

Parasitología molecular

ENFERMEDAD DE CHAGAS

Estudio de la estructura genética de población de aislamientos del linaje I de *Trypanosoma cruzi* mediante microsatélites en áreas rurales del Gran Chaco, Argentina

Anahí Alberti-D'Amato^{1,2}, Christian Barnabé², Martin Llewellyn³, Mercedes Monje-Rumi¹, Paula Ragone¹, Juan José Lauthier¹, Nicolás Tomasini¹, Alejandro Uncos¹, Federico Ramos¹, María Celia Mora¹, Julio Nasser⁴, Miguel Ángel Basombrío¹, Michel Tibayrenc², Patricio Diosque¹

¹ Unidad de Epidemiología Molecular, Instituto de Patología Experimental, Universidad Nacional de Salta, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina

² Institut de Recherche pour le Développement, Francia

³ London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom

⁴ Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Argentina

Introducción. El estudio de la estructura genética de población de *Trypanosoma cruzi* resulta de interés en relación con aspectos del conocimiento básico y de la epidemiología de la enfermedad de Chagas. En el cono sur de América Latina, la presencia del linaje TcI no ha sido de gran relevancia en humanos; sin embargo, la persistencia de TcI en ambos ciclos (silvestre y doméstico) está bien documentada.

El objetivo fue analizar la estructura genética de población del linaje TcI y la influencia del ciclo en la estructuración de población.

Materiales y métodos. Se hizo el aislamiento de *T. cruzi* a partir de 60 huéspedes de un área de la provincia de Chaco, Argentina, de 1999 a 2008. Los aislamientos se realizaron por dos métodos. Se obtuvieron clones mediante micromanipulación. Los aislamientos y clones se analizaron mediante 10 *loci* de microsatélites específicos. Se estudiaron los indicadores de población (H_o , H_e , riqueza alélica, Fis, Fst, genotipos multilocus, etc.) con los programas FSTATv1.2, Arlequin v3.0, Multilocus v1.3.

Resultados. Se obtuvieron aislamientos de TcI de 29 huéspedes (14 comadrejas, 12 triatomíneos y 3 perros), y se analizaron de 95 *stocks*: 47 aislamientos y 48 clones. Después de la corrección de clones,

se encontraron 42 *stocks* representativos. Se obtuvieron 24 genotipos multilocus diferentes y un Fis de 0,391, lo que indica exceso de homocigotas. Se observó una gran estructuración de población. Al tener en cuenta el ciclo de procedencia, no se observaron diferencias en los índices de población ($F_{st} > 0,05$). Sin embargo, se encontraron diferencias cuando se analizó la procedencia geográfica de los huéspedes ($F_{st} > 0,25$).

Conclusiones. Los resultados sugieren que el ciclo de transmisión no es de gran importancia en la estructuración de población y que probablemente ésta esté explicada en función de la distancia geográfica, lo cual sugiere fenómenos de aislamiento o ausencia de flujo génico entre subpoblaciones del linaje TcI en nuestra área de estudio.

• • •

Clonación y expresión de las subunidades α y β de la deshidrogenasa de 2-oxoisovalerato de *Trypanosoma cruzi*

Carolina Manchola¹, Brian Suárez², Ariel Silber²

¹ Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

² Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil

Introducción. *Trypanosoma cruzi* usa aminoácidos como fuente de carbono y energía. Los estudios demostraron que L-prolina y L-glutamato favorecen la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos, y la presencia de L-leucina y L-isoleucina inhibe el catabolismo de L-prolina, lo que interfiere con la metaciclogénesis inducida por prolina.

La degradación de aminoácidos ramificados en *T. cruzi* comienza con una deaminación catalizada por la tirosina aminotransferasa. Después, el complejo enzimático α -cetoácido deshidrogenasa, conformado por dos componentes (E1, E2), es responsable de las siguientes tres reacciones de esta vía.

Objetivo. Clonar y expresar las subunidades α y β de la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (componente E1 del complejo α -cetoácido deshidrogenasa).

Materiales y métodos. Utilizando los datos depositados para el genoma de *T. cruzi*, se diseñaron oligos para amplificar los ORF de estudio. Estos fragmentos se obtuvieron por PCR a partir de ADN molde extraído de formas epimastigotas de la cepa CL-14 y clonados en vectores de tipo T. Posteriormente, la identidad se verificó por secuenciación y los fragmentos se subclonaron en el vector (pET28a+) para expresión recombinante en *Escherichia coli*. Diferentes condiciones de expresión (tiempo, temperatura, IPTG, cepa) se han ensayado para cada proteína. La detección de actividad enzimática se hizo usando extractos crudos de *T. cruzi*.

Resultados. Los genes en estudio fueron amplificados por PCR y sus productos de expresión fueron resueltos en geles de SDS-PAGE, y se observó la masa esperada para cada una. Además, la actividad enzimática usando 3-metil ácido 2-oxopentanoico como sustrato en *T. cruzi* confirma la existencia de esta vía de degradación en el parásito.

Conclusiones. *Trypanosoma cruzi* es capaz de degradar aminoácidos ramificados y generar intermediarios que pueden ser usados como sustento energético. No obstante, la caracterización de la vía completa sigue siendo objeto de estudio para determinar su papel funcional en la biología de *T. cruzi*.

• • •

Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* inhibe la ruta de las lectinas del sistema del complemento humano al interactuar con L-ficolina

Carolina Valck, Paula Abello, Katherine Weinberger, Galia Ramírez, Lorena Aguilar, Andrea González, Francisca Coddou, Ismael Maldonado, Arturo Ferreira
Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Introducción. *Trypanosoma cruzi*, agente de la enfermedad de Chagas, infecta a 20 millones de personas en América Latina. A diferencia de los epimastigotes no infecciosos, los tripomastigotes infecciosos resisten la actividad del sistema del complemento, brazo efector de la inmunidad innata y adquirida. CRP, T-DAF, ácido siálico y lipasas en los tripomastigotes explican esta resistencia. *In vitro*, la calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), al igual que la humana, inhibe la ruta clásica del complemento, ya que interactúa con C1, detector de señales de peligro de la ruta clásica, y compite con (C1r-C1s)₂ para unirse a las colas colagenosas

de C1q. Dada la similitud estructural y funcional de C1 con las ficolinas, otro detector de señales de peligro del sistema del complemento, se estudió si TcCRT interactúa e inhibe la activación de ficolinas humanas.

Materiales y métodos. La activación de L-ficolina humana en presencia de TcCRT recombinante se observó por ELISA, usando ácido lipoteicoico como activador de la vía. La unión de TcCRT a ficolinas se detectó mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. La presencia de TcCRT en epimastigotes y tripomastigotes se detectó mediante citometría de flujo.

Resultados. La TcCRT inhibe la ruta de activación de las lectinas humanas, iniciada por L-ficolina, propiedad no compartida por H-ficolina. L-ficolina se une a tripomastigotes. TcCRT no se une a la porción globular de L-ficolina, comportamiento similar al de HuCRT que se une a la misma región donde MASP interactúa con L-ficolina. Sólo los tripomastigotes exponen TcCRT en forma significativa en sus superficies. Así, L-ficolina humana se une al 86 % de los tripomastigotes y sólo a 27 % de los epimastigotes.

Conclusión. La unión de L-ficolina a TcCRT y la inhibición funcional consecuente de la ruta de las lectinas del complemento, pueden ser una estrategia de *T. cruzi* para evadir al sistema inmunitario.

Financiación. Proyectos: FONDECYT-Chile (1095095) y Bicentenario de Anillos CONICYT-Chile (ACT-112)

• • •

***Trypanosoma cruzi* unidades discretas de tipificación: microsatélites *loci* y genética de poblaciones de las DTU TcV y TcI en Bolivia y Perú**

Christian Barnabé¹, Thierry De Meeûs^{2,3}, François Noireau¹, Marie-France Bosseno¹, Eric Marcelo Monje¹, François Renaud¹, Simone Frédérique Brenière¹

¹ MIVEGEC, Université de Montpellier 1 et 2, Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, Institut de Recherche pour le Développement, Representación en Bolivia, La Paz, Bolivia

² UMR 177 IRD-CIRAD, Interactions Hôtes-Vecteurs-Parasites dans les Infections dans les Trypanosomatidae, Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide,

Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso

³ CNRS, Délégation Languedoc-Roussillon, Montpellier, France

Introducción. *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, se clasifica en seis unidades discretas de tipificación, TcI a TcVI, en donde TcI y TcV se encuentran principalmente en infecciones humanas. El análisis de marcadores microsatélites fue seleccionado para estudiar la estructura de las poblaciones naturales pertenecientes a estas unidades discretas de tipificación.

Materiales y métodos. Se hizo el análisis de genética de poblaciones a partir de 11 submuestras de aislamientos provenientes de Bolivia y Perú: seis corresponden al grupo TcI y cinco al grupo TcV, definidas por cuatro criterios: unidades discretas de tipificación, origen biológico a partir de especies de vectores, origen geográfico y fecha de aislamiento.

Resultados. En el análisis, la agrupación de microsatélites no mostró relación entre las seis unidades discretas de tipificación, pero es relevante para el análisis de unidades discretas de tipificación. La mayoría de las cepas TcV presentaron el mismo genotipo *multilocus* en todas las submuestras, encontrándose cinco *loci* heterocigotos y cinco *loci* homocigotos. En TcI, cuatro grupos se definieron de acuerdo con las especies de vectores. La mayoría de ellos concuerdan con un tipo de propagación por clones (aislamientos procedentes de *Triatoma infestans* y *Triatoma sordida*), mientras que algunas poblaciones altamente homocigotas (procedentes de *Rhodnius stali*) sugieren que el sexo puede ocurrir con mayor o menor frecuencia, corroborando la existencia de una posible recombinación.

Conclusiones. No se observó una correlación entre el factor espacio-temporal con la diversidad genética observada, mientras que la ecología, sobre todo en lo que respecta al huésped, mostró ser un factor importante. Estos resultados ponen de manifiesto la extrema heterogeneidad de *T. cruzi* y sugieren la necesidad de realizar mayores estudios sobre la genética de poblaciones en una escala espacio-temporal y ecológica integradas.

• • •

Aislamientos de *Trypanosoma cruzi* del estado Miranda, Venezuela: aproximación a su caracterización biológica y molecular

Daisy Lozano^{1,2}, Mercedes Viettri³, Elizabeth Ferrer³, Servio Urdaneta¹, Leidi Herrera¹

¹ Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de

Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

² Postgrado en Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

³ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Maracay, Venezuela

Introducción. *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un parásito con variabilidad biológica y molecular, el cual afecta a 18 millones de personas en América. Se consideraba que esta parasitosis estaba controlada en Venezuela; sin embargo, se han presentado brotes recientes de transmisión oral en Caracas y el estado Miranda, regiones no endémicas.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar a nivel biológico y molecular, aislamientos de *T. cruzi* de vectores y mamíferos del estado Miranda.

Materiales y métodos. Se analizaron 23 muestras de *T. cruzi* obtenidas de heces de *Panstrongylus geniculatus* (17), de sangre de *Rattus rattus* (1), *Didelphis marsupialis* (2) y humanos (3); se inocularon en modelo de ratón (200 formas metacíclicas por gramo) y se recuperaron por hemocultivo en medio NNN para la caracterización biológica y extracción de ADN por Chelex. Se corroboró a la especie *T. cruzi* mediante presencia de ADN de cinetoplasto (iniciadores 121-122) y se reconocieron genotipos mediante el estudio del gen de mini-exón (iniciadores TC-TCI-TCII), y de los ADN ribosómicos 24Sα (iniciadores D71-D72) y 18S (iniciadores V1-V2).

Resultados. El curso de la infección reveló en media un periodo prepatente de 12 días, parasitemia máxima de $6,9 \times 10^4$ y 43,33 % de mortalidad, con heterogeneidad en su comportamiento biológico a pesar de corresponder a un mismo genotipo (TcI), lo cual explicaría las diferentes manifestaciones de la parasitosis.

Conclusión. El trabajo refuerza la necesidad de realizar más estudios sobre ciclos de transmisión urbanos y periurbanos de *T. cruzi* en el estado Miranda, con potencial riesgo de expansión de la parasitosis hacia la vecina ciudad capital de Caracas (Distrito Metropolitano) y estados próximos.

Financiamiento. Proyectos: Proyecto en Red Misión Ciencia MPPCTII N°. 2008000911-6, Proyecto FONACIT N°. G-2005000827 y PROYECTO LOCTI-Universidad de Carabobo.

• • •

Análisis de la variabilidad del gen *TSSA* en clones colombianos de *Trypanosoma cruzi* I y sus implicaciones en el desarrollo de ensayos de serología específicos de linaje

Daniel Suárez, Juan David Ramírez, Felipe Guhl
Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La gran variabilidad en *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, ha permitido clasificarlo en seis diferentes DTU (*Discrete Typing Units*), siendo TcI la más predominante en Colombia. Los reportes actuales demuestran la notable variabilidad dentro de TcI y su asociación a ciclos de transmisión, utilizando marcadores como la región intergénica del gen minixón (SL-IR), citocromo-b (Cytb), entre otros. El objetivo de este trabajo es la utilización del gen *TSSA* (*Trypomastigote Small Surface Antigen*) como nuevo marcador que permita confirmar esta variabilidad en TcI, además de correlacionar las implicaciones biológicas para posibles ensayos de serología específicos de linaje.

Métodos y materiales. Se seleccionaron 50 clones aislados de humanos, vectores y reservorios de diferentes regiones geográficas de Colombia. Su caracterización como TcI se hizo usando la región SL-IR. El gen *TSSA* fue secuenciado y alineado en ClustalW. Se construyeron árboles de máxima verosimilitud (MV) y una red de haplotipos por *median-joining* utilizando Network 2.0. Se predijo la secuencia de polipéptidos y la estructura secundaria de cada una de las secuencias de los clones.

Resultados. La presencia de los polimorfismos observados en las secuencias del gen *TSSA*, no permitieron realizar asociaciones con los genotipos propuestos por SL-IR, pero los resultados filogenéticos permiten establecer gran variabilidad dentro de TcI para *TSSA*, así como inferir asociaciones con ciclos de transmisión y grupos de clones con la construcción de redes de haplotipos. Los análisis de predicción de estructura secundaria de *TSSA* confirman su gran variabilidad y la asociación a plegamientos de péptidos diferentes dentro de TcI, así como importantes sustituciones en residuos asociados a O-glucosilaciones.

Conclusiones. Este es el primer estudio que evalúa la variabilidad del gen *TSSA* en clones colombianos y determina importantes cambios a nivel de plegamientos de péptidos, haciendo

poco confiable su uso para ensayos serológicos específicos de linaje.

• • •

Caracterización genética de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* (TcI)

Eréndira Rojas-Ortega, Ignacio Martínez, Bertha Espinoza
Laboratorio de Estudios sobre Tripanosomiasis Americana, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Introducción. *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, se ha dividido en seis grupos genéticos: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI, los cuales están presentes en diversas regiones de Latinoamérica. Recientemente se ha descrito la existencia de subgrupos de TcI en Centroamérica. En México se ha demostrado que el grupo genético predominante es TcI, pero no se han reportado subgrupos. El objetivo del presente trabajo es analizar mediante microsatélites polimórficos la variabilidad genética del grupo TcI en México.

Metodología. Un panel de 67 cepas mexicanas de *T. cruzi*, caracterizadas como TcI, se analizaron en siete *loci* de microsatélites mediante PCR. Los productos de amplificación se observaron en geles de acrilamida al 12 o 15 %. Con los datos obtenidos, se construyó una matriz binaria que se analizó con el programa Mr. Bayes 3.1.2. Los árboles filogenéticos obtenidos se visualizaron mediante el programa Treeview 1.6.6. Además, se evaluó la sensibilidad de algunas de las cepas de origen humano a los fármacos nifutimox y benznidazol.

Resultados. Con el análisis de microsatélites se determinó que las cepas mexicanas TcI podían subagruparse en al menos dos genotipos (TcIA y TcIB), siendo predominante el segundo, en el cual se incluye el 73 % de las cepas analizadas. También, se determinó que en el genotipo TcIA predominaron las cepas de origen humano (80 %), mientras que en el genotipo TcIB predominaron las cepas obtenidas de vectores (85 %). Por otra parte, se observaron diferencias en la sensibilidad de las cepas evaluadas frente a los fármacos empleados, siendo sólo una de ellas resistente a ambos.

Conclusión. Las cepas mexicanas de *T. cruzi*, del grupo TcI, pueden subagruparse en al menos dos genotipos mediante análisis de microsatélites, los cuales parecen estar relacionados con el huésped.

Agradecimientos. Los autores agradecen a DGAPA-UNAM por su apoyo mediante el proyecto IN229209.

Cross-talk de células asesinas naturales y células dendríticas durante la infección por *Trypanosoma cruzi*

Estela Batalla, Carolina Poncini, Gerardo Mirkin, Agustina Pino, Stella González Cappa, Catalina Alba Soto

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires, Argentina

Introducción. En la infección por *Trypanosoma cruzi* las células asesinas naturales (NK) participan en la protección mediante citotoxicidad y producción de IFN- γ . Se les atribuye un papel regulador de la respuesta adaptativa en infecciones sistémicas, por su interacción con las células dendríticas (CD) y su producción de IL-10. Aquí se evaluaron, en la infección de ratón, el diálogo células asesinas naturales-células dendríticas y el efecto de la IL-10 sobre el mismo.

Materiales y métodos. En ratones de 6 a 8 semanas infectados con cepas de *T. cruzi* de alta (RA) y baja virulencia (K98) se midieron por FACS marcadores celulares y citocinas, así como la citotoxicidad de células blanco marcadas con CFSE, por incorporación de IP.

Resultados. A las 18 horas después de la infección, las células asesinas naturales aumentaron su potencial citotóxico (CD107a), su citotoxicidad frente a YAC y producción de IFN- γ , y más tardíamente (48 horas después de la infección), la producción de IL-10. Estudiando el diálogo células asesinas naturales-células dendríticas, se observó con la infección, aumento de la citotoxicidad de células asesinas naturales sobre células dendríticas inmaduras (CDi), siendo mayor con la cepa de menor virulencia ($p < 0,05$; C Vs. RA, y K98 Vs. RA, $p < 0,01$; C Vs. K98). Empleando ratones IL-10 KO y WT, infectados con RA, se demostró que la IL-10 regula negativamente la capacidad citotóxica de las células asesinas naturales sobre las CDi ($p < 0,05$).

Conclusiones. Se encontró correlación inversamente proporcional entre virulencia de la cepa de *T. cruzi* y citotoxicidad de las células asesinas naturales sobre las CDi. Esto contribuiría a aumentar diferencialmente el porcentaje de CDi en ratones infectados con la cepa de mayor virulencia, resultado en concordancia con nuestros hallazgos previos sobre la mayor proporción de CDi durante la infección con RA. La inducción por parte del parásito de IL-10 en diferentes tipos celulares, incluidas células asesinas naturales, podría constituir un mecanismo inmunorregulador

que, en el diálogo células asesinas naturales-células dendríticas, inhibiría la maduración de la mezcla de células dendríticas. Por ende, retrasaría la iniciación de la respuesta adaptativa, lo que favorece el establecimiento y la persistencia parasitarios.

• • •

Caracterización molecular de cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de presuntos brotes de enfermedad de Chagas oral en Colombia

Juan David Ramírez¹, Marleny Montilla², Zulma Cucunubá², Felipe Guhl¹

¹ Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La enfermedad de Chagas es una zoonosis compleja causada por *Trypanosoma cruzi*. Este parásito está compuesto por poblaciones heterogéneas, demostrado en seis unidades discretas de tipificación (TcI a TcVI). Existen diversas rutas de infección y la vía vectorial es la más frecuente. Se han reportado recientemente brotes de enfermedad de Chagas por vía oral en Brasil, Venezuela y Colombia, lo cual muestra la necesidad de obtener más información acerca de la epidemiología de estos brotes. En el año 2009, se detectaron dos presuntos brotes de enfermedad de Chagas oral en Colombia (Lebrija y Bucaramanga). Cinco cepas fueron aisladas de pacientes. El objetivo de este trabajo fue elucidar las características genéticas de estos aislamientos, con el propósito de obtener mayor información acerca de la dinámica de transmisión de esta ruta de infección.

Materiales y métodos. Los cinco aislamientos (LER, EH, XcH, NcH y LJVP) fueron clonados mediante dilución limitante y se obtuvieron de 5 a 10 clones por cepa. La caracterización molecular se llevó a cabo mediante amplificación de la región intergénica del gen miniexón (SL-IR) y el dominio divergente D7 del ADNr. Los clones se sometieron a secuenciación directa de las regiones SL-IR, el gen citocromo B y el gen SSU ADNr, para observar la variabilidad genética entre los clones.

Resultados y conclusiones. De acuerdo con los resultados, todos los clones fueron caracterizados como TcI y se encontraron los genotipos Ia y Id. Cuando se realizaron la secuenciación directa y los análisis respectivos, los clones de las cepas LER y XcH mostraron un alto grado de divergencia,

incluyendo distintos genotipos de TcI dentro de una misma cepa. Estos resultados corroboran el patrón de transmisión por contaminación entre ciclos de la enfermedad de Chagas en los presuntos brotes de infección oral en Colombia y sugiere la necesidad de continuar estudios con el fin de comprender la epidemiología molecular de este tipo de infecciones.

• • •

Caracterización molecular y detección de *Trypanosoma cruzi* II, III, IV y VI en clones aislados en Colombia

Juan David Ramírez¹, Martin Llewellyn², Michael Miles², Marleny Montilla³, Felipe Guhl¹

¹ Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

² Pathogens Unit, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom

³ Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, una zoonosis que afecta más de 10 millones de personas en Latinoamérica. Este protozoo presenta una gran variabilidad genética demostrada en seis unidades discretas de tipificación. En Colombia, *T. cruzi* I (TcI) y *T. cruzi* II (TcII) son las unidades discretas de tipificación más prevalentes. El objetivo de este estudio fue evaluar la posible presencia de las unidades discretas de tipificación II a VI en las poblaciones de *T. cruzi* circulantes en Colombia.

Materiales y métodos. Se evaluaron 350 clones de *T. cruzi* aislados de humanos, insectos vectores y reservorios de diferentes áreas geográficas de Colombia. Se hizo la caracterización molecular mediante amplificación de la región intergénica del gen mini-exón, el gen *24Sα*, el gen *18S*, y secuenciación directa del gen glucosa fosfato isomerasa (GPI), utilizando un panel de 32 cepas de referencia de todas las unidades discretas de tipificación.

Resultados y conclusiones. La mayoría de los clones fueron caracterizados como TcI. Asimismo, se encontraron cuatro clones TcII (MHOM/CO/07/EBcl4, MHOM/CO/07/EBcl20, IPAN/CO/10/PGPA2cl7, IPAN/CO/10/PGPA2cl8), dos clones TcIII (ITrV/CO/04/TVcl7, MDAS/CO/10/SLDN1cl3), cuatro clones TcIV (MHOM/CO/07/YLYcl7, ITrV/CO/04/TVcl6, ITrV/CO/04/TVcl9, IRHO/CO/10/SLB3cl5) y diez clones TcVI (MHOM/CO/07/VScI6, MHOM/CO/07/VScI7, MHOM/CO/07/VScI8, MHOM/CO/07/VScI9, IRHO/CO/09/Rp540cl4,

IRHO/CO/09/Rp540cl5, IRHO/CO/09/Rp540cl6, IRHO/CO/09/Rp540cl6, IRHO/CO/09/Rp540cl7, IRHO/CO/09/Rp540cl8, IRHO/CO/09/Rp540cl9).

Estos resultados demuestran la gran diversidad de DTU que circulan en Colombia, y se reporta la presencia de DTU como TcVI en *Rhodnius prolixus* silvestres que se ha asociado al ciclo doméstico. Estos resultados corroboran previas hipótesis de transmisión por contaminación y reflejan la existencia de varias DTU en Colombia.

• • •

Caracterización de la expresión de profilina en *Trypanosoma cruzi*

Juan Felipe Osorio-Méndez, Ana María Cevallos, Juliana Herrera, Juan Olivera, Federico Sánchez, Roberto Hernández

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, México, D.F., México

Universidad Nacional Autónoma de México, Posgrado en Ciencias Biológicas, México, D.F., México

Introducción. El citoesqueleto de los tripanosomátidos es atípico, se basa principalmente en polímeros de tubulina y no se han podido identificar microfilamentos de actina. Sin embargo, se tiene evidencia de la expresión de varias isoformas de actina y de la existencia de genes codificadores para proteínas habitualmente involucradas en la regulación de la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de microfilamentos. Una de estas proteínas es la profilina, una proteína que interactúa con la actina, con regiones ricas en prolinas de otras proteínas y con la membrana plasmática para regular la polimerización de la actina. Trabajos previos sugieren la expresión y funcionalidad de profilina en *Trypanosoma brucei*.

Por esta razón, se planteó como objetivo caracterizar la expresión de esta proteína en *T. cruzi*.

Materiales y métodos. Se utilizó cromatografía de afinidad a poliprolinas para purificar la profilina a partir de extractos de epimastigote de *T. cruzi*. Se está analizando la localización subcelular de la profilina fusionada con una proteína roja fluorescente en epimastigotes transfectados con un vector para expresión que codifica para esta proteína quimera.

Resultados. Se purificó una proteína del tamaño esperado para la profilina de *T. cruzi* en la fracción soluble en detergente de extractos de epimastigotes, la cual no se encuentra presente en una fracción soluble en ausencia de detergente. A diferencia de otras profilinas, esta proteína eluye a

concentraciones bajas de sales. Se construyó un vector de expresión para *T. cruzi* que codifica para profilina fusionada con la proteína roja fluorescente mCherry. Este vector lo estamos utilizando para analizar la localización subcelular de profilina en epimastigotes.

Conclusiones. Los resultados obtenidos a la fecha sugieren que la profilina de *T. cruzi* se encuentra asociada a membranas en el estadio de epimastigote. Además, comparada con profilinas de otras especies, también sugieren una menor afinidad de esta proteína por las poliprolinas.



Multilocus Sequence Typing: en busca de un nuevo método de referencia para la tipificación de aislamientos de *Trypanosoma cruzi*

Juan José Lauthier, Nicolás Tomasini, María Mercedes Monje-Rumi, Anahí Maiten Alberti-D'Amato, Paula Gabriela Ragone, Miguel Ángel Basombrío, Patricio Diosque

Unidad de Epidemiología Molecular, Instituto de Patología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina

Introducción. Actualmente, la tipificación molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, se hace mediante técnicas basadas en el análisis visual de patrones de bandas. La técnica de tipificación por secuenciación multilocus (, *Multilocus Sequence Typing*, MLST) es una herramienta ideada originalmente para la tipificación de bacterias, la cual se basa en la secuenciación de genes metabólicos de copia simple de ≈500 pb. Esta herramienta minimiza la interpretación subjetiva de datos, ya que se trabaja directamente con secuencias de nucleótidos y, además, presenta la ventaja de que los datos de secuencias son fácilmente intercambiables mediante bases de datos a través de internet.

Materiales y métodos. En el presente trabajo se examinaron fragmentos de 10 genes metabólicos en cepas de referencia provenientes de toda América y un conjunto de aislamientos provenientes de la provincia de Chaco, Argentina. Las secuencias obtenidas se manipularon de tres modos diferentes: i) identificación de secuencias diploides tipo; ii) duplicación de sitios polimórficos, y iii) concatenación de las secuencias de los 10 fragmentos de genes estudiados. Estos datos se utilizaron para la construcción de árboles *neighbor joining*.

Resultados. Se obtuvieron árboles a partir de los cuales se identificaron los seis DTU de *T. cruzi* con altos valores de *bootstrap*. Se identificaron cinco

genotipos de TcI y 2 de Tc V para los aislamientos provenientes de la Provincia de Chaco.

Conclusiones. Los resultados obtenidos muestran que el enfoque de MLST representa una herramienta promisoriosa para la tipificación de aislamientos de *T. cruzi*, ya que presenta un gran poder resolutivo y es de fácil reproducibilidad, lo cual convierte al MLST en un excelente candidato a convertirse en el método de referencia para la tipificación molecular de aislamientos de *T. cruzi*.

Financiación. Chagas Epinet, a European Union Seventh Framework Program e IRD-DSF.



Chagas' disease in a wormy world

María Teresa Galán-Puchades¹, Antonio Osuna²

¹ Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia, España

² Laboratorio de Bioquímica y Parasitología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, España

Introduction. Most hosts, including humans, are infected with multiple parasites. Interactions between intestinal helminths or extraintestinal larvae, and pathogens causing diseases such as tuberculosis, AIDS, and malaria are particularly interesting. Helminth infection can bias the human immune response towards a T-helper type 2 (Th2) over a type 1 (Th1) response impairing the host's ability to control concurrent intracellular microparasite infections, such as *Trypanosoma cruzi*, and potentially modifying disease dynamics.

Material and methods. We have revised literature with the aim to search evidence on the interactions between helminths and *T. cruzi* and whether co-infection may favour or not the transmission or alter the clinical progression of Chagas' disease in different hosts, including humans.

Results. As a result of a human autopsy survey, people who harbour co-infection with cysticercosis and *T. cruzi* lived more than those who harboured only one of the two parasites or none. Dogs suffering from Chagas' disease only, showed impaired heart lesions compared with those presenting co-infection with *Dirofilaria immitis*, the more prevalent group. Chronic helminth infections in mice showed a significant influence in the susceptibility to *T. cruzi*.

Conclusions. Epidemiological as well pathological studies in humans typically focus on single-parasite systems. Consequently, our current disease-by-disease approach to modelling and treating infectious diseases, such as Chagas' disease, may be inadequate. A helminth-induced

immune reaction in humans may play an important role in disease establishment and may influence the pathological course and progression of the disease. In particular, as helminths are among the most common parasites of free-living animals, they may play a relevant yet underappreciated role in shaping Chagas' disease emergence patterns in natural populations.

Great care should be taken in the interpretation of immunological and pathological data from human Chagas' disease, as helminth co-infections may interfere significantly with human responses and should be taken into account by researchers and clinicians.

• • •

Caracterización biológica y molecular de *Trypanosoma rangeli* aislado de un paciente de Casanare

Marleny Montilla¹, Paula Pavía², Carolina Flórez¹, Zulma M. Cucunubá¹, Concepción Puerta², Edgar Parra³, Mariela Torres⁴

¹ Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Patología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Grupo de Entomología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. *Trypanosoma rangeli* es un parásito no patógeno para el hombre que comparte con *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, áreas geográficas, insectos vectores y huéspedes mamíferos. Además, tienen antígenos comunes que dan lugar a falsos positivos en el diagnóstico de *T. cruzi*.

En este trabajo se presenta la caracterización biológica y molecular de un aislamiento de un paciente de Casanare, correspondiente a *T. rangeli*.

Materiales y métodos. Se obtuvo un aislamiento de tripanosoma por hemocultivo de una gestante de Yopal, Casanare, con ELISA positivo en papel filtro y pruebas en suero negativas de ELISA e IFI. La confirmación de la especie se hizo mediante PCR con los iniciadores TcH2AF-R, TrF1-R2 y Tr-Int 1-2. Para evaluar el comportamiento biológico, se inocularon 10 insectos *Rhodnius prolixus* por vía intracelómica. A los 30 días después de la infección, se analizaron muestras de contenido rectal y glándulas salivales, las cuales se inocularon en dos ratones CD1-ICR. A los 13 días después de la

infección, se tomaron muestras para hemocultivo y detección del parásito.

Resultados. Las pruebas de PCR permitieron identificar el aislamiento como *T. rangeli*. En las muestras de glándulas salivales, se observaron más de 20 parásitos y, en las de contenido rectal, un parásito por campo. Luego de pase por ratón, sólo se detectó parasitemia en los animales inoculados con glándulas salivales, cuyo hemocultivo a los 15 días presentó formas parasitarias. En los estudios de histopatología no se observaron parásitos ni cambios en los cortes de hígado, corazón, bazo, intestino y músculo esquelético.

Conclusiones. Este caso indica la necesidad de confirmar los resultados positivos para enfermedad de Chagas obtenidos por pruebas serológicas en individuos procedentes de áreas en donde circulen ambos parásitos, con otras técnicas de mayor especificidad.

• • •

Role of the *IL4+33* gene polymorphism in *Trypanosoma cruzi* infection in Venezuela

Yessenia Aviles, Ángel Villasmil, Violeta Ogando, Mercedes Fernández-Mestre

Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental "Miguel Layrisse", Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela

Introduction. Chagas' disease is an infectious disease caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi* and whose pathogenesis is still matter of intense debate. However, the complexity of the host-parasite relationship in Chagas' disease suggests the involvement of different components of the immune system. Cytokines produced in response to *T. cruzi* infection appear to modulate disease progression by enhancing or inhibiting parasite replication in a variety of cell types. In particular, the T_H2 cytokine IL-4 maintains inflammation and parasite persistence in Chagas' disease.

Since inflammatory and anti-inflammatory cytokines play an important role during the chronic phase of Chagas' disease we investigated in this study the potential association between the *IL4+33T/C* gene polymorphism and susceptibility to *T. cruzi* infection.

Materials and methods. Whole blood was collected from 153 ethnically mixed Venezuelan subjects, classified in two groups: serologically positive for *T. cruzi* (n=86) and healthy individuals (n=67). To assess the cytokine genotypes, a polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-

SSP) methodology was applied. Frequencies were determined by direct counting and Fisher's exact test was applied to determine frequency differences between groups.

Results. We have observed a significant increase of the *IL4+33 CC* genotype among patients compared to healthy individuals (37.21 Vs. 17.91%; OR: 2.72; 95%CI: 1.27-5.82; $p=0.007$; $pc=0.02$), suggesting that this genotype could confer susceptibility to *T. cruzi* infection in Venezuelans. In addition, a decrease of the *IL4+33 CT* genotype was observed in patients when compared with healthy individuals (54.65 Vs. 73.13%; OR: 0.44; 95% IC: 0.22-0.87; $p=0.01$; $pc=0.03$).

Conclusions. The results suggest that the *IL4+33T/C* polymorphism could play an important role in the pathogenesis of chronic *T. cruzi* infection and support a possible involvement and potential role of the inflammatory and anti-inflammatory cytokines-related genes in Chagas' disease.

• • •

Real time PCR quantification of Colombian *Trypanosoma cruzi* I and II stocks in *Rhodnius prolixus* and Balb/c mice

Yizeth Bogotá, Juan David Ramírez, Felipe Guhl
Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction. *Trypanosoma cruzi* is the ethiological agent of Chagas' disease, a complex and endemic zoonotic pathology linked to the American continent. *T. cruzi* is considered a highly variable parasite divided into six Discrete Typing Units (DTUs) showing various host-vector-parasite interactions. The main insect vector of *T. cruzi* in Colombia is *Rhodnius prolixus* which has been found mostly infected with TcI. The aim of this study was to evaluate the parasite-vector-host interactions determining the role of *R. prolixus* and Balb/c mice in the possible selection of two Colombian *T. cruzi* I and II stocks.

Materials and methods. *Trypanosoma cruzi* I stock CG and *T. cruzi* II stock VS were characterized by the intergenic region of mini-exon gene. One hundred and eighty 4th instar *R. prolixus* were artificially infected and separated in three groups (TcI, TcII and TcI-TcII). The samples from faeces from this triatomines were collected in the 15, 30, 60 and 90 days after infection and the parasitemia was quantified using a real time PCR assay. The mice were infected with TcI, TcII and TcI-TcII and the

blood samples were collected every 18 days and further quantified using a real time PCR assay. The values of quantification were statistically analyzed to observe plausible interactions.

Results and conclusions. The real time PCR quantification showed that TcI and TcII coexist in mice and triatomines as well. The results showed that there is not any type of selection favouring any DTU growth dynamics in the stocks analyzed under the experimental conditions. These results suggest that there are other interactions that probably are generating *R. prolixus* to be mainly infected with TcI and further research is needed in this field.

• • •

Obtención de un complejo entre la proteína de *Trypanosoma cruzi* recombinante (Pgr24) y la peroxidasa C de rábano picante (HRPc), como herramienta de diagnóstico de la enfermedad de Chagas, mediante ELISA indirecto

Yollyseth Medina, María Tibisay Ruiz, Wilfredo Quiñones, Juan Luis Concepción
Laboratorio de Enzimología de Parásitos, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

El desarrollo de herramientas sensibles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, es necesario para la efectiva tamización de sueros.

En este trabajo se reporta la obtención de un conjugado entre la proteína recombinante de 24 kDa (Pgr24), con la peroxidasa C (HRPc), empleando el glutaraldehído como entrecruzador químico.

La reacción de conjugación se llevó a cabo en dos pasos, utilizando una relación 1:5 (Pgr24:HRPc). En un primer paso la Pgr24 se mezcló con glutaraldehído al 1,25 % (concentración final), incubando por dos horas a 4 °C; posteriormente, el exceso de glutaraldehído se eliminó empleando una columna PD-10. En el segundo paso de conjugación se añadió la HRPc, incubando por dos horas a 4 °C, deteniendo la reacción al agregar glicina 0,2 M concentración final. La separación de las diferentes especies de conjugados, de las proteínas sin conjugar, se hizo a través de una columna de exclusión molecular Sefarosa S-200. A las fracciones obtenidas por la columna, se les determinó la actividad peroxidasa y la capacidad de reaccionar con anticuerpos anti-Pgr24.

Los anticuerpos contra la Pgr24 obtenidos en conejo, se purificaron mediante una precipitación

con sulfato de amonio y una cromatografía de intercambio de iónico; tres microgramos (3 µg) de estos anticuerpos purificados se fijaron en una placa para ELISA, para evaluar las fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular, incubando las fracciones por una hora a 37 °C, revelando la presencia de conjugado, por incubación con una solución de TMB y cuantificando la intensidad del color con un lector de placas para ELISA.

Se obtuvo una población heterogénea de conjugados Pgr24 - HRPc demostrado por la elución de fracciones con diferentes pesos moleculares, con actividad peroxidasa y que son reconocidas por los anticuerpos anti-Pgr24, fijados en las placas para ELISA.

Con esta herramienta se pueden detectar con mayor sensibilidad los anticuerpos presentes en personas infectadas con *T. cruzi*.

• • •

Clonación y expresión funcional de las acuaporinas de *Trypanosoma cruzi*

Yulexi Ortiz^{1,2}, Silvana Verlezza^{1,2}, Jéssica De Días^{1,2}, Irina Arocha², Sabrina Marsiccobetre², José Luis Ramírez², Katherine Figarella², Néstor L. Uzcátegui^{1,2}

¹ Universidad Central de Venezuela, Escuela de Bioanálisis, Caracas, Venezuela

² Fundación Instituto de Estudios Avanzados, Venezuela

Introducción. En el genoma de *Trypanosoma cruzi* existen cinco genes putativos con secuencias que codifican para acuaporinas (AQP). Varios estudios previos han reportado únicamente la caracterización de la acuaporina 1 de *T. cruzi* (TcAQP1).

Con el presente trabajo se comenzó el estudio de las cuatro secuencias restantes, denominadas de acuerdo con la nomenclatura TcAQP2, TcAQP3, TcAQP4 y TcAQP5.

Materiales y métodos. Se clonaron y secuenciaron los genes putativos de acuaporinas, a partir de ADN de epimastigotes de *T. cruzi*. Para ello, se diseñaron cebadores específicos de acuerdo con las secuencias reportadas en bases de datos. Para el estudio funcional de TcAQP2, se hizo la subclonación en el plásmido pYES.2 (Invitrogen) y la transformación del constructo en *Saccharomyces cerevisiae*.

Resultados. Las secuencias de TcAQP2-5 obtenidas son idénticas a las reportadas en bases de datos (GeneDB). Se predijeron, con el uso de bioinformática, las características estructurales de las proteínas putativas, resultando todas éstas propias de la familia AQP: seis segmentos transmembrana, cinco lazos conectores y dos motivos NPA, altamente conservados. TcAQP2 se expresó funcionalmente en una cepa de *S. cerevisiae* que no posee su acuaporina nativa. En estas condiciones, TcAQP2 complementó el fenotipo de osmorregulación, lo que indica que este canal permite el paso de agua y glicerol a través de la membrana de levaduras. Las evidencias experimentales sugieren también que TcAQP2 podría transportar sustancias tóxicas como AsIII y metilglioxal.

Conclusión. Se confirmaron las secuencias de los cuatro genes de acuaporinas reportados en las bases de datos, aquí nombrados como TcAQP2-5. La expresión funcional de TcAQP2 en el modelo de *S. cerevisiae* demuestra que este canal complementa la función de la acuaporina propia de la levadura y, en estas condiciones, interviene en procesos de osmorregulación, verificando, para esta proteína, su identidad y funcionalidad como acuaporina.

• • •