

SELECCION DE CLONES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* POR AISLAMIENTO Y CULTIVO

Bosseno M.F.¹, Yacsik N.², Vargas F.² & Brenière S.F.¹

Introducción

Las cepas que infectan a los huéspedes vectores y mamíferos son poblaciones heterogéneas compuestas de varios clones de *T. cruzi* (Miles & Cibulskis, 1986; Tibayrenc *et al.*, 1986; Brenière *et al.*, 1989; Bosseno *et al.*, 1996). La caracterización genética clásica de las cepas de *T. cruzi* (electroforesis de isoenzimas, análisis del ADN) requiere cantidades importantes de parásitos y necesita el aislamiento y el cultivo masivo de las cepas. Las cepas de los vectores se aíslan directamente del tubo digestivo; el hemocultivo y el xenodiagnóstico permiten el aislamiento de cepas de los pacientes. En todos estos casos, se necesita un tiempo largo de multiplicación *in vitro* de los parásitos para lograr cantidades suficientes y durante este proceso se supone que ciertos clones pueden ser seleccionados (Miles & Cibulskis, 1986; Brenière *et al.*, 1989).

Gracias a las nuevas técnicas de biología molecular, se pueden identificar los clones de *T. cruzi* en las heces y la sangre de los huéspedes sin aislar las cepas (Veas *et al.*, 1991; Avila *et al.*, 1991). Como en el ciclo doméstico boliviano circulan mayormente los clonets 20 y 39 (Brenière *et al.*, 1995 & 1998) comparamos en este trabajo las frecuencias de estos clonets en *Triatoma infestans* antes y después del aislamiento y cultivo masivo de las cepas. Los clonets se detectaron por PCR e hibridación en las heces y a partir del ADN de las cepas y los resultados fueron complementados por el análisis isoenzimático de las cepas.

Material y métodos

Muestreo - Un total de 108 cepas de *T. infestans* capturados en diferentes áreas de Bolivia y en sitios domésticos y peridomésticos fueron aisladas: el tubo

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

² IBBA, La Paz, Bolivia

digestivo de cada insecto fue sembrado en condiciones estériles en medio de cultivo NNN y luego en LIT. Las cepas fueron amplificadas por subcultivos semanales hasta la obtención de cantidades suficientes para su análisis por electroforesis de isoenzimas (20 mg a 50 mg de sedimento húmedo de parásitos). Todos los insectos presentaron flagelados en sus heces (observación directa en microscopio). Antes del aislamiento, una gota de heces fue recolectada de 51 insectos en condiciones apropiadas y conservada a -20°C para la determinación de la composición clonal por PCR/hibridación.

Caracterización de los clones 20 y 39 por PCR/hibridación - Las heces recolectadas antes del aislamiento se procesaron según Brenière *et al.* (1992). El procedimiento consiste en diluir las heces en agua destilada, amplificar las HVRm por PCR e hibridar los productos de amplificación, después de su electroforesis y transferencia sobre membranas, con las sondas 20 y 39 específicas de los clones 20 y 39. La preparación de las sondas fue anteriormente descrita (Veas *et al.*, 1991; Brenière *et al.*, 1992). De la misma manera, la caracterización de las cepas aisladas fue realizada usando como blanco en la PCR el ADN total obtenido por extracción fenol/cloroformo. Esta caracterización fue aplicada por lo menos sobre una cepa de cada zimodema identificado.

Caracterización isoenzimática - El análisis isoenzimático de cada cepa fue realizado por electroforesis en acetato de celulosa usando 12 sistemas enzimáticos: glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT, EC 2.6.1.1), glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PD, EC 1.1.1.49), glucosa fosfato isomerasa (GPI, EC 5.3.1.9), glutamato dehidrogenasa NAD⁺(GDH NAD⁺, EC 1.4.1.2), glutamato dehidrogenasa NADP⁺(GDH NADP⁺, EC 1.4.1.4), isocitrato dehidrogenasa (IDH, EC 1.1.1.42), malato dehidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37), enzima málica (ME, EC 1.1.1.40), peptidasas (substratos: L-leucil-leucina-leucina and L-leucil-L-alanina) (PEP, EC 3.4.11 or 13), 6-fosfo-gluconato dehidrogenasa (6PGDH, EC 1.1.1.44), y fosfo-glucomutasa (PGM, EC 2.7.5.1). Las condiciones experimentales fueron anteriormente descritas por Ben Abderrazak *et al.* (1993). Las distancias fenéticas de Jaccard (1908) se calcularon entre pares de cepas y las relaciones evolutivas se visualizaron en un dendrograma construido por el proceso de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages) con el programa Mac Dendro (Thioulouse, 1989).

Resultados

La Tabla 1 resume los perfiles de hibridación obtenidos antes y después del cultivo masivo de 51 cepas. Cuatro perfiles fueron observados :

- productos de PCR reconocidos solamente por la sonda 20, correspondientes a los clones pertenecientes al clonet 20;
- productos de PCR reconocidos solamente por la sonda 39, correspondientes a los clones pertenecientes al clonet 39;
- productos de PCR reconocidos por las dos sondas, correspondientes a una infección mixta por clones del clonet 20 y del clonet 39;
- productos de PCR no hibridados correspondientes a una infección por clones que no pertenecen ni al clonet 20 y 39.

Tabla 1. Detección de los clonet 20 y 39 antes y después del aislamiento y cultivo de las cepas de *T. infestans*

Detección de los clonet	En heces (antes del cultivo)	En cepas aisladas (después del cultivo)
Clonet 20 solamente	7	24
Clonet 39 solamente	16	15
Clonet 20 + 39	21	4
Otros clones	7	8
Frecuencia del clonet 20	0.55	0.55
Frecuencia del clonet 39	0.73	0.37

Las distribuciones de los clonet antes y después del cultivo fueron diferentes ($P < 0.001$). La frecuencia del clonet 39 fue inferior después del cultivo y solamente 4 infecciones mixtas fueron detectadas en las cepas aisladas. La Tabla 2 detalla la composición clonal de las muestras e indica los zimodemas identificados. En 12 muestras, después del cultivo, se identificaron clones diferentes de los previamente caracterizados en las heces. Este resultado evidenció mezclas adicionales llegando para la muestra a 60.8%. Además, en un caso de mezcla inicial de los clonet 20 y 39, se identificó después del cultivo otro clon (Z13) demostrando una infección múltiple de por lo menos tres clones diferentes. La caracterización directa es la técnica más adecuada para la detección de mezclas, sin embargo, algunas mezclas de clonet no fueron detectadas en las heces (Tabla 2).

Tabla 2. Modificaciones de la composición clonal antes y después del aislamiento y cultivo

		Composición clonal			
Antes del cultivo (heces)		Después del cultivo (cepas)			
	No. de muestras	Clonet 20 solamente Z*	Clonet 39 solamente Z*	Clonet 20 + 39 Z**	Otros clones Z*
Clonet 20 solamente	8	4 Z1, Z5, Z8	1 Z18	2 Z5, Z6	0
Clonet 39 solamente	16	3 Z1	10 Z15, Z17, Z19, Z21, Z22	1 Z5	2 Z11
Clonet 20 + 39	21	16 Z1, Z2, Z4, Z5, Z7	3 Z16, Z17, Z20	1 Z16	1 Z13
Otros clones	6	1 Z1	1 Z16	0	4 Z11, Z9, Z10, Z23, Z24

* Los números de los zimodemas corresponden a los de la Fig. 1;

** El zimodema dominante esta indicado, la mezcla esta identificada por la presencia de perfiles superpuestos de dos zimodemas para solamente algunos loci

El análisis de las 21 cepas aisladas de triatomíneos presentando al inicio una mezcla de los clonet 20 y 39 mostró claramente que el clonet 20 se desarrolló con más frecuencia (0.76) que el clonet 39 (14.3%). La mezcla permaneció solamente en 1 caso después del cultivo (Tabla 2). Algunas cepas fueron identificadas como distintas de los clonet 20 y 39 mientras estos clonet fueron presentes en las heces. La capacidad de crecimiento de algunos clones distintos de los clonet 20 y 39 se mostró mayor. La concordancia entre la composición clonal antes y después del cultivo fue de 37.2%. La mayoría de las discordancias fueron debidas a la falta de detección de las mezclas iniciales después del cultivo (Tabla 2; 20/31 = 64,5%).

Las cepas fueron tipificadas por isoenzimas y comparadas a dos cepas de referencia SO34 cl4 y MN pertenecientes a los clonet 20 y 39 respectivamente. De las 108 cepas, 2 presentaron un perfil típico de mezcla de zimodemas. El

dendrograma de la Figura 1 confirmó que las cepas del ciclo doméstico en Bolivia se reparten en los dos filum de *T. cruzi*. En cada filum, la mayoría de las cepas estuvieron estrechamente relacionadas entre si y cercanas a las cepas de referencia.

Los perfiles de la hibridación de las cepas con las sondas 20 y 39 fueron correlacionados a la topología general del dendrograma. Los zimodemas no reconocidos por las dos sondas fueron los más alejados de las cepas de referencias (Z1 y Z15, Fig. 1). Las cepas que presentaron estos zimodemas fueron aisladas de la región subandina del departamento de La Paz donde la colonización humana es reciente y abundan especies silvestres.

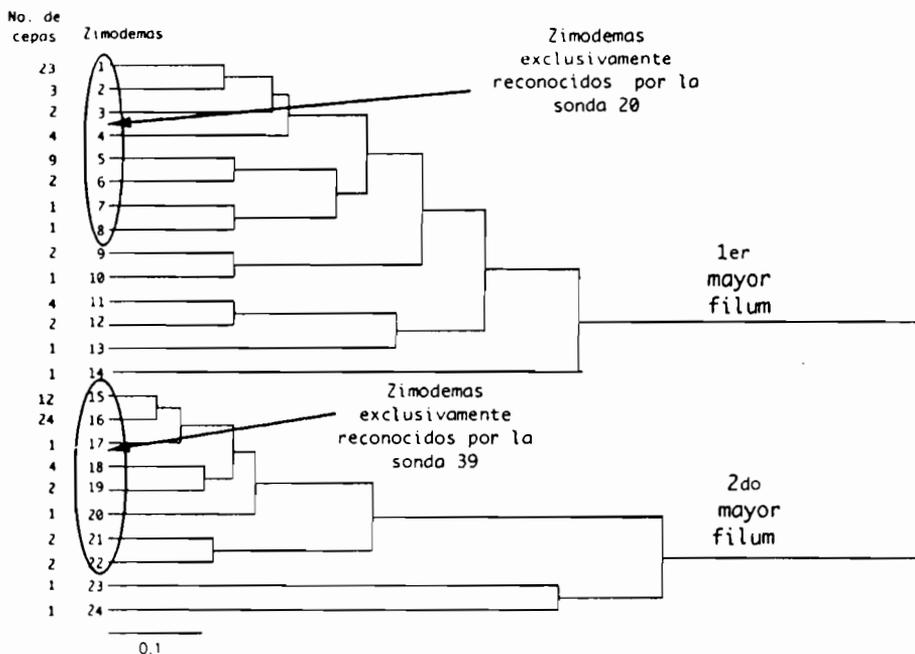


Figura 1. Dendrograma de los zimodemas identificados entre 106 cepas aisladas de *T. infestans*. UPGMA ("Unweighted Pair-Group Method") construido a partir de las distancias de Jaccard calculadas entre pares de cepas. Los zimodemas 1 y 15 corresponden a las cepas de referencia pertenecientes a los clon 20 y 39 respectivamente.

Discusión

Casos de infecciones por poblaciones heterogéneas de *T. cruzi* fueron descritos en varias ocasiones gracias a la visualización de perfiles isoenzimáticos superpuestos correspondientes a dos zimodemas o por el aislamiento de varios zimodemas en un mismo huésped. Así, se evaluó alrededor de 10% de mezclas en vectores y pacientes en Bolivia (Tibayrenc *et al.*, 1986; Brenière *et al.*, 1989). Sin embargo, gracias a la caracterización directa por PCR/hibridación, identificamos tasas de infecciones mixta mucho más elevadas en *T. infestans* (Bosseno *et al.*, 1996).

El presente trabajo demostró que la detección de las mezclas en cepas aisladas y cultivadas fue poco sensible y que el clonete 20 se aísla más fácilmente que el clonete 39. Anteriores trabajos mostraron que las cepas de *T. cruzi*, clonadas en el laboratorio, exhibieron grandes diferencias de velocidad de crecimiento *in vitro* (Dvorak *et al.*, 1980) y Laurent *et al.* (1997) mostraron que los clones pertenecientes al clonete 20 crecieron mejor que los del clonete 39. Estos resultados concuerdan con los nuestros y explican la selección del clonete 20 durante la etapa del cultivo cuando los triatominos presentan al inicio infecciones por los dos clones. La composición clonal después del cultivo sería dependiente de las características de crecimiento *in vitro* de cada clon.

La caracterización directa de los clones de las poblaciones naturales en las muestras biológicas (heces y sangre) es indispensable para obtener un resultado más exacto de la composición clonal en un huésped. De tal manera, se necesita desarrollar herramientas apropiadas a la detección y caracterización de las cepas circulando en una cierta área geográfica (ej. sondas de ADN, cebadores específicos de fila...). La técnica debe ser sensible para detectar los parásitos particularmente en los huéspedes (mamíferos) donde, en la mayoría de las fases de la infección, la parasitemia es muy baja. Las partes hipervariables de los minicírculos del cinetoplasto, fácilmente amplificadas por PCR, presentan múltiples copias y sus secuencias son muy similares entre clones genéticamente relacionados. La producción de sondas suplementarias de ADN del cinetoplasto, específicas de otras fila de clones, podría permitir el desarrollo de la detección directa de clones en otras áreas endémicas.