ARTICULO

Comportamiento de genotipos de *Trypanosoma cruzi* en *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectado*:* aproximación biológica y molecular a fenómenos de competencia.

Nilsa González[1], Hernan Carrasco[2], Servio Urdaneta-Morales[1], Clara Martínez[2], Leidi Herrera[1].

[1]Instituto de Zoología y Ecologia Tropical (IZT), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.

[2]Instituto de Medicina Tropical (IMT), Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela

Correspondencia: Leidi Herrera
E-mail herrerleidi@ahoo.com

RESUMEN

Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida, Trypanosomatidae)*,* parásito de naturaleza clonal, presenta una considerable heterogeneidad genética, manifiesta en tres linajes como son TcI y TcII y Z3, este ultimo presente con mayor frecuencia en la región ecuatorial y por encima de la cuenca amazónica. En Venezuela hay un franco predominio del genotipo TcI sobre TcII. Un aspecto interesante es la diversificación de subpoblaciones de *T. cruzi en* el vector y los morfotipos que prevalecen en este micro ambiente, condicionantes de virulencia y transmisibilidad. Los efectos de más de un genotipo del parasito en el vector no han sido ampliamente estudiados En el presente estudio se presentan cambios de la cinética de desarrollo del parasito en el vector, la metaciclogénesis y carga parasitaria cuando se han realizado infecciones experimentales únicas y mixtas de genotipos del *T. cruzi* en *Rhodnius prolixus.* Desde el análisis molecular del gen de miniexon se obtuvieron evidencias de posible competitividad y selección en el modelo vector utilizado. Los resultados se analizan desde una perspectiva epidemiológica.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi, Rhodnius prolixus*, genotipos, morfotipos, competencia.

ABSTRACT

Behavior of *Trypanosoma cruzi* genotypes in experimentally infected *Rhodnius prolixus*: Molecular and biological approaches to competence phenomena

Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) a clonal parasite, presents a considerable genetic heterogeneity, manifested in three lineages, defined as TcI, TcII and Z3, the latter present more frequently in the equatorial region and over the Amazon basin. In Venezuela there is a predominance of TcI genotype. An interesting aspect is the diversification of T cruzi subpopulations in the vector and morphotypes that prevail in this microenvironment, determining virulence and transmissibility. The effects of more than one parasite linage in the vector have not been widely studied. The present study show changes in the kinetics of parasite development in the vector, parasite load and metaciclogenesis with single and mixed T. cruzi genotypes in *Rhodnius prolixus*. From the molecular analysis of miniexon gene was possible evidence competitiveness and selection . The results are analyzed from an epidemiological perspective.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, *Rhodnius prolixus,* genotypes, morphotypes, competition

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente causal de la enfermedad de Chagas, es un hemoflagelado heteroxeno cuyo ciclo de vida se presenta entre insectos vectores responsables de su transmisión (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) y hasta ocho ordenes de mamíferos, incluyendo al hombre (1,2). La transmisión de *T. cruzi* al mamífero se da con mayor frecuencia cuando los triatominos, estrictamente hematófagos, depositan sus heces cargadas con las formas infectantes o tripomastigotes metacíclicos, los cuales entran a través de escoriaciones de la piel o mucosas intactas.

T. cruzi es básicamente de naturaleza clonal, presentando una considerable heterogeneidad genética, evidenciada por la presencia de tres linajes como son TcI y TcII (tradicionalmente asociados al ciclo de transmisión silvestre y domestico respectivamente) y Z3, presente con mayor frecuencia en la región ecuatorial y por encima de la cuenca amazónica (en infecciones del ciclo silvestre y ocasionalmente en infecciones en humanos). En Venezuela hay un franco predominio del genotipo TcI tanto en ciclos de transmisión silvestres como domésticos y escasos son los registros de la presencia de TcII (3, 4).

Un aspecto interesante es la diversificación de subpoblaciones de *T. cruzi en* el vector y los morfotipos (esferomastigotes, epimastigotes y tripomastigotes) los cuales prevalecen en este micro ambiente y que son condicionantes de la virulencia y transmisibilidad al mamífero. La fuente sanguínea, especie de vector, biota bacteriana sinergística en el tracto digestivo, parecen tener influencia en la cinética poblacional del parasito en el vector (5, 6).

Los efectos de más de un genotipo del parasito en el hospedador mamífero han sido estudiados, sin embargodel desarrollo de genotipos simpátricos

en el micronicho intestinal del vector no hay muchas investigaciones (4, 7).

Los ensayos planteados en el presente trabajo, con poblaciones únicas y mixtas de genotipos del *T. cruzi* en el modelo *Rhodnius prolixus,* vector primario en la mayoría de las áreas endémicas de Venezuela (8), muestran evidencias de posible competitividad y selección de genotipos. Se discuten sus implicaciones epidemiológicas (9; 10).

MATERIALES Y METODOS

Estudio de la cinética de infección en el vector. Protocolo de Infección experimental

Una total de 180 *R. prolixus* de III y IV estadio, criados y mantenidos en laboratorio, en colonias renovadas cada cinco años, fueron infectados experimentalmente, con sangre desfibrinada de conejo, mantenida a 37 ºC e infectada con 6 x 103 parásitos/ml, provenientes de cultivo RPMI (Gibco®), en fase logarítmica; para una ingesta de 0,5 ml de sangre/triatomino en condiciones de ayuno de hasta 1 mes.

Las condiciones de alimentación artificial para *R. prolixus* de los estadios descritos fueron estandarizadas y para tal fin se utilizó un sistema de alimentador artificial de circulación externa y continua, de agua caliente por bombeo circular (Figura 1).

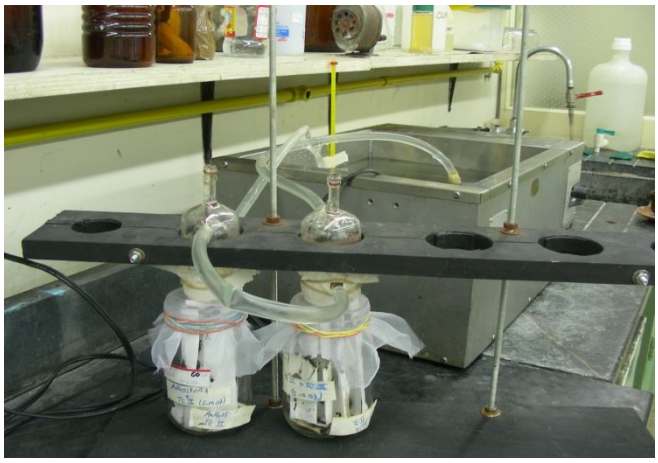


Figura 1. Sistema de alimentación artificial o xenodiagnostico artificial de triatominos en cámaras de circulación externa de agua a temperatura fisiológica 37 ºC y circulación interna de sangre desfibrinada de conejo previamente infectada con cada uno de los aislados o cepas escogidas, mantenidas a través de un sistema de bombeo submarino de agua suministrada por baño de María Gallenhamp y soporte fijo en madera para hasta 6 alimentadores simultáneos (diseño de González, Hernández y Herrera , 2008, en registro y publicación).

El protocolo de infección fue el siguiente:

Grupo 1: 60 triatominos infectados con la cepa de referencia de *T cruzi* I WA 250 cl10B.(M/DID/BR/Wa 250)

Grupo 2: 60 triatominos infectados con la cepa de referencia Z3 CanIII. (M/HOM/BR/68/CAN III CL2*a)*

Grupo 3: 60 triatominos infectados con proporciones equivalentes de las cepas TcI y Z3 (mixtas),

Una vez establecida la infección, se realizó el seguimiento de la cinética de morfotipos, durante 90 días a partir del quinto día post ingurgitación (pi) y cada cinco a siete días aproximadamente (5).

Los morfotipos fueron determinados en heces frescas (400X) evacuadas espontáneamente por el insecto y por examen del macerado de tracto digestivo en 10 µl de solución salina 0,8%, obtenido de 5 % de ejemplares extraídos y disecados, de la población inicial infectada, contados mediante el método de Brener modificado (12).

Caracterización molecular en la cinética de infección. El material obtenido del tracto digestivo, adicionalmente fue utilizado para extracción de ADN por un kit de purificación basado en "salting out" (Wizard Genomic DNA Purification System, Promega). La pureza e integridad del ADN fue corroborada por separación electroforética en gel de agarosa al 0,8% a 70V, en buffer TAE (Tris-ácido acético 40 mmol/L, pH 8; EDTA 1 mmol/L) por 45 minutos.

La detección de ADN de genotipos de *T. cruzi* en infecciones simples y mixtas fue determinada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región variable de los minicírculos del ADN del Kinetoplasto (ADNk) con los iniciadores S35(5'-AAATAATGTACGG(T/G)GAGATGCATGA-3') y S36 (5'GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'). La reacción se desarrolló en 20 µL de volumen final que contuvo 10 ng de ADN molde, en un buffer de reacción (10 Tris-HCl 10 mmol/L , pH 8,5, KCl 500 mmol/L) , 1 U de *Taq* polimerasa, $MgCl_2$ 1 mmol/L, desoxynucleotidos trifosfato (dNTP) 200 µmol/L y 10 pmol de cada iniciador específico. La reacción de PCR se llevó a cabo mediante el siguiente programa: Desnaturalización inicial a 95 ºC durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de Desnaturalización a 94 ºC, por 1 minuto, Hibridación a 65 ºC por 1 minuto y Extensión a 72ºC por 1 minuto, terminando con una Extensión final a 72ºC, durante 10 minutos. Los productos de la PCR fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y teñidos con Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL) (13).

Para estudiar las diferentes sub poblaciones, se llevo a cabo la amplificación de repeticiones simples del gen de miniexon del parásito en el ADN obtenido de triatominos en infecciones mixtas, usando iniciadores complementarios a la región del miniexón (GenBank Nº de acceso X00935) correspondientes a GE12 (5`-GGG AAG CTT CTG TAC TAT ATT GGT A-3`) y GE13 (5`-GGG AAT TCA ATA TAG TAC AGA AAC TG-3`). Brevemente, la PCR se llevó a cabo con un volumen final de 25 ul de mezcla de reacción que contuvo 10 ng de ADN genómico como molde, 100 pmol de cada iniciador y 100 µmol/L de dNTPs en un buffer de reacción (10 Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,5, KCl 500 mmol/L) $MgCl_2$ 1,5 mmol/L y 1 U de Taq® polimerasa. La amplificación fue llevada a cabo sobre las

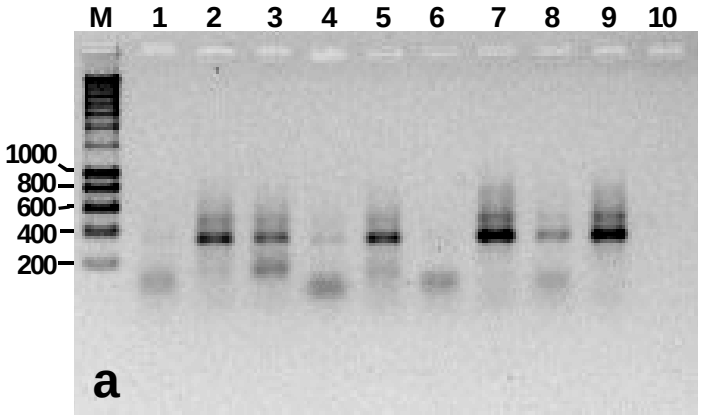
siguientes condiciones: cinco ciclos (94 °C, 30 s; 45 °C, 2 min; 65°C, 30 s) seguido de 25 ciclos (94 °C, 30 s; 50 °C, 1 min; 72°C, 3 min). Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE. La visualización de los productos amplificados se logró mediante tinción con bromuro de etidio, fotografiado Mediante el sistema Gel Doc 2000 de BioRad (se muestran los negativos de las imágenes digitalizadas). El tamaño de los productos de amplificación se determinó con un patrón estándar de ADN lineal de doble hebra entre 200 pb a 12 kb (Hiperladder I, Bioline ©) y un patrón estándar de ADN lineal de doble hebra entre 500 pb a 5 kb (Hiperladder III, Bioline ©) según el caso (4, 14).

Análisis estadístico. Las diferencias para los datos y curvas de cinética en infecciones únicas y mixtas para cada caso fueron evaluados por la prueba de categorización de valores como Kruskal Wallis usando el programa Statgraphic plus.-2005.

RESULTADOS

La estandarización de la alimentación artificial sobre el modelo *R. prolixus* establecido, reveló que para los estadios ninfales del modelo vector escogido, en condiciones de alimentación sobre sangre de conejo desfibrinada a 37 °C, esta especie toma un total de 0,5 mL de sangre/ejemplar para la repleción completa, con diuresis espontánea y limpia de heces, a 1 minuto post repleción.

Todos los triatominos infectados artificialmente y examinados tanto en heces expulsadas espontáneamente, como en disección, esta última sobre el 5% de la población de triatominos, con poblaciones únicas y mixtas del parásito, revelaron la presencia de morfotipos del parásito tan temprano como siete días y mantenidas en promedio hasta 50-60 días, evidenciado por la amplificación de la banda característica para ADNk de 330 pares de bases (pb), (Figura 2).



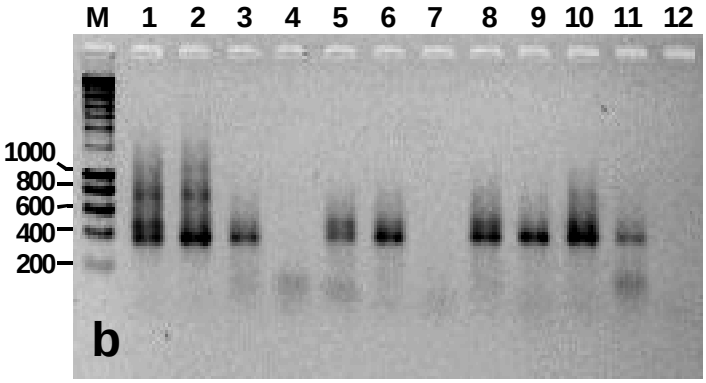


Figura 2 (a) Amplificación de la región variable del minicírculo de ADNk (330 pb) en infección simple con una subpoblación de *Trypanosoma cruzi* (TcI) en *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectado M (marcador) = Hiperladder I (Bioline, de abajo hacia arriba 200-400-600-800 pb). 1= Dia7pi 2=Día 14 pi, 3= Día 22 pi, 4=Día 30 pi 5=Día 30 pi, 6-8= Día 50 pi 9= Día 60, 10= Control Negativo **(b)** Amplificación de la región variable del minicírculo de ADN k (300 pb) en infección mixta con subpoblaciones de *Trypanosoma cruzi* (TcI+ Z3) en *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectado M (marcador) = Hiperladder I (Bioline,), 1= Referencia TcI, 2= Referencia Z3, 3= Día 7pi 4= Día 14 (muestra 6), 5= Día 14, 6= Día 22, 7= Día 22, 8= Día 30, 9= Día 50 10 y 11= Día 60, 12= Control Negativo de la reacción.

En relación a la cinética, se observó el patrón típico para *T. cruzi*, con una fase estacionaria de crecimiento seguida de una fase logarítmica, en promedio para el día 20 post infección (pi). Igualmente, en promedio a partir del 5to día pi., se observaron los epimastigotes, responsables del mantenimiento de la infección en el vector, para sucederse hacia la metaciclogenesis según la secuencia típica de crecimiento (17).
Los morfotipos presentes en túbulos de Malpighi sobre el 5% de la población disecada, mostraron que infecciones con TcI presentaron mayor valor de formas multiplicativas (epimastigotes) hasta el final del periodo de estudio en relación con las infecciones con Z3, las cuales mostraron retardo en el crecimiento y una carga menor de epimastigotes.

Una reducción similar de la adaptación del parásito fue observada también para la población de formas infectantes o tripomastigotes metacíclicos tanto para las infecciones únicas (Z3) como para las infecciones mixtas (TcI + Z3) con disminución de la metaciclogénesis (en promedio de un 75%). En este caso fue observado también un descenso de la infección triatomínica en 50% de la población total y una mortalidad mayor para las infecciones mixtas con respecto a las infecciones únicas o sencillas (Figura 3a, 3b y 3c).

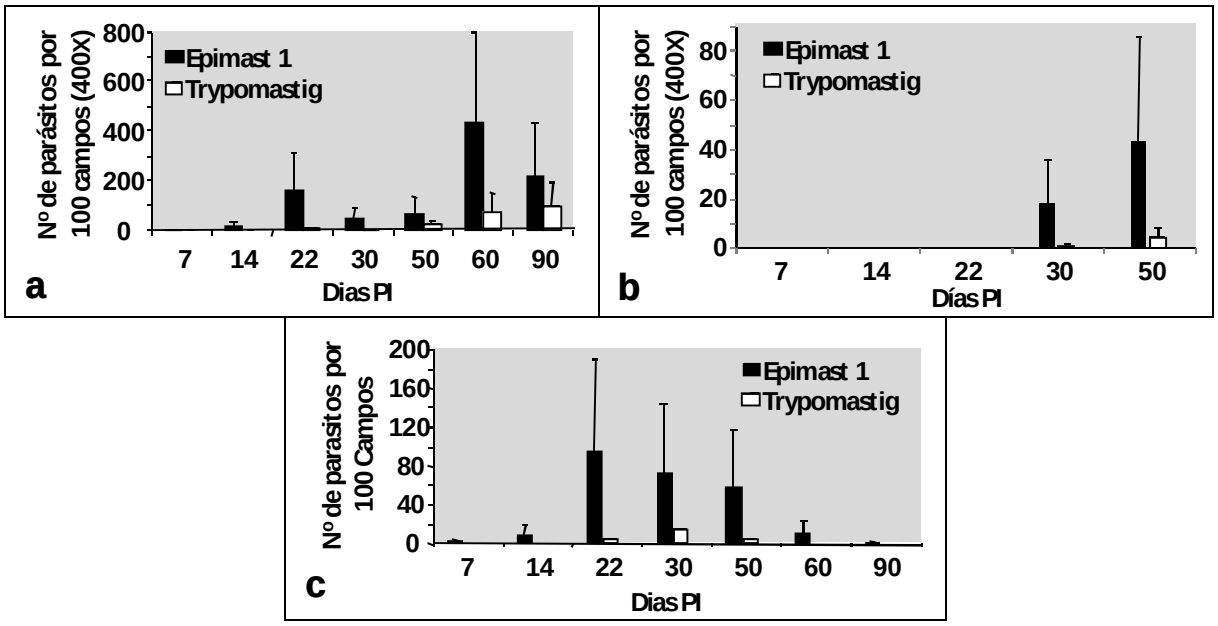


Figura 3. (a) Cinética de morfotipos de *T. cruzi* en heces obtenidas por disección de *Rhodnius prolixus* infectado con TcI. **(b)** Cinética de morfotipos de *T. cruzi* en heces obtenidas por disección de *Rhodnius prolixus* infectado con Z3. **(c)** Cinética de morfotipos de *T. cruzi* en heces obtenidas por disección de *Rhodnius prolixus* infectado con Tc I + Z3

Los datos evaluados por Kruskal Wallis, revelaron diferencias significativas en la supoblaciones de epimastigote (Estadistico = 7,28941 *p*= 0,0261291) y de metacíclicos (Estadistico = 6,76529 *p* = 0,033957) en cada caso.

A pesar de la baja carga parasitaria los metacíclicos fueron probados en su capacidad infectiva a través de su inoculación en modelo murino con protocolo de baja virulencia (10), resultando competentes o infectivos, aún cuando en el caso de Z3 y de la infección mixta de baja adaptabilidad, se presentó una prepatencia de hasta 18 días en promedio.

La evaluación del espaciador del gen de mini exón reveló una banda de valor oscilante entre 544-560 para variantes de TcI y una banda por encima de 560 para Z3. En resumen, la cinética de infección con poblaciones mixtas, aun cuando con pocos eventos de amplificación por PCR, revelaron predominantemente bandas correspondientes a TcI y para el final de la infección (50 a 60 días pi) revelaron exclusivamente bandas correspondientes TcI sin aparición de Z3. (Figura 4).

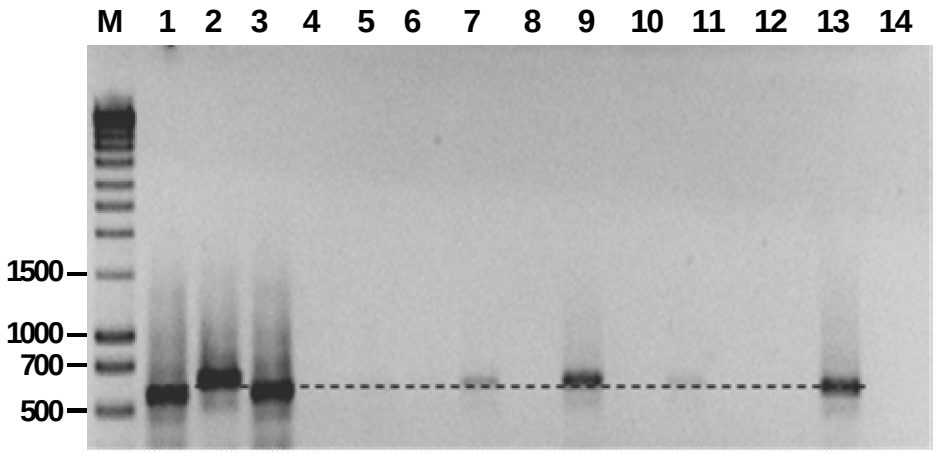


Figura 4. Amplificación por PCR de repeticiones simples del gen de miniexon, usando primers complementarios a la región del exón (Nº de acceso X00935L) para amplificar una banda de valor oscilante entre 544-560 para variantes de TcI y una banda por encima de 560 para Z3, en infecciones experimentales de *R. prolixus. C*arril 1.: Marcador Hyperladder III(Bioline). Carril 2: ADN de TcI. Carril 3: ADN de Z3. Carril 4: ADN de mezcla TcI + Z3. Carril 5: Control negativo de la reacción. Carriles 6 al 10: Z3 colectado de tracto digestivo a los 7, 14, 22, 30 y 50 días post ingurgitación. Carriles 11 al 14: infección mixta (TcI-Z3) colectado de tracto digestivo en los mismos intervalos de tiempo.

DISCUSIÓN

El efecto de infecciones mixtas de diferentes subpoblaciones de *T. cruzi* en el hospedador vertebrado ha sido estudiado ampliamente (15), sin embargo poco se ha hecho a este respecto en el modelo triatomino (7, 16). Los resultados obtenidos con las técnicas utilizadas permitieron seguir la cinética de infección y la predominancia de genotipos del parasito en el intestino del vector sin necesidad de métodos de amplificación en cultivo, lo cual podría ser utilizado para la evaluación de infecciones naturales de vectores en áreas endémicas.

Dado que estos vectores son los dispersadores del parásito por excelencia, es lógico pensar que en condiciones naturales, el mismo se encuentre infectado con más de una sub población del parásito. El sinergismo o la selección de sub poblaciones de *T. cruzi* en el vector podría ser el reflejo de los genotipos predominantes en un área geográfica específica y por ende de la clínica de la infección que estaría asociada a ellos (17).

R. prolixus se mostró susceptible a infecciones con las cepas de referencias de los linajes similares a los que circulan en Venezuela (3) lográndose co-infección, de genotipos con reducción del *fittness* del parasito en cuanto a su número o carga parasitaria, aún cuando la cinética siguió el patrón característico ya reportado para *T. cruzi* en este vector y en otras especies vectoras (5, 7). Los resultados revelan que durante todo el periodo experimental, TcI parece ser que amplifica predominantemente frente a Z3, quedando TcI al final de la infección (2 meses pi) como el único genotipo que se revela por métodos moleculares en nuestro modelo.

Sin embargo los resultados no permiten asegurar una exclusión de Z3 ya que en baja carga parasitaria la PCR podría resultar negativa.

R. prolixus podría actuar en infecciones mixtas, como filtro biológico para algunos sub tipos de parásitos y con esto se puede inferir una posible selección que favorece el crecimiento de TcI en el intestino del vector. Esta capacidad de selección de genotipos parece ser vector dependiente (18), para esta cepa de *R. prolixus* obtenida en Venezuela y refrescada periódicamente con cepas de origen silvestre y peridoméstico recién colectadas, lo cual explicaría porque en áreas endémicas de nuestro país, se ha encontrado TcI como genotipo predominante (3).

Este trabajo es una primera aproximación a los escasos estudios con datos parasitológicos y moleculares coincidentes, que ayuden a dilucidar la existencia de asociaciones específicas vector-subpoblaciones del parásito en el laboratorio y en el campo. Pruebas moleculares confirmatorias con algunos otros marcadores para probar la predominancia o segregación de subpoblaciones dentro del vector se están llevando a cabo

AGRADECIMIENTOS *A la Dra Elizabeth Ferrer y al Dr. Francisco Triana del Instituto de Investigaciones Biomedicas BIOMED, Universidad de Carabobo Sede Aragua, por la revisión del manuscrito y sus recomendaciones. Al auxiliar docente. Lic. Luís Villamizar por su asistencia técnica en la manutención de colonias de triatominos.* ***Financiamiento:*** *CDCH –UCV Proyecto No: PI 03-00-5748-2004 y FONACIT Proyecto G-2005000827.*

BIBLIOGRAFIA

.

1. Hoare. The Trypanosomes of Mammals, Blackwell Sc. Pub, Oxford, 1972; pp. 749.
2. Podlipaev SA. Insect trypanosomatids: the need to know more. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000; 95:517-22.
3. Añez N, Crisante G, da Silva FM, Rojas A , Carrasco H, Umezawa E, Stolf AM, Ramírez JL, Teixeira MG. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. Trop. Med. Int. Health. 2004; 12: 1319-26.
4. O'Connor O, Bosseno MF , Barnabe C, Douzery E, Breniere S F. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. Infect. Genet. Evol. 2007; 7: 587–593.
5. Perlowagora-Szumlewicz, A, Moreira JC. In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1994; 89: 603-618.
6. Kollien, A, Schaub, G. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. Parasitol.Today. 2000; 16: 381-387.
7. Araújo CA, Cabello PH, Jansen AM. Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: *In vitro* and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. Acta Trop. 2007; 101:225-231.
8. Pifano F. Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Med. 1960; III: 73-99.
9. Bosseno MF, Yacsik N, Vargas F, Breniere,SF. Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal Genotypes (Clonet 20 and 39) Isolated from Bolivian Triatomines Following Subculture in Liquid Medium. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000; 95: 601-607.

10. Herrera, L., Pinho, A., Viegas, C., Lorosa, E., Xavier, S., Emperaire, L., Mangia, R., Carrasco, H., Fernandes, O., y Jansen A. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in João Costa, Piauí, Brazil, an endemic area of Chagas disease. Acta Parasitológica, 2003; 48:.

11. Gómez-Nuñez J, Fernández M. La colonia de *Rhodnius prolixus* en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Bol. Infor. Dir. Malariol. San. Amb. 1963; 3: 134-137.

12. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi.* Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 1962; 4: 389-396.

13. Vallejo G, Guhl F., Chiari E. , Macedo A. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by Polymerase Chain Reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Trop. 1999; 72**:** 203-212.

14. Murthy VK, Dibbem K.M., Campbell, D.A., PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli.* Mol Cell Probes. 1992; 6:237-43.

15. Macedo AM., Penna SDJ. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitol. Today. 1998; 14: 119 124.

16. Pinto AS, de Lana M, Bastrenta B, Barnabé C, Quesney V, Noël S, Tibayrenc M.Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. Parasitol Res. 1998; 84:348-53.

17. Marcet PL, Duffy J, Cardinal MV, Burgos JM, Lauricella MA, Levin MJ, Kitron U, Gurtler RE, Schijman AG. PCR- based screening and lineage identification of *T. cruzi* directly from fecal simples of triatomine bugs from northwestern Argentina. Parasitology. 2006; 132: 57-65.

18. Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Differential *in vitro* and *in vivo* behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus.* Exp Parasitol. 1996; 82:112-21