

## ARTICULO

**Heterogeneidad genética del ADN de kinetoplasto (kADN) de *Trypanosoma cruzi* inducida por tratamiento con Bromuro de Etidio**

Ana Rita De Lima Rivero, María Consuelo Navarro Aguilera, Rosa Yanet Arteaga Ochoa, Víctor Tulio Contreras Álvarez.

Laboratorio de Protozoología. Instituto de Biología Molecular de Parásitos. Facultad Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia, Estado Carabobo. Venezuela.

**Correspondencia:** A.R.De Lima Rivero

**Email:** adelima@uc.edu.ve

**Financiamiento** Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) Proyecto S1-2001000683; del Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCH-UC) Proyectos FCS-2003005 y FCS-2006006.

**RESUMEN**

Se reportan cambios en los perfiles de esquizodemos de *Trypanosoma cruzi* después del tratamiento con Bromuro de Etidio (BrEt). En este trabajo nos propusimos determinar si el tratamiento con BrEt produce modificaciones estables en el kADN de *Trypanosoma cruzi*. El BrEt causó daños perceptibles en el kinetoplasto (diskinetoplastia) de tripomastigotas metacíclicos de cinco aislados diferentes (dos clones y tres cepas) de *T. cruzi* después del primer, segundo y tercer tratamiento con dicho mutágeno. Partiendo de metacíclicos diskinetoplásticos de los cinco aislados estudiados, el medio axénico seleccionó parásitos con kinetoplasto normal; cuatro de ellos mostraron esquizodemos idénticos al aislado parental y uno mostró cambios en la región de los minicírculos. Se obtuvieron clones y sub-clones de una cepa parental usada como control de heterogeneidad genética y de un clon derivado de ella (control de homogeneidad), mantenido por cuatro años en cultivo antes y después del tercer tratamiento con BrEt. El análisis de esquizodemos mostró diferencias entre clones de la cepa parental, ninguna diferencia entre sub-clones del clon derivado de la cepa parental y nuevamente aparecen cambios en algunos clones obtenidos después del tratamiento con BrEt. El análisis de esquizodemos de los parásitos clonados demostró que el BrEt inserta mutaciones estables en los minicírculos, las cuales se mantienen silentes en la población. También se demostró una alta tasa de cambio del kADN e inducción de heterogeneidad genética a escala de laboratorio.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, kADN, esquizodemos.

## ABSTRACT

### ***Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA (kDNA) genetic heterogeneity induced by ethidium bromide treatment.**

Changes in the schizodeme profiles of *Trypanosoma cruzi* after treatment with Ethidium Bromide (EthBr) are reported. In this work, our proposal was to determinate if the treatment of *T. cruzi* with EthBr put in stable modifications in the kDNA. EthBr caused perceptible damage in the kinetoplast (diskinetoplasty) of metacyclic trypomastigotes of five different isolates (two clones and three strains) of *T. cruzi* after first, second and third treatment. In the five cultures starting of metacyclic diskinetoplastic, the axenic culture choosed parasites with normal kinetoplast; four showed shizodemes identical to the parental isolated and one showed changes in the minicircles region. A parental strain used as a genetic heterogeneity control, and its derived-clone (genetic homogeneity control) maintained for 4 years in culture before and after of the third treatment with EthBr was cloned and sub-cloned. Schizodeme analyses showed, as expected, differences among clones of the parental strain, no differences among sub-clones from derived-clone and newly appear changes in any clones obtained after of the treatment with EtBr. Schizodeme analysis of cloned parasites evidenced that EthBr inserted stables mutations in the minicircles which were maintained silent into population. A high change rate of *T. cruzi* kDNA and genetic heterogeneity induction to scale of laboratory also was demonstrated.

**Key Words:** *Trypanosoma cruzi*, kDNA, schizodemes.

## INTRODUCCION

*Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Enfermedad de Chagas, es un *Trypanosomatidae* perteneciente al Orden *Kinetoplastida*, caracterizado por presentar el ADN mitocondrial ubicado en el kinetoplasto. Durante el ciclo vital de los parásitos de la Familia *Trypanosomatidae* ocurren transformaciones morfológicas en una sucesión sincrónica con cambios de aspecto, tamaño y ubicación del kinetoplasto (1). La organela cumple un doble papel: uno funcional, como mitocondria para garantizar la sobrevivencia de los estadios dependientes de fosforilación oxidativa, y otro como reservorio de heterogeneidad poblacional del genoma extra-nuclear. Varios de los rasgos inusuales de los tripanosomatídeos (trans-splicing, edición de los ARN mitocondriales y escasez de intrones), son comunes en los kinetoplastidios desde antes de la adopción del parasitismo.

El ADN del kinetoplasto (kADN) representa más del 20% del ADN total celular y consta de dos tipos de moléculas de ADN circulares y concatenadas, algunos maxicírculos y miles de minicírculos. Los maxicírculos tienen genes típicamente mitocondriales, muchos de los cuales se traducen sólo después de editarlos. Los minicírculos codifican los ARN guías involucrados en los procesos de maduración de los ARNm ó ARN mitocondriales (edición de ARN). Se ha demostrado que la heterogeneidad de los mini-círculos es producto de recombinaciones entre ellos (2) y que esto contribuye en la síntesis de ARN guías (ARNg) que participan en los procesos de edición de ARNm mitocondriales (3).

Los diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi* se caracterizan por presentar cambios en el número y secuencia de los mini-círculos que conforman su kADN (4, 5). Esta variabilidad en la región de mini-círculos ha sido utilizada como marcador molecular para la tipificación y comparación entre diferentes aislados

de tripanosomatídeos (6). La caracterización genotípica de los tripanosomatídeos se hace comparando los fragmentos de la digestión del kADN con endonucleasas de restricción, usando la técnica de esquizodemos (7).

Para fines comparativos, el análisis del kADN por esquizodemos tiene las ventajas siguientes: (a) los genes mitocondriales son pequeños en tamaño y complejidad, lo que facilita el análisis con endonucleasas de restricción y su secuenciamiento; (b) las secuencias de ADN mitocondrial cambian mucho más rápidamente que los genes nucleares (8), de ahí que sean más útiles para comparar organismos con divergencias recientes; (c) el genoma de la organela muestra más polimorfismo dentro de una especie, revelando detalles de la estructura poblacional que no son obtenibles por otros métodos; (d) el kADN es resistente a la manipulación (9). Una de las aplicaciones más comunes de la técnica de esquizodemos es la caracterización de aislados de regiones geográficas (6, 10, 11, 12). También se ha utilizado con éxito para discriminar entre especies relacionadas de tripanosomatídeos como *T. cruzi* y *T. rangeli* (13) y varias especies de *Leishmania* (14, 15).

Recientemente se ha extendido el uso de otras técnicas para detectar la heterogeneidad genética de los tripanosomatídeos, como la amplificación mediante PCR de regiones de ADN que actúan como marcadores genéticos. Entre esos marcadores se cuenta la secuencia de 300-350 pb situada en el espaciador intergénico del gen de la secuencia líder o miniexón del ADN nuclear de *T. cruzi* (16) y una secuencia de 110-125 pb del rARN 24Sα (17). Sin embargo, estas técnicas de amplificación sólo permiten la clasificación del parásito en dos grupos o linajes: *T. cruzi*-I y *T. cruzi*-II (16, 17, 18).

Posteriormente se pudo establecer una mayor diversificación del parásito, empleando estas mismas secuencias mediante la técnica PCR multiplex permitiendo su clasificación como *T. cruzi*-I, *T. cruzi*-II, *T. cruzi* Z3 o *T. rangeli* (19). También, mediante la utilización de fragmentos de restricción polimórficos se logró la ampliación de *T. cruzi*-II en cinco subgrupos denominados IIa, IIb, IIc, IId y IIe (20). Sin embargo, la mayor detección de variabilidad genética en *T. cruzi* ha sido obtenida mediante la amplificación de la región de minicírculos del kADN (21, 22), reafirmando la validez de la técnica de esquizodemos para detectar subpoblaciones de parásitos asociadas a ciertos factores como aislamiento de cepas a partir de un hospedador, condiciones de mantenimiento en el laboratorio y patogenicidad entre otros.

La inducción de diskinetoplastia utilizando mutágenos químicos, conduce a la pérdida total de la organización del kinetoplasto y se evidencia como la ausencia de esa organela por microscopía óptica. El Bromuro de Etidio (BrEt) actúa como un agente intercalante del ADN del parásito, inhibe la DNA polimerasa mitocondrial y bloquea la duplicación del kinetoplasto. Bajas concentraciones de BrEt producen inhibición selectiva de la topoisomerasa tipo II del kADN (23), provocando alteraciones en la cantidad e incluso desaparición del ADN del kinetoplasto con presencia de estructuras mitocondriales sin contenido interno que no son detectables a nivel citológico.

En este trabajo aportamos evidencias indicando que la mutagénesis química de *Trypanosoma cruzi* con BrEt contribuye a enriquecer la heterogeneidad genética del parásito, generando organismos con esquizodemas modificados.

## MATERIALES Y METODOS

**Parásitos y condiciones de mantenimiento:** la cepa EP se aisló de un caso humano en 1967 y se mantuvo 9 años por pases sucesivos cada 2 semanas en ratones albinos (condición vertebrado). A partir de 1977, se identificó como EPm y se ha mantenido en *Rhodnius prolixus* con pases eventuales en ratón (condición triatomino). Para el momento de iniciar los ensayos de mutagénesis, la cepa EPm tenía 17 años en la condición triatomino. La cepa EPv representa un aislado de la línea madre mantenido en cultivo por “repiques” semanales desde 1985 (condición cultivo), y tenía 9 años mantenida en esa condición para el momento de iniciar los ensayos de mutagénesis. El clon EPm6 se obtuvo en 1991 de formas de cultivo de la cepa EPm, por dilución límite, plaqueo en agar blando y selección de una colonia (24). Este clon se mantuvo en la condición triatomino por 3 años antes de iniciar los ensayos de mutagénesis. El aislado dK111 se obtuvo del clon EPm6 en 1995 después del tercer tratamiento con BrEt, partiendo de metacíclicos con 32% de akinetoplastia, incubando en medio LITB (25). Los cultivos derivados de estos parásitos mutagenizados se mantuvieron por 4 años antes de iniciar los ensayos de clonamiento por dilución límite y siembra de 1 parásito/100 µl en placas de plástico con 96 pozos. Los ensayos de clonaje del aislado dk111, EPm y sub-clonaje de EPm6 se hicieron simultáneamente. La cepa Brasil de *Trypanosoma cruzi* se aisló en Brasil de un caso humano, se trajo al laboratorio en cultivo y se mantiene desde 1977 en la condición triatomino. La cepa PP fue aislada de un caso humano (Pedro Parra) en 1969, se mantuvo en la condición vertebrado hasta 1977 y a partir de ahí en la condición triatomino. La cepa RpN2 se aisló en 1989 de un vector (*Rhodnius prolixus*) naturalmente infectado y se mantiene desde su aislamiento en la condición triatomino.

El aislado Dm30L se clonó de la cepa Dm30, la cual se aisló de un rabipelado (reservorio, *Didelphis marsupialis*) en 1976 y se mantiene en la condición triatomino. El clonaje se hizo en 1986 por micro-manipulación y “pesca” de 1 metacíclico de la orina de insectos experimentalmente infectados e inoculación en camadas de ratones recién nacidos. Los parásitos de las condiciones triatomino y ratón se re-aislaron de ratones experimentalmente infectados y se mantienen por pases seriados en medio de cultivo (26). Los aislados usados en este trabajo pertenecen filogenéticamente al linaje *T. cruzi* I revelados según la región de 350 pb situada en el espaciador intergénico del gen de la secuencia líder o miniexón del ADN nuclear de *T. cruzi* y/o la secuencia de 110 pb del rADN 24Sα.

**Mutagénesis con BrEt y obtención de masas:** Cultivos con 2 x 10<sup>7</sup> parásitos/mL al quinto día de crecimiento a 27°C en medio LITB de cada cepa (PP, Brasil, RpN2) y de cada clon (EPm6 y Dm30L) de *T. cruzi* se trataron con BrEt (5 µg/ml) durante 18 horas en tres oportunidades diferentes y consecutivas. Después del primer tratamiento se obtuvieron formas metacíclicas mediante inducción *in vitro* en medio TAU3AAG (27) y se

purificaron por cromatografía en columnas de intercambio iónico. Las formas metacíclicas obtenidas de las cepas EPm, Dm30L, PP, Brasil y RpN2 fueron incubadas en medio LITB e identificadas como dK1, dK2, dK3, dK4 y dk5, respectivamente. Estos cultivos se mantuvieron por pases seriados en medio axénico por al menos 4 meses hasta que se hizo un segundo tratamiento idéntico con BrEt. Los cultivos obtenidos del segundo tratamiento se identificaron como dK11, dK22, dK33, dK44, dk55 y se mantuvieron por al menos 6 meses previo al tercer tratamiento, obteniéndose cultivos identificados como dK111, dK222, dK333, dK444 y dk555, los cuales fueron mantenidos en cultivo por varios años. Controles de las cepas parentales (EPm, Dm30L, PP, Brasil y RpN2) y de la línea parental clonada (EPm6) fueron similarmente procesados, pero sin el tratamiento con BrEt. El efecto mutagénico del BrEt se evaluó determinando el porcentaje de formas metacíclicas sin kinetoplasto (akinetoplásticos) en láminas coloreadas con Giemsa ácido. De cada condición de mutagénesis, así como de las condiciones controles sin mutagenizar se obtuvieron masas de aproximadamente 350 mgs de peso húmedo de los parásitos para la extracción del kADN (9).

**Análisis de Esquizodemos:** Para la digestión se incubó 2 µg de kADN con 4 Unidades de EcoR1 (Sigma, R2881) durante 1 hora a 37° C. Posteriormente a cada muestra se añadió 8 µg de Proteinasa K (Sigma, P-6556) y se incubó durante 1 hora a 37° C (9). Los fragmentos de restricción fueron separados electroforéticamente empleando geles de poliacrilamida con gradiente 4,5-10% (28), fijados y coloreados con la técnica de plata metálica (29). Se utilizó como patrón electroforético el fago lambda digerido con HindIII y EcoR1 (Sigma, D-9281).

**Obtención de clones y sub-clones del parásito.** La cepa EPm y el clon EPm6, re-aisladas de la condición triatomino y mantenidas en cultivo por un tiempo equivalente al del aislado dK111 se clonaron o sub-clonaron por dilución limitante, "sembradas" (1 parásito/pozo) en placas de 96 pozos e incubadas en medio LITB durante 28 días a 27 °C. Muestras de kADN obtenidas de parásitos cultivados a partir de pozos positivos se compararon mediante la técnica de esquizodemos (9). Los clones derivados de la cepa EPm se identificaron como mD7, mD9, mC6, los sub-clones derivados del clon EPm6 como 6C6, 6D6, 6E3, 6E5, 6F9 y del aislado dk111 como kD5, kD9 y kF2.

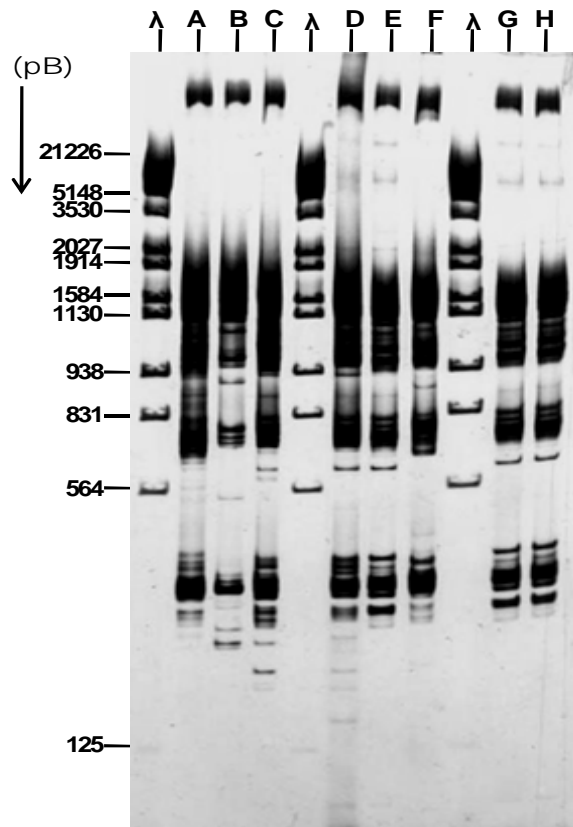
**Análisis densitométrico:** el tamaño de los fragmentos de restricción se calculó mediante digitalización de los geles secados entre hojas de papel celofán en un densitómetro BIO-RAD modelo GS-670, empleando el programa Molecular Analyst/PC Versión 1.2.

## RESULTADOS

En los aislados dK1, dK3 y dK5 sometidos a un segundo y tercer tratamiento, hubo un incremento progresivo del porcentaje de diskinetoplastia (Filas dK1 a dK111; dk3 a dK333; dK5 a dK555), mientras que con el segundo tratamiento los aislados dK2 y dK4 muestran el mismo porcentaje de diskinetoplastia que con el primer tratamiento (dK22 y dK44) y el incremento en el porcentaje de diskinetoplastia ocurrió con el tercer tratamiento. Los cultivos derivados de las

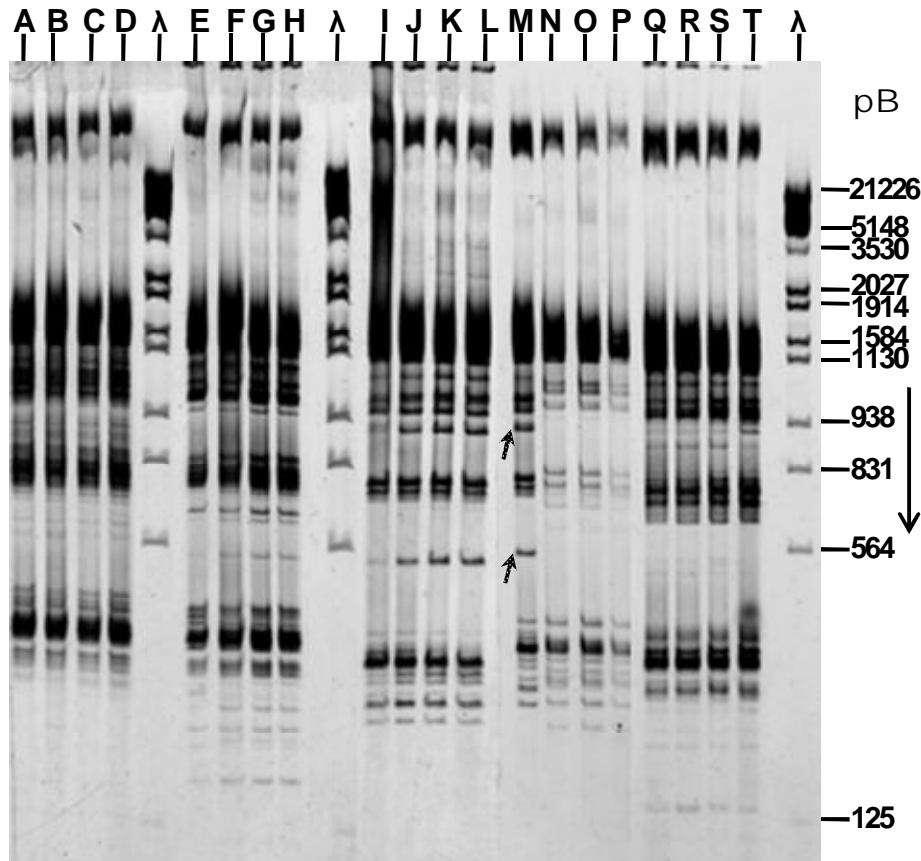
diferentes mutagénesis, presentaron kinetoplasto con apariencia normal. La comparación de las curvas de crecimiento de poblaciones mutagenizadas (dK1, dK11 y dK111, dK2, dK22, dK222, dK3, dK33, dk333, dK4, dK44, dK444 y dK5, dK55, dK555) mantenidas en cultivo por tiempos variables entre las sucesivas mutagénesis y metacicloogénesis, no mostraron diferencias significativas en su capacidad para crecer en medio LITB respecto a los aislados parentales. También mantuvieron la capacidad para diferenciarse a metacíclicos y resistencia a la lisis por complemento (resultados no mostrados).

**Análisis de esquizodemos:** La Figura 1 muestra que el perfil de esquizodemos de la cepa EPM (canal B) es diferente del clon EPM6 (canal A) y del aislado de la cepa EPM mantenido en cultivo (Canal C). El clon Dm30L mantenido por igual tiempo en la condición cultivo (canal D), vertebrado (canal E) y triatomino no muestra diferencias significativas en sus perfiles de restricción. Los perfiles de restricción del kADN del clon Dm30L sometido a digestión por 3 o 4 horas (canales G y H) también muestran idénticos perfiles.



**Figura 1.** Análisis de esquizodemos de los perfiles de restricción del kADN de cepas y clones de *Trypanosoma cruzi* mantenidos en condiciones diferentes por tiempos variables. Canal A corresponde al clon 6 de la cepa EPM (canal B) y de un aislado de EPM mantenido por varios años en cultivo (Canal C). Los canales D a F corresponden al clon Dm30L mantenido por varios años en cultivo (D), en ratón (E) y por pases alternos triatomino/ratón (F). El clon Dm30L mantenido en ratón fue digerido con Eco R1 por 3 y 4 horas respectivamente (canales G y H). Los canales λ corresponden a fragmentos del fago lambda digerido con Hind III y Eco R1. Los números a la izquierda indican el tamaño de los fragmentos en pares de bases (pB).

La Figura 2 muestra que cada cepa parental (canales A, E, I, M y Q) presenta perfiles de esquizodemos distintos con diferencias significativas entre ellos por debajo del marcador 1130 pb. El primero, segundo y tercer tratamiento de los aislados EPm6, Dm30L, PP y RpN2 (canales B a D, F a H, J a L y R a T, respectivamente) no produjo cambios en los perfiles parentales (canales A, E, I y Q).

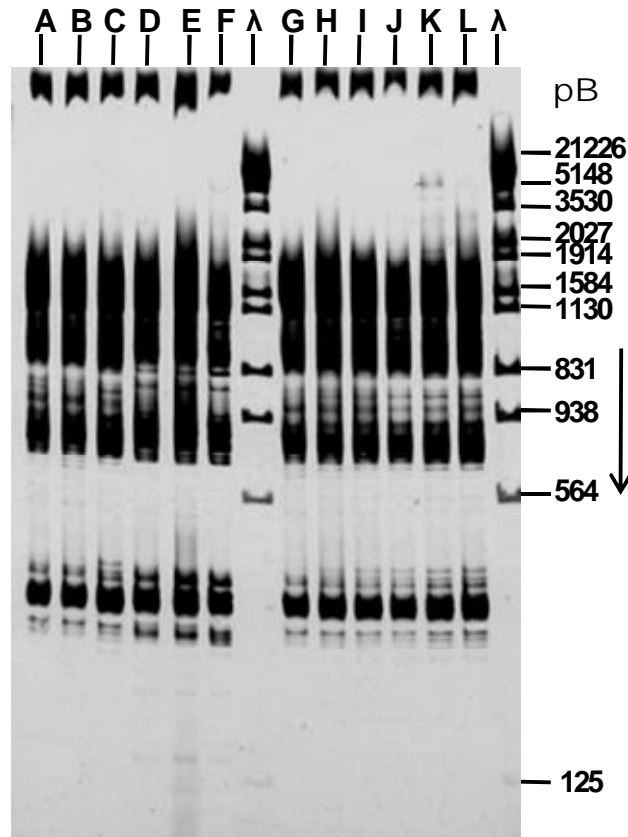


**Figura 2.** Análisis de esquizodemos de los perfiles de restricción del kADN de cepas y clones de *Trypanosoma cruzi* antes y después de uno, dos y tres tratamientos con BrEt. Los canales A, E, I, M y Q corresponde a los aislados parentales (EPm6, Dm30L, PP, Brasil y RpN2, respectivamente) antes de tratar con BrEt, los canales B, F, J, N y R a parásitos con un tratamiento (dK1, dK2, dK3, dK4 y dK5, respectivamente), los canales C, G, K, O y S a parásitos con dos tratamientos (dK11, dK22, dK33, dK44 y dK55, respectivamente) y los canales D, H, L, P y T a parásitos con tres tratamientos (dK111, dK222, dK333, dK444 y dK555, respectivamente). Los canales  $\lambda$  corresponden a fragmentos del fago lambda digerido con Hind III y Eco R1. Los números a la derecha indican el tamaño de los fragmentos en pares de bases (pB).

Sin embargo después primer tratamiento, el perfil del aislado dK4 (canal N) es diferente al perfil de la cepa parental Brasil (canal M), donde se aprecian al menos dos fragmentos de restricción (punta de flecha, izquierda del canal M) ausentes en el aislado dK4. Este nuevo perfil se mantuvo igual en los dos tratamientos siguientes (dK44 y dK444, canales O y P).

En la Figura 3 se observa que los parásitos clonados mantenidos en cultivo por 12 y 24 meses (canales B y C) conservan el mismo perfil del clon EPm6

parental usado como tiempo cero del estudio y recientemente aislado de la condición triatomino (canal A). Parásitos no clonados mantenidos en cultivo por 12 y 24 meses (canales E y F) presentan el mismo perfil de la cepa RpN2 parental recientemente aislada de la condición triatomino (canal D).



**Figura 3.** Análisis de esquizodemos de los perfiles de restricción del kADN de aislados de *Trypanosoma cruzi* tratados o no con BrEt y mantenidos en cultivo por diferentes tiempos. El canal A corresponde al clon EPM6 mantenido en la condición triatomino, los canales B y C al clon EPM6 mantenido en cultivo por 12 y 24 meses, respectivamente. Los canales D, E, F a la cepa RpN2 mantenida en cultivo por 0, 12 y 24 meses. El canal G al clon EPM6 antes de tratar con BrEt, los canales H e I al aislado dK1 mantenido en cultivo después del primer tratamiento con BrEt por 1 y 4 meses, respectivamente. Los canales J y K al aislado dK11 mantenido en cultivo después del segundo tratamiento por 1 y 6 meses, respectivamente. El canal L al aislado dK111 mantenido en cultivo después del tercer tratamiento por 1 mes. Los canales lambda corresponden a fragmentos del fago lambda digerido con Hind III y Eco R1. Los números a la izquierda indican el tamaño de los fragmentos en pares de bases (pB).

Los aislados dK1 después del primer tratamiento con BrEt mantenidos en cultivo por 1 o 4 meses (canales H e I), muestran perfil idéntico que el clon EPM6 parental sin mutagenizar (canal G). Los aislados dK11 después del segundo tratamiento con BrEt mantenidos en cultivo por 1 o 6 meses (canales J y K), muestran igual perfil que clon EPM6 parental sin mutagenizar (canal G). El aislado dK111 después del tercer tratamiento con BrEt mantenido en cultivo por 1 mes (canal L), muestra el mismo perfil que el clon EPM6 antes de mutagenizar (canal G).



**Clonaje de parásitos genéticamente homogéneos y heterogéneos:** Los resultados del clonaje por dilución y siembra de 1 parásito/pozo en placas de 96 pozos fueron: (a) en la placa EPm se obtuvo crecimiento en 17 pozos (16% de eficiencia). Se seleccionaron 2 clones (EPmD7 y EPmD9) para el análisis de esquizodemos, los cuales crecieron como epimastigotes de aspecto redondeado en la fase inicial del aislamiento; (b) en la placa del clon EPmC6 se obtuvieron 35 sub-clones (34% de eficiencia), 12 de ellos se expandieron en medio LITB y se usaron cinco para el análisis del kDNA (EPm6C6, EPm6D6, EPm6E3, EPm6E5 y EPm6F9); y (c) de la placa con la sub-población dK111 mutagenizada y mantenida por 4 años en cultivo antes del clonaje, se obtuvieron 14 clones (13% de eficiencia) y se seleccionaron 3 (dK111D5, dK111D9 y dK111F2) para análisis de esquizodemos.

La Figura 4 muestra que mediante clonaje de la cepa parental EPm (canal A) usada como indicador de heterogeneidad, se evidenciaron perfiles con fragmentos de restricción diferentes al parental (flechas a la izquierda de los canales B y D), uno compartido por los clones EPmD7 y EPmD9 (canales B y C) y otro diferente para el clon EPm6 (canal D). Los sub-clones EPm6C6, EPm6D6, EPm6E3, EPm6E5 y EPm6F9 (canales E, F, G, H e I) derivados del clon EPm6 presentaron un perfil común sin modificaciones significativas al perfil del clon parental EPm6 (canal D).

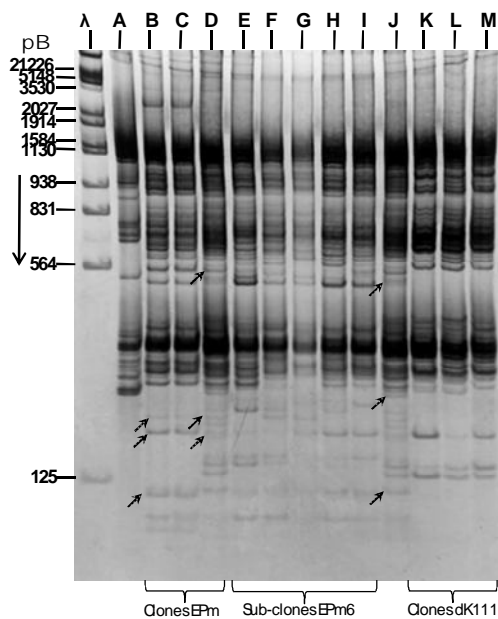


Figura 4. Análisis de esquizodemos de los perfiles de restricción del kADN de una cepa de *Trypanosoma cruzi* antes y después de tratar con BrEt y de los clones y sub-clones obtenidos a tiempos diferentes en cultivo como descrito en Materiales y Métodos. El canal A corresponde a la cepa parental EPm usada como control de heterogeneidad, los canales B, C y D a los clones EPmD7, EPmD9 y EPm6 obtenidos de la cepa parental, los canales E, F, G, H e I a los sub-clones EPm6C6, EPm6D6, EPm6E3, EPm6E5 y EPm6F9 derivados del clon EPm6, el canal J corresponde al aislado dk111 obtenido del tercer tratamiento del clon EPm6 con BrEt y los canales K, L y M a los clones dK111D5, dK111D9 y dK111F2 derivados del aislado dK111. Los canales λ corresponden a fragmentos del fago lambda digerido con Hind III y Eco R1. Los números a la derecha indican el tamaño de los fragmentos en pares de bases (pB).

Este perfil también es compartido por el aislado dK111 (canal J) derivado del clon EPm6 después de tres mutagénesis con BrEt. Los clones dK111D5, dK111D9 y dK111F2 (canales K, L y M) derivados del aislado dK111 mostraron un perfil común que difiere del perfil parental (canal J) por la ausencia de algunos fragmentos de restricción (flechas a la izquierda del canal J).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se confirma la heterogeneidad genética *Trypanosoma cruzi* y que el esquema de mantenimiento en el laboratorio selecciona sub-poblaciones del parásito en aislados genéticamente heterogéneos. Se demuestra que el tratamiento de una población de *T. cruzi* genéticamente homogénea con BrEt, introduce mutaciones crípticas y estables en los minicírculos, evidenciadas por clonaje y análisis de esquizodemos.

El esquema de mutagénesis para cada aislado y en cada oportunidad, se hizo tratando igual número de epimastigotas con igual concentración de BrEt previo a su diferenciación en tripomastigotas metacíclicos. Estas condiciones de trabajo permitieron cuantificar la acción del mutágeno en condiciones comparables para los cinco aislados, eludiendo el problema al mutagenizar parásitos con diferentes tasas de crecimiento. La diferencia en los porcentajes de diskinetoplastia indica una sensibilidad diferente del parásito al mutágeno, en función del aislado (Tabla I) y podría estar asociada a contenidos diferentes de ADN total de estos parásitos (30). El incremento progresivo en el porcentaje de diskinetoplastia (Tabla I) con los sucesivos tratamientos usando las mismas condiciones, puede estar relacionado a reducción progresiva en la cantidad total de kADN/parásito debido a los tratamientos sucesivos.

La obtención de cultivos de parásitos sin alteraciones morfológicas en el kinetoplasto partiendo de metacíclicos mutagenizados, indica que el cultivo en medio axénico actuó como un filtro biológico que seleccionó poblaciones con kinetoplasto normal. El hecho que los diferentes aislados (dK1 a dK5, dk11 a dK55 y dK111 a dK555, Tabla I) después del tratamiento con el mutágeno hayan mantenido las curvas de crecimiento, capacidad metaciclogénica y resistencia al complemento igual que las poblaciones parentales, indica que no se alteraron propiedades biológicas fundamentales para la sobrevivencia del parásito y sugiere que no hay alteraciones significativas a nivel del genoma nuclear.

La identidad mostrada por los perfiles del clon Dm30L obtenidos después de 3 y 4 horas de digestión (canales G y H, Figura 1), excluye la posibilidad de que los cambios en los patrones de restricción sean producto de digestión parcial del kADN. El hecho que, partiendo de la cepa EPm (canal B, Figura 1) se hayan obtenido dos perfiles de restricción diferentes (canales A y C, Figura 1) indica que el aislado EPm es genéticamente heterogéneo y que se seleccionaron sub-poblaciones distintas tanto por el mantenimiento prologado en cultivo (EPv) como por clonaje en placas de agar. Resultados previos de nuestro grupo, demostraron que la cepa EPm (mantenida en la condición triatomino) y la cepa EPv (mantenida por largo tiempo en la condición cultivo), tienen diferencias significativas en infectividad, virulencia, capacidad metaciclogénica y expresión antigénica (26, 31), compatible con su

condición de genéticamente heterogénea. En apoyo a la heterogeneidad de la cepa EPM, existe el hecho de obtener al menos un clon con perfil de esquizodemos diferente (canal A vs canal B), por clonaje en agar blando. En contraste, el aislado Dm30L que por su condición de clon es genéticamente homogéneo, cuando se mantuvo por varios años bajo tres esquemas diferentes, mantuvo perfil de esquizodemos idéntico. Estos resultados confirman que cuando la población es genéticamente heterogénea, el esquema de mantenimiento no modifica el perfil de kADN, sino que actúa como filtro biológico seleccionando el perfil dominante. Adicionalmente, se confirman planteamientos previos (32) donde la mezcla de dos cepas (Y y F) con esquizodemos y velocidades de crecimiento diferentes y “repique” en ratones con intervalos diferentes, selecciona uno de los perfiles de kADN de la mezcla. Esos resultados iniciales les permitieron proponer que el mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en el laboratorio con esquemas diferentes actúa como filtro biológico de sub-poblaciones con capacidades biológicas diferentes.

La caracterización de cinco aislados (dos clones y tres cepas) por la técnica de esquizodemos, confirma su utilidad como herramienta de tipaje de aislados diferentes de *Trypanosoma cruzi* (canales A, E, I, M y Q, Figura 2). La detección de cambios en el perfil de restricción de al menos una cepa después de tratada con BrEt, evidencia la capacidad de la técnica para detectar variaciones en los fragmentos de restricción aún cuando se trabajó con sub-poblaciones biológicamente filtradas en condiciones que seleccionan metacíclicos con kinetoplasto normal. Es evidente que la filtración biológica de metacíclicos diskinetoplásticos generó sub-poblaciones con esquizodemos diferentes, confirmando que el tratamiento de *Trypanosoma cruzi* con BrEt produce alteraciones en el kinetoplasto de los epimastigotas (33). Como el cambio en el perfil ocurrió sólo en uno de los 5 aislados sometidos a 3 tratamientos y se expresó a partir de la primera mutagénesis (canal M, Figura 2), es posible que las poblaciones con modificaciones en los minicírculos representen menos de 1% de la población total, el cual es el límite de detección de la técnica (34) y que el perfil modificado pasó a ser el esquizodemo predominante. Esto es de esperar debido a que la selección de sub-poblaciones se hizo en condiciones que favorecían la amplificación de los parásitos sin daño morfológico del kinetoplasto. En parásitos del género *Leishmania* se ha descrito cambios en la proporción y número de minicírculos con diferentes secuencias del kADN conservando la morfología característica del kinetoplasto, proceso denominado como transkinetoplastidia (35).

La comparación de los perfiles de una cepa y de un clon mantenidos por 1 y 2 años en la condición cultivo (Figura 3) confirmó la estabilidad en los perfiles de esquizodemos de aislados de *T. cruzi* mantenidos por varios años bajo el mismo esquema de mantenimiento (7, 9, 36). El hecho que los aislados mutagenizados 1, 2 y 3 veces consecutivas mostraron idéntico perfil al clon EPM6 en un tiempo de cultivo tan corto como 1 mes (canales H, J, L vs canal G, Figura 4) confirma que la filtración biológica por cultivo de metacíclicos con diferentes porcentajes de diskinetoplastia, selecciona y amplifica rápidamente el perfil de la sub-población dominante (sin excluir la existencia de mutantes crípticos representados con bajo porcentaje en la población analizada). Cuando la selección de los parásitos mutagenizados se hace *in vitro* infectando cultivos de células con metacíclicos diskinetoplásticos, se observa que las alteraciones

morfológicas producidas en el kinetoplasto de metacíclicos se transmiten y amplifican tanto en los amastigotas (37), como en la mutagénesis de tripomastigotas sobrenadantes de células en cultivo (38).

Para evidenciar la existencia de mutantes crípticos en los parásitos mutagenizados y filtrados por cultivo, se hizo clonaje de una población después de 3 tratamientos con BrEt. De las 5 sub-poblaciones obtenidas (dK111, dK222, dk333, dK444 y dK555) se seleccionó la sub-población dK111 por proceder del clon (EPm6) y disponerse de la cepa parental (EPm) sabidamente heterogénea. Los resultados obtenidos del clonaje y análisis de esquizodemos de la cepa EPm (Figura 4) indican que el tratamiento con BrEt contribuye a la heterogeneidad genética del kADN y que el mantenimiento en cultivo por largo tiempo conserva sub-poblaciones mutadas cuyo perfil no es dominante y que pueden ser evidenciadas por clonaje. Esta afirmación se deriva de la presencia de perfiles diferentes al clonar la cepa EPm mantenida en la condición triatomino y la conservación en los perfiles de los sub-clones derivados de EPm6. Los resultados también indican la existencia de mutantes crípticos en muy bajo porcentaje en el aislado dK111, cuyo perfil dominante coincide con el perfil del clon EPm6 (canal J vs canal D, Figura 4). Finalmente, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con BrEt, muta algunos minicírculos transformando un clon (EPm6) en una población genéticamente heterogénea y que esas mutaciones se establecieron en el tiempo como clones genéticamente diferentes, sin alteraciones morfológicas en el kinetoplasto. A nivel de laboratorio, esta es la primera demostración de la alta tasa de recambio del k-ADN y que modificaciones genéticas pueden ser inducidas mediante mutagénesis química, sin afectar las propiedades biológicas básicas de *Trypanosoma cruzi*.

**AGRADECIMIENTOS** A la Lic. Diana Graterol por su excelente asistencia técnica, al Sr. Wilmer Pineda y Sr. Johny Abanese por su apoyo en la infraestructura del laboratorio.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Elias MC, da Cunha JP, de Faria FP, Mortara RA, Freymüller E, Schenkman S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist* 2007; 158:147-157.
2. Gibson W, Garcide L. Kinetoplast DNA minicircles are inherited from both parents in genetics hybrids of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 42:45-54.
3. Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL, Panigrahi AK. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci* 2005; 30:97-105.
4. Macina RA, Sánchez DO, Affranchino JL, Engel JC, Frasch AC. Polymorphisms within minicircle sequence classes in the kinetoplast DNA of *Trypanosoma cruzi* clones. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 42:175-187.
5. Macina RA, Sánchez DO, Gluschankof DA, Burrone OR, Frasch AC. Sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 21:25-32.
6. Camandaroba EL, Reis EA, Reis MG, Andrade SG. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* colombian strain clones isolated from the acute phase of murine infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:613-615.
7. Morel C, Chiari E, Camargo P, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:6810-6814.

8. Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:1967-1971.
9. Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop 1985; 18:67-73.
10. Mimori T, Maldonado M, Samudio M, Rojas de A A.;Moreno R, Sakamoto M. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolates from Paraguay, using restriction enzyme analysis of kinetoplast DNA. Annals Trop Med Parasitol 1992; 86:231-237.
11. Jaramillo N, Moreo J, Triana O, Arcos-Burgos M, Muñoz S, Solari A. Genetic structure and phylogenetic relationships of colombian *Trypanosoma cruzi* populations as determined by schizodeme and isoenzyme markers. Am J Trop Med Hyg 1999; 61:989-993.
12. Torres JP, Ortiz S, Muñoz S, Solari A. *Trypanosoma cruzi* isolates from Chile are heterogeneous and composed of mixed populations when characterized by schizodeme and southern analysis. Parasitology 2004; 128:161-168.
13. Goncalves AM, Nehme-Russell NS, Brandao A, Jansen AM Schizodeme analysis with the restriction endonuclease RSA I differentiates between *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86:477-478.
14. Momen H, Grimaldi G, Pacheco Jr RS, Jaffe CL, McMahon-Pratt D, Marzochi MC. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. Am J Trop Med Hyg 1985; 34:1076-1084.
15. Jackson PR., Lawrie JM, Stiteler JM, Hawkins DW, Wohlhieter JA, Rowton ED. Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. Vet Parasitol 1986; 20:195-215.
16. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbel DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1996; 83:141-152.
17. Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. Mol Biochem Parasitol 1993; 62:45-52.
18. Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira ACV, Naiff RD, Barret TB, Degrave W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence. Am J Trop Med Hyg 1998; 58:807-811.
19. Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendoca B, Derre R, Junqueira ACV, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TB, Campbell DA, Coura J.R. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95:97-99.
20. Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol 2000; 30:35-44.
21. Marcet PL, Duffy T, Cardinal MV, Burgos JM, Lauricella MA, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. Parasitology 2006; 132:57-65.
22. Salazar A, Schijman AG, Triana-Chávez O. High variability of colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. Acta Trop 2006; 100:110-118.
23. Shapiro TA, Englund PT. Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. Proc Nat Acad Sci USA 1990; 87:950-954.
24. Tanuri A, Andrade PP, Almeida DF. A simple, highly efficient plating methods for tripanosomatids. J Protozool 1981; 28: 360-362.

25. Goitia-Aular M, Boiso JF. Cultivo de *Trypanosoma cruzi* (cepa Elpidio Padrón) en un medio semidefinido. Efecto de algunas variaciones en la composición y condiciones del mismo. *Acta Cientif Venezol* 1982; 33:488-496.
26. Contreras VT, Araque W, Delgado V. *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis *in vitro*. I. Changes in the properties of metacyclics trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89:253-259.
27. Contreras VT, Salles J, Thomas N, Morel C, Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 16:315-327.
28. Laemmli UK. Cleavage of structures proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
29. Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM. An improved silver staining procedure for schizodeme analysis in polyacrilamide gradient gels. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85:101-106.
30. Dvorak JA, Hall TE, Crane MJ, Engel JC, McDaniel JP, Uriegas R. *Trypanosoma cruzi*: Flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/Organism by means of mithramycin induced fluorescence. *J Protozool* 1982; 29: 430-437.
31. Contreras VT, De Lima AR, Zorrilla G. Maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:753-760
32. Deane MP, Souza MA, Pereira NM, Goncalves AM, Momem H, Morel M. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analysis. *J Protozool* 1984; 31:276-280.
33. Docampo R, Boiso JF, Stoppani AOM. Alteraciones metabólicas en *Trypanosoma cruzi* disquinetoplástico por acción del bromuro de etidio. *Medicina* 1974; 34:525-531.
34. Morel CM, Gonçalves AM, Deane MP, Chiari E, Carneiro M, Romanha AJ. Schizodeme characterization of natural and artificial populations of *Trypanosoma cruzi* as a tool in the study of Chagas disease. In: Newton BM and Mitchal F. , editor. *In New Approaches to the Identification of Parasites and Their Vectors*. Basel: Schwabe, Co. AG; 1984. pp. 253–275. 1984
35. Lee S, Lee S, Chang K. Transkinetoplastidy: a novel phenomenon involving bulk alterations of mitochondrion-kinetoplast DNA of a trypanosomatid protozoan. *J Protozool* 1992; 39:190-196.
36. García ES, Vieira E, Goncalves AM, Morel CM. A strain of *Trypanosoma cruzi* and its biochemical characterization after passage through different invertebrate hosts. *Ann Trop Med Parasitol* 1986; 80:361-363.
37. Contreras VT, Pacheco I, Navarro MC, De Lima AR, Arteaga R. Análisis ultraestructural del efecto del bromuro de etidio sobre diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi*. *Memorias del V Interamerican Microscopy Congress*. 1999; 1: 117-120.
38. Deane MP, Kloetzel JK. Differentiation and multiplication of dyskinetoplastic *Trypanosoma cruzi* in tissue culture and in the mammalian host. *J Protozool* 1969; 16:121-126