JOURNAL OF
BASIC AND APPLIED GENETICS
ISSN: 1852-6233

Desde la Genética de Poblaciones, aportes al conocimiento de la historia natural de algunas zoonosis

Cristina N. Gardenal

Cátedra de Genética de Poblaciones y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba

ngardenal@efn.uncor.edu

ABSTRACT

This review presents a brief account of our studies aimed to characterize the population genetic structure of species of sanitary interest, to identify the processes that model it and to analyze its possible association with environmental factors related to persistence and spreading of some zoonoses. In rodents, the studies involve species that are reservoir of the Argentine hemorrhagic fever virus and of hantavirus responsible for the Pulmonary syndrome. Our results on species of mosquitoes vectors of dengue and several types of encephalitis are also referred. We emphasize the importance of a precise taxonomic identification, by means of molecular markers, of the species involved in the transmission of different viral genotypes in order to define the areas with potential risk of infection.

Key words: Population genetic structure, zoonosis, reservoir rodents, vector mosquitoes, taxonomic identification

RESUMEN

Se presenta una síntesis de nuestros estudios tendientes a caracterizar la estructura genética poblacional en especies de interés sanitario, identificar los procesos que la determinan y analizar su posible asociación con factores ambientales vinculados con la persistencia y expansión de algunas zoonosis. En roedores, lo estudios se refieren a especies reservorio del virus que produce la Fiebre hemorrágica argentina y reservorio de hantavirus que originan Síndrome pulmonar. Se mencionan también las investigaciones sobre especies de mosquito vectores del dengue y de varios tipos de encefalitis. Además, se destaca la importancia de la identificación taxonómica precisa, mediante marcadores moleculares, de las especies que intervienen en la transmisión de diferentes genotipos virales a fin de delimitar las áreas con potencial riesgo de infección.

Palabras clave: estructura genética poblacional, zoonosis, roedores reservorio, mosquitos vectores, identificación taxonómica.

La principal línea de investigación de nuestro laboratorio ha continuado, durante estos últimos 15 años, la originalmente planteada: el estudio de la estructura genética de poblaciones de especies involucradas en la transmisión de enfermedades virales. Los trabajos se centraron en dos grupos de organismos, roedores reservorio (es decir, que no manifiestan patología pero son capaces de replicar determinadas especies de virus y eliminarlo durante toda su vida con las heces, orina, sangre y saliva) y mosquitos vectores (esto es, intermediarios que utilizan los arbovirus para llegar al vertebrado que adquiere la enfermedad). Estos estudios tienen como objetivos principales analizar el grado de contacto entre subpoblaciones y su influencia en la transmisión del agente infeccioso entre individuos reservorio, detectar posibles "cuellos de botella" que alteren su transmisión vertical, aportar a la taxonomía precisa de roedores autóctonos para evaluar el riesgo de contraer enfermedades en diferentes regiones geográficas y el rol de la co-especiación entre patógenos y sus hospederos. En el caso de especies vectoras no autóctonas, nos interesa analizar los patrones de colonización desde países limítrofes y delimitar poblaciones locales (demos) que podrían presentar diferencias en resistencia a insecticidas, capacidad vectorial, etc.

En la continuidad de las líneas de trabajo, un hecho destacable marcó el período comprendido en estos últimos años. Hacia 1996-97 comenzaron a implementarse en nuestro laboratorio los nuevos "marcadores" moleculares, una diversidad de técnicas para revelar polimorfismo a partir de diferentes segmentos de ADN amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Al comienzo, complementaron las tradicionales isozimas y luego las fueron reemplazando.

Como síntesis de las investigaciones realizadas en los últimos 15 años en poblaciones naturales de especies de interés sanitario, referiré brevemente los estudios que consideramos más importantes.

EN MOSQUITOS VECTORES DE *ENCEFALITIS Y DENGUE*

En poblaciones de *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus* de Argentina situadas sobre una transecta N-S de unos 2000 km, se encontraron altos niveles de flujo génico entre estas formas, cuyo *status* taxonómico es controvertido. La mayor identidad genética se observó entre las poblaciones de cada especie más próximas del área central; se realizaron además cruzamientos en condiciones de laboratorio, con alto índice de eclosión en oviposturas híbridas. Estos resultados apoyan la presunción de que no se trata de especies diferentes y revelan que ambas formas pueden ser vectores eficientes del virus de encefalitis de St. Louis (Humeres, *et al* 1998).

Analizamos luego, utilizando isozimas, la estructura poblacional del vector de la encefalitis equina del Oeste (WEE), *Aedes albifasciatus*, a dos niveles geográficos: a) en diferentes ambientes dentro del ecosistema de Mar Chiquita, donde se observaron muy altas tasas de dispersión (de Sousa et al 1996a) y b) en áreas inundables de la provincia de Córdoba que incluyen diversas regiones fitogeográficas. Los bajos niveles de flujo génico de la población del SE con las restantes guardan relación con la historia geológica de la región (de Sousa, *et al* 1996b). Un estudio posterior en base a RAPDs-PCR reveló la relación entre diferenciación genética y presencia de ambientes favorables para el desarrollo de larvas en la especie (de Sousa, *et al* 1999). El análisis temporal de frecuencias alélicas demostró variaciones compatibles con cambios ambientales; las áreas inundables actuarían como transportadores pasivos de larvas (de Sousa, *et al* 1997).

Iniciamos simultáneamente estudios de estructura genética en la especie introducida *Aedes aegypti*, principal vector del dengue en nuestro país. Los primeros trabajos abarcaron pocas poblaciones, pero pusieron de manifiesto que se han producido introducciones múltiples a partir de subpoblaciones genéticamente diferentes; además, son los primeros trabajos que revelan que el transporte pasivo de larvas y huevos es el principal mecanismo de dispersión de este mosquito en Argentina (de Sousa, *et al* 2000 y 2001). Logramos establecer por primera vez las condiciones particulares necesarias para amplificar por PCR el fragmento "rico en A+T" del ADN mitocondrial en *Ae. aegypti* (Rondan Dueñas, *et al* 1999) e iniciamos así el análisis filogeográfico de poblaciones de toda el área de distribución de la especie en Argentina, incluyendo muestras de zonas limítrofes. Fue posible reconstruir los patrones de colonización hacia nuestro país a partir de la re-introducción de la especie en 1986.

Se encontró que el haplotipo predominante en el este, noreste y centro de Argentina lo es también en Brasil y Paraguay, mientras que el predominante en Bolivia se encuentra en alta frecuencia en el noroeste argentino, llegando hasta la provincia del Chaco. El grado de dispersión de los haplotipos predominantes, siguiendo estas dos vías principales de colonización, guarda clara relación con la magnitud del tráfico comercial con Brasil y con Bolivia. La ciudad de Salta es la que mostró la mayor diversidad haplotípica, lo que indicaría la existencia de un potencial alto polimorfismo en capacidad vectorial y otras propiedades de importancia epidemiológica. En las ciudades de Santiago del Estero, La Rioja y Tucumán se detectaron haplotipos exclusivos que muy probablemente representen relictos de poblaciones ancestrales que no fueron completamente erradicadas durante las campañas de control del vector (Rondan Dueñas, *et al* 2002 y 2009; Albrieu Llinás y Gardenal, en prensa). Como producto colateral de estas investigaciones, clonamos, secuenciamos y caracterizamos desde el punto de vista estructural la región completa "rica en A+T" del ADN mitocondrial de *Ae. aegypti* (Rondan Dueñas, *et al.,* 2006). En la ciudad de Córdoba, un área de infestación reciente con el mosquito, la distancia genética entre poblaciones es mayor entre aquéllas conectadas por rutas y avenidas muy transitadas por transportes de carga (Julio et al 2009). Recientemente hicimos un análisis de las posibles rutas de ingreso de la especie al territorio uruguayo (Soliani, *et al.*, 2010). Demostramos también que en Argentina existen poblaciones naturales con diferente susceptibilidad al temefós, larvicida comúnmente usado en las campañas actuales de control (Biber, *et al.,* 2006 y Albrieu Llinás, *et al.,* 2010).

EN ROEDORES DE LOS GÉNEROS *CALOMYS Y OLIGORYZOMYS*

La única especie que actúa como reservorio del virus Junin, agente etiológico de la Fiebre hemorrágica argentina (FHA), es *C. musculinus*. Para delimitar las áreas de riesgo de contraer la enfermedad, es importante realizar una identificación inequívoca de la especie a la que pertenecen los individuos en los cuales se detecta el virus; esta tarea es muy laboriosa y particularmente difícil cuando se trata de ejemplares juveniles. Por ello, describimos marcadores de ADN simples, que permiten identificar fácilmente las especies de *Calomys* más frecuentes en la Pampa Húmeda con técnicas de uso corriente en laboratorios de Virología (González Ittig, *et al* 2002a).

Durante estos últimos años profundizamos el análisis de las causas de los altos niveles de polimorfismo detectados en *Calomys musculinus* y en *C. laucha*, el estudio del sistema de cruzamiento y, en especial, la variación geográfica y temporal (variaciones en el tamaño efectivo) de frecuencias alélicas y genotípicas, con el propósito de conocer el grado de contacto entre sus poblaciones e inferir así las probabilidades de transmisión del virus Junin entre roedores infectados y no infectados (Chiappero y Gardenal 2001; Chiappero, *et al.,* 2002a y 2002b; Gardenal, *et al.,* 2002; Porcasi, *et al.,* 2005; Chiappero, *et al.,* 2006). El uso de diferentes marcadores moleculares y, en consecuencia, de métodos más precisos e informativos de análisis estadístico de los datos, nos permitió concluir que *C. musculinus* habría sufrido una brusca expansión de rango geográfico en tiempos relativamente recientes (posiblemente, a partir del desarrollo de la agricultura en la Pampa Húmeda). Sin embargo, los niveles actuales de flujo génico serían bajos a moderados, por lo cual no es esperable una extensión sostenida y uniforme del área endémica de FHA; nuestros resultados apoyan la hipótesis de probable re-emergencia focal de la enfermedad en aquellas localidades donde se detecte la presencia del virus y las modificaciones climáticas o las que el hombre produzca en el ambiente, puedan favorecer explosiones poblacionales locales del roedor (Chiappero y Gardenal 2003; González Ittig y Gardenal 2002 y 2004; González Ittig, *et al.*, 2007).

A nivel microgeográfico, comparamos la estructura genética entre poblaciones rurales y urbanas de *C.musculinus* de la ciudad de Río Cuarto y sus alrededores. El análisis de las relaciones de parentesco entre individuos basado en la información provista por loci de microstálites nos permitió demostrar que las poblaciones de estos dos tipos de ambientes difieren notablemente en su dinámica; las de la ciudad no tienen contacto actual con las rurales (o muy limitado), sino que representan relictos de efectos fundadores anteriores al rápido desarrollo urbano de Río Cuarto. Como esta localidad se

encuentra próxima a la zona endémica de FHA, estos resultados tienen también interés epidemiológico (Chiappero, *et al.*, 2011). Para hacer posible este estudio debimos previamente desarrollar cebadores para amplificar microsatélites en el género *Calomys* (Chiappero, *et al.,* 2005).

Nuestros estudios en *Oligoryzomys* se centraron en la identificación molecular de especies cuya taxonomía basada en métodos tradicionales es muy confusa. Dado que varias especies del género están involucradas en la transmisión de diferentes genotipos de Hantavirus que ocasionan fiebre hemorrágica con síndrome pulmonar, es necesario delimitar el rango geográfico de cada una de ellas para definir las áreas endémicas potenciales de la enfermedad. Los resultados permitieron determinar que *O. longicaudatus*, reservorio del genotipo viral Andes Sur, sólo se distribuye en el sur de Argentina y Chile. Los ejemplares del norte, a los que se había dado igual denominación pero que transmiten el genotipo Oran, corresponden a la especie *O. chacoensis*, mientras que los reservorio del genotipo viral Bermejo pertenecen a una de las "formas" del complejo *O. flavescens* (González Ittig, *et al.,* 2002b; Rivera*, et al.,* 2007). El estudio de las relaciones filogenéticas entre las especies de *Oligoryzomys* se profundizó recientemente, con datos de secuencias de dos segmentos de ADN mitocondrial de ejemplares de América Central y del Sur que cubren buena parte del rango geográfico del distribución del género (González Ittig, *et al.*, 2010). Además, un análisis filogeográfico de poblaciones de *O. longicaudatus* de Argentina y Chile reveló que los Andes constituyen una barrera eficiente para el flujo génico entre las poblaciones, las que se habrían expandido de oeste a este (González Ittig, *et al.,* 2010). Nuestros estudios están centrados actualmente en el grado de contacto entre poblaciones de los valles orientales de los Andes, utilizando microsatélites como marcadores. Al igual que para *Calomys*, debimos desarrollar cebadores para su amplificación (González Ittig, *et al.,* 2008); cuando se trata de especies autóctonas, los laboratorios del exterior no se interesan por este tipo de estudios, en especial si conocen la pobre relación esfuerzo vs. "rendimiento" en publicaciones que esa tarea demanda.

Nuestra interacción con centros de Virología y Epidemiología permite la transferencia de estos resultados a la problemática de enfermedades transmisibles al hombre.

BIBLIOGRAFÍA

Albrieu Llinás, G., Gardenal, C.N. Phylogeography of *Aedes aegypti* in Argentina: long-distance colonization and rapid restoration of fragmented relicts after a continental control campaign. Vector-Born and Zoonotic Diseases (en prensa).

Albrieu Llinás, G., Seccacini, E., Gardenal, C.N., Licastro, S. (2010) Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. Mem I Oswaldo Cruz 105: 113-116.

Biber, P.A., Rondan Dueñas, J., Ludueña Almeida, F., Gardenal, C.N., Almirón, W.R. (2006) Laboratory evaluation of susceptibility of natural subpopulations of *Aedes aegypti* larvae to temephos. J Am Mosquito Contr 22: 408-411.

Chiappero, M.B., Gardenal, C.N. (2001) Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) markers and their use in population genetics studies of *Calomys musculinus* (Rodentia, Muridae), the reservoir of Argentine Hemorrhagic Fever. Hereditas 135: 85-93.

Chiappero, M.B., Sabattini, M.S., Blanco, A., Calderón, G.E., Gardenal, C.N. (2002a). Gene flow among *Calomys musculinus* (Rodentia, Muridae) populations in Argentina. Genetica. 114: 63-72.

Chiappero, M.B., Blanco, A., Calderón, G.E., Sabattini, M.S., Gardenal, C.N. (2002b). Genetic structure of populations of *Calomys laucha* (Muridae, Sigmodontinae) from central Argentina. Biochem Syst Ecol 30: 1023-1036.

Chiappero, M.B., Gardenal, C.N. (2003) Restricted gene flow in *Calomys musculinus* (Rodentia, Muridae), the natural reservoir of Junin virus. J Hered 94: 490-495.

Chiappero, M.B., Gardenal, C.N., Panzetta-Dutari, G.M. (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers in *Calomys musculinus* (Muridae, Sigmodontinae, Phyllotini), the natural reservoir of Junin virus. Mol Ecol Notes 5: 593-595.

Chiappero, M.B., García, B.A., Calderón, G. E., Gardenal, C.N. (2006) Temporal fluctuation of effective size in

populations of *Calomys musculinus* (Muridae, Sigmodontinae). J Mammal 87: 848-854.

Chiappero, M., Panzetta-Dutari, G., Gómez, D., Castillo, E., Polop, J., Gardenal, C.N. (2011) Contrasting genetic structure of urban and rural populations of the wild rodent Calomys musculinus (Cricetidae, Sigmodontinae). Mamm Biol 76: 41-50..

de Sousa, G.B., Blanco, A., Gardenal, C.N. (1996a) Genetic structure of *Aedes albifasciatus*_from a marsh ecosystem in Córdoba, Argentina. J Med Entomol 33: 531-536.

de Sousa, G.B., Jiménez, A., Blanco, A., Gardenal, C.N. (1996b) Gene flow in *Aedes albifasciatus* (Diptera, Culicidae) from Central Argentina. J Med Entomol 33: 894-900.

de Sousa, G.B., Jiménez, A., Blanco, A., Gardenal, C.N. (1997) Temporal variation of allozyme frequencies in *Aedes albifasciatus* (Diptera, Culicidae from Argentina. Biochem Genet 35: 339-349.

de Sousa, G.B., Panzetta-Duttari, G., Gardenal, C.N. (1999) Genetic structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera, Culicidae) populations in central Argentina determined by RAPD-PCR markers. J Med Entomol 36: 400-404.

de Sousa, G.B., Avilés, G., Gardenal, C.N. (2000) Allozymic polymorphism in *Aedes aegypti* populations from Argentina. J Am Mosquito Contr 16: 206-209.

de Sousa, G.B., Blanco, A., Gardenal, C.N. (2001) Genetic relationships among *Aedes aegypti* populations from Argentina using RAPD-PCR markers. J Med Entomol 38: 371-375.

Gardenal, C.N., Chiappero, M.B.; de Luca D'Oro, G.M., Mills, J.N. (2002) Allozymic polymorphism and genetic differentiation among populations of *Calomys musculinus* and *Calomys laucha* (Rodentia: Muridae) from eastern Argentina. Mamm Biol 67: 294-303.

González Ittig, R.E., Chiappero, M.B.; Blanco, A., Provensal, C., Gardenal, C.N. (2002a) Accurate identification of three cryptic species of rodents of the genus *Calomys* using RAPD-PCR and mitRFLP markers. Biochem Syst Ecol 30: 425-432.

González Ittig, R.E., Theiler, G.R., Gardenal, C.N. (2002b) A contribution to the subgeneric systematics of *Olygoryzomys* (Rodentia, Muridae) from Argentina by means of PCR-RFLP patterns of mitochondrial DNA. Biochem Syst Ecol 30: 23-33.

González Ittig, R.E., Gardenal, C.N. (2002) Haplotype diversity of the mitochondrial DNA D-loop region in *Calomys musculinus* (Rodentia, Muridae) detected by PCR-RFLP. Biochem Genet 40: 293-302.

González Ittig, R.E., Gardenal, C.N. (2004) Recent range expansion and low levels of contemporary gene flow in *Calomys musculinus*: its relationship with the emergence and spread of Argentine haemorrhagic fever. Heredity 93: 535-541.

González-Ittig, R.E., Patton, J., Gardenal, C.N. (2007) Analysis of cytochrome *b* nucleotide diversity confirms a recent range expansion in *Calomys musculinus*. J Mammal 88: 777-783.

González Ittig, R.E., Gardenal, C.N. (2008) Co-amplification of mitochondrial pseudogenes in *Calomys musculinus* (Rodentia, Cricetidae): a source of error in phylogeographic studies. Genome 51:73-78.

González Ittig, R. E., Salazar-Bravo, J., Polop, J., Gardenal, C. (2008) Isolation and characterization of microsatellite markers in *Oligoryzomys longicaudatus* (Muridae, Sigmodontinae, Oryzomini), the natural reservoir of Andes Hantavirus. Mol Ecol Res 8:1466-1468.

González Ittig, R.E., Rossi-Fraire, H.J., Cantoni, G.E., Herrero, E.R., Benedetti, R., Gallardo, M.H., Gardenal, C.N. (2010) Population genetic structure of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia, Cricetidae) from Argentina and Chile based on the mitochondrial control region. Can J Zool 88: 23-35.

González Ittig, R.E., Salazar Bravo, J., Bárquez, R., Gardenal, C.N.. (2010) Phylogenetic relationships among species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia, Cricetidae) from Central and South America. Zool Scr, 39: 511-526..

Humeres, S.G., Almirón, W.R., Sabattini, M., Gardenal, C.N. (1998) Genetic diovergence and gene flow between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) in Argentina. Mem I Oswaldo Cruz 93: 57-62.

Julio, N.B., Chiappero, M.B., Rossi, H., Rondan Dueñas, J.C., Gardenal, C.N. (2009) Genetic structure of *Aedes aegypti* in Córdoba city (Argentina), a recently reinfested area. Mem I Oswaldo Cruz 104**:** 626-631.

Porcasi, X., Calderón, G., Lamfri, M., Gardenal, C., Polop, J., Sabattini, M., Scavuzzo, M. (2005) The use of satellite data in modeling population dynamics and prevalence of infection in the rodent reservoir of Junin virus. Ecol Model 185: 437-449.

Rivera, P.C., González Ittig, R.E., Rossi, H., Levis, S., Gardenal, C.N. (2007) Molecular identification and phylogenetic relationships among the species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia, Cricetidae) present in Argentina, putative reservoirs of hantaviruses. Zool Scr 36: 231-239.

Rondan Dueñas, J.C., Panzetta-Duttari, G., Gardenal, C.N. (1999) Specific requirements for PCR amplifications of long mitochondrial A+T rich DNA. BioTechniques 27: 258-260, 1999.

Rondan Dueñas, J.C., Panzetta-Dutari, G., Blanco, A., Gardenal, C.N. (2002) Restriction fragment length polymorphism of the mtDNA A+T rich region as a genetic marker in *Aedes aegypti*. Ann Entomol Soc Am 95: 352-358.

Rondan Dueñas, J.C., Gardenal, C.N., Albrieu Llinás, G., Panzetta-Dutari, G.D. (2006) Structural organization of the mitochondrial DNA control region in A*edes aegypti.* Genome 49: 931-937.

Rondan Dueñas, J.C., Albrieu Llinás, G., Panzetta-Dutari, G., Gardenal, C.N. (2009) Two different routes of colonization of *Aedes aegypti* in Argentina from neighboring countries. J Med Entomol 46: 1344-1354.

Soliani, C., Rondan Dueñas, J.C., Chiappero, M.B., Martínez, M., García Da Rosa, E., Gardenal, C.N. (2010) Genetic relationships among populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and northeastern Argentina inferred from ISSR-PCR data. Med Vet Entomol,24: 316-323..

- Received **04/08/2010**
- Accepted **29/08/2011**