

La molécula de ADN al auxilio del conocimiento de los triatominos, vectores de la enfermedad de Chagas

■ Por Ph.D. Simone Frédérique Brenière^{1,3}, Ph.D. Etienne Waleckx^{1,2}, Dra. Anita Villacis³

¹INTERTRYP, CIRAD, IRD, TA A-17/G, International Campus in Baillarguet, Montpellier, France

²Centro de Investigaciones Regionales "Dr Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

³Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL)

(frederique.breniere@ird.fr) (Etienne.waleckx@ird.fr) (AGVILLACIS@puce.edu.ec)

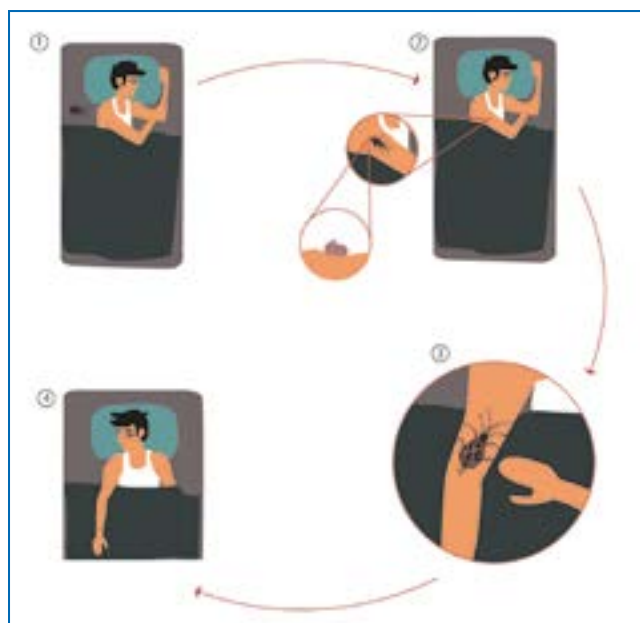
Dentro de la biología que estudia los procesos de vida desde un punto de vista molecular, nos hemos interesado particularmente en las secuencias de la macromolécula de ácido desoxirribonucleico abreviado como ADN, la cual es de gran utilidad para comprender quiénes son los triatominos, vectores de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas afecta, aproximadamente, a 6-7 millones de personas, siendo endémica en los países de América Latina (WHO, 2018). Alrededor de 10 000 personas mueren cada año por manifestaciones clínicas causadas por esta enfermedad; más de 25 millones de personas viven con riesgo de contraer la infección. La carga económica global que representa es similar o superior a varios tipos de cáncer y enfermedades infecciosas. Existen más de 150 especies de triatominos, vectores o potenciales vectores de la enfermedad de Chagas; se llaman

chinche caballo o chinchorros en Ecuador. Son hemípteros hematófagos (chupadores de sangre) obligatorios en todos sus estadios de desarrollo. Viven en su mayoría en ambientes silvestres, sin embargo, algunas especies tienen una importancia médica en la transmisión de la enfermedad de Chagas a los seres humanos porque invaden y colonizan el hábitat humano. La transmisión vectorial del agente causal de la enfermedad, *Trypanosoma cruzi* (parásito unicelular), no ocurre a través de la saliva y la picadura del insecto como en otras enfermedades infecciosas transmitidas por mosquitos y flebotomos (paludismo, dengue, leishmania, etc...), ya que la forma infectiva (peligrosa) se encuentra en las heces del insecto. El insecto se infecta cuando se alimenta de la sangre de un mamífero infectado, y en la Figura 1

presentamos el escenario clásico de la transmisión del parásito al hombre. A parte de otros modos de transmisión (congénita, transfusión sanguínea, trasplante de órganos, accidentes de laboratorio), los triatominos también tienen una importancia crucial en la transmisión oral; esta transmisión ocurre por consumo de bebidas y/o alimentos contaminados por las heces de estos insectos.

Ahora comprendemos que estos insectos son peligrosos y estudiar sus hábitos, su comportamiento, su relación con el parásito ayuda a entender cómo se desarrollan los ciclos de transmisión, permitiéndonos luchar de mejor manera contra la enfermedad de Chagas.



Por María José Carrasco

Figura 1. Modo clásico de transmisión por los vectores "chinchorros": en la noche los insectos (1) se aproximan a la persona dormida para alimentarse, (2) pican a la persona causando una lesión en la piel, (3) defecan durante la alimentación (toma de sangre) y/o poco después, y depositan las heces infectadas en la piel o cerca de las mucosas (por ejemplo, el ojo), (4) cuando las heces entran en contacto con la lesión o las mucosas debido a que la persona se rasca, los parásitos invaden las células y la persona queda infectada.

Cuatro cuestionamientos claves que el componente molecular puede ayudarnos a resolver

- 1) ¿Cuál es la especie de los triatominos capturados?
- 2) ¿De qué huéspedes se alimentan estos insectos?
- 3) ¿Cuántos de estos insectos están infectados por *T. cruzi*?
- 4) ¿Cuál es el grupo genético del parásito que infecta estos insectos?

Identificando las especies de triatominos

No se distinguen tan fácilmente las especies de triatominos. Los taxónomos las clasificaron en base a su morfología agrupándolas en complejos de especies dentro de los cuales estas pueden ser muy parecidas. Lo que es complicado es reconocer a todos los miembros de una misma especie, porque existe una gran variabilidad intra-específica (misma especie) de tamaño y colores. También los triatominos son insectos de gran “plasticidad”, capaces de colonizar espacios bioclimáticos (desde bosques andinos secos a bosque tropicales húmedos) y hábitats (naturales o artificiales) muy diferentes, lo que a lo largo del tiempo ha influenciado sobre sus características morfológicas. Otro problema es que las características morfológicas inter-específicas de las ninfas son poco relevantes y la taxonomía basada en la morfología necesita ejemplares adultos. Finalmente, como para muchos organismos, la identificación morfológica de las especies de triatominos requiere entomólogos especializados, quienes se basan sobre observaciones en el estereomicroscopio y claves de determinación de especies.

Las moléculas del ADN nuclear y mitocondrial también cambian a lo largo del tiempo: grandes partes evolucionan de manera regular, te-

niendo un papel de “reloj molecular”, lo que permite almacenar la historia evolutiva del organismo en este libro, que es el ADN. Lo fascinante del enfoque molecular es que el ADN se traduce en un escrito (secuencia) que usa un alfabeto codificado que se almacena para siempre. Aunque genomas enteros de varios organismos sean en la actualidad conocidos (secuenciados), no se podía hasta recientemente secuenciar el genoma entero de muchos organismos debido a que era un proceso largo y muy costoso. Así, la mayor parte de los estudios moleculares de los triatominos se limitan a la secuenciación de fragmentos de genes para grandes números de especímenes usando el método de PCR (“Polymerase Chain Reaction”). Escoger los fragmentos de genes apropiados a su estudio es fundamental, y definir el propósito de investigación, adaptar el muestreo de insectos y escoger el fragmento de ADN adecuado son los pasos más importantes que se recomiendan para iniciar un estudio (Mas-Coma and Bargues, 2009).

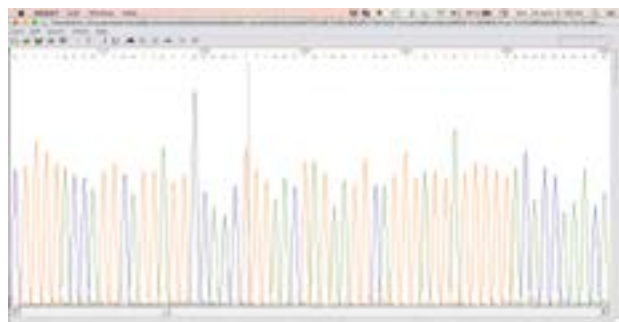
Ahora les presentamos un ejemplo: la Amazonia es una amplia región donde viven numerosas especies de triatominos. Hace 20 años no se reportaban casos de transmisión de la enfermedad, mientras que ahora se considera a la enfermedad de Chagas como emergente en esta región. Así, es primordial conocer las especies que viven en

el ambiente selvático cercano a los asentamientos humanos. En un primer estudio que hicimos en Bolivia, cerca de la pequeña ciudad de Yucumo, capturamos 34 ejemplares de triatominos del género *Rhodnius* (el género se reconoce fácilmente en todos los estadios por la posición apical de las antenas en la cabeza del insecto) (Brenière *et al.*, 2017). De estos 34 ejemplares, solamente dos fueron adultos machos, y según el análisis de su morfología se dudaba entre dos especies parecidas, *R. stali* o *R. pictipes*. Gracias al estudio de los órganos sexuales de uno de los machos, se pudo clasificar a los dos machos, éstos eran morfológicamente idénticos, como *R. stali*; sin embargo, este análisis es aún más especializado. Quedaban otros 32 ejemplares para los cuales no se podía definir la especie por su morfología. Entonces, se secuenciaron 4 fragmentos de genes para cada ejemplar (adultos y ninfas). La sorpresa fue identificar una ninfa como *R. robustus* y a los otros ejemplares (ninfas y adultos) como *R. stali*.

Lo que se secuencía hoy, será valioso mañana

Se inicia el proceso por la extracción del ADN de las patas del insecto, y se secuencía el fragmento de ADN blanco (Fig. 2). Luego se busca en el banco de genes la(s) secuencia(s) de mayor identidad con la secuencia estudiada. Sin embargo, combinar un enfoque fi-

Figura 2. Cromatograma de un fragmento de secuencia que permite con el programa MEGA7 validar la secuencia final.



logenético (árboles evolutivos) permite analizar las relaciones entre los especímenes en estudio y especies vecinas gracias a las secuencias disponibles en bancos de genes (Fig. 3). Al final del estudio, se enriquece el banco de genes con las nuevas secuencias.

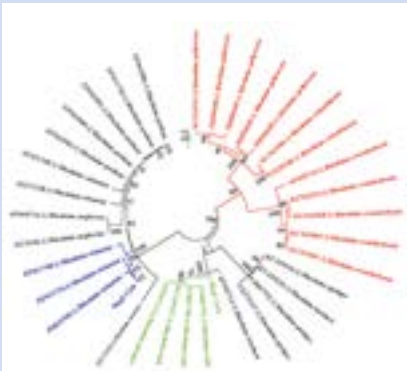


Figura 3. Árbol filogenético construido con secuencias de un fragmento del gen citocromo b (369 bp). Incluye todas las secuencias de las especies del género *Rhodnius* disponibles en banco de genes (GenBank). Las dos secuencias que se quieren determinar (Hap1 Cytb y Hap2 Cytb) se agrupan respectivamente con *R. stali* (color verde) y *R. robustus* (color azul). *R. ecuadoriensis*, principal vector en Ecuador, se agrupa con *R. pallidus*, *R. colombiensis* (color rojo). Datos comunicados por SF Brenière.

Identificando las fuentes alimenticias de los triatominos

Controlar la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas es un reto importante en varias regiones de Latinoamérica. El conocer de qué animales se alimentan los triatominos permite ahondar no solamente (i) sobre los huéspedes que mantienen estas poblaciones en su medio ambiente, sino (ii) sobre los movimientos de estos insectos relacionando las fuentes alimenticias con el lugar de colecta del insecto (dentro de la casa, en el peridomicilio o en el campo) (iii) sobre los principales animales que pueden ser potenciales reservorios. Los triatominos tienen ninfas muy parecidas a los adultos, viven en el mismo hábitat y

llevan una vida similar; así, todos los estadios son hematófagos. Se podrá entonces determinar las fuentes alimenticias en todos los estadios considerando que las ninfas se desplazan solamente caminando, mientras que los adultos pueden caminar y volar. Hoy en día, la mejor manera y más utilizada de analizar las fuentes alimenticias (sangre ingerida) de los triatominos consiste en extraer el ADN del contenido digestivo de cada insecto, y amplificar secuencias por PCR utilizando cebadores universales para vertebrados para ver si se alimentaron de mamíferos, reptiles, aves y anfibios; así, este proceso permite identificar todo tipo de fuente alimenticia. En caso de múltiples comidas (diferentes huéspedes) se puede obtener una secuencia que presenta muchas ambigüedades (observación de doble picos en el cromatograma) debido a la superposición de secuencias. En este caso, lamentablemente, las especies no se pueden determinar. Sin embargo, se resuelve el problema por un método molecular (clonación) que permite obtener separadamente las diferentes cadenas de ADN. Así en 2009-2010, hemos detectado en especímenes de *Meccus longipennis* silvestres (vector principal en el estado de Jalisco en México) mezclas de fuente alimenticias de *Dasyptus novemcinctus* (tatú) con *Bos taurus* (vaca) o *Sigmodon* sp. (pequeño roedor silvestre) o *Sceloporus occidentalis* un lagarto común en la región. En otro ejemplar de *M. longipennis*, capturado dentro de una casa en un pueblo Mexicano del estado de Nayarit, se detectaron 4 diferentes fuentes alimenticias, *Homo sapiens* (ser humano), *D. novemcinctus*, *Sigmodon* sp. y *Mus musculus* (Brenière *et al.*, 2010) y nos sorprendió observar en estos insectos capturados dentro de las casas muchas fuentes de animales silvestres (Fig. 4). Similares estudios se están realizando en el CISEAL-PUCE.

Identificando los variantes del parásito que infectan los triatominos

Trypanosoma cruzi es un complejo de cepas genéticamente muy diversas. Ciertas cepas presentan grandes distancias evolutivas similares a las que se pueden observar entre especies diferentes. Se propuso una clasificación sub-específica de siete grupos genéticos (TcI a TcVI y Tcbat) llamados DTUs (Discrete Typing Units). También, las cepas de *T. cruzi* tienen características biológicas muy heterogéneas, pero no existe una clasificación biológica consensual que sea utilizada para caracterizarlas. Es su composición genética que permite clasificar las cepas en su DTU y entonces el ADN aquí, juega otra vez un papel indispensable. Cuando se capturan triatominos, la primera pregunta es conocer si están infectados por *T. cruzi*, es decir, si son “peligrosos”. Se puede detectar al parásito por su ADN, mediante el método de PCR. Este método tiene como ventaja su alta especificidad y mayor sensibilidad. También los fragmentos de ADN permiten reconocer los grupos genéticos del parásito. Estos análisis permiten identificar a las cepas aisladas en laboratorio, pero también directamente a las cepas contenidas en el intestino de los triatominos; de este modo, se evita la selección de algunas cepas sobre otras que ocurre cuando se coloca las cepas en cultivo.

¿Qué podemos esperar de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva?

La secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) se refiere a varias tecnologías nuevas y más rápidas de secuenciación del ADN y el ARN [Illumina® (Solexa); Roche 454; Ion torrent: Proton / PGM; SOLiD]; revolucionaron de manera eficaz la genómica. Estas

tecnologías NGS se aplican a genomas enteros o a partes escogidas del genoma. Tienen 3 pasos comunes: (i) la preparación de las muestras a partir de la extracción del ADN (producción de una biblioteca de fragmentos de ADN), (ii) la amplificación de los fragmentos de ADN de forma separada, de tal manera que se pueda formar paquetes de ADN (clusters), (iii) la secuenciación de los paquetes. Estas nuevas tecnologías son recientemente aplicadas a triatomíneos. A continuación presentamos dos ejemplos para dar una idea del poder de estas nuevas tecnologías. Primeramente, aplicando una estrategia de detección de los genomas enteros (metagenómica no dirigida) a contenidos digestivos de *Triatoma*

dimidiata capturados en Guatemala, se obtuvo alrededor de 3.25 millones de secuencias por espécimen, con aproximadamente 1% correspondiente al parásito, 20% al triatomíneo, 11% a bacterias, y 4% a fuentes alimenticias (Orantes *et al.* 2018); en base a estas secuencias se obtuvieron los resultados siguientes: i) la identificación de las DTUs de *T. cruzi*, ii) la observación de una diversidad bacteriana superior en los insectos infectados, iii) la distinción de diferentes poblaciones geográficas del triatomíneo y iv) la detección de fuentes alimenticias, como gallina, perro, pato y ser humano. La segunda estrategia (metabarcoding o metagenómica dirigida) consiste en amplificar por PCR fragmentos escogidos de ADN como fragmentos específicos del triatomíneo, del parásito, para detectar su variabilidad, y otros que permiten detectar las fuentes alimenticias y el microbioma (Waleckx *et al.* 2019). De esta manera, se ha podido detec-

tar en *T. dimidiata* del Yucatán (México) una diversidad de fuentes alimenticias y de genotipos de *T. cruzi* por insecto nunca antes reportada. Esta información sin duda permitirá descubrir comportamientos y hábitos de los triatomíneos desconocidos.

Literatura consultada

WHO, 2018. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet (revised 1 February 2018), [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).

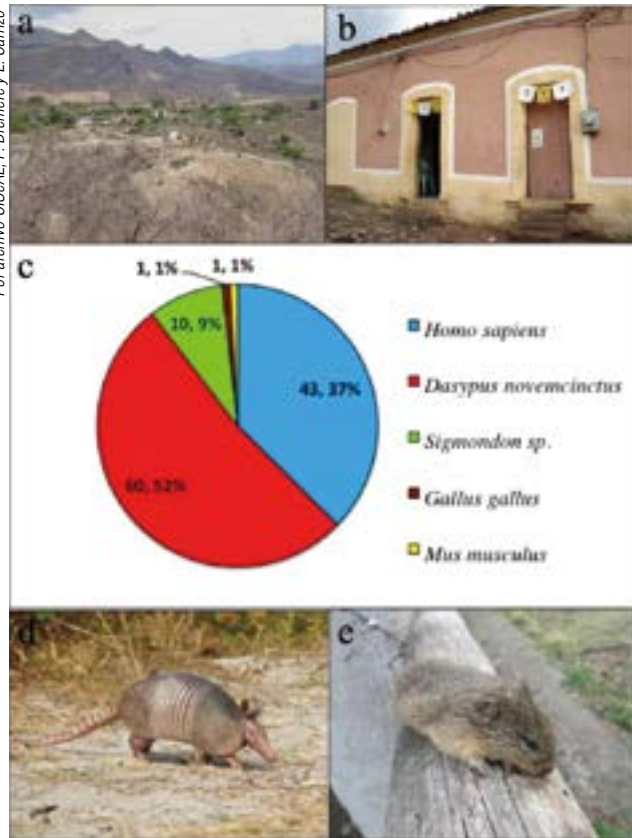
Mas-Coma, S., Bargues, M.D., 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop* 110, 112-136.

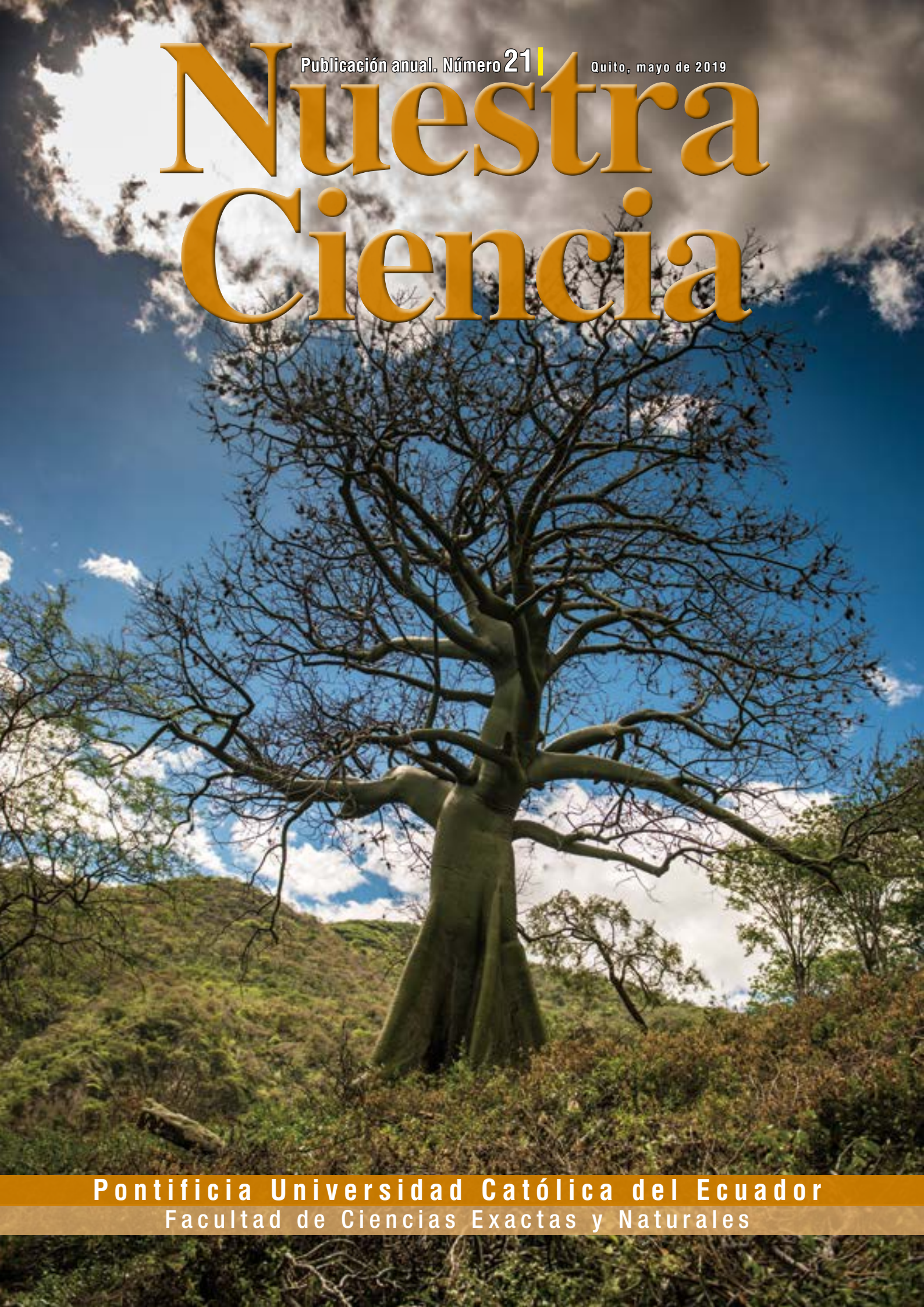
Brenière, S.F., Bosseno, M.F., Gastelum, E.M., Soto Gutierrez, M.M., de Jesus Kasten Monges, M., Barraza Salas, J.H., Romero Paredes, J.J.,

de Jesus Lozano Kasten, F., 2010. Community participation and domiciliary occurrence of infected *Meccus longipennis* in two Mexican villages in Jalisco state. *Am J Trop Med Hyg* 83, 382-387.

Orantes, L.C., Monroy, C., Dorn, P.L., Stevens, L., Rizzo, D.M., Morrissey, L., Hanley, J.P., Rodas, A.G., Richards, B., Wallin, K.F., Helms Cahan, S., 2018. Uncovering vector, parasite, blood meal and microbiome patterns from mixed-DNA specimens of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *PLoS Negl Trop Dis* 12, e0006730.

Waleckx E, Arnal A, Dumonteil E (2019). Metabarcoding, un nuevo abordaje para el estudio de los ciclos de transmisión de la enfermedad de Chagas y la ecología de sus vectores. In: Avances y perspectivas de la biotecnología en la península de Yucatán. Zamora-Bustillos R & Sandoval-Gío JJ (Eds). TECN, Mérida, México. pp.1051-1065.





Publicación anual. Número 21 | Quito, mayo de 2019

Nuestra Ciencia

Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales