

# ECO-DISTRIBUCION DE LOS CLONES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Barnabé C. <sup>1</sup> & Brenière S.F. <sup>2</sup>

## Introducción

El análisis de la repartición geográfica de los clones de *T. cruzi* en base a una revisión bibliográfica general se dificulta por la falta de normalización de las técnicas (se utilizaron diferentes marcadores genéticos: Macedo *et al.*, 1992; Zavala-Castro *et al.*, 1992; González *et al.*, 1994), por estudios con números reducidos de loci, por la ausencia de análisis filogenéticos en muchos trabajos y la falta del uso de las mismas cepas de referencias. Por lo tanto, decidimos presentar resultados de los análisis isoenzimáticos (15 a 22 loci) desarrollados sobre un mismo soporte (acetato de celulosa), en condiciones experimentales similares, usando las mismas cepas de referencia. La tipificación de las diferentes cepas fue totalmente comparable y se pudo relacionarla con los 6 subgrupos de *T. cruzi* actualmente identificados (Brisse, 1997; Tibayrenc, 1998; Brisse *et al.*, 1998).

En este primer capítulo, en base a los últimos estudios filogenéticos de *T. cruzi*, propusimos una nueva nomenclatura con fines de abandonar una terminología muy confusa. De manera no coordinada varias clasificaciones fueron utilizadas en la literatura, multiplicando la nominación de zimodemas :

- Ready & Miles (1979) propusieron la división del taxón en 3 grupos isoenzimáticos, zimodemas 1, 2 y 3.
- Romanha (1982) describieron 4 tipos isoenzimáticos nombrados ZA, ZB, ZC y ZD.
- Tibayrenc & Miles (1983) distinguieron las cepas bolivianas y brasileñas pertenecientes al zimodema 2 y las nombraron Z2 Bol y Z2 Bra.

---

<sup>1</sup> CEPM, CNRS/IRD9926, IRD, Montpellier, France ;

<sup>2</sup> IRD, calle Cicerón n° 609, Col. Los Morales, AP 11530, México DF

- Tibayrenc & Ayala (1988) identificaron 43 diferentes zimodemas (Z1 a Z43) correspondientes a clones naturales de los cuales algunos, llamados clones mayores (Tibayrenc & Brenière, 1988), fueron frecuentemente encontrados en diferentes áreas geográficas : clones 19, 20, y 39. Los clones 19 y 20 fueron estrechamente relacionados y ambos distantes del clon 39.
- Tibayrenc *et al.* (1991b) propusieron el término de clonet para definir, en poblaciones de reproducción clonal, cepas presentando en común una misma serie de marcadores genéticos.
- a modo de simplificación, Bosseno *et al.* (1996) nombraron clonet 20 y clonet 39 grupos de clones filogenéticamente distintos e hibridados específicamente con sondas de ADN compuestas de las partes hipervariables de los minicírculos del ADN del cinetoplasto. Los clonet 20 y 39 corresponden a grupos de clones monofiléticos (Brenière *et al.*, 1998).
- Tibayrenc (1995) propuso, en base a estudios isoenzimáticos adicionales y RAPD, la división del taxón en 2 principales linajes filogenéticos nombrados primer y segundo mayor filum (Tibayrenc, 1998). Souto *et al.* (1996) corroboraron esta dicotomía del taxón.
- finalmente, Brisse (1997) con un estudio RAPD en paralelo al análisis isoenzimático con 22 loci, confirmó los dos linajes e identificó 6 grupos monofiléticos nombrados Z19/20, Z27, Z32, Z36, Z39, Z43 en referencia a zimodemas representantes de los grupos y identificados por Tibayrenc & Ayala (1988).

La Tabla 1 expone las principales clasificaciones citadas en la literatura y sus correspondencias con la nueva nomenclatura propuesta en el primer capítulo. La primera cifra define las grandes divisiones, la segunda las divisiones dentro de los dos linajes principales.

## Material y métodos

*Origen de las cepas* - Un total de 796 cepas fueron aisladas de diversos huéspedes pertenecientes a ciclos domésticos (78%) y silvestres (22%) en 13 países. Se estudiaron 279 cepas aisladas de humanos (35%) presentando diferentes patologías con documentación parcial y no se pudo analizar los datos respecto a la clínica de la enfermedad de Chagas. Trecientos cuarenta y ocho cepas (44%) fueron aisladas de 13 especies de vectores: 257 de *Triatoma in-*

**Tabla 1.** Correspondencia entre las diferentes clasificaciones de *Trypanosoma cruzi*

Nomenclatura propuesta	Previas nomenclaturas según diferentes autores							
	Ready & Miles 1979	Romanha 1982	Tibayrenc & Miles 1983	Tibayrenc & Ayala 1988	Scuto <i>et al.</i> 1996	Bosseno <i>et al.</i> 1996	Brisse 1997	Tibayrenc 1998
Tc 1	Z1	ZC?	Z1	Z1 a Z25	Linaje 2	incluye clonet 20	Z19/20	1er mayor "clade"
Tc 2.1	Z3	ZC?	Z3	Z26 a Z29	Linaje 1		Z27	2do mayor "clade"
Tc 2.2	Z2	ZA	Z2 Bra	Z30 a Z34	Linaje 1	Clonet 32 (no publicado)	Z32	2do mayor "clade"
Tc 2.3	?	?	?	Z35 y Z36	Linaje 1		Z36	2do mayor "clade"
Tc 2.4	Z2	ZB?	Z2 Bol	Z37 a 41	Linaje 1	Clonet 39	Z39	2do mayor "clade"
Tc 2.5	?	ZB?	?	Z42 y Z43	Linaje 1		Z43	2do mayor "clade"

"clade" = filum

*festans*, 26 de *Rhodnius prolixus*, 16 de *T. sordida*, 11 de *T. spinolai* y 10 de *Panstrongylus geniculatus*. Los reservorios (mamíferos y marsupiales) de *T. cruzi* son muy numerosos y 123 cepas (15,4%) se aislaron de 22 diferentes especies silvestres. Además se estudió 26 cepas aisladas del perro (*Canis familiaris*) consideradas como pertenecientes al ciclo doméstico.

**Análisis isoenzimático** - Cada cepa fue producida en cantidad suficiente por cultivo masivo en medio LIT. Los parásitos fueron lavados y concentrados por centrifugación para obtener un mínimo de 50 mg de peso húmedo de parásitos por cepa. La extracción de las proteínas y las condiciones de electroforesis en acetato de celulosa fueron aplicadas según los protocolos previamente descritos (Ben Abderrazak *et al.*, 1993).

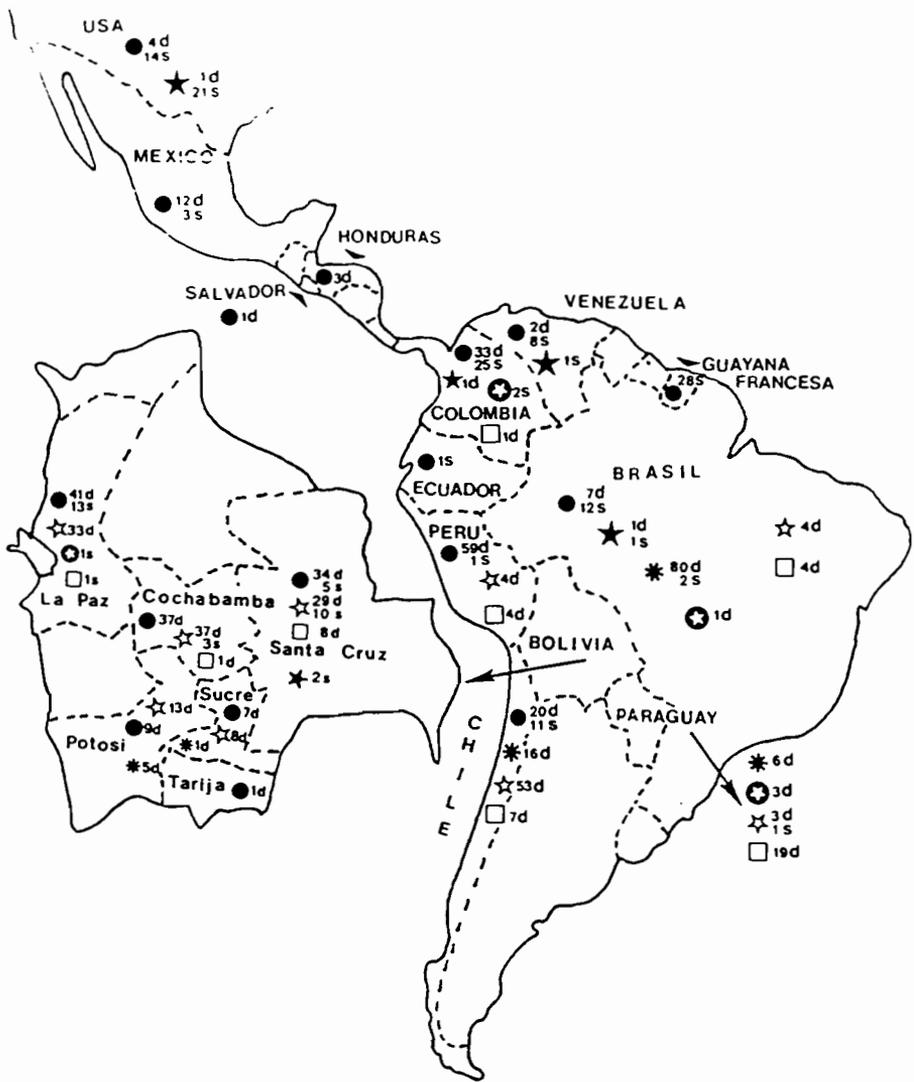
## Resultados

Las cepas se distribuyeron en los dos linajes de *T. cruzi* en las mismas proporciones: Tc 1 (49%) y Tc 2 (51%). La Figura 1 ilustra la repartición geográfica de los diferentes grupos.

Las cepas Tc 1 fueron ampliamente repartidas sobre todo el área de dispersión de *T. cruzi* excepto el Paraguay. Estas cepas estarían ausentes del ciclo doméstico en el Paraguay pero no tuvimos datos sobre cepas de ciclo silvestre. Las cepas Tc 1 presentaron una diversidad genética importante, sin embargo, identificamos un subgrupo de clones (nombrado clon 20) y reconocido por una sonda de ADN del cinetoplasto (Brenière *et al.*, 1998); sería el primer subgrupo monofilético de Tc 1. El clon 20 fue mayor en el ciclo doméstico boliviano y se encontró también con menores frecuencias en otras áreas (Venezuela, Brasil y Perú).

Las cepas Tc 2.1 fueron poco abundantes (3,5%) y presentaron una gran dispersión geográfica. Las cepas de este grupo se aislaron de manera general de los huéspedes silvestres (89,3%) pero pueden escasamente infectar al hombre y al perro cuando estos entran en el ambiente silvestre. Este grupo presentó también una importante diversidad genética.

Las cepas Tc 2.2 se encontraron en la parte sur del Cono Sur (Bolivia, Brasil, Chile y Paraguay) y fueron principalmente aisladas del ciclo doméstico; fue el grupo principal que infectó al hombre en Brasil. La sonda específica de ADN del cinetoplasto (clon 32, Tabla 1) identificó los clones pertenecientes a este grupo.



**Figura 1.** Distribución geográfica de los subgrupos de *T. cruzi* en varios país y diferentes departamentos de Bolivia. La numeración de los clones corresponde a la nueva nomenclatura propuesta en el trabajo anterior "Genética de las poblaciones de *T. cruzi* : conocimientos actuales", en base a los últimos análisis de filogenia de las poblaciones naturales de *T. cruzi*.

● =Tc1, ★ =Tc2.1, \* =Tc2.2, ⊙ =Tc2.3, ☆ =Tc2.4, □ =Tc2.5

Las cepas Tc 2.3 fueron poco abundantes (0.9%) y aisladas de ciclos silvestres y domésticos. Estas cepas estarían sobre todo asociadas al ciclo silvestre pero, al igual de las cepas Tc 2.1, podrían ocasionalmente ser transmitidas a huéspedes del ciclo doméstico.

Las cepas Tc 2.4 y Tc 2.5 se caracterizaron por su estado heterocigoto para varios loci isoenzimáticos y podrían derivar de eventos de recombinación entre las cepas de los grupos Tc 2.2 y Tc 2.3 (Brisse, 1997). Cada uno de estos grupos presentó una baja diversidad genética. Las cepas Tc 2.4 fueron específicamente reconocidas por la sonda del cinetoplasto nombrada 39 y pertenecieron al segundo grupo de cepas encontradas en el ciclo doméstico en Bolivia (Brenière *et al.*, 1998). Los dos grupos fueron principalmente identificados en la parte sur del Cono Sur. Las cepas Tc 2.4 fueron más abundantes que las Tc 2.5 excepto en el Paraguay donde Tc 2.5 fue mayor en el ciclo doméstico.

## Discusión

*Distribución de los subgrupos según los ciclos* - Las cepas Tc 1 fueron aisladas de ciclos domésticos y silvestres pero se observaron diferentes situaciones. En Brasil, las cepas Tc 1 fueron escasamente aisladas de huéspedes de ciclo doméstico. En cambio en Bolivia, *T. infestans*, el vector principal totalmente adaptado al hábitat humano, fue frecuentemente encontrado infectado por cepas del clon 20 que pertenece a Tc 1. En Colombia, las cepas silvestres y domésticas pertenecieron en su mayoría a Tc 1 y presentaron una diversidad genética importante. Sin embargo, se observaron grandes semejanzas genéticas entre las cepas de los dos ciclos. Este resultado apoya la hipótesis de un estrecho contacto entre los ciclos domésticos y silvestres en Colombia, probablemente debido al comportamiento de varias especies de vectores que son a la vez adaptadas a los ecotopos domésticos y silvestres. En Bolivia, las cepas Tc 1 se aislaron de los dos ciclos pero la gran parte de las cepas silvestres presentaron grandes distancias evolutivas con el clon 20 profuso en el ciclo doméstico. Similarmente, pocas cepas del clon 39 (abundante en el ciclo doméstico) fueron halladas en el ciclo silvestre. Los clon 20 y 39 podrían tener un origen silvestre y una adaptación preferencial a *T. infestans*, el único vector doméstico responsable de la enfermedad de Chagas en el país.

*Distribución de los subgrupos en el hombre* - Se pudo aislar de pacientes chagásicos cepas pertenecientes a todos los subgrupos. En México, Colombia, Venezuela y Perú donde las cepas Tc 1 predominaron en los dos ciclos,

los pacientes fueron infectados con cepas de este grupo. En Chile, Brasil y Paraguay la mayoría de las cepas aisladas de humanos pertenecieron a Tc 2 (94,3%) y en Chile, los porcentajes de las cepas Tc 1 (41.6%) y Tc 2 (50.4%) en *T. infestans*, el principal vector de la enfermedad de Chagas, fueron distintos de los de pacientes (Tc 2 = 91.7%,  $P < 0.001$ ). De igual manera, en Bolivia, la caracterización directa de los clonets 20 y 39 en la sangre de pacientes mostró que el clonet 39 (Tc 2.4) se detectó con mayor frecuencia que el clonet 20 (subgrupo de Tc 1), sin embargo, estos clonets presentaron porcentajes similares en *T. infestans* (Brenière et al., 1995 & 1998). Estos resultados sugieren que las cepas Tc 2 son más infectantes para el hombre.

En conclusión, para evaluar las implicaciones médicas de los clones de *T. cruzi*, es necesario identificar los subgrupos de clones directamente en la sangre de los pacientes para evitar las etapas intermedias de aislamiento y cultivo que podrían seleccionar ciertos clones.