ADN de cepas de referencia, hibridaron específicamente con las HVRm de grupos de clones genéticamente muy relacionados: la sonda 39 reconoció a todos los miembros de un subgrupo del segundo mayor filum nombrado clonet 39 (Fig. 1, Tc 2.4; Veas *et al.*, 1991; Brenière *et al.*, 1998); la sonda 32 reconoció a otro subgrupo del mismo filum (Tc 2.2, dato no publicado). La tercera sonda estudiada, sonda 20, reconoció un subgrupo de clones del primer mayor filum nombrado clonet 20 que se puede considerar como un grupo monofilético (Vea *et al.*, 1991; Brenière *et al.*, 1995 & 1998). Estos datos y otros muestran que las secuencias de las HVRm de varios kinetoplastidae pueden distinguir específicamente grupos genéticos (unidades taxonómicas útiles; Mathieu Daudé *et al.*, 1994; Brenière *et al.*, 1996).

Propuesta para una nomenclatura del taxón *T. cruzi*

La concordancia entre varios análisis del genoma de *T. cruzi* permite considerar la división del taxón en dos linajes biológicamente válida. Consecuentemente, proponemos que estos dos linajes o fila se llamen Tc 1 y Tc 2 (Fig. 1B). Por otro lado, existen buenos argumentos filogenéticos para subdividir el linaje Tc 2 en 5 subgrupos (Brisse, 1997; Brisse *et al.*, 1998). Se propone la numeración siguiente para estos grupos: Tc 2.1, Tc 2.2, Tc 2.3, Tc 2.4 y Tc 2.5 (Fig. 1B). El clonet 20 incluido en Tc 1, representaría un grupo monofilético y la confirmación de tal resultado en base a un mayor muestreo de cepas y a análisis adicionales permitiría nombrarlo Tc 1.1. La puesta en evidencia de subestructuración dentro de los grupos del linaje Tc 2 podría fácilmente introducirse a la

nomenclatura por un nombramiento tipo Tc 2.1.1. Tc 2.1.2 por ejemplo. Algunas cepas presentan posiciones taxonómicas difíciles de establecer; una cepa intermedia entre Tc 1 y Tc 2 perteneciente al taxón *T. cruzi* se podría indicar como Tc 0; una cepa perteneciente a Tc 2, no claramente relacionada a uno de los 5 grupos actualmente identificados, se podría nombrar Tc 2.0.

De acuerdo a esta nueva nomenclatura, Tc 1 incluye las cepas del zimodema 1 de Miles, el clonot 20 y corresponde al primer mayor filum de *T. cruzi*; Tc 2.1 incluye el zimodema 3 de Miles y exclusivamente cepas de ciclos silvestres; Tc 2.2 el zimodema 2 de Miles y cepas de ciclo doméstico frecuentemente identificadas en el Cono Sur (Brasil, Chile, Sur de Bolivia); Tc 2.3 incluye cepas escasamente aisladas de ciclos domésticos y silvestres; Tc 2.4 es bastante homogéneo y se caracteriza por la presencia de perfiles heterocigotos en varios loci, este grupo incluye el clonot 39; finalmente Tc 2.5 presenta también perfiles heterocigotos en varios loci e incluye la cepa de referencia Tulahuen muy conocida por varios laboratorios.