

GENOTIFICACIÓN DE *Trypanosoma cruzi* EN PACIENTES CON DISTINTO GRADO DE CARDIOPATÍA CHAGÁSICA

Peralta, Romina

*Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología Aplicadas
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL)*

Área: Ciencias Biológicas

Sub-área: Bioquímica

Grupo: X

Palabras clave: Chagas, genotificación, MLS-PCR.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria de sangre y tejidos causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2007). En Argentina, se estima que más de 2 millones de personas están infectadas (Storino y col., 2002), y de estos, entre un 20 y 30% evolucionan generalmente a la miocardiopatía chagásica crónica (CCC) después de una etapa silenciosa de 10 a 20 años de duración. Actualmente no se conocen exactamente los factores que determinan la evolución hacia la enfermedad cardíaca por lo que algunas líneas de trabajo orientaron sus investigaciones hacia la respuesta inmune y/o genética del hospedero infectado (García Borrás y col., 2006); mientras que otras lo hicieron hacia la genética del parásito (Risso y col., 2004). Respecto al parásito, éste posee una única mitocondria que contiene ADN extranuclear dispuesto en una red compleja y compacta llamada kinetoplasto, formada por 40-50 maxicírculos y 5000 a 10000 minicírculos (Bloom y col., 2000). Cada minicírculo tiene cuatro regiones altamente conservadas de 120 pb separadas entre sí por regiones hipervariables de 330 pb, ambos utilizados como blancos para la detección de *T. cruzi* por PCR. La gran variabilidad genética de *T. cruzi* es resultado de un proceso de evolución clonal, donde el intercambio genético intraespecie ha contribuido a su estructura poblacional. Actualmente, se lo clasifica en Unidades Discretas de Tipificación (UDT), enumeradas de I a VI, cada una integrada por cepas genéticamente similares, identificables por marcadores genéticos (Zingales y col., 2009). En base a esto, se ha buscado relacionar las distintas poblaciones con la infección en humanos, teniendo en cuenta las regiones geográficas, vías de transmisión y diferentes manifestaciones clínicas (Virreira y col., 2006). Mientras que algunos consideran a las UDT TcII, TcV y TcVI como las principales causantes de CCC (Venegas y col., 2009), otros asocian a TcI con manifestaciones más graves de la enfermedad (Burgos y col., 2008), y otros no han podido encontrar ningún tipo de asociación (D'Ávila y col., 2006). Teniendo en cuenta que la diversidad genética de *T. cruzi*, su interacción con el sistema inmune del hospedero y otros factores ambientales pueden condicionar la evolución clínica de los infectados, es de interés genotipificar la cepa parasitaria y analizar su asociación con la evolución de la patología chagásica.

Proyecto: CAI+D2011. Marcadores genéticos asociados a la regulación inmunoendócrina: potenciales agentes pronósticos de la evolución hacia la cardiopatía chagásica crónica.

Director del proyecto: Diez, Cristina Noemí

Director del becario: Diez, Cristina Noemí

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar si existe asociación entre el tipo de cepa infectante de *T. cruzi* y la evolución de la infección a la miocardiopatía chagásica crónica.

Objetivos específicos:

- Purificar ADN de muestras de sangre de individuos infectados con *T. cruzi* por más de 20 años.
- Amplificar las regiones hipervariables del ADNk de *T. cruzi*.
- Realizar MLS-PCR para la identificación de las diferentes UDT de *T. cruzi*.

METODOLOGÍA

Se trabajó con muestras de sangre de 52 individuos con Chagas crónico con más de 20 años de infección y fueron clasificados en 2 grupos: Asintomáticos, con clínica y electrocardiograma (ECG) normal (30); CCC (Cardiopatía chagásica crónica) con signos y síntomas de insuficiencia cardíaca congestiva y ECG patológico (22).

Se purificó ADN de dichas muestras, previamente conservadas en Guanidina/EDTA (6M/0,1M) por la técnica convencional que consta de una extracción con fenol/cloroformo/isoamílico, y posterior precipitación etanólica. Cada grupo fue procesado con un control negativo con agua y un control positivo con ADN del parásito. Para evaluar la calidad y concentración de ADN se usó un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ para leer DO a 260 y 280nm.

Dado que en nuestra región solo se han identificado 4 tipos de UDT (TcI, TcII, TcV y TcVI) infectando humanos, se realizó la genotificación de dichas cepas por PCR de minicírculos específica de linaje (MLS-PCR) a partir de las muestras purificadas sin tener que aislar previamente al parásito (Diez y col., 2010). En una primera reacción, se amplificaron todas las secuencias hipervariables de los minicírculos (RHVm) por PCR convencional, utilizando primers sintetizados comercialmente por Invitrogen™, y el termociclador de gradiente Veriti Thermal cycler Applied Biosystem®. La composición de la mezcla de reacción y programa de PCR se describen en la tabla 1 y 2, respectivamente. En cada PCR se incluyeron controles negativos y positivos de purificación de ADN de muestras y dos blancos de reacción, sin ADN. Los productos de 330 pb generados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% coloreado con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain y un transiluminador de UV.

Tabla 1. Programa de PCR.

CICLOS	ETAPAS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
1	Desn. Inicial	95	5
35	Desnaturalización	95	1
	Hibridación	60	1
	Extensión	72	1
1	Extensión final	72	5

Tabla 2. Mezcla de reacción de PCR para la identificación de ADNk.

REACTIVOS	VOLUMEN µl (conc. final)
Buffer 5X	10 (1X)
MgCl ₂	6 (3 mM)
dNTPs	0,5 (0,25 mM)
Primer F/R	2 (0,4 µM)
Taq polimerasa	0,4
Agua miliQ	24,1
Muestra	5

Proyecto: CAI+D2011. Marcadores genéticos asociados a la regulación inmunoendócrina: potenciales agentes pronósticos de la evolución hacia la cardiopatía chagásica crónica.

Director del proyecto: Diez, Cristina Noemí

Director del becario: Diez, Cristina Noemí

La MLS-PCR es una PCR anidada que se realiza sobre una concentración estandarizada de los amplificadores obtenidos previamente. En ésta, utilizamos oligonucleótidos específicos para cada UDT, con sus T° de hibridación respectivas, y el mismo programa de la primer PCR, variando solamente el número de ciclos (30 ciclos) (ver Tabla 3).

Tabla 3. Primers usados para cada UDT.

UDT	PRIMERS	T° ANNEALING (°C)	TAMAÑO (pbs)
Tc I	X61	63	111
Tc II	IB1	63	160
Tc V	GP1	56	166
Tc VI*	Grp 1	55	175
	TUL	39	160

*Para TcVI se utilizaron dos tipos de primers para aumentar la sensibilidad de detección.

Con los productos obtenidos se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 3% coloreados con GelRed™ y se visualizaron en transiluminador UV.

En todos los casos se utilizaron controles negativos de reacción y de purificación de ADN, así como de carga de muestra. Como controles positivos se usaron cepas de referencia correspondientes a cada UDT. Los datos

obtenidos fueron evaluados estadísticamente utilizando el Test de Fisher y el Test de correlación de Spearman utilizando como significación estadística $p < 0,05$.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Resultados:

Purificación de ADN: de las lecturas de ADN en el Nanodrop, se obtuvo un índice de pureza entre 1,8 y 2,0, adecuado para el análisis.

Amplificación de ADNk: En se observa el producto de amplificación de 330pb.

Tipificación de *T. cruzi* (amplificación por MLS-PCR): Del total de las muestras, el 83% pudo ser tipificado. Comparando ambos grupos, se observó una frecuencia mayor de TcV como infección única en los Asintomáticos y de TcVI en CCC (Test de Fisher, $p < 0.05$). La infección mixta más frecuente fue TcV/TcVI en ambos grupos, destacándose la presencia de TcVI en la mayoría de las infecciones mixtas. TcII se encontró en muy baja frecuencia en general y solamente asociada a otras UDT en asintomáticos, mientras que en CCC se encontró distribuida de igual forma en infecciones únicas y mixtas. TcI se encontró en un 11,5% en sanos, sola o asociada a TcVI mientras que en el segundo grupo se halló en un 17,6%, sola o asociada a TcV y TcVI.

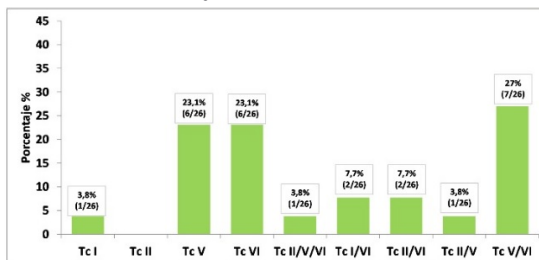


Figura 1. Distribución de todas las UDT tipificadas en el grupo A.

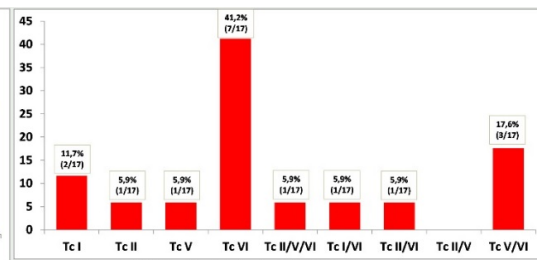


Figura 2. Distribución de todas las UDT tipificadas en el grupo CCC.

Proyecto: CAI+D2011. Marcadores genéticos asociados a la regulación inmunoendócrina: potenciales agentes pronósticos de la evolución hacia la cardiopatía chagásica crónica.

Director del proyecto: Diez, Cristina Noemí

Director del becario: Diez, Cristina Noemí

Conclusiones:

En las infecciones únicas, se observó una mayor frecuencia de UDT TcV en infectados asintomáticos respecto a los CCC, mientras que en estos últimos, TcVI fue la más frecuente. Estos resultados indicarían que la UDT TcVI podría estar asociada al desarrollo de la miocardiopatía chagásica, mientras que TcV a un mejor pronóstico. Estas tendencias deberían corroborarse con un número mayor de muestras de pacientes con estas características.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- **Burgos J., Altcheh J., Bisio M., Duffy T., Valadares H., Seidenstein M., Piccinali R., Freitas J., Levin M., Macchi L., Macedo A., Freilij H., Schijman A.**, 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int Parasitol*; 37: 1319–1327.
- **Bloom D., de Haan A., Van Den Burg J., Van Der Berg M., Sloof P., Jirku M., Lukes JyBenne R.**, 2000. Mitochondrial minicircles in the free-living bononid *Bodo saltans* contain two gRNA gene cassettes and are not found in large networks. *RNA* 6(1):121-35.
- **D'Avila D., Gontijo E., Lages-Silva E., Meira W., Chiari E., Galvão L.**, 2006. Random amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* isolates from chagasic patients with different clinical forms. *Parasitol Res.*;98(5):455-61.
- **Diez C., Lorenz V., Ortiz S., Gonzalez V., Racca A., Bontempi I., Manattini S., Solari A., Marcipar I.**, 2010. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* sub-lineage in human samples from a north-east Argentina area by hybridization with DNA probes and specific PCR. *Am J Trop Med Hyg.*;82(1):67-73.
- **García Borrás S., Diez C., Cotorruelo C., Pellizon O., Biondi C., Beloscar J., Bottasso O., Racca A.**, 2006. A class II DRB 1 polymorphism in Argentinians undergoing chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Ann Clin Biochem*; 43:214-216.
- **Risso M., Garbarino G., Mocetti E., Campetella O., Gonzalez S., Buscaglia C., Leguizamon M.**, 2004. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J Infect Dis*; 189:2250–2259.
- **Venegas J., Coñoepan W., Pichuantes S., Miranda S., Apt W., Arribada A., Zulantay I., Coronado X., Rodriguez J., Reyes E., Solari A., Sanchez G.**, 2009. Differential distribution of *Trypanosoma cruzi* clones in human chronic chagasic cardiopathic and non-cardiopathic individuals. *Acta Trop.*;109(3):187-93.
- **Virreira M., Alonso-Vega C., Solano M., Jijena J., Brutus L., Bustamante Z., Truyens C., Schneider D., Torrico F., Carlier Y., Svoboda M.**, 2006. Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*; 75: 871–879.
- **WHO**, 2007. “Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)”. Report of Scientific group in Chagas disease; 1533–1543.
- **Zingales B., Andrade S., Briones M., Campbell D., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A., Machado C., Miles M., Romanha A., Sturm N., Tibayrenc M., Schijman A.**, 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(7): 1051-4.