

Tesis de Posgrado

Estructura y evolución de minicírculos del ADN kinetoplástico de *Trypanosoma Cruzi*

Sánchez, Daniel Oscar

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sánchez, Daniel Oscar. (1986). Estructura y evolución de minicírculos del ADN kinetoplástico de *Trypanosoma Cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1953_Sanchez.pdf

Cita tipo Chicago:

Sánchez, Daniel Oscar. "Estructura y evolución de minicírculos del ADN kinetoplástico de *Trypanosoma Cruzi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1953_Sanchez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis 1953

ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTRUCTURA Y EVOLUCION DE MINICIRCULOS
DEL ADN KINETOPLASTICO DE TRYPANOSOMA CRUZI

AUTOR: DANIEL O. SANCHEZ

DIRECTOR: DR. A. CARLOS C. FRASCH

LUGAR DE TRABAJO: CATEDRA DE QUIMICA BIOLOGICA Y
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA, FACULTAD
DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BUENOS
AIRES

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

-1986-

Tesis 1953

A mis hijos,
Andy y Ale

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Leiva, por haberme interesado en el campo de las Ciencias Biológicas.

A la Dra. González Cappa, quien guió mis primeros pasos en la investigación científica, por su amistad, comprensión y su enorme calidad humana.

A Tania, Alejo y Víctor, por su amistad y colaboración en el desarrollo de mis trabajos.

A mis compañeros de laboratorio, José Luis Affranchino, Raúl Madrid, Roberto Macina, Silvia Goijman, Daniel Corach, Carlos Ibañez, Héctor Targovnik y Juan Carlos Garberi, por su colaboración y estímulo.

Al Dr. A.O.M. Stoppani, por haberme permitido desarrollar parte de mis investigaciones en el Centro de Investigaciones Bioenergéticas.

Al Dr. A.C.C. Frasch, junto a quien me inicié en la Biología Molecular.

A Cristina Daponte mi más afectuoso agradecimiento por su valiosa colaboración y resistencia.

Por último quiero expresar mi agradecimiento al personal docente y no docente de las Cátedras de Microbiología y de Química Biológica de la Facultad de Medicina, por su colaboración durante el desarrollo de mis tareas.

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADN-k	ADN-kinetoplástico
ADNn	ADN nuclear
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
Kpb	Miles de pares de bases
mc	Minicírculos
pb	Pares de bases
SDS	Sodio dodecil sulfato
SSC	NaCl 0.15 M, citrato de sodio 0.015 M
TRIS	Tris(hidroximetil) amino metano

INDICE

INTRODUCCION

1.	Generalidades de los tripanosomas	1
2.1.	La Enfermedad de Chagas	2
2.2.	Desarrollo de la enfermedad	4
3.	Ubicación sistemática, Morfología y ciclo de vida del <u>Trypanosoma cruzi</u>	5
3.1.	Ubicación sistemática	5
3.2.	Morfología	8
3.3.	Ciclo de vida	9
4.	Organización y Estructura del ADN nuclear y mitocondrial	10
4.1.	ADN nuclear	10
4.2.	Cromatina	11
4.3.	Estructura de los telómeros	11
4.4.	Organización del genoma nuclear	12
4.5.	ARN ribosomales	13
4.6.	Variación antigénica en tripanosomas africanos	14
4.7.	Minixones y transcripción discontinua	15
4.8.	ADN-kinetoplástico	16
4.8.1.	Maxicírculos	16
4.8.2.	Minicírculos	19
4.8.2.1.	Función de los minicírculos	22
4.8.2.2.	Evolución de los minicírculos	25
5.	Objetivos	27

MATERIALES Y METODOS

1.	Parásitos	28
2.	Purificación de ADN-kinetoplástico	29
3.	Corte con enzimas de restricción y electroforesis de ADN	30
4.	Clonado de minicírculos	30
5.	Transformación de <u>E. coli</u> HB 101	31
5.1.	Preparación de células competentes	31

5.2	Transformación de las células	32
6.	Marcación de ADN "in vitro"	32
7.	Transferencias de ADN a filtros de nitrocelulosa	33
8.	Hibridación	33
9.	Hibridación "in situ" de colonias	34
10.	Preparación de plásmidos	34
11.	Elución de fragmentos de ADN de geles de agarosa	35
12.	Hibridación de ADN-k en puntos ("dot hibridation")	36
13.	Determinación del número de copias de minicírculos	36

RESULTADOS

1.	Clonado de minicírculos de <u>T.cruzi</u>	37
2.	Mapa físico de los clones de minicírculos	37
3.	Regiones homólogas entre minicírculos	41
4.	Detección de subpoblaciones de minicírculos	43
5.	Caracterización de diferentes subpoblaciones de minicírculos en cepas de <u>T.cruzi</u>	47
5.1.	Hibridación con pTck-1 (subfragmento 1)	50
5.2.	Hibridación con pTck-12	50
5.3.	Hibridación con pTck-13	50
5.4.	Hibridación con pTck-14	51
6.	Polimorfismo en subpoblaciones homogéneas de minicírculos en clones de parásitos	52
7.	Cuantificación del número de minicírculos en subpoblaciones homogéneas	58
8.	Un método rápido para la identificación de aislamientos de <u>T. cruzi</u>	60
9.	Identificación de parásitos obtenidos de casos agudos y crónicos con sondas de minicírculos	62

DISCUSION	67
-----------	----

BIBLIOGRAFIA	76
--------------	----

INTRODUCCION

1. GENERALIDADES DE LOS TRIPANOSOMAS

Los tripanosomas son protozoos flagelados, pertenecientes al orden kinetoplastida (1,2). Las especies de este orden se caracterizan por poseer una región especializada, el kinetoplasto, dentro de su única mitocondria. Dentro de esta región se localiza el ADN mitocondrial (ADNm) de estos organismos. Los miembros de este orden son en su gran mayoría parásitos, (con excepción de la familia Bodonidae). Algunos géneros como Phytomonas son patógenos para plantas, otros como el género Crithidia son parásitos de insectos. Los géneros Trypanosoma y Leishmania viven en el torrente sanguíneo o intracelularmente en vertebrados. Estos dos últimos géneros son agentes causales de algunas de las principales enfermedades parasitarias del hombre, por ejemplo, las Leishmanias son responsables de distintas enfermedades como la Leishmaniasis cutánea (Leishmania tropica: Botón de Oriente), Leishmaniasis mucocutánea (L. brasiliensis: espundia) y Leishmaniasis viscerales (L. donovani: Kala-azar). Estas enfermedades afectan principalmente a la población de áreas tropicales y subtropicales en todo el mundo. Dentro del grupo de los Trypanosomas, Trypanosoma cruzi es el agente causal de la Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas-Mazza; T. brucei incluye distintas subespecies que producen la Tripanosomiasis Africana o Enfermedad del Sueño en el hombre (T. Brucei rhodesiense, enfermedad aguda, T. brucei gambiense, enfermedad crónica) y su equivalente en animales salvajes o domésticos (T. brucei brucei, Nagana). Esta última especie afecta las principales áreas de Africa,

por lo que las mismas no son adecuadas para el desarrollo de la ganadería y consecuentemente contribuyen a la mal nutrición de sus habitantes. Estas enfermedades afectan a millones de personas en todo el mundo principalmente en los países en desarrollo (3,4).

La importancia médica, el perjuicio económico que ocasionan estos organismos y el hecho de no contar con tratamientos adecuados para algunas de estas enfermedades, ha impulsado a numerosos científicos de todo el mundo al estudio de estos parásitos. Por otra parte muchas de estas especies son extremadamente interesantes de por sí, lo que también ha hecho de los tripanosomas un objeto de investigación atractivo para los bioquímicos y biólogos moleculares.

Las investigaciones realizadas en este campo durante las últimas décadas han conducido al descubrimiento de cuatro importantes características de los tripanosomas.

1. La particular cantidad y estructura de su ADN mitocondrial.
2. La presencia de una organela, hasta el presente única en los miembros de este grupo denominada glicosoma (5).
3. El mecanismo de variación antigénica de los tripanosomas del grupo de T. brucei (6,7) y
4. Un sistema de transcripción discontinua (8).

2.1. La Enfermedad de Chagas

En 1909, Carlos Chagas descubre un nuevo flagelado en el intestino de un insecto hematófago (Pastrongylus megistus) muy común en las cabañas del estado de Minas Gerais (Brasil). Chagas denominó a este

nuevo organismo Trypanosoma (Schizotripanum) cruzi (9) en honor a su maestro Oswaldo Cruz. Posteriormente demuestra la presencia de este parásito en la sangre de un niño y de un gato (10) y describe con bastante detalle las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad que denominó Tripanosomiasis americana y, que con posterioridad se la conociera como Enfermedad de Chagas.

Por muchos años esta nueva enfermedad fue considerada como exótica y restringida casi exclusivamente al Brasil. Sin embargo con el advenimiento de técnicas modernas para el inmunodiagnóstico y mejores estudios epidemiológicos se tuvo un panorama más realista de la situación.

Hoy, sabemos que es una de las enfermedades parasitarias más ampliamente distribuida en América Latina (sur de Estados Unidos hasta la Provincia de Río Negro en Argentina) y que constituye un serio problema sanitario para la región. Aunque la mayoría de estos países tienen áreas de gran endemicidad, la prevalencia es mayor en Brasil, Argentina y Venezuela. En nuestro país aproximadamente un 10% de la población está infectada, existiendo algunas localidades de la provincia de Santiago del Estero en donde el 70% ó más de los residentes está infectado.

Uno de los problemas básicos en parasitología es cómo explicar el amplio rango de efectos patológicos asociados con la infección de hospedadores vertebrados por organismos de morfología idéntica. La infección del hombre por T. cruzi es uno de estos ejemplos. Los resultados de la infección varían desde la ausencia de manifestaciones clínicas

hasta la muerte del paciente a corto o largo plazo. Por otra parte, es un hecho bien conocido que las características clínicas de la enfermedad de Chagas varían en diferentes regiones geográficas. Por ejemplo, la miocardiopatía chagásica es más frecuente en Argentina que en otros países (11,12). Las afecciones del aparato digestivo son frecuentes en el centro de Brasil y raros en Venezuela.

2.2. Desarrollo de la Enfermedad

Comienza con la entrada del parásito al huésped y luego de un período de latencia de aproximadamente 7-10 días comienzan o no las manifestaciones clínicas. La infección puede cursar sin manifestaciones clínicas durante el período agudo, siendo esto aproximadamente en el 90% de los casos. La etapa aguda se caracteriza por la gran proliferación intracelular del parásito y por una marcada parasitemia. Los síntomas más comunes de esta etapa son: fiebre, irritabilidad, cefalalgias, y mialgias.

La evolución de la etapa aguda dura entre 40-60 días retrocediendo los signos y síntomas a la normalidad. Luego de esta etapa la infección evoluciona al período crónico.

En nuestro país los pacientes crónicos sintomáticos alcanzan al 20-30% de los individuos infectados.

Las manifestaciones cardiológicas de la enfermedad son: hipertrofia, trastornos de conducción y del ritmo cardíaco. Las manifestaciones del aparato digestivo son: hipertrofia y dilatación (megaesófago,

megacolon).

En la enfermedad de Chagas los factores que determinan las diferentes manifestaciones clínicas y su relación con diferentes áreas geográficas no están bien definidos, pero se suponen relacionadas con la existencia de diferentes cepas del parásito en distintas regiones, interactuando a su vez con poblaciones de hospederos que difieren en muchos aspectos (genéticos, nutricionales, etc.). Es decir que la consecuencia de la interacción huésped-parásito no dependería exclusivamente de las diferencias en uno u otro de los componentes, sino de la particular asociación que se da entre una determinada población de parásitos y una particular población de hospederos.

3. UBICACION SISTEMATICA, MORFOLOGIA Y CICLO DE VIDA DEL Trypanosoma cruzi

3.1. Ubicación sistemática

Según el Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoología (13) y Hoare (14), la ubicación sistemática de los tripanosomas es la esquematizada en la Figura 1.

Los géneros de la familia Trypanosomatidae se caracterizan por la posición relativa del kinetoplasto respecto al núcleo.

Los miembros del género Trypanosoma se dividen en 2 grandes grupos o secciones según el tipo de desarrollo de los tripanosomas en el vector y en el mamífero.

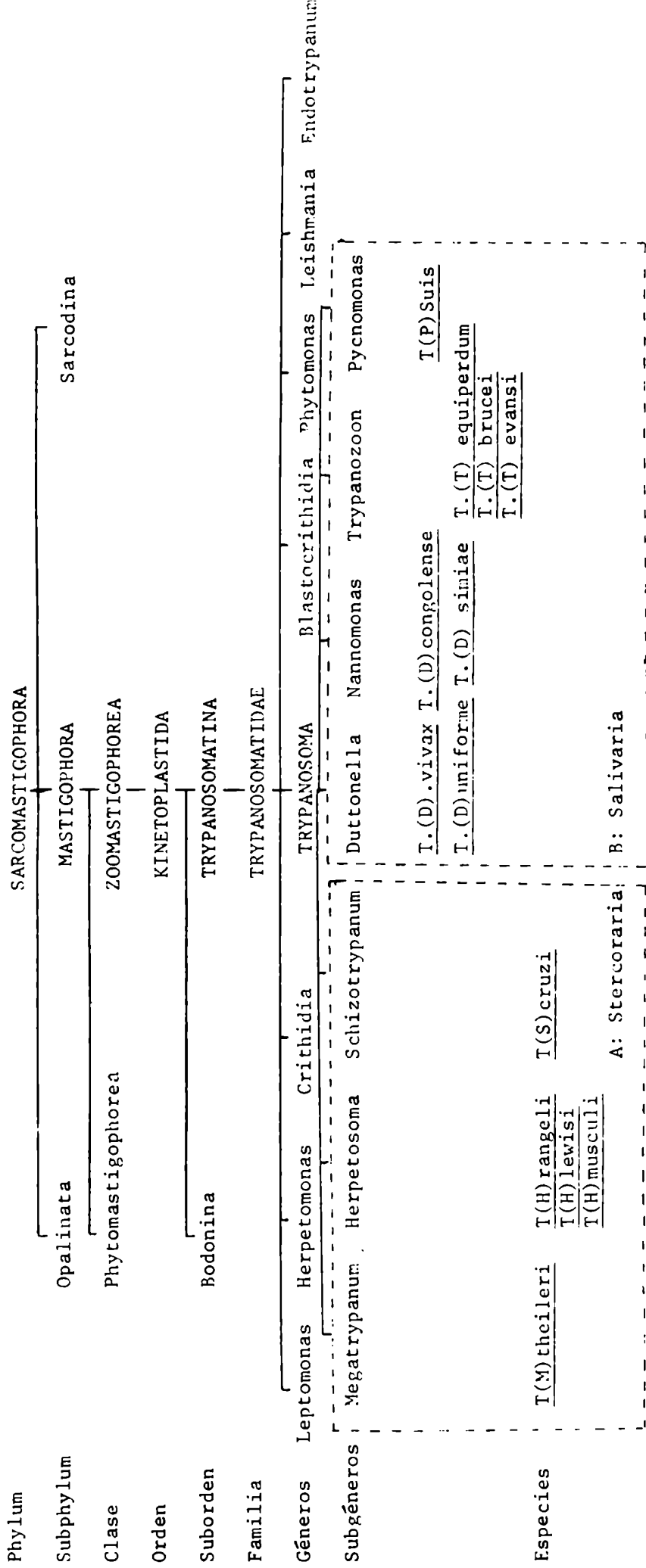


FIGURA 1. Ubicación taxonómica de las especies del género Trypanosoma

Sección Salivaria: Comprende las especies cuyo ciclo en el vector se completa en la región anterior del tubo digestivo y por lo tanto se transmiten por inoculación.

Sección Estercoraria: Las especies de este grupo completan su desarrollo dentro del vector en la región posterior del tubo digestivo (ampolla rectal), transmitiéndose por contaminación (excepto T.range-li). La multiplicación en el mamífero es discontinua, usualmente en uno de sus estadios morfológicos.

La única especie de este grupo patógena para el hombre es T.cruzi. Existe un considerable número de evidencias que indican que esta especie no es un grupo homogéneo de parásitos, sino que estaría compuesta por una población heterogénea de organismos que exhiben diferentes características.

Algunas de estas evidencias son:

- 1) las variaciones significativas de las características clínicas de la enfermedad de una determinada región geográfica respecto de otras.
- 2) Determinadas relaciones huésped-vector también sugieren la existencia de diferentes cepas del parásito. Por ejemplo se ha observado que Rhodnius pallescens y Triatoma dimidiata, los principales vectores en Panamá no se infectan cuando son alimentados sobre pacientes chagásicos que adquirieron la enfermedad en Argentina, mientras que Triatoma infestans, el principal vector en Argentina, sí se infecta. Inversamente, los vectores de Panamá evidencian una alta incidencia de infección respecto del de Argentina, cuando se alimentan sobre pacientes chagásicos de Panamá (15).

3) Se ha establecido que diferentes aislamientos de T. cruzi difieren significativamente en su infectividad, tiempo de duplicación, morfología, afinidad tisular y composición antigénica (16,17,18,19,20,21).

4) Respecto a las diferencias antigénicas se encontró similitudes entre cepas de Brasil, que no son compartidas con cepas de Argentina, Chile o Venezuela (22).

Por otra parte, las cepas argentinas difieren a su vez en otros aspectos, como ser su capacidad de inducir actividad neutralizante en huéspedes experimentales (23).

3.2. Morfología

Tripomastigote: Es la forma circulante en el mamífero. Tiene 20-25 μm de longitud. Presenta un kinetoplasto de forma esférica ubicado en la región posterior al núcleo, respecto de la dirección de movimiento del parásito. El flagelo emerge desde el extremo posterior y recorre la superficie del parásito hacia el extremo anterior.

Epimastigote: Es la forma de multiplicación en el intestino del insecto vector. Mide aproximadamente 10-16 μm . El kinetoplasto de formación discoidal se ubica en la región anterior al núcleo.

Tripomastigote metacíclico: Similar al tripomastigote pero más fino.

Esferomastigote: De forma redondeada con un pequeño flagelo que rodea al parásito. Tiene capacidad de división.

Amastigote: Forma intracelular en el huésped mamífero. De forma redondeada, mide aproximadamente 2-4 μm de diámetro, carece de flagelo y se divide activamente en el interior de la célula.

3.3. Ciclo de vida

El vector Triatoma infestans (en la Argentina) es un insecto hematófago que se infecta por ingestión de tripomastigotes presentes en la sangre periférica de un mamífero infectado. Estos tripomastigotes se diferencian en la luz del tubo digestivo del vector a epimastigotes. Esta forma se divide activamente y sería la responsable del mantenimiento de la infección en el vector, ya que éste permanece infectado de por vida. Por último los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal del insecto (24), siendo esta forma la que posee capacidad infectiva para el huésped mamífero. En 1968 se comunicó la existencia de una forma denominada esferomastigote (25) que diferenciados a partir de los tripomastigotes podrían originar tripomastigotes metacíclicos o epimastigotes.

Cuando el vector infectado se alimenta sobre un huésped susceptible, elimina parte de las heces durante la ingesta de sangre y es a través de estas heces que se vehiculizan los tripomastigotes metacíclicos. Estos penetran en la piel del huésped a través de microescoriaciones o a través de las mucosas, como la conjuntiva. En el sitio de entrada, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células iniciando de esta manera la etapa intracelular. La entrada del parásito

a la célula se realiza por un proceso de endocitosis, en el que inter-
vendría la fibronectina como receptor de adhesión e interiorización
del tripomastigote en la célula huésped (26). En el interior de la cé-
lula se produce la diferenciación a la forma amastigote que se multi-
plica por división binaria. Después de un determinado número de divi-
siones comienza la diferenciación hacia la forma tripomastigote que
son liberadas a la circulación por ruptura de la célula. Estos tripom-
astigotes invaden nuevas células reiniciando el ciclo amastigote-tri-
pomastigote y perpetuando de esta manera la infección en el huésped.

4. ORGANIZACION Y ESTRUCTURA DEL ADN NUCLEAR Y MITOCONDRIAL

4.1. ADN nuclear (ADNn)

El núcleo de los tripanosomátidos presenta algunas característi-
cas peculiares entre los eucariotas, por ejemplo, durante la división
nuclear, persiste la membrana nuclear y no hay condensación de la cro-
matina por lo que no se observan cromosomas visibles (27). Reciente-
mente Solarí (28) ha reportado la existencia de 10 placas densas en nú-
cleos en división de T. cruzi. Si estas placas representan cinetocoros,
indicaría la existencia de 10 cromosomas.

La cantidad de ADNn de T. cruzi es de aproximadamente $2,8 \times 10^{-13}$ g
por célula (29-30), lo que representa un tamaño del genoma de aproxima-
damente $2,5 \pm 0,2 \times 10^8$ pb. En base a los valores de complejidad ciné-
tica obtenidos por curvas de cinética de reasociación, los valores an
tes mencionados son concordantes con los de un genoma diploide (29).

Por otra parte Tait (31) estudiando la variación en los patrones de isoenzimas en una serie de aislamientos de T.b.brucei ha presentado fuertes evidencias de que los tripanosomas serían diploides.

4.2. Cromatina

La cromatina de T. cruzi está organizada, como en el resto de los eucariotas, en unidades repetidas (nucleosomas). Cada nucleosoma contiene alrededor de 200 pb de ADN asociado con histonas (32,33,34), sin embargo, la presencia de una histona H 1 similar a la del resto de los eucariotas parece dudosa (32,33), aunque se ha descrito la presencia de 2 proteínas básicas de rápida movilidad, posiblemente subfracciones de la H 1 debido a que tiene alto contenido en lisina (33). Este hecho ha sido descrito en diferentes tripanosomátidos y posiblemente sea una nueva característica de este grupo de protozoos.

4.3. Estructura de los telómeros

Los primeros trabajos sobre los genes de las proteínas de superficie de los tripanosomas africanos mostraban que el segmento de ADN directamente adyacente a los extremos de los cromosomas (telómeros) no eran cortados por enzimas de restricción, indicando que consistían de pequeñas repeticiones de ADN o de ADN muy modificado, por otra parte el tamaño de este segmento era muy distinto en diferentes poblaciones de tripanosomas sugiriendo una inusual inestabilidad (35). Recientemente Van der Ploeg et al., (36) han determinado que todos los telómeros analizados (más de 30) crecen aproximadamente 6 pb por generación

de tripanosomas y son acortados por ocasionales largas deleciones (37). Los resultados de Van der Ploeg et al., indican que el crecimiento de los telómeros es debido principalmente a la adición de unidades de (CCCTAA) y que las regiones que no se cortan por enzimas de restricción contienen 3 tipos de secuencias: 1) Secuencias (CCCTAA)_n localizadas hacia la región terminal, 2) oligómeros de 29 bases derivados de los anteriores, de localización subterminal y por último una tercer región más compleja rica en AT, que contiene también varias repeticiones (CCCTAA) y muchos segmentos pequeños de homopolímeros.

4.4. Organización del genoma nuclear

Experimentos de renaturalización de ADN han demostrado que el genoma nuclear de T. brucei contiene un 12% de secuencias altamente repetitivas y un 20% de secuencias moderadamente repetitivas en adición a las copias únicas de ADN (38). En T. cruzi estos componentes están presentes en diferentes proporciones, 9, 35 y 49% respectivamente (29). Dentro de las secuencias altamente repetidas se ha descrito la presencia de un ADN satélite (38,41). El ADN satélite es un componente general presente en el genoma de eucariotas superiores y está constituido por secuencias de ADN repetidas miles de veces y organizadas en "tandem". En T. brucei, T. equiperdum y T. cruzi las unidades de repetición son de 177, 180, 195 pb, respectivamente (38,41,42), siendo el número de copias por genoma de aproximadamente 120.000 en T. cruzi (42) y localizadas en minicromosomas al igual que en T. brucei (43).

El análisis de secuencias moderadamente repetidas en T. cruzi demostró que están organizadas en familias de largas repeticiones distribuidas a través del genoma (44).

4.5. ARN ribosomales

Los ARN ribosomales citoplasmáticos (ARNr) de la mayoría de los eucariotas superiores están compuestos de 2 grandes y 2 pequeños ARNs, los 23-28S y 18S, y los 5,8S y 5S, respectivamente. Sin embargo, algunos organismos se desvían de este patrón (45). Los ribosomas de los tripanosomatideos son excepcionales por el hecho de que contienen 3 ARNs de gran tamaño (46,47,48) y 5 ó 6 ARNs de pequeño tamaño (49,50, 51).

Castro et al., y Hernández et al., (48,51) comunicaron para T. cruzi que la subunidad mayor del ribosoma contiene: 2 ARNs grandes, denominado alfa (1.661 ± 10 bases) y beta (2.028 ± 12 bases) unidos entre sí por puentes de hidrógeno, constituyendo así el ARNr 24S (de aproximadamente 4.000 nucleótidos) y 5 ARNs pequeños denominados S_1 (261 bases), S_2 (217 bases), S_3 (197 bases), S_4 (141 bases) y S_5 (110 bases). Con excepción del S_3 unido al ARN beta por puentes de Hidrógeno, el resto de los ARNs pequeños probablemente estén unidos a proteínas ribosomales. La subunidad menor del ribosoma posee un ARN 18S (aproximadamente 2.500 bases).

La organización de los genes para los ARNr en Leishmania donovani (46), T. brucei (47) y T. cruzi (52) es similar a la observada en

eucariotas. T. cruzi tiene aproximadamente 114 genes nucleares para los ARNr (48) y su organización en el genoma es como sigue: Los genes de los ARNr 18 S, beta y alfa y 3 de los pequeños (S_1 , S_2 y S_3) mapean en 2 fragmentos adyacentes de 9,88 y 1,7 Kpb generados por la enzima de restricción Sst I. Los otros 2 ARNr pequeños (S_4 y S_5) fueron localizados fuera del cistron ARNr e independientes uno del otro.

4.6. Variación antigénica en tripanosomas africanos

Una de las características interesantes de los tripanosomas y por ende la más estudiada ha sido el mecanismo de variación antigénica de los tripanosomas africanos.

Estos parásitos pueden multiplicarse por meses en el torrente sanguíneo del huésped mamífero. Para escapar de la respuesta inmune del huésped, el parásito cambia constantemente el principal componente de su cubierta, esto es una glicoproteína de peso molecular de 60-65 KD denominada VSG (Variables Surface Glycoprotein) (53). Cada VSG es codificada por un gen distinto, denominado BC (Basic Copy) (54), siendo el repertorio de cada tripanosoma muy grande. Más de 100 VSGs funcionales han sido identificados inmunológicamente (55) y más de 1000 genes potenciales se han detectado por hibridación molecular (56). Una fracción muy importante de estos genes se han encontrado cercanos a los telómeros (57). La BC es un gen inactivo por la falta de un promotor y de un exón que codifica los primeros 35 nucleótidos del ARNm (58,59). La expresión de los genes para las VSGs localizados internamente en los cromosomas es invariablemente acompañado de la duplicación

del gen y su posterior transposición a un sitio de expresión localizado cercano al extremo de un cromosoma (60,61). Los genes para las VSG localizadas en los extremos de los cromosomas pueden moverse al sitio de expresión por un mecanismo denominado conversión telomérica (62) o puede activarse sin duplicación por un mecanismo desconocido hasta el presente (63). Borst et al., han descrito la existencia de más de 100 minicromosomas con genes para las VSG localizadas en sus telómeros (64) por lo que este tipo de genes parecen ser muy importantes en el mecanismo de variación antigénica.

4.7. Miniexones y transcripción discontinua

Los primeros 35 nucleótidos de todos los ARNm para las VSGs son idénticos y están codificados en 1 miniexón (65). Existen aproximadamente 200 miniexones por núcleo en T.brucei (66). Recientemente De Lange et al. (67) han demostrado que este miniexón también está presente en el extremo 5' de la mayoría o de todos los ARNm en T.brucei. En base a la organización en tandem de más de 10 unidades de estos miniexones y la gran abundancia de ARNm con este miniexón, estos autores sugieren que la transcripción de los genes que codifican para proteínas en T.brucei es muy inusual y podría ser un proceso discontinuo (67,68). Por otra parte, estos autores también demostraron la presencia de miniexones en el extremo 5' de muchos ARNm de Trypanosoma vivax y Trypanosoma cruzi por lo que concluyen que este novedoso sistema de transcripción en eucariotes no sería exclusivo de los tripanosomas que poseen un mecanismo de variación antigénica, sino que

sería un fenómeno general del género *Trypanosoma* (69).

4.8. ADN-Kinetoplástico (ADN-k)

El ADN-k fue el primer ADN extracromosomal descrito (70). Su cantidad varía entre el 5 y 30% del ADN total de la célula. Está situado en una región especializada (kinetoplasto) de la mitocondria de los tripanosomátidos. El kinetoplasto se localiza siempre muy próximo a la base del flagelo (71). El ADN-k está constituido por dos tipos de moléculas circulares, unas de gran tamaño (13 a 40 Kpb, según la especie) denominadas maxicírculos y otras de pequeño tamaño (0,45 a 2,5 Kpb, según la especie) denominadas minicírculos (Tabla I).

Los maxicírculos y minicírculos están concatenados en una unidad estructural que tiene la forma de un disco ligeramente cóncavo (71,72) cuando están dentro de la mitocondria y adoptan una forma de canasta cuando están en solución. Los maxicírculos son funcionalmente análogos a otros DNAs mitocondriales; mientras que la función de los minicírculos es desconocida.

4.8.1. Maxicírculos

El número de maxicírculos por célula varía entre 20 y 50, lo que representa un 5-10% del ADN-k total.

En todas las especies de tripanosomátidos estudiadas se han detectado transcritos de maxicírculos (73-78). Los dos ARNs más abundantes son los ARN ribosomales mitocondriales (9 y 12 S) (77). Estos ARNs son los más pequeños descritos hasta el momento (658 y 1256 bases respectivamente) (79). Los genes para los ARN 9 y 12 S están separados por

TABLA I. PROPIEDADES DEL ADN-k DE ALGUNOS TRYPANOSOMATIDAE

Organismo	Minicirculos		Complejidad (en equivalentes de mc)	Maxicirculos		ADN-k Densidad (gr/cm ³)
	Tamaño (Kpb)	N° de Subpoblaciones		Tamaño (Kpb)		
<u>Crithidia</u>						
<u>C. acanthocephali</u>	2,5		1,6		1,702	1,702
<u>C. fasciculata</u>	2,5	> 10	1,7	35	1,702	1,702
<u>C. luciliae</u>	2,5	> 10	2-2,5	35	1,703	1,703
<u>Phytomonas</u>						
<u>P. davidi</u>	1,1	≥ 10	1,3	36,5	1,699	1,699
<u>Herpetomonas</u>						
<u>H. muscarum muscarum</u>	1,1	~ 10	-	32	1,698	1,698
<u>H. muscarum ingenoplastis</u>	16,7-23,5	~ 10	-	36,5	1,698	1,698
<u>Leishmania</u>						
<u>L. tarentolae</u>	0,9	3	1,3	30,5	1,703	1,703
<u>Trypanosoma (Schizotrypanum)</u>						
<u>T. (S) cruzi</u>	1,4	> 10	0,7-1,4	40	1,698	1,698
<u>Trypanosoma (Trypanozoon)</u>						
<u>T. (T) brucei</u>	1,0	> 250	164	20	1,691	1,691
<u>T. (T) equiperdum</u>	1,0	1	1	-	1,692	1,692
<u>T. (T) evansi</u>	1,0	1	1	-	1,691	1,691
<u>Trypanosoma mega</u>	2,1	~ 70	37	24,5	1,693	1,693

siete nucleótidos en T.brucei (79) y por alrededor de 3000 bases en C. luciliae (80). Son transcriptos a partir de la misma cadena (75,78), pero a diferencia del resto de los ADNs mitocondriales analizados el orden de transcripción es: subunidad mayor-subunidad menor (81). Otros transcriptos menos abundantes poseen colas de poli A y probablemente representen ARNm mitocondriales (75). Otros genes mitocondriales han sido tentativamente identificados en los maxicírculos por hibridación con fragmentos de ADNs mitocondriales de otros organismos y por análisis de secuencias. De esta forma se han localizado las subunidades I, II y III de la citocromo oxidasa, apocitocromo b y 10 marcos de lectura abierta no asignados (82-84). Un hecho destacable es que hasta ahora no se ha detectado la presencia de ARNs de transferencia, hecho bastante inusual ya que todos los ADNs mitocondriales estudiados codifican para estos ARN.

Según Hajduk et al. (85) el mecanismo de replicación de los maxicírculos es a través de un sistema similar al círculo rodante ("rolling circle").

La característica general de la organización de los maxicírculos es el agrupamiento de los genes en una región de la molécula denominada región conservada. A través de esta región los maxicírculos de todas las especies hibridan en forma cruzada (78,86). En el resto de la molécula prácticamente no existen genes que sean transcriptos (75,87,88) y se la ha denominado región divergente. Esta región contiene un número significativamente menor de sitios de restricción que en el resto de la molécula, sugiriendo que existen secuencias repetitivas. Recientemente

Muhich et al., han secuenciado un fragmento de esta región de los maxicírculos de L.tarentolae y demostrado que está compuesta casi exclusivamente de secuencias repetitivas. Estas repeticiones pueden agruparse al menos en seis diferentes familias (89). Por otra parte esta región es muy variable en tamaño y secuencia entre las especies y aún dentro de diferentes aislamientos de T.brucei (90); por lo que las regiones divergentes de los maxicírculos de distintas especies no hibridan en forma cruzada (88). Esta región variable podría ser análoga a la región rica en A+T del ADNm de Drosophila que también varía en tamaño entre distintas especies y que no es transcripta (91). Por analogía con el ADNm de Drosophila, la región divergente podría contener el origen de replicación de maxicírculo (92). Recientemente Kim y Ray (92) han aislado un fragmento de 189 pB de los maxicírculos de Crithidia fasciculata que introducido en un plásmido, sin el origen de replicación, le confiere la capacidad de replicar autonomamente en levadura, por lo que es muy probable que este fragmento contenga el origen de replicación del maxicírculo. La secuenciación de este fragmento de ADN mostró un alto contenido de A+T (79,4%) con una gran asimetría en la distribución de los residuos de adenina y timina entre las dos cadenas.

4.8.2. Minicírculos

Los minicírculos (mc) constituyen aproximadamente el 90-95% del ADN-k. Concadados entre si determinan la estructura en malla del mismo (Figura 2) (93,94,95). En cada kinetoplasto existen miles de mc, variando el tamaño y complejidad de los mismos entre los distintos géne-

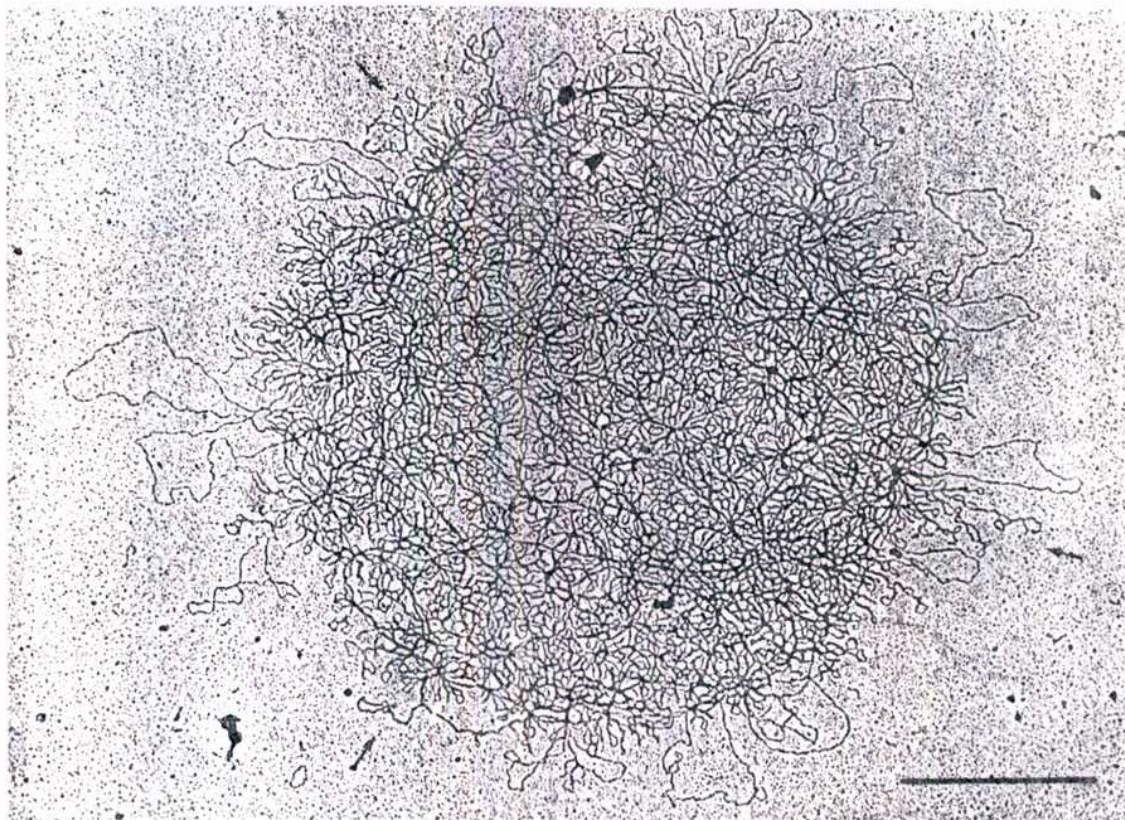


FIGURA 2. Fotografía de la red de ADN-k al microscopio electrónico. En el borde de la red de minicírculos se observan maxicírculos, algunos de los cuales están superenrollados (flechas). La barra es 1 μ m. Tomado de Borst y Hoeijmakers (93).

ros y especies (ver Tabla I).

En el género Crithidia los análisis por enzimas de restricción han demostrado la existencia de por lo menos 10 clases de mc. La complejidad total de los mc, expresada en equivalentes de mc es de 1,5-2,5 mc (96) lo que indica que las diferentes clases de mc comparten extensas regiones de homología. Las diferencias entre las clases de mc se debe principalmente a un reordenamiento de las secuencias en partes específicas de la molécula. Los mc en las especies del género Leishmania aparentan ser menos heterogéneas que en Crithidia. Según Challberg y Englund el 90% de los mc en L.tarentolae forman parte de 3 subpoblaciones homogéneas, difiriendo las 2 poblaciones mayoritarias solamente en 10-15% de su secuencia (97). Por el contrario Kidane et al. han comunicado para la misma especie que el 50% de los mc estarían por lo menos en 5 subpoblaciones de mc (98). En T. brucei los mc son muy heterogéneos. Cada kinetoplasto tiene más de 200 clases de mc que comparten solamente 25% de sus secuencias (99). La secuenciación de 2 mc de esta especie ha demostrado que existe una región de 122 pb de casi perfecta homología, en adición a 20 pequeños segmentos homólogos de 10 a 15 pb distribuidos a lo largo de la molécula. Estos segmentos difieren en su posición, orientación y número de copias presentes en distintos mc, sugiriendo un gran reordenamiento de las secuencias (100). Sorprendentemente los mc de T.evansi y T.equiperdum, especies muy relacionadas con T. brucei son homogéneos (41,102) en secuencia.

En T. cruzi existen entre 20.000 y 30.000 mc de aproximadamente 1400 pb. Cada mc tiene un segmento de 118 pb que se repite 4 veces,

dispuestos en ángulo recto. Estos segmentos son microheterogéneos en secuencia, siendo parte de las mismas iguales en todas las repeticiones (103-107) y con un alto contenido en A+T (108).

4.8.2.1. Función de los mc

Muchos son los interrogantes que aún quedan sin responder acerca de los mc, pero el más importante: ¿Cuál es su función?, todavía no tiene respuesta. ¿Los mc tienen genes?, varias evidencias indicarían que no.

1. La secuencia de los mc tiene una velocidad de evolución extremadamente rápida.
2. La secuencia de los mc es muy heterogénea en muchas especies.
3. Hay una gran variedad de tamaños, que incluye mc de aproximadamente 465 pb (Trypanosoma vivax) (109) hasta 2300 pb en Crithidia
4. El análisis de la secuencia de 2 mc de T.brucei ha demostrado que podrían codificar solo una proteína de 52 ó 70 aminoácidos (100); mientras que en T.equiperdum ésta es incluso menor (22 aa), asumiendo que es usado el código genético normal en la mitocondria de los tripanosomas y que no hay intrones (110).

El análisis de la secuencia de un mc de T.cruzi ha mostrado que podría codificar para una proteína de 106 aa, siendo la mayor descrita hasta el presente (111); sin embargo no se ha detectado ningún transcrito de mc en estas especies. No obstante, el alto número de copias de mc por célula hace razonable asumir que el producto de un gen sería necesario en grandes cantidades. Sin embargo en todas las especies estudiadas (excepto una) no se han detectado transcritos ni en ARN

mitocondrial ni en ARN total. Dentro de éstas especies se incluyen C. luciliae (74), T. brucei (tripomastigote y formas de cultivo) (75, 78), L. tarentolae (76,77), Phytomonas davidi (73) y Herpetomonas muscarum ingenoplastis. En la mayoría de estas especies transcriptos poco frecuentes de maxicírculos son fácilmente detectados, lo que indicaría que transcriptos de mc presentes aún en bajas proporciones podrían ser detectados. Por otra parte mc de T. brucei clonados en plásmidos no inducen la síntesis de proteínas en sistemas de minicélulas de E. coli (110).

En contraste con estos resultados Fouts et al. han encontrado un transcripto en C. acanthocephali. Este transcripto de 240 bases hibrida con la cadena pesada de los mc y está presente en la mitocondria y en el citoplasma en concentraciones iguales (111), sin embargo estos resultados no han sido confirmados por otros autores y por otra parte se ha sugerido que podría ser el resultado de un artificio de técnica al hibridar las colas de poli A de los ARN mensajeros con un segmento rico en dT presente en los mc de esta especie (112). Evidentemente serán necesarias más investigaciones para resolver estas discrepancias.

En base a las características de la secuencia de los mc es poco probable que los mc codifiquen una proteína estable o ARN estructural de un tamaño razonable. La única posibilidad sería una proteína pequeña muy heterogénea en tamaño y en secuencia de aminoácidos e inestable en la evolución.

Recientemente Shlemai y Zadol (113) han logrado la expresión de fragmentos de mc de Crithidia fasciculata usando vectores de expresión

en E. coli. Inmunsueros preparados contra esta proteína reaccionan específicamente con antígenos del parásito. El rol de esta o estas proteínas en el ciclo biológico del parásito por ahora son desconocidos. Este es el primer dato experimental que indicaría que los mc de Crithidia codifican por proteínas, reabriendo nuevamente una antigua discusión al respecto.

Una característica común entre los mc de distintas especies de tripanosomátidos (con la posible excepción de T. cruzi) es la presencia de una curvatura en la molécula (114,115). La presencia de esta curvatura altera dramáticamente la movilidad electroforética del fragmento que la contiene cuando es corrido en geles de poliacrilamida. Por ejemplo un fragmento de 414 pb de un mc de Leishmania tarentolae presenta un tamaño aparente de 1380 pb cuando es corrido en un gel de poliacrilamida 12% (114). La presencia de esta curvatura no es debida a modificaciones del ADN, sino a la particular secuencia de nucleótidos de esta región de la molécula. Similares alteraciones en la migración de fragmentos de mc han sido descritas en las siguientes especies (116): Trypanosoma brucei, Herpetomonas muscarum, Crithidia fasciculata y Trypanosoma equiperdum.

Los mc de T. equiperdum poseen una sola curvatura dentro de su molécula localizada dentro de la región conservada de los mc (116). Recientemente Kidane et al. han llegado a los mismos resultados para los mc de L. tarentolae (98). La secuenciación de la región central de la curvatura ha mostrado la presencia de un segmento de 7 u 8 pb ($CA_{5-6}T$) que se repite varias veces, distribuyéndose a su vez en for-

ma simétrica alrededor del centro (117).

La única propiedad conocida de los mc ampliamente conservada dentro de la familia de los tripanosomátidos es hasta ahora esta estructura, la cual podría jugar un papel importante en el empaquetamiento de los mc dentro del kinetoplasto o ser un sitio de reconocimiento para determinadas proteínas (114).

4.8.2.2. Evolución de los minicírculos

El ADN-k de diferentes géneros e incluso de especies del mismo género difieren significativamente en su contenido de G+C, indicando esto la existencia de grandes alteraciones en la secuencia de los mc durante su evolución. Existe en general una tendencia a disminuir la densidad del ADN-k desde los géneros más primitivos hasta los más recientes; concomitantemente (con algunas excepciones) hay una reducción en el tamaño de los mc (Tabla I) y un incremento en la complejidad total de la secuencia de los mc.

Los mc de diferentes especies no hibridan en forma cruzada, incluso puede existir solamente una homología parcial entre mc de diferentes "stocks" de una misma especie (90).

En algunas especies la secuencia de los mc puede cambiar tan rápidamente que puede producir alteraciones en los perfiles de mc cortados por enzimas de restricción, en el transcurso de unos pocos años (86, 87). Esto sugiere una evolución muy rápida y al azar de la secuencia de los mc más que una selección específica. Por otra parte la comparación de los datos obtenidos por secuenciación de mc ha revelado que existe una región conservada entre las diferentes especies que presenta

un cierto grado de homología, sugiriendo una conservación preferencial (relativa al resto de la molécula) de estos segmentos (118,119). Dentro de esta región conservada, existe una secuencia de 14 pb (12 en T.cruzi) presente en todas las especies analizadas (98). El resto de la molécula parece evolucionar más rápidamente y al azar.

El origen de la heterogeneidad en tamaño y secuencia de los mc se desconoce; se supone que juegan un papel muy importante en su generación el reordenamiento de las secuencias (como resultado de eventos de recombinación (80,120) y una rápida evolución de las mismas.

El hecho de que la ausencia de maxicírculos funcionales es (eventualmente) acompañada por la pérdida de la heterogeneidad de los mc sugiere que un sistema mitocondrial activo estaría involucrado en generar y mantener la heterogeneidad de los mismos.

Por otra parte, la organización de los mc en una región conservada y una variable parece ser una característica general de los protozoarios del orden Kinetoplastida, aunque en T. cruzi la región conservada está presente cuatro veces por molécula, lo que sugiere que los mc en esta especie podrían haberse generado por duplicaciones de un mc ancestral de pequeño tamaño (aproximadamente 360 pb) en el curso de la evolución (103).

Recientemente Ponzi et al., han demostrado que los mc de T.lewisi presentan dos regiones conservadas dispuestas simétricamente (121).

Barrois et al. y Chance han sugerido que en la región conservada podría localizarse el origen de replicación (119, 122), por otra parte, los recientes hallazgos de una conformación especial en la molécula

(curvatura) en esta región indicaría que la misma también puede estar relacionada con una función poco usual de los mc.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo de tesis son:

1. Estudiar la organización y evolución de las poblaciones de minicírculos en T. cruzi
2. Analizar los sitios de restricción polimórficos presentes en una subpoblación de minicírculos y su variación en clones de parásitos.
3. Obtención de sondas específicas para la identificación de distintos aislamientos del parásito.
4. Desarrollo de un método rápido para la tipificación de aislamientos.

Por último se presentan los resultados obtenidos del análisis de algunos aislamientos y clones del parásito con sondas específicas, que sugieren que diferentes grupos de parásitos estarían relacionados con distintas formas clínicas de la Enfermedad de Chagas.

MATERIALES Y METODOS

1. PARASITOS

Se utilizó el estadio epimastigote de T. cruzi. Los epimastigotes de la cepa Tulahuén (Tul 0) se cultivaron a 28°C en medio líquido de Warren con el agregado de suero bovino fetal al 4% (123). Los epimastigotes de las cepas restantes se cultivaron en medios bifásicos y se cosecharon al 4to. día de crecimiento (124).

Las cepas usadas fueron:

Tulahuén (Tul 0): aislada de un triatomíneo en Chile. Es poco infectiva para el ratón (125).

RA: cepa aislada en General Pico (La Pampa) en febrero de 1978 de un paciente con enfermedad aguda. Los tripomastigotes de esta cepa son de forma predominantemente delgada (126).

AWP: aislada en Santiago del Estero en abril de 1970 de un niño con enfermedad aguda. Los tripomastigotes son predominantemente "broad".

UP: aislada en diciembre de 1970 de un paciente infectado accidentalmente en el laboratorio. Presenta características similares a la cepa citada anteriormente.

CA-1: aislada en diciembre de 1974 de un paciente oriundo de la provincia de San Luis afectado de una miocarditis chagásica crónica. Presenta tripomastigotes con morfología similar a la reportada para las cepas "stout" (127).

No produce infecciones letales en ratón. Presenta parasitemias fácilmente detectables aún 12-18 meses post-infección, comportamiento inusual en este huésped (128).

IT: aislada de un paciente con enfermedad aguda.

ITN: reaislamiento de la cepa IT previo tratamiento del paciente con Nifurtimox.

F : aislada de un paciente con cardiopatía crónica sintomática.

FN: reaislamiento de F previo tratamiento con Nifurtimox.

MG: aislada de un paciente con megacolon y miocarditis crónica.

Y : aislada en Brasil de un paciente con enfermedad aguda. Presenta características similares a la cepa RA.

Los epimastigotes de las cepas antes mencionadas fueron usados sin previo clonado.

Los clones de parásitos de la Cepa CA-I-59,-64,-65,-67,-69,-70,-71,-72,-73 y Miranda -76,-78,-83, fueron obtenidos por el Doctor J.C. Engel (16).

Las cepas Perú, Sonia e Y fueron provistos por los Doctores J.J. Cazzulo y E.L. Segura.

El resto de los aislamientos y clones estudiados (Fig. 16) fueron obtenidos por la Lic Silvia Arauzo.

2. PURIFICACION DE ADN-k

Los epimastigotes se cosecharon por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 4°C y se lavaron 3 veces con NaCl 0,154 M.

El pellet se resuspendió en buffer Tris-HCL 10 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM, EDTA 100 mM, a una concentración de 0,1 gr de parásitos por ml y se lisaron por el agregado de SDS (1% concentración final). El lisado de parásitos se incubó con 1 mg/ml de pronasa a 37°C durante 30

minutos. Luego se extrajo varias veces con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:48:2). El ADN-k fue sedimentado por centrifugación a 16.000 g durante 60 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer Tris-HCl 10mM (pH 7,5), EDTA 1 mM y se incubó nuevamente con SDS (0,1% final) y pronasa (0,5 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se extrajo con fenol:cloroformo. El ADN se precipitó por el agregado de 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5,6) y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C.

3. CORTE CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y ELECTROFORESIS DE ADN

El corte con enzimas de restricción se realizó usando las condiciones recomendadas por los fabricantes (BRL).

Para asegurar un corte total del ADN-k, se agregó 2 veces consecutivas un exceso de enzima, analizándose una alícuota de cada muestra por electroforesis en gel. La electroforesis de los fragmentos de ADN se realizó en geles horizontales de agarosa (2% P/V) en buffer Tris/Borato (pH 8,3) (129) conteniendo 0,5 ug de bromuro de etidio. El voltaje aplicado fue de 4 volts/cm. Los geles fueron transiluminados con una lámpara de UV y fotografiados.

4. CLONADO DE MINICIRCULOS

Los mc de la cepa Tul 0, se clonaron en el sitio EcoRI o BamHI del plásmido pBR 325 (130). La detección de las colonias conteniendo plásmidos con insertos de mc se realizó por hibridación con ADN-k de la

misma cepa marcado "in vitro".

Los clones de mc de la cepa AWP se obtuvieron por corte del ADN-k con Hind III y posterior ligado al plásmido pBR 322 cortado por la misma enzima.

El clon de mc pTck M-84 fue cedido por el Licenciado Roberto Macina.

5. TRANSFORMACION DE Escherichia coli HB 101 (131)

5.1. Preparación de células competentes

Se inoculó 10 ml de medio LB con una colonia de E.coli HB 101 incubándose toda la noche a 37°C con agitación. Una alícuota de este cultivo se diluyó 1/100 con medio LB; incubándose a 37°C con agitación, hasta que el cultivo alcanzara una densidad óptica de 0,5 a 550 nm. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4000 g durante 5 minutos a 4°C, resuspendiéndose el pellet en CaCl₂ 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) en un volumen igual a la mitad del volumen original del cultivo.

La suspensión de células se dejó 15 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 4000 g durante 5 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en CaCl₂ 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) en 1/15 del volumen original. Las células resuspendidas se fraccionaron en alícuotas de 200 ul guardándose a 4°C. Las células se usaron dentro de las 24 horas.

5.2. Transformación de las células

A cada alícuota de bacterias se agregó la mezcla de ligado (no mayor de 40 ng de ADN por tubo), dejándose en hielo durante 30 minutos, posteriormente se incubó a 42°C durante 2 minutos. A cada una de las mezclas se le agregó 1 ml de medio LB y se incubaron 1 hora a 37°C sin agitación.

Alícuotas de 200 ul de bacterias transformadas se distribuyeron por rastrillado en placas de Petri conteniendo medio LB con 1,5% de agar y 50 ug/ml de ampicilina. La eficiencia de transformación medida con pBR 322 fue de 10^5 - 10^6 colonias por ug de plásmido.

6. MARCACION DE ADN "IN VITRO"

Se realizó según lo descripto por Rigby et al. (132). La mezcla de incubación (100 ul, volumen final) conteniendo 1 ug de ADN, 1 nmol de dATP, dGTP y TTP, 50 pmoles de $\alpha^{32}P$ dCTP (2000 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, U.S.A.) y 200 pgr de ADN asa I (Biolab) en un buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), $MgCl_2$ 5 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, 50 ug/ml de albúmina bovina, se incubó durante 10 minutos a 16°C. Posteriormente se agregaron 5 unidades de ADN polimerasa de E. coli (Biolab) y se continuó la incubación durante 90 minutos. La reacción se detuvo llevando la mezcla a una concentración final de 30 mM de EDTA. El ADN marcado se separó del nucleótido libre pasando la mezcla de reacción a través de una columna (9 x 90 mm) de Sephadex G-50 equilibrado con Tris-HCl 10 mM (pH 7,8), EDTA 1 mM, saturado con ADN de

esperma de salmón. Se recogieron alícuotas de 200 ul. La actividad del ADN marcado se estimó midiendo la radiación Cerenkov en un contador de centellero líquido.

Las actividades específicas fueron siempre mayores o iguales a 10^7 cpm/ugr de ADN.

7. TRANSFERENCIA DE ADN A FILTROS DE NITROCELULOSA

Después de la electroforesis, los geles de agarosa se incubaron en NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M durante una hora, posteriormente se neutralizaron en Tris-HCl 0,5 M (pH 7,4), NaCl 1,5 M durante una hora. El ADN de los geles se transfirió a filtros de nitrocelulosa (Sartorius, Tamaño de poro 0.2 um) según el procedimiento descrito por Southern (133). El buffer de transferencia fue 20 X SSC (1 X=NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM). Después de la transferencia los filtros se lavaron en 3 X SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente, se secaron entre papeles de filtro y se calentaron a 80°C durante 2 horas.

8. HIBRIDACION

La prehibridación (1-2 horas) de los filtros se realizó a 62°C en SSC, 5 x Denhart (1 x= Ficoll, polivinil pirrolidona, albúmina bovina, 0,02% p/v de cada una) (134); 0,1% SDS, 20 ug/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y 10 ug/ml de poli (A). La hibridación se realizó por 15 horas en la misma solución más el agregado del ADN marcado con P³² previamente desnaturalizado 5 minutos a 100°C.

El lavado de los filtros se realizó en condiciones relajadas (3 cambios de una solución 3 x SSC, 0,1% SDS a 62°C, 45 minutos cada vez) o en condiciones estrictas (3 cambios de 0,3-0,1 x SSC; 0,1% SDS a 65°C, 45 minutos cada vez) y se expusieron con una película radiográfica Kodak X-0 mat 5 a -70°C con pantallas intensificadoras.

9. HIBRIDACION "IN SITU" DE COLONIAS (135)

Para la hibridación "in situ" de colonias se colocó un filtro de nitrocelulosa sobre la superficie de una caja de Petri conteniendo las colonias de bacterias. Posteriormente los filtros se transfirieron a placas de Petri conteniendo medio de cultivo fresco y se incubaron a 37°C hasta que las colonias alcanzaran un tamaño de 1-2 mm.

Los filtros de nitrocelulosa conteniendo las colonias fueron desnaturalizados sobre papel de filtro embebido en NaOH 0,5 M durante 5 minutos, neutralizados de igual forma en Tris-HCl 1 M (pH 7,4) durante 5 minutos y Tris-HCl 0,5 M (pH 7,4), NaCl 1,5 M durante otros 5 minutos. Los filtros se secaron a temperatura ambiente y se calentaron a 80°C durante 2 horas.

La hibridación de los filtros se realizó en las condiciones antes descriptas.

10. PREPARACION DE PLASMIDOS

Se realizó por el método de lisis alcalina de Birnboim (136). Tres ml de medio LB con ampicilina (100 ug/ml, concentración final) se inoculó

con una colonia y se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó 1,5 ml a 10.000 g durante 1 minuto. El pellet de bacterias se resuspendió en 100 ul de una solución fría de glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM (pH 8.0) y 4 mg/ml de Lisozima (Sigma), incubándose a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se agregó 200 ul de una solución fría de NaOH 0,2 N y SDS 1% y se incubó a 0°C durante 5 minutos. A esta mezcla se le agregó 150 ul de una solución fría de acetato de potasio 5 M (pH aproximado 4.8) y se incubó en hielo durante 5 minutos. A continuación se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se extrajo con un volumen igual de fenol:cloroformo (50:50; v/v). El ADN se precipitó del sobrenadante por el agregado de 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en Tris HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM, conteniendo RNAsa (20 ug/ml).

11. ELUCION DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA

Para la recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa, las electroforesis se realizaron en geles preparados con agarosa de bajo punto de fusión (Agarosa, Type VII, Low Gelling Temperature, SIGMA) (137). Después de las electroforesis se cortaron los fragmentos de gel que contenían las bandas de ADN. Posteriormente se fundieron a 65°C y se les agregó aproximadamente 5 volúmenes de Tris HCl 25 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM a 37°C. A esta solución se la extrajo 3 veces con un volumen igual de fenol, 1 vez con 1 volumen de fenol:cloroformo (50:50; v/v) y

una vez con cloroformo. El ADN se precipitó del sobrenadante con etanol.

12. HIBRIDACION DE ADN-k EN PUNTOS ("DOT HIBRIDIZATION")

Un volumen de 5 ul de ADN-k (0.08-0.4 ug) o parásitos de distintas cepas se sembraron sobre filtros de nitrocelulosa. La desnaturalización del ADN se realizó colocando los filtros sobre papeles de filtro embedi dos en NaOH 0,5 M durante 5 minutos, neutralizándose de igual forma en papeles de filtro embebidos en Tris-HCl 0,5 M (pH 7.4) NaCl 1,5 M 2 ve ces, 5 minutos cada vez. Posteriormente los filtros se lavaron en 3 x SSC y se secaron durante 2 horas a 80°C. La prehibridación e hibri dación se realizaron en las condiciones anteriormente descriptas. El lavado de los filtros se realizó en condiciones estrictas (0.1 x SSC/ 0.1% SDS, 65°C).

13. DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS DE MINICIRCULOS.

Cantidades conocidas de ADN-k e insertos de mc fueron cortadas con la misma enzima de restricción, corridas en geles de agarosa, transferidos a filtros de nitrocelulosa e hibridadas con el inserto de mc marcado "in vitro" con ³²P.

Por comparación de las intensidades en las autoradiografías se determinó qué porcentaje de los mc totales correspondían a una determina da subpoblación.

RESULTADOS

1. CLONADO DE MINICIRCULOS DE T.cruzi

El clonado de mc de la cepa Tul 0 se realizó en los sitios Eco RI y Bam HI del plásmido pBR 325. ADN total del parásito se cortó parcialmente con Eco RI y Bam HI con el objeto de obtener moléculas completas.

Se aislaron veinte clones que daban una señal positiva por hibridación con ADN-k de Tul 0 marcado "in vitro" con P³². De cada clon, se purificó ADN, se cortó con Eco RI y Bam HI y se corrieron en geles de agarosa al 1%, después de la transferencia a filtros de nitrocelulosa, se hibridaron con ADN-k marcado con P³². Los clones identificados como pTck-1,-12,-13 y -18, se seleccionaron en base a su tamaño y porque daban señales muy fuertes en las placas radiográficas. El clon pTck-14 fue seleccionado porque daba una señal más débil.

Los clones de mc de la cepa AWP se obtuvieron por corte del ADN-k con Hind III. La banda correspondiente a mc linealizados fue eluída del gel y clonado en el sitio Hind III del plásmido pBR 322. Se detectaron por hibridación dos poblaciones de moléculas.

Un clon representativo de cada una (pTckAWP-2 y pTckAWP-3) se utilizó para posteriores estudios.

2. MAPA FISICO DE LOS CLONES DE MINICIRCULOS

Los mapas de los diferentes clones de mc se realizaron mediante cortes simples y dobles del plásmido o de los insertos de mc aislados. En algunos casos se utilizó geles de poliacrilamida para obtener mejor resolución de los fragmentos pequeños. Sin embargo, este último método,

complicó la construcción de los mapas ya que se observaron diferencias en el peso molecular aparente de los fragmentos cuando se compararon los valores obtenidos de geles de poliacrilamida 5% y geles de agarosa 2%. Los valores obtenidos con los geles de poliacrilamida fueron mayores que con los de agarosa, pero las diferencias no excedieron del 20%. Los pesos moleculares indicados en la Fig. 3 corresponden a los obtenidos en geles de agarosa 2%.

El análisis de los mapas de restricción reveló algunas características interesantes. En algunos mc los sitios *Taq* I, *Hap* II y *Hae* III se encontraron agrupados de una manera similar en una región de aproximadamente 100 pb, (Fig. 3). En pTck-12 y pTck-18 estos agrupamientos estaban separados por una distancia de 1/4 ó 1/2 mc, indicando por lo tanto la posición de las zonas constantes. En pTck-14 sólo se detectaron 2 agrupamientos que sugieren la presencia de sólo dos regiones constantes, siendo uno de los agrupamiento atípico.

Las regiones constantes no fueron idénticas entre las diferentes moléculas ya que varios sitios de restricción estaban ausentes.

Por otra parte, la existencia de sitios de restricción, principalmente *Taq* I (Fig. 3, pTck-1) fuera de las regiones constantes, evidenciaron una mayor heterogeneidad de los mc que la inferida de la observación de los geles de ADN-k cortado con enzimas de restricción. Sin embargo la distancia entre los sitios *Taq* I y *Hae* III (aproximadamente 90 pb) parece estar bien conservada entre los mc, cuando ADN-k se cortó con *Taq* I se obtuvo un fragmento de 1/4 de mc (360 pb) (Fig. 4); el corte posterior con *Hae* III mostró que aproximadamente la mitad de

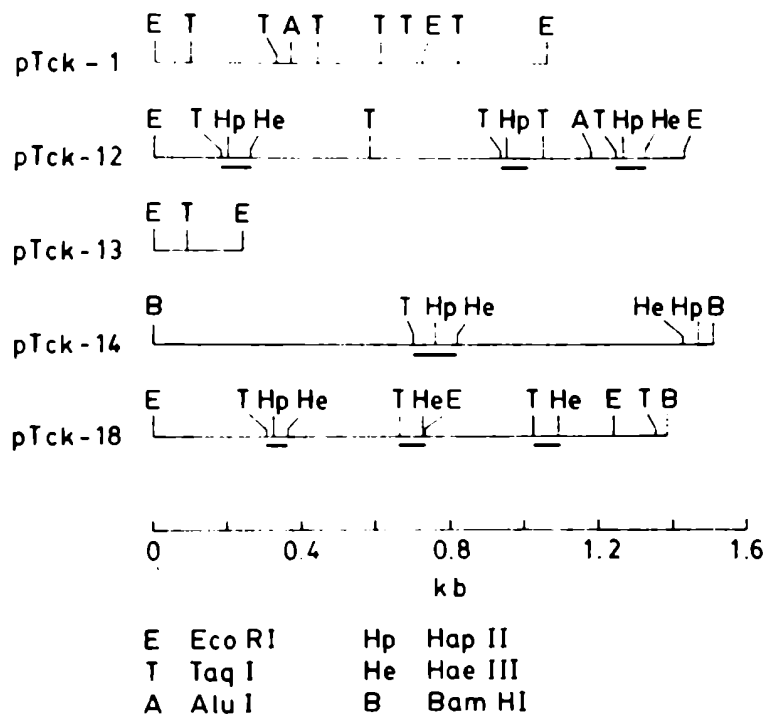


FIGURA 3. Mapa de sitios de restricción de los clones de minicírculos. Todos los mapas fueron construídos usando dobles digestiones de los plásmidos recombinantes o de los insertos de minicírculos aislados, con las enzimas de restricción indicadas. El tamaño de los fragmentos se calculó a partir de su movilidad electroforética en geles de agarosa al 2%. Las barras indican agrupamientos de sitios de restricción. El inserto Eco RI mayor y menor de pTck-1 y pTck-18 es denominado A y B, respectivamente, en experimentos posteriores.

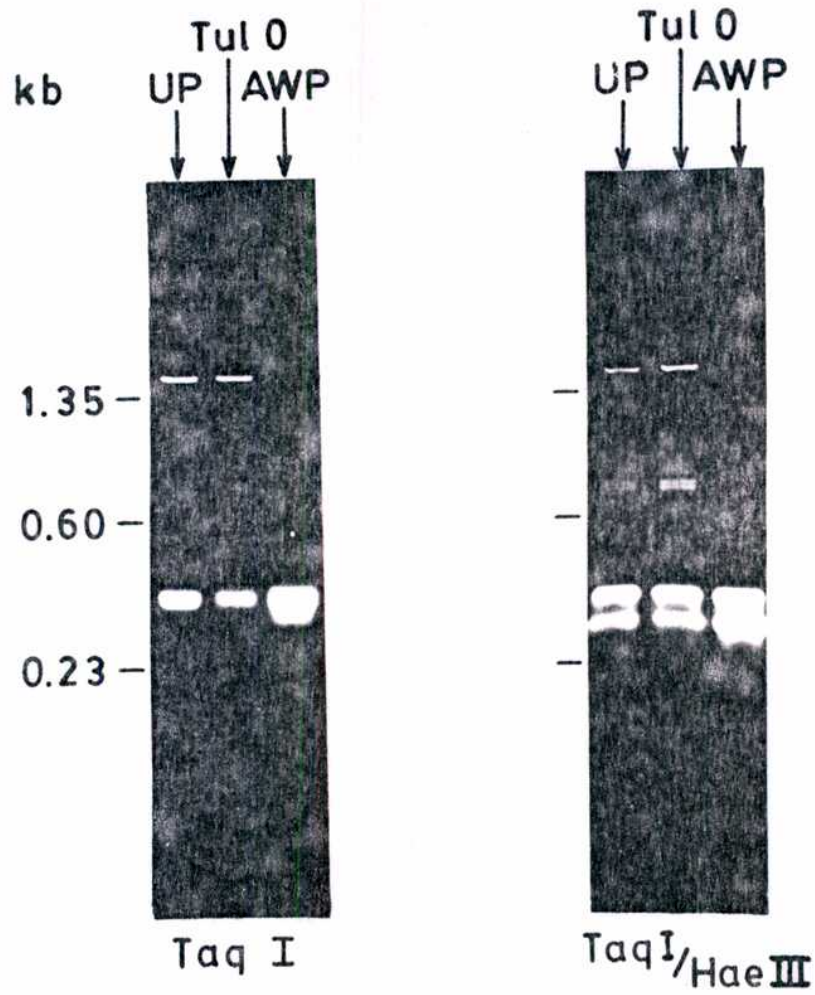


FIGURA 4. Localización de las regiones constantes de los minicírculos en digestiones de ADN-k. ADN-k de los aislamientos indicados de *T. cruzi* se cortaron con Taq I o Taq I/ Hae III y se corrieron en geles de agarosa al 2% como se describe en Materiales y Métodos.

estos fragmentos eran clivados a un tamaño de 270 pb, lo que indica que la mayoría de los mc conservan esta distancia, cuando ambos sitios están presentes.

Para confirmar la presencia de diferente número de regiones constantes en pTck-12 y pTck-14 se utilizó pTck-13 como sonda debido a que este fragmento de mc hibrida en condiciones relajadas con las regiones constantes de los mc y no con las regiones variables heterólogas (ver más adelante).

En pTck-12 las dos regiones constantes a la derecha del mapa (Fig. 5 B) se localizaron dentro de los dos agrupamientos de sitios de restricción. De las dos regiones constantes presentes en la izquierda del mapa, una no pudo ser exactamente localizada y la longitud de la otra no se determinó por la ausencia de sitios de restricción o la presencia de fragmentos coomigrantes. En pTck-14 sólo se detectó una región constante dentro del agrupamiento Taq I - Hap II - Hae III (Fig. 5 B).

En el extremo derecho del mapa podría localizarse una segunda región constante, pero no se pudo detectar debido al pequeño tamaño de los fragmentos generados.

3. REGIONES HOMOLOGAS ENTRE MINICIRCULOS

Para detectar regiones homólogas entre mc individuales, se usó el inserto de pTck-13 como sonda, debido a su pequeño tamaño y a que hibrida con la mayoría de los fragmentos de ADN-k generados por distintas enzimas de restricción (ver Fig. 8 y 9) lo que significa que pTck-13 contiene al menos en parte una región constante. El inserto de

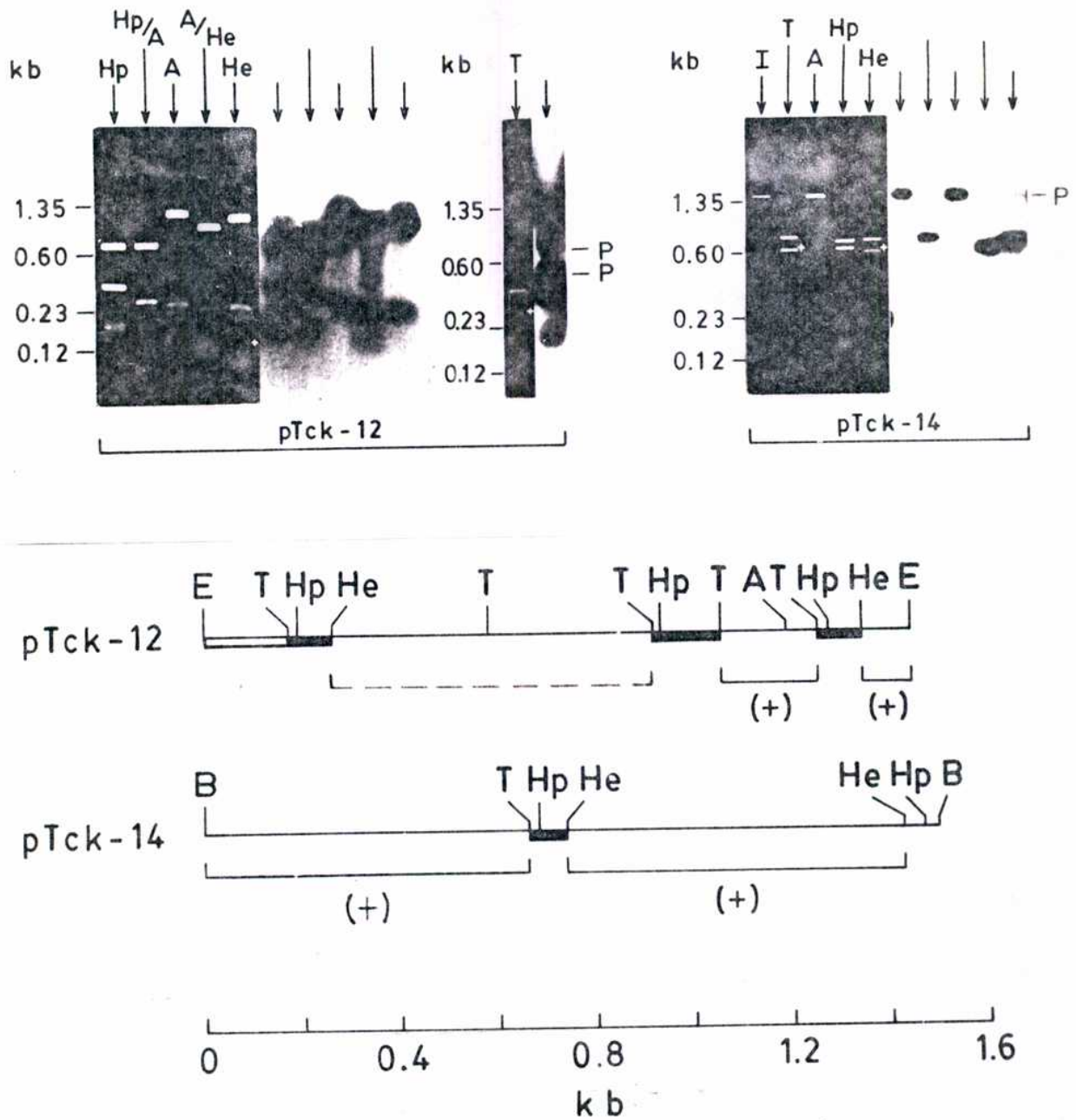


FIGURA 5. Localización de las regiones constantes de los minicírculos clonados en pTck-12 y pTck-14. A: Los insertos de minicírculo se cortaron con las enzimas de restricción indicadas (abreviaturas en Fig.3) y corridos en geles de agarosa al 2%, posteriormente se transfirieron a filtros de nitrocelulosa e hibridaron con la sonda pTck-13. El lavado de los filtros se realizó en 3 x SSC/0.1% SDS a 62°C. B: Mapa de sitios de restricción de los insertos de pTck-12, -14, indicando la localización de las regiones constantes. Las barras negras indican las regiones constantes. La barra blanca y la línea entrecortada indican imprecisiones en la extensión o en la localización de regiones constantes, respectivamente. (+): fragmentos que no hibridan con la sonda. P: fragmentos generados por la digestión parcial del inserto.

pTck-13 detectó los cuatro clones de mc en condiciones de hibridación relajada (Fig. 6), sin embargo, cuando los filtros se lavaron en 0.3 x SSC desaparecieron las señales de pTck-1 (fragmento B), pTck-14 y pTck-18 (fragmento B) disminuyó la señal del fragmento A de pTck-1 y pTck-12 y permaneció sin cambio la del fragmento A de pTck-18. De acuerdo a esto, la extensión y/o el número de bases no apareadas de las regiones homólogas a pTck-13 varía en los distintos mc analizados indicando que las regiones constantes de los mc presentan variaciones entre distintas moléculas así como dentro de la misma molécula.

4. Detección de subpoblaciones de minicírculos

Alícuotas de ADN-k de la cepa Tul 0 se cortaron con diferentes endonucleasas de restricción, corridas en geles de agarosa 2%, transferidas a filtros de nitrocelulosa e hibridadas con tres clones diferentes de mc (Fig. 7). Después de la hibridación, los filtros se lavaron en 3 x SSC (condiciones relajadas) o en 0.3 x SSC (condiciones estrictas) como se indica en la Figura. Usando como sonda el fragmento A del plásmido pTck-1 (ver Fig. 3) se detectaron casi todos los fragmentos de mc visibles en el gel en las dos condiciones de lavado. Sin embargo, para obtener autorradiografías de los filtros lavados en 0.3 x SSC de igual intensidad que las obtenidas con los filtros lavados en 3 x SSC, fue necesario exponerlos por un período 14-16 veces mayor. Con el clon pTck-13 se obtuvieron resultados similares, sin embargo, en este caso no todas las bandas se revelaron con la misma intensidad cuando los filtros se lavaron en condiciones estrictas (0.3 x SSC) (Fig. 7). Por otra parte, pTck-13 probablemente detectó

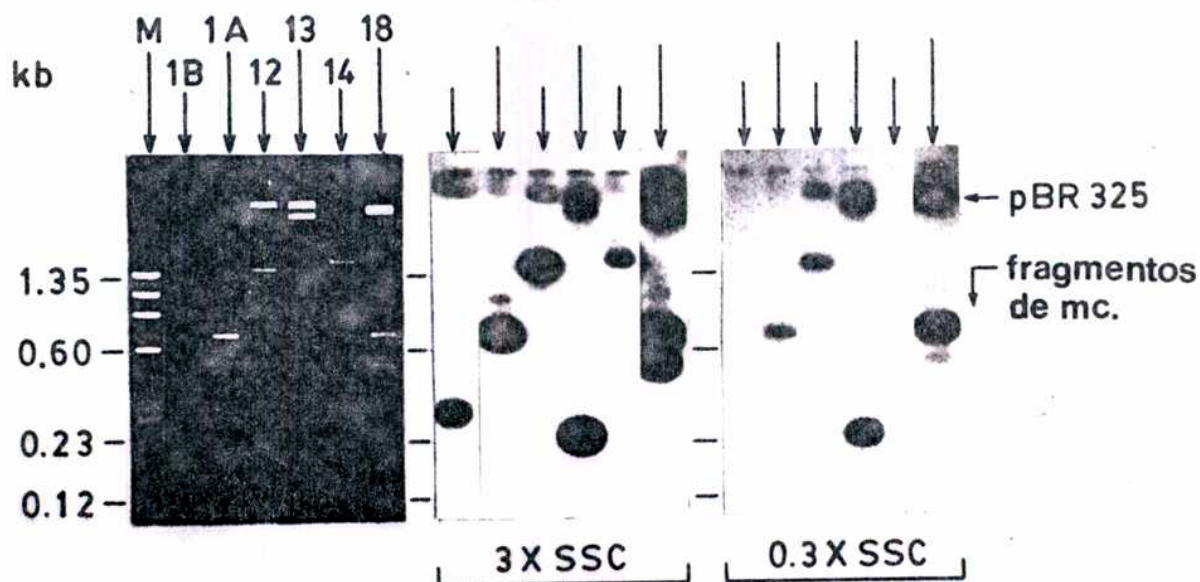


FIGURA 6. Homología entre clones de minicírculos. Los plásmidos recombinantes indicados (pTck-) fueron digeridos con Eco RI o Bam HI para liberar los insertos (ver Fig. 3) y se corrieron en geles de agarosa al 2%. En algunos casos se corrió directamente los insertos de mc (1 A y 1 B, insertos A y B de pTck-1). El ADN de los geles se transfirió a filtros de nitrocelulosa e hibridó con pTck-13. Los filtros se lavaron como se indica en la figura. pTck-13 contiene un segundo inserto no relacionado con minicírculos.

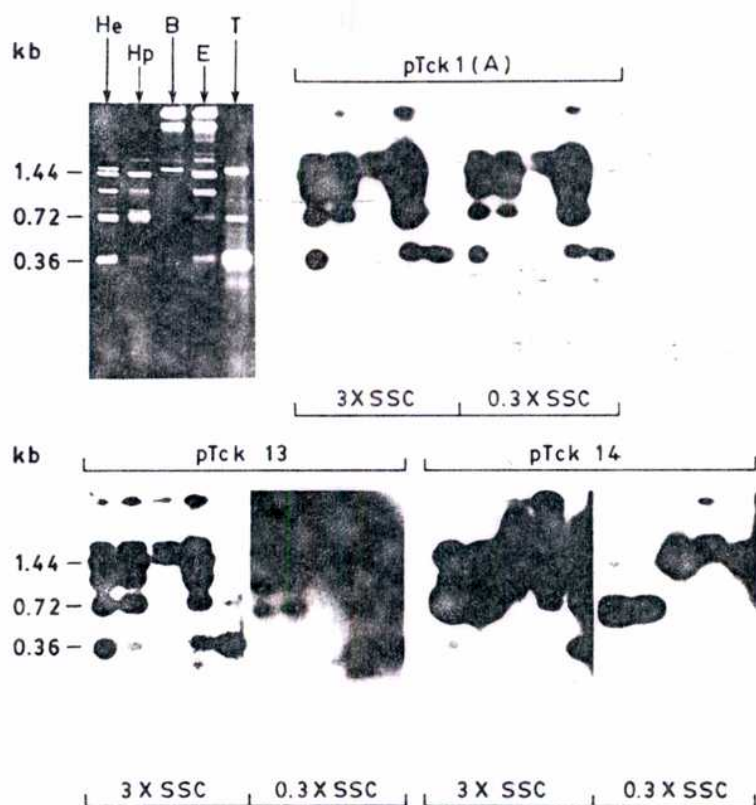


FIGURA 7. Patrones de hibridación del ADN-k de *T. cruzi* (Tul 0) con las sondas pTck-1, pTck-13 y pTck-14. ADN-k de Tul 0 se cortó con las enzimas de restricción indicadas (abreviaturas en la Fig. 3) y posteriormente se hibridó con los clones de minicírculos mencionados. Los filtros se lavaron en condiciones relajadas (3 x SSC) y estrictas (0.3 x SSC).

un fragmento homólogo, esto es una banda del mismo tamaño que el inserto en cortes de ADN-k con Eco RI. Con pTck-14 se obtuvo un patrón completamente diferente (Fig. 7), ya que cuando se lavó los filtros en $0,3 \times \text{SSC}$ sólo se detectaron determinados fragmentos de mc. En la Fig. 7 se puede ver que las bandas detectadas en cada digestión se correlacionan con el mapa de restricción mostrado en la Fig. 3, esto es dos bandas de un tamaño aproximado a $1/2$ mc en los cortes con Hae III o Hap II y moléculas linearizadas en los cortes con Bam HI y Taq I. Como el mc Tck-14 no tiene sitios Eco RI, los mc de esta subpoblación que son liberados de la malla de ADN-k, corren como moléculas circulares abiertas ("open circles") o como círculos covalentemente cerrados. Estos resultados son indicativos de que esta es una subpoblación de mc homogénea. Sin embargo, se detectaron algunos mc polimórficos dentro de esta subpoblación, por ejemplo, algunas moléculas han perdido un sitio Hap II y/o un sitio Hae III ya que son detectadas moléculas del tamaño de mc linearizados que hibridan con pTck-14 en los cortes de ADN-k con estas dos enzimas. Por otra parte, una pequeña fracción de moléculas presentaron un sitio Eco RI como se evidencia por la débil banda de mc. Linearizados en la autoradiografía de la Fig. 7. En los filtros hibridados con pTck-14 y lavados en $3 \times \text{SSC}$ se detectó la mayoría de las bandas visibles en el gel, al igual que con las otras sondas de mc. Este resultado era de esperar debido a que pTck-14 tiene al menos una región constante (Fig. 5 B) que en condiciones relajadas puede hibridar con las regiones constantes del resto de los mc.

Para comprobar la homogeneidad de los mc presentes en la banda correspondiente a mc linearizados por Tap I, se realizó un segundo corte con Hae III. Hae III debería cortar todas las moléculas Tck-14 a un tamaño menor de 1/2 mc (Fig. 3). Como se puede ver en la Fig. 4 la doble banda de 650 pb incrementa en intensidad, pero la banda de mc linearizados no desaparece completamente.

Los mismos resultados se obtuvieron en otra cepa de T. cruzi (UP) donde está presente la subpoblación de mc Tck-14 (ver Fig. 8 y 9). En contraposición no se detectaron mc linearizados por Taq I en la cepa AWP, donde esta subpoblación no está presente (Fig. 8 y 9). Estos resultados sugieren que en las cepas Tul 0 y UP la banda correspondiente a mc linearizados por Taq I está compuesta, al menos parcialmente, por mc Tck-14 con cierto grado de heterogeneidad debido a la ausencia de sitios Hae III en una parte de las moléculas de esta subpoblación.

En la Fig. 6 se puede ver que la movilidad electroforética de pTck-14 es menor que el promedio de los mc linearizados. Estas diferencias fueron confirmadas en digestiones de ADN-k (Fig. 7) donde las moléculas linearizadas por Taq I o Bam HI que hibridan con pTck-14 tienen una movilidad menor que los mc linearizados por Hap II o Eco RI. Si estos resultados son debidos a una real diferencia de tamaño o a diferencias estructurales por ahora no pueden ser respondidos (114).

5. CARACTERIZACION DE DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE MINICIRCULOS EN CEPAS DE T. cruzi

Alícuotas de ADN-k de diferentes cepas fueron cortadas con dife-

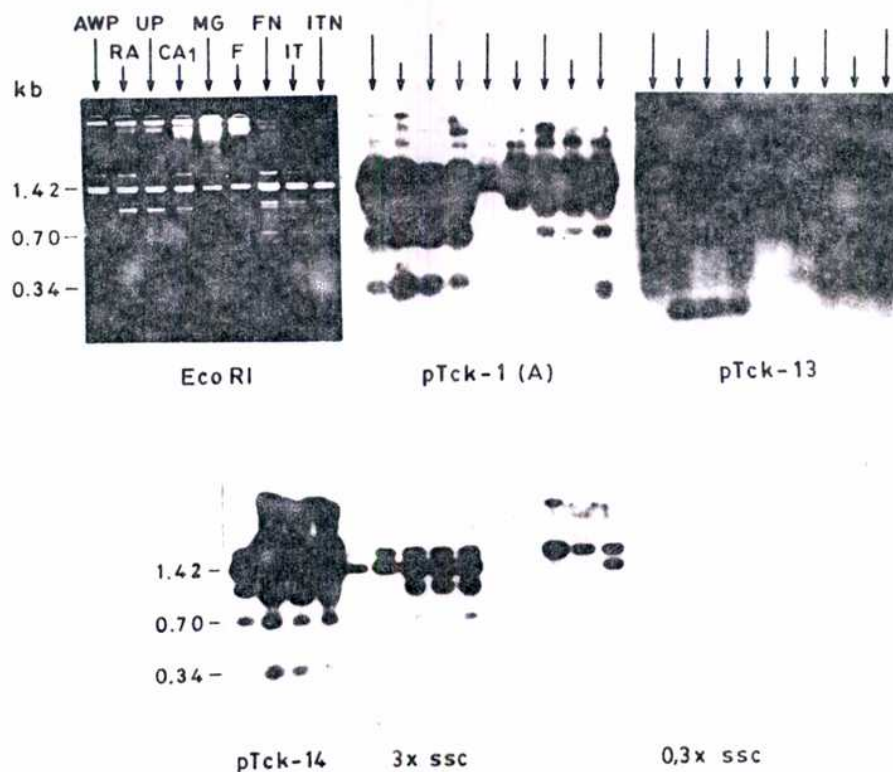


FIGURA 8. Patrones de hibridación de ADN-k de distintos aislamientos de *T. cruzi* con diferentes sondas de minicírculos. ADN-k de distintos aislamientos se digirió con Eco RI y se corrió en un gel de agarosa al 2%, posteriormente se transfirió e hibridó con los clones de minicírculo indicados (pTck-). Las autoradiografías corresponden a los filtros lavados en condiciones estrictas. En la hibridación con pTck-14, también se incluye la autoradiografía del filtro lavado en condiciones relajadas (3 x SSC).

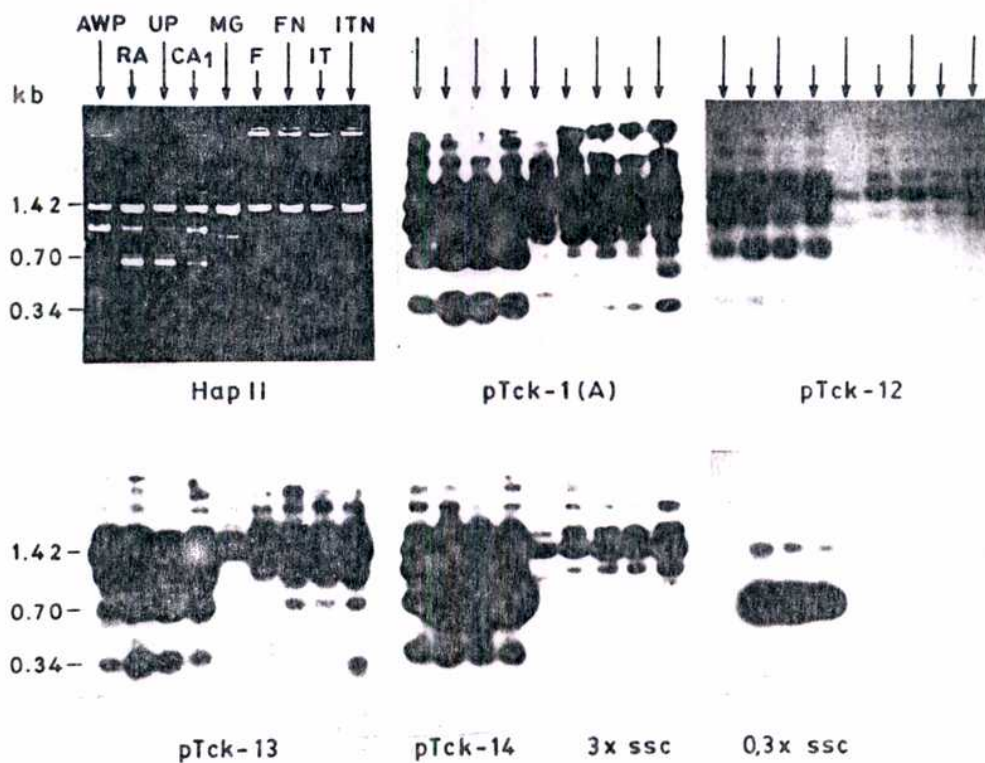


FIGURA 9. Patrones de hibridación de ADN-k de distintos aislamientos de *T. cruzi* con diferentes sondas de minicírculos. ADN-k de distintos aislamientos se digirió con Hap II y se corrió en un gel de agarosa al 2%, posteriormente se transfirió e hibridó con los clones de minicírculos indicados (pTck-). Las autoradiografías corresponden a los filtros lavados en condiciones estrictas. En la hibridación con pTck-14, también se incluye la autoradiografía del filtro lavado en condiciones relajadas (3 x SSC).

rentes enzimas de restricción, corridas en geles de agarosa 2% transferidas a filtros de nitrocelulosa e hibridadas con diferentes sondas. El lavado de los filtros se realizó en condiciones estrictas y relajadas. En la mayoría de los casos el número de bandas detectadas fue casi idéntico en ambas condiciones de lavado y por lo tanto los resultados del lavado en condiciones relajadas son omitidas. Sin embargo, en las muestras hibridadas con la sonda pTck-14, las condiciones de lavado fueron críticas por lo que se presentan ambos tipos de resultados.

5.1. Hibridación con pTck-1 (Subfragmento A)

Este fragmento de mc detectó la mayoría de las bandas visibles en el gel (Fig. 8 y 9). En las cepas MG, F, FN, IT e ITN, bandas que difícilmente eran visibles en las digestiones con Haq II fueron claramente visibles después de la hibridación.

Resultados similares se obtuvieron después de la hibridación con el subfragmento B del mismo clon.

5.2. Hibridación con pTck-12

Esta sonda hibridó con la mayor parte de las bandas resultantes del corte con Hap II (Fig. 9). Sin embargo, pTck-12 casi no detectó los fragmentos de 1/4 de mc, así como los mc de la cepa MG.

5.3. Hibridación con pTck-13

Los resultados de las hibridaciones en los cortes con Eco RI, fueron algo diferentes de los obtenidos con pTck-1 ya que a diferencia de éste, la banda correspondiente a 1/4 de mc difícilmente hibrida con

pTck-13. Por otra parte, un fragmento de mc del mismo tamaño que el inserto fue claramente visible en las cepas UP, RA y CA-1 (Fig. 8), pero no en las restantes. Estos resultados indicarían que esta sonda detectó un fragmento homólogo de mc al igual que en Tul 0 (ver Fig. 7). Cuando se analizan los cortes con Hpa II (Fig. 9) el fragmento homólogo de mc no se detectó posiblemente por estar incluido en fragmentos mayores de ADN.

5.4. Hibridación con pTck-14

Después del lavado de los filtros en 3 x SSC se detectó la mayoría de las bandas de mc de todas las cepas (Fig. 8 y 9). Cuando el lavado se realizó en 0.3 x SSC solamente se detectaron fragmentos específicos en las cepas RA, UP, y CA-1. El análisis por enzimas de restricción de esta población de mc en las tres cepas mencionadas, mostró el mismo mapa de restricción con Tap I, Hap II, Hae III y Bam HI, coincidiendo con el de Tul 0 y con el mapa de restricción de pTck-14 (ver Fig. 7 y 3). Sin embargo, en las tres cepas una baja proporción de moléculas de esta subpoblación, presentaron sitios polimórficos (principalmente Hpa II) en adición a un nuevo sitio, Eco RI presente en aproximadamente la mitad de las moléculas de esta subpoblación en la cepa CA-1 (Fig. 8).

6. POLIMORFISMO EN SUBPOBLACIONES HOMOGENEAS DE MINICIRCULOS EN CLONES DE PARASITOS

Para analizar las posibles variaciones de sitios de restricción en subpoblaciones homogéneas de mc, esto es, en grupos de moléculas similares, primero fue necesario localizar sondas específicas. Dos mc clonados en pBR322 (pTck AWP-2 y pTck AWP-3) originalmente aislados de la cepa AWP de T. cruzi, fueron detectados en dos grupos de clones de parásitos de las cepas Miranda y CA 1. Utilizando condiciones de hibridación estrictas, ambos clones de mc detectaron bandas específicas en las digestiones de ADN-k (Fig. 10). Las principales bandas detectadas fueron similares a las obtenidas a partir de las moléculas clonadas (Fig. 11). Por ejemplo, la sonda pTck AWP-2 detectó principalmente fragmentos de 0.90, 0.35 y 0.20 Kpb en las digestiones de ADN-k con Hae III (el último fragmento es poco visible en las autoradiografías de la Fig. 12, panel central), los que a su vez, fueron iguales a los fragmentos Hae III del mc clonado en pTck AWP-2 (ver mapa en la Fig.11). Resultados similares se obtuvieron con Hap II y Hind III para pTck AWP-2 y Hae III y Hap II para pTck AWP-3, lo que permitió concluir que los mc clonados en estas sondas pertenecían a subpoblaciones constituidas por moléculas similares (o idénticas) (comparar los mapas en la Fig. 11 con las principales bandas detectadas en las autoradiografías de las Figs. 10 y 12 para pTck AWP-2 y Fig. 10 para pTck AWP-3). Es de mencionar que en las condiciones de hibridación usadas, pTck AWP-2 y -3 no hibridaron en forma cruzada.

Con estas dos sondas para subpoblaciones de mc homogéneos (o casi

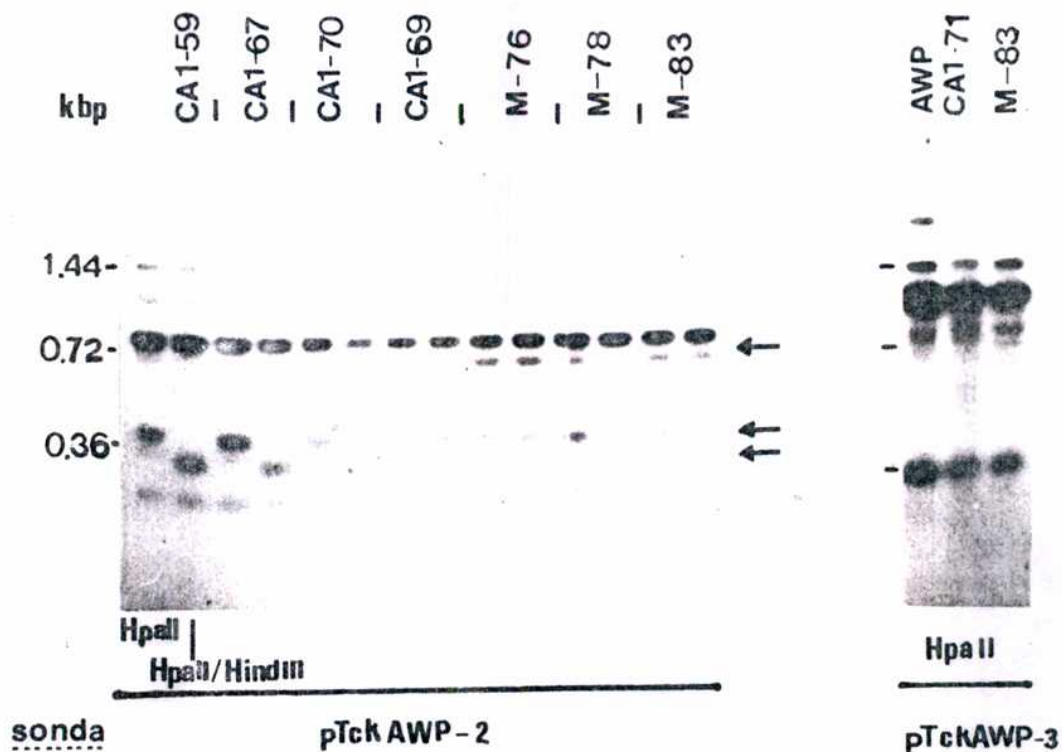


FIGURA 10. Detección de las subpoblaciones de minicírculos Tck AWP-2 y -3 en diferentes clones de parásitos y análisis de sitios de restricción polimórficos. ADN-k de los clones de *T. cruzi* indicados se digirió con Hpa II o Hpa II/Hind III y se corrió en geles de agarosa al 2%, posteriormente se transfirió e hibridó con las sondas indicadas. La flecha superior indica el fragmento Hpa II de 0.66 Kpb detectado en los clones CA 1-69, M-76, M-78 y M-83, pero ausente en los clones CA 1-59, -67 y -70. La flecha del medio indica el fragmento Hpa II de 0.40 Kpb que es cortado por Hind III a un fragmento de 0.35 Kpb (flecha inferior) en los clones CA 1-59, -67 y -70, pero no en los otros clones. M-: clones de parásitos de la cepa Miranda.

homogéneos, ver más adelante) se estudió la presencia de sitios de restricción polimórficos en estas subpoblaciones. Cuando se analizó la subpoblación Tck AWP-2 en un grupo de clones de parásitos (CA 1-59, -64, -67, -70, -71, y -72) se detectó los fragmentos esperados para esta subpoblación, esto es, 0.90, 0.35 y 0.20 Kpb para Hae III y 0.78, 0.40 y 0.27 Kpb para las digestiones con Hpa II (ver líneas de CA 1-64 y -72 en la Fig. 12). Sin embargo, en uno de los clones de este grupo (CA 1-73), se observaron nuevas bandas de 1.25 Kpb con Hae III y de 1.15 Kpb con Hpa II (Fig. 12, flecha superior). Las nuevas bandas en estas digestiones fueron del tamaño esperado, si un sitio de restricción Hae III (entre los fragmentos de 0.90 y 0.35 Kpb en el extremo derecho del mapa en la Fig. 11), y si un sitio Hpa II (entre los fragmentos de 0.78 y 0.40 Kpb del extremo derecho del mapa en la Fig. 11), estuvieran perdidos respectivamente. La confirmación de que los nuevos fragmentos Hae III y Hpa II eran el resultado de la pérdida de esos sitios de restricción en algunas moléculas de la subpoblación Tck AWP-2 del clon CA 1-73, se obtuvo después de la hibridación del filtro de nitrocelulosa mostrado en la Fig. 12 con la sonda de 0.40 Kpb del mc pTck AWP-2 cortado con Hpa II (fragmento Hpa II del extremo derecho del mapa de la Fig. 11). Este fragmento de 0.40 Kpb detectó en las digestiones de ADN-k de CA 1-73 su fragmento homólogo y los nuevos fragmentos Hpa II y Hae III (flecha superior del panel derecho de la Fig. 12). Cuando un análisis similar fue realizado en otro grupo de parásitos clonados (CA 1-65, -69 y Miranda -76, -78, -83) se observó la ausencia de dos sitios de restricción distintos a los anteriores. El sitio Hpa

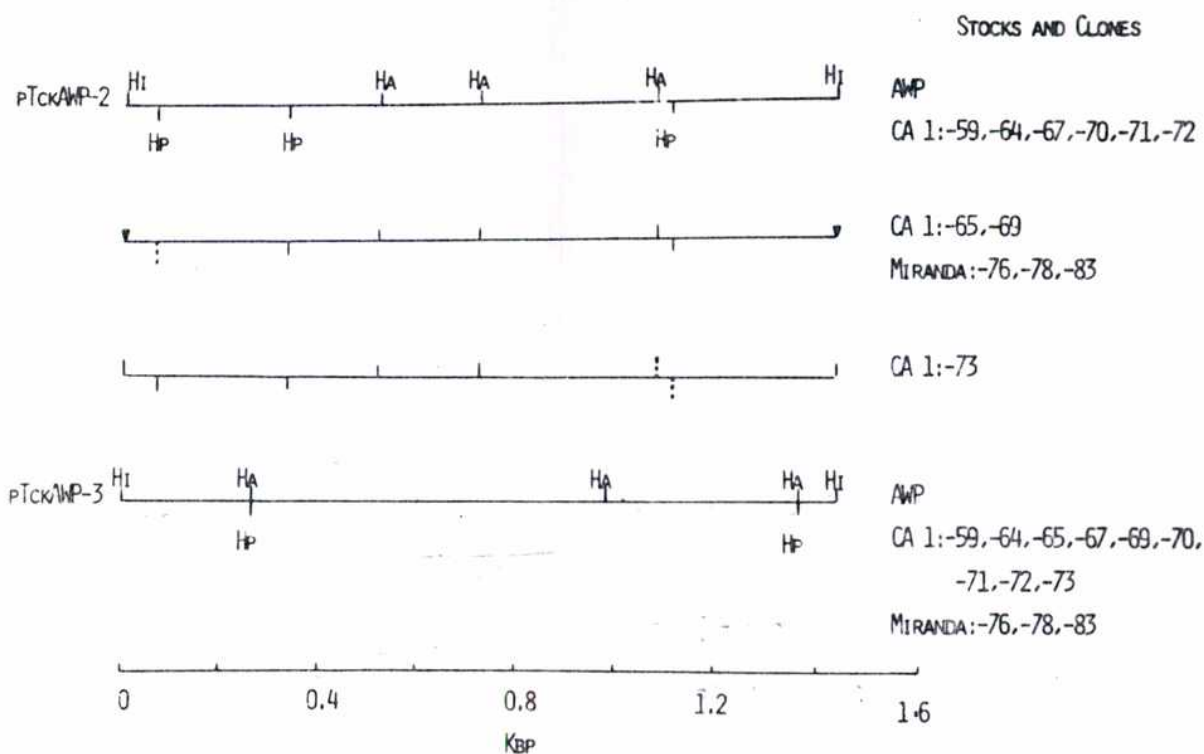


FIGURA 11. Mapa de sitios de restricción de los minicirculos Tck AWP-2 y -3 en diferentes clones de parásitos. Triángulos y líneas entrecortadas, indican sitios de restricción ausentes en la mayoría o en parte de los minicirculos de la subpoblación, respectivamente. El tamaño (en Kpb) de los fragmentos Hae III y Hpa II de pTck AWP-2 es (de izquierda a derecha) 0.20, 0.35, 0.90 y 0.27, 0.78, 0.40, respectivamente. M-: clones de parásitos de la cepa Miranda; Hi: Hind III; Hp: Hpa II; Ha: Hae III.

II en el extremo izquierdo del mapa en la Fig. 11, faltaba en algunos mc de la subpoblación Tck AWP-2, generando en este grupo de parásitos una nueva banda de 0.66 Kpb (flecha inferior en la línea CA 1-65 en la Fig. 12 y flecha superior en las líneas CA 1-69 y Miranda -76, -78, y -83 en la Fig. 10). En esta nueva banda también se confirmó que su origen se debía a la ausencia de un sitio Hpa II (el sitio Hpa II entre los fragmentos de 0.40 y 0.27 Kpb, Fig. 11), usando el fragmento de 0.40 Kpb de pTck AWP-2 como sonda que detectó su fragmento homólogo conjuntamente con el fragmento de 0.66 Kpb (línea CA 1-65 en la Fig. 12, flecha inferior). El otro sitio de restricción perdido en este segundo grupo de parásitos fue el sitio Hind III. Esta enzima corta el fragmento Hpa II de 0.40 Kpb (flecha del medio en la Fig. 10) a un fragmento de 0.35 Kpb (flecha inferior en la Fig. 10) y a un pequeño fragmento no visible en la autoradiografía. Sin embargo, este no fue el caso en los parásitos de este segundo grupo de clones, como puede verse en la Fig. 10 (flecha del medio). A diferencia de los sitios de restricción polimórficos previamente descritos, que faltaban en algunas moléculas de la subpoblación Tck AWP-2, el sitio Hind III no se detectó en la mayoría (o todas) las moléculas de este segundo grupo de parásitos.

La otra subpoblación de mc analizada en ambos grupos de parásitos fue Tck AWP-3. Esta sonda detectó en las digestiones de ADN-k los fragmentos esperados, según el mapa de restricción del mc (Fig. 11). Por otra parte, también se observaron nuevas bandas (ver panel de la derecha en la Fig. 10). Por ejemplo, en las digestiones con Hap II se

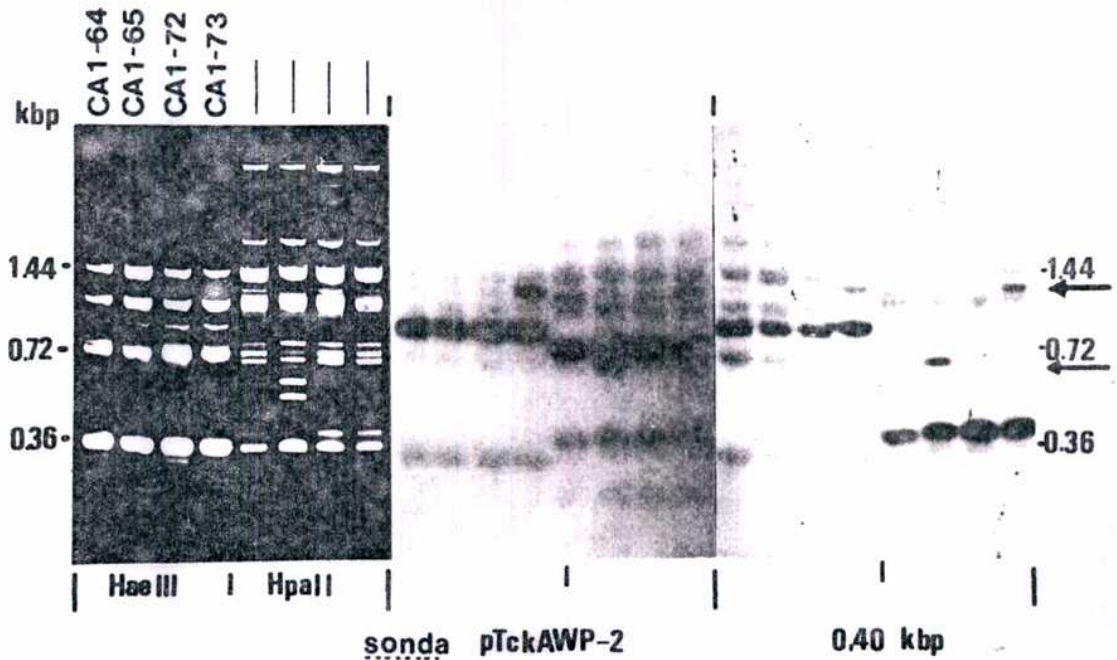


FIGURA 12. Detección de la subpoblación de minicírculos Tck AWP-2 en diferentes clones de parásitos y análisis de sitios de restricción. ADN-k de los clones de parásitos indicados se digirió con Hae III o Hpa II y se corrió en geles de agarosa al 2% (panel de la izquierda). Después de la transferencia, los filtros se hibridaron con la sonda pTck AWP-2 (panel central) o con el fragmento Hpa II de 0.40 Kpb del inserto de pTck AWP-2 (panel de la derecha) (ver el mapa en la Fig. 11). La flecha superior indica la nueva banda detectada en las digestiones Hae III y Hpa II del clon CA 1-73. La flecha inferior indica la banda de 0.66 Kpb presente en la digestión Hpa II del clon CA 1-65.

deberían ver sólo dos bandas (1.10 y 0.34 Kpb, Fig. 11), sin embargo, también son visibles nuevas bandas aunque más débiles de 0.90 y 1.44 Kpb (la banda de mayor tamaño en la Fig. 10 corresponde a moléculas circulares). Este resultado sugiere la presencia de sitios de restricción variables. Esta posibilidad sin embargo, fue difícil de confirmar para esa subpoblación de mc porque la mayoría de los nuevos fragmentos generados por Hpa II y Hae III corren a la altura correspondiente a 1/1, 3/4, 1/2 y 1/4 de la longitud de un mc, haciendo muy difícil la diferenciación entre "nuevas bandas" y el fondo de las hibridaciones con otros mc.

7. CUANTIFICACION DEL NUMERO DE MINICIRCULOS EN SUBPOBLACIONES HOMOGENEAS.

Para cuantificar el número de mc de la subpoblación Tck-14 se corrieron con Hpa II cantidades crecientes de ADN-k e inserto de pTck-14, posteriormente se corrieron en un gel de agarosa 2% y se transfirió e hibridó con el inserto de pTck-14. Los resultados presentados en la Fig. 13 indican que aproximadamente 5 ng de inserto y 100 ng de ADN-k dan señales similares en la autoradiografía, lo que significa que en el ADN-k 1 mc de cada 20 es homólogo al mc Tck-14. Con objeto de determinar si una subpoblación de mc podía variar en número entre diferentes parásitos, se cuantificó el número de mc de las subpoblaciones Tck AWP-2 y -3 en diferentes clones de parásitos. Ambos mc representaron entre el 5 y el 15% del total de mc en todos los clones analizados. No

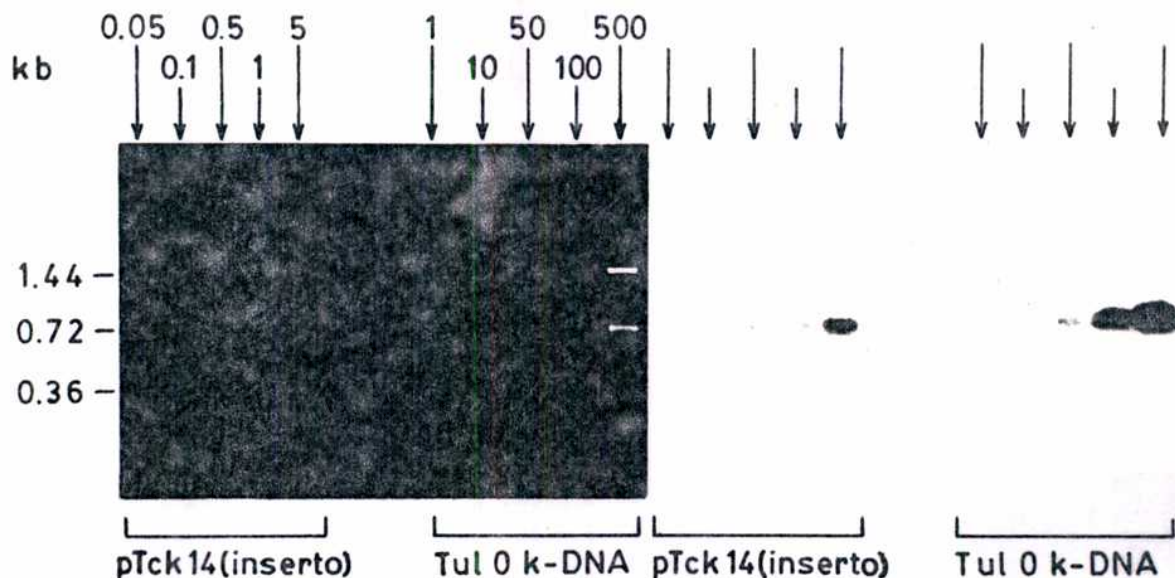


FIGURA 13. Cuantificación del número de minicírculos de la subpoblación Tck-14. Diferentes cantidades (ng) de ADN-k de Tul 0 o del inserto de minicírculo de pTck-14 se cortaron con Hpa II y se corrieron en un gel de agarosa al 2% (panel de la izquierda). Después de la transferencia se hibridó con pTck-14 (panel de la derecha). El lavado de los filtros se realizó en condiciones estrictas (0.3 x SSC/0.1% SDS).

se encontraron variaciones significativas después de realizar cuatro determinaciones independientes para determinar el número de ambas moléculas, ya que las diferencias entre los clones no fueron mayores que las fluctuaciones entre los experimentos.

8. UN METODO RAPIDO PARA LA IDENTIFICACION DE AISLAMIENTOS DE T.cruzi

El hecho de contar con mc específicos de determinados aislamientos de T. cruzi (por ejemplo pTck-14) nos permitió el desarrollo de un método rápido para detectar específicamente cepas relacionadas entre si a través de la utilización de estos mc como sondas en experimentos de hibridación en puntos ("dot-spot hybridation"). Dos concentraciones de ADN-k se sembraron sobre filtros de nitrocelulosa e hibridaron con cuatro mc clonados, dos de la cepa Tul 0 (pTck-14 y pTck-12) y dos de la cepa AWP (pTck AWP-2 y pTck AWP-3). Después del lavado de los filtros en 0.1 x SSC a 65°C, las señales de pTck-14 y pTck AWP-2 fueron claramente distintas para diferentes aislamientos (Fig. 14). pTck-14 detectó las cepas Tul 0, Perú RA y Up, mientras que pTck AWP-2 hibridó con AWP y con los clones CA 1-70, CA 1-71, Miranda-78 y -83. Por otra parte pTck-12 y pTck AWP-3 no dieron buenas relaciones señal/fondo. Filtros similares fueron hidridados con diferentes ADN-k (Fig. 14). Inesperadamente estas sondas también detectaron específicamente determinadas cepas de T. cruzi. Por ejemplo ADN-k de las cepas Perú y AWP usadas como sondas, específicamente identificaron los mismos aislamientos que pTck-14 y pTck AWP-2 respectivamente. ADN-k de la

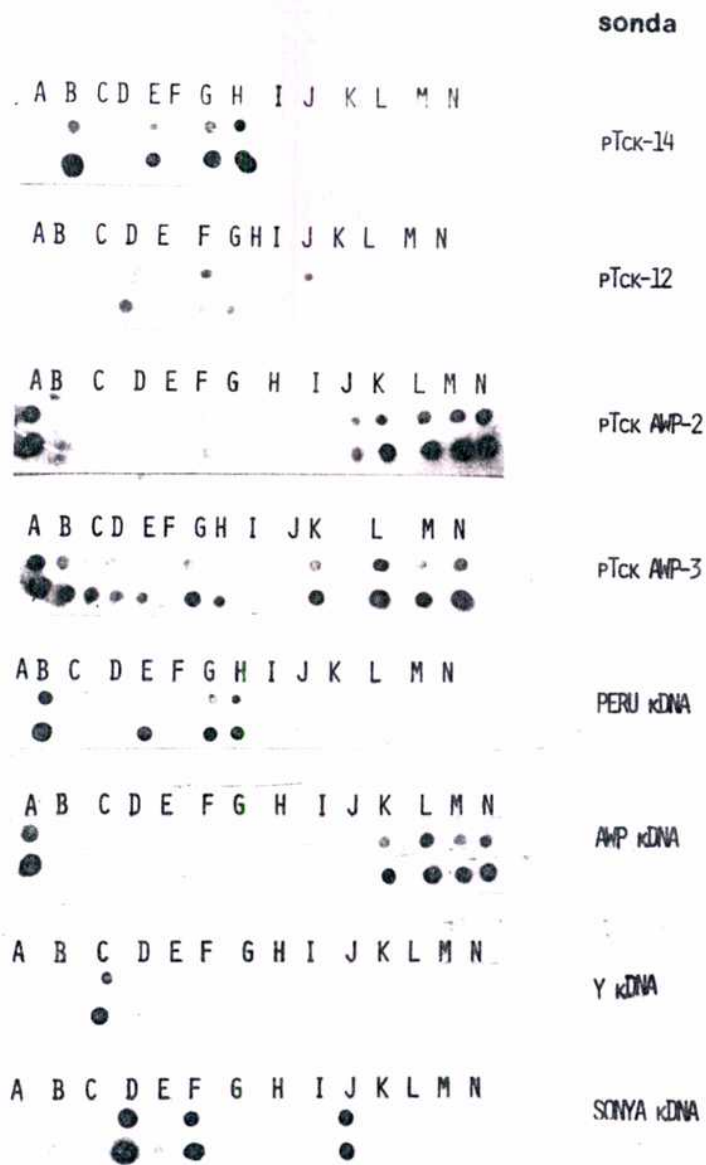


FIGURA 14. Hibridación en puntos ("dot hybridation") de diferentes aislamientos de *T. cruzi*. Dos concentraciones (0.08 y 0.4 ug, primera y segunda línea en cada autoradiografía) de ADN-k de los aislamientos indicados, se sembraron sobre filtros de nitrocelulosa e hibridaron con clones de minicírculos (pTck-) o con ADN-k. Los filtros se lavaron en 0.1 x SSC/0.1% SDS. Las autoradiografías se realizaron con películas Kodak X-0 mat R y pantallas amplificadoras. A. AWP; B. Perú; C. Ipsilon; D. Sonya; E. Tuluahuén; F. TN; G. RA; H. UP; I. Mg; J. FN; K. CA 1-70; L. CA 1-71; M. Miranda-78; N. Miranda-83.

cepa Y sólo se detectó a sí misma, mientras que ADN-k de la cepa Son-ya hibridó también con TN y FN. Resultados similares se obtuvieron cuando se sembró en los filtros parásitos enteros en lugar de ADN-k (Fig. 15).

En experimentos previos se mostró que la cepa CA-1 tenía la subpoblación de mc Tck-14 (Fig. 8). Sin embargo, este no es el caso con los clones de parásitos CA-1 utilizados en este estudio. Estas diferencias pueden deberse a una mezcla accidental de tripanosomas, ya que los mismos provenían de diferentes laboratorios o a una selección de poblaciones ocurrida durante el mantenimiento en estos laboratorios.

9. IDENTIFICACION DE PARASITOS OBTENIDOS DE CASOS AGUDOS Y CRONICOS CON SONDAS DE MINICIRCULOS.

ADN-k de diferentes aislamientos y clones de T.cruzi, obtenidos de casos agudos y crónicos de la Enfermedad de Chagas, se cortaron con Hae III, corrieron en geles de agarosa al 2% y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa; posteriormente se hibridaron con diferentes sondas de mc (Fig.16,17). En los aislamientos y clones estudiados no se detectó el mc pTck AWP-2 (Fig. 16, panel B). Por otra parte los clones de mc pTck M-84 y -88 (Fig. 16, paneles C y D) detectaron específicamente a uno de los dos casos de Chagas congénito y la mayoría de los casos crónicos (excepto C3V) y no hibridaron con ninguno de los aislamientos y clones derivados de casos agudos (Fig. 16).

Para determinar si los parásitos provenientes de casos agudos podrían ser específicamente detectados, se realizó la hibridación con

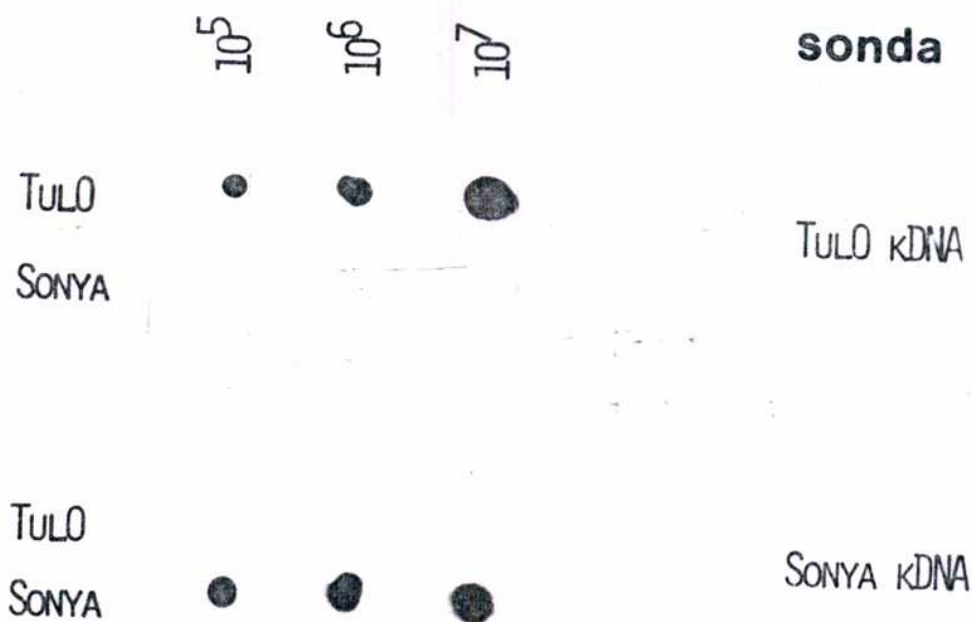


FIGURA 15. Hibridación en puntos ("dot hybridation") realizados con parásitos enteros. Tres diferentes cantidades de parásitos de los aislamientos Tulahuén (Tul 0) y Sonya se sembraron sobre filtros de nitrocelulosa. Los filtros se desnaturalizaron y neutralizaron como se describe en Materiales y Métodos, posteriormente se hibridaron con ADN-k de Tul 0 o Sonya.

ADN-k obtenidos de dos casos agudos. Como se mostró previamente en experimentos de hibridación en puntos, el ADN-k puede ser utilizado como sonda específica para la identificación de parásitos (ver Fig.14). En la Fig. 17, se puede ver que ADN-k de SE 8V usado como sonda detectó los aislamientos y clones de los casos agudos SE 7V, SE 8V y SE 9V, así como el caso crónico C3V, no detectado con la sonda anterior. Por otra parte ADN-k de SE 6V hibridó con el clon SE 6V/2 y con el caso congénito SJ 1/1 (Fig. 17), no detectado previamente.

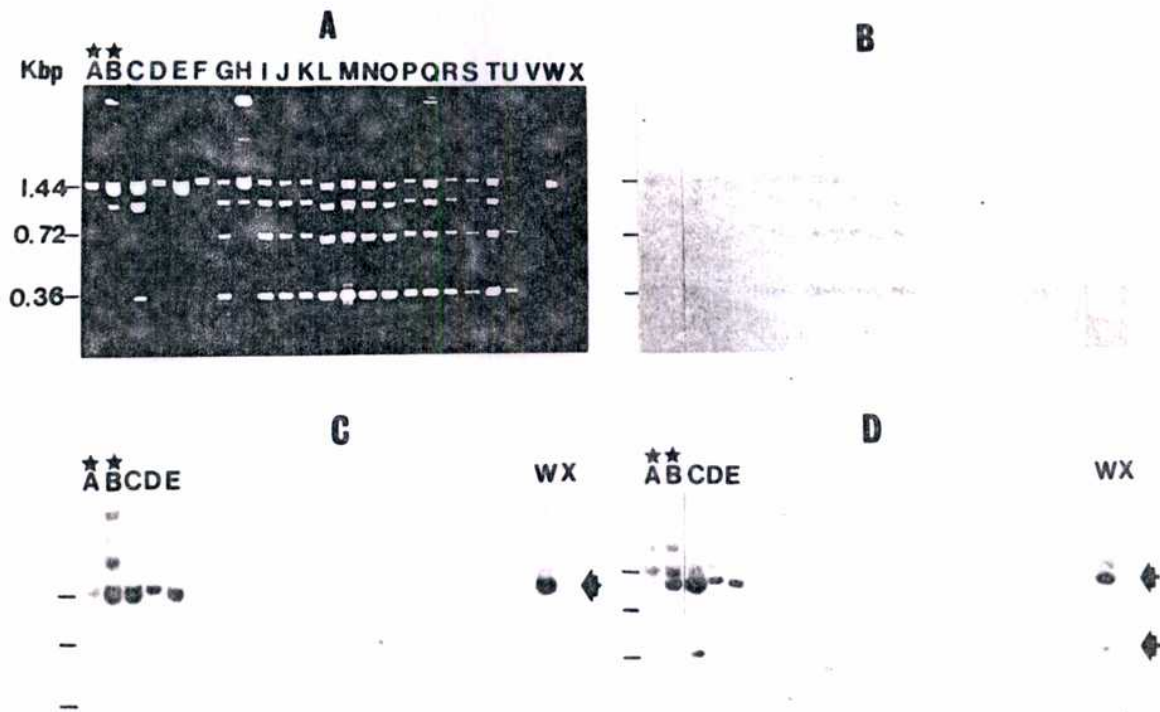


FIGURA 16. Detección de parásitos aislados de pacientes chagásicos crónicos. ADN-k de diferentes aislamientos y clones de *T. cruzi* se cortaron con Hae III y corrieron en geles de agarosa al 2% (panel A). El ADN se transfirió a filtros de nitrocelulosa e hibridó con las sondas de minicírculos pTck AWP-2, pTck M-84 y pTck M-88 (panel B, C y D respectivamente). En los paneles C y D sólo se indican los aislamientos y clones de casos congénitos y crónicos (con y sin asterisco, respectivamente). Las flechas indican las bandas correspondientes a los fragmentos Hae III de los insertos de minicírculos de los clones pTck M-84 (panel C) y pTck M-88 (panel D). A. aislamiento 53 1/1; B. aislamiento BA 2H; C. aislamiento C 4H; D. aislamiento C 5H; E. clon C 5H/14; F. aislamiento SE 6V; G. aislamiento SE 7V; H. clon SE 6V/2; I. aislamiento SE 8V; J. clon SE 8V/25; K. clon SE 8V/32; L. clon SE 9V/1; M. clon SE 9V/5; N. clon SE 9V/7; O. clon SE 9V/7'; P. clon SE 9V/9; Q. clon SE 9V/12; R. clon SE 9V/14; S. clon SE 9V/16; T. clon SE 9V/22; U. clon SE 9V/23; V. clon SE 9V/24; W. aislamiento SE F1; X. aislamiento C 3V.

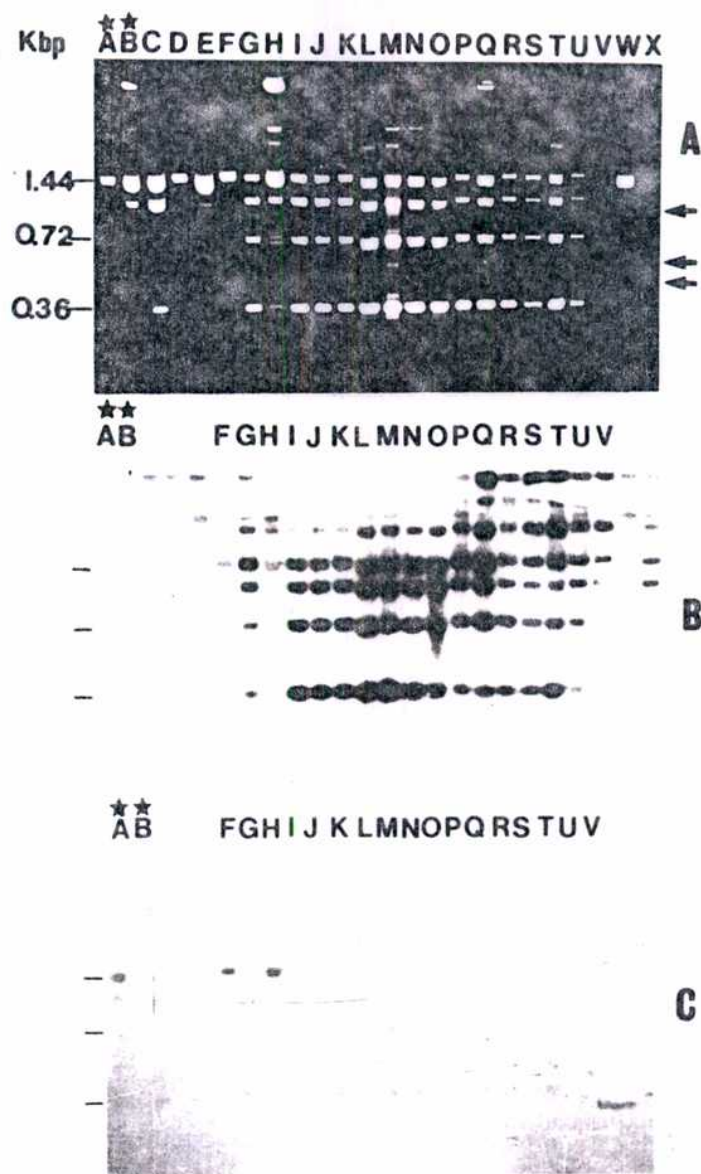


FIGURA 17. Identificación de parásitos aislados de casos agudos de la enfermedad de Chagas. ADN-k de diferentes aislamientos y clones de *T.cruzi* se cortaron con Hae III y corrieron en gels de agarosa al 2% (panel A). El ADN se transfirió a filtros de nitrocelulosa e hibridó con ADN-k obtenido de parásitos aislados de casos agudos (SE 8V, panel B y SE 6V, panel C). En los paneles B y C sólo se indican los aislamientos de casos congénitos (con asterisco) y agudos. Abreviaturas: ver Fig. 16.

DISCUSION

Las tres características más llamativas de los mc son: 1. La existencia de una curvatura en la moléculas (114); 2. La presencia de regiones conservadas dentro de los mc del mismo subgénero (100,103,119) y 3. La heterogeneidad dentro de cada malla de ADN-k (86). Las diferencias detectadas en la movilidad electroforética de mc clonados en geles de poliacrilamida 5% y geles de agarosa 2% son una buena indicación de la presencia de curvaturas en alguna de las clases de mc en T. cruzi. Respecto a la presencia de regiones conservadas o constantes, todas las cepas de T. cruzi estudiadas hasta el presente contienen cuatro de ellas, en la mayoría de sus mc (103). Sin embargo, los resultados presentados en las Figs. 3 y 5 indican que al menos una de las subpoblaciones de mc (Tck-14) contienen una (o dos como máximo) región(es) constante(s). Esto, sin embargo, podría ser una excepción ya que la distribución de los sitios de restricción en otras moléculas clonadas (pTck-12 y pTck-18) sugieren la presencia de una región constante en cada cuarto de mc (Fig. 3). Respecto al grado de conservación de las regiones constantes entre las moléculas es difícil de responder basados en datos de mapas de restricción. Sin embargo, estos sugieren un alto grado de conservación en dos de las agrupaciones de pTck-12 y una en pTck-14 y pTck-18 (Fig. 3). En concordancia con esto, las distancias entre los sitios Taq I y Hae III cuando ambos si tios están presentes ha sido conservada en la mayoría de los mc (Fig. 4). Otras regiones constantes, sin embargo, parecen haber divergido en mayor grado, considerando el número de sitios de restricción presentes (Fig. 3) (107). Por otra parte, los resultados obtendios por

hibridación con pTck-13 (Fig.6) también son indicativos de la existencia de diferentes grados de homología entre las regiones constantes de diferentes mc e incluso dentro de la misma molécula (ver línea 18 en el panel de la derecha de la Fig. 6).

Los fragmentos de mc de diferentes cepas se analizaron por hibridación con mc clonados usando condiciones de hibridación estrictas y relajadas. En ambas condiciones, tres de las sondas (pTck-1,-12 y -13) detectaron la mayoría de los fragmentos en todas las cepas (Fig. 8 y 9) indicando que las subpoblaciones de mc detectadas constituyen familias heterogéneas y que están ampliamente distribuidas en la naturaleza ya que están presentes en la mayoría de los aislamientos analizados (Fig. 8 y 9). Por otra parte, pTck-14 en condiciones estrictas sólo hibridó con 4 aislamientos (Tul 0, CA-1, RA y UP) (Fig. 7,8 y 9) y en cada aislamiento el número de bandas fue limitado a fragmentos específicos, indicando la detección de una subpoblación de mc homogénea. Como pTck-14 tiene una región constante es probable que en condiciones de hibridación relajadas detecte las regiones constantes de la mayoría de los mc, mientras que en condiciones estrictas sólo reconozca secuencias de mayor homología es decir, su propia subpoblación, El análisis de los sitios de restricción de esta subpoblación en las cepas antes mencionadas, reveló que estos eran idénticos, excepto por la presencia de sitios polimórficos en una pequeña fracción de las moléculas y por un nuevo sitio Eco RI en aproximadamente el 50% de los mc de esta subpoblación en la cepa CA-1.

Estos resultados ponen de relieve la existencia de subpoblaciones

de mc homogéneas en T. cruzi, característica no descripta hasta el presente para este parásito. La existencia de estas poblaciones plantean el interrogante del origen de las mismas considerando que la regla general en este parásito es la presencia de poblaciones de mc heterogéneas. La existencia de las poblaciones homogéneas podría ser explicada de la siguiente forma (Fig. 18): debido a la rápida velocidad de evolución de los mc constantemente se generan nuevas moléculas, si alguno de estos mc son preferencialmente replicados, el número de copias del mismo aumentará generando de esta manera una nueva población de mc. A través del tiempo el acúmulo de mutaciones, inserciones y/o deleciones y recombinaciones, como se ha demostrado en T. brucei, Leishmanias y Critidias (86, 120, 138-139) llevarán en definitiva a que esta población de mc en principio homogénea se convierta gradualmente en una población heterogénea. Si este es el caso de la población Tck-14, la pérdida de sitios Hpa II y/o Hae III en algunas moléculas (Fig. 4 y 7) o el nuevo sitio Eco RI en CA-1 (Fig. 8) podrían ser indicativos de que esta población está en una etapa temprana de divergencia. Un ejemplo de la posible evolución de este tipo de mc podrían ser los resultados obtenidos con el fragmento clonado de la subpoblación Tck-13 (Fig. 7 y 8). Este clon detecta un fragmento de mc de igual tamaño en las cepas CA-1, RA, UP y Tul 0 y a su vez híbrida con la mayoría de los fragmentos de mc, lo que podría ser el resultado actual de la expansión de una antigua subpoblación de mc que ha divergido y recombinado con otras familias de mc.

Según el modelo de replicación de mc propuesto por Englund (140)

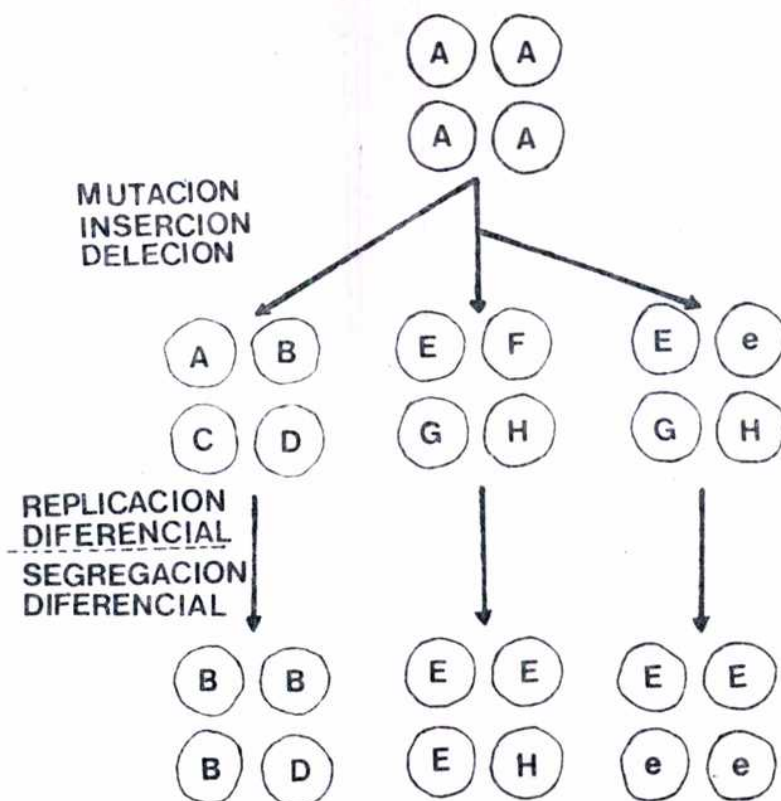


FIGURA 18. Un posible modelo de evolución de los minicírculos. En un tripanosoma hipotético con un único tipo de minicírculos, aparecen nuevas moléculas después de un número desconocido de generaciones. En algunos casos, parásitos muy relacionados pueden tener moléculas similares que difieren en algunas regiones, pero que preservan la estructura general (indicado con E y e). Después de un número indeterminado de generaciones, algunos minicírculos pueden crecer en número respecto del resto de las moléculas, generando de esta manera una subpoblación de minicírculos homogénea.

cada mc replica una vez por división celular. Sin embargo, no se puede descartar que una molécula pueda replicar diez veces por cada nueve divisiones celulares, lo que a través del tiempo conduciría a la expansión de un determinado tipo de mc. Por otra parte el sistema enzimático involucrado en la liberación, replicación y "reattachment" de los mc podría reconocer en forma preferencial las secuencias presentes en ciertos mc.

Entre otras explicaciones que puedan dar cuenta de la presencia de subpoblaciones homogéneas de mc está la distribución desigual de los mc durante la segregación del ADN-k (97) entre las dos células hijas. Este mecanismo podría explicar la existencia de mc específicos de cepas pero, difícilmente explique el aumento del número de copias de ciertas moléculas en detrimento de otras, a menos que se admita la ausencia de segregación de las mismas.

Sin embargo, es posible que este mecanismo actúe en conjunto con la replicación diferencial de mc (Fig. 18).

El análisis de una subpoblación de mc homogénea en diferentes clones de parásitos demostró la variabilidad de ésta respecto de los sitios de restricción. Los sitios polimórficos fueron observados en la mayoría de las moléculas de ciertos clones (por ejemplo el sitio Hind III de pTck AWP-2 en los clones de parásitos CA 1-65, -69 y M-76, -78 y -83), o más frecuentemente en una parte de los mc de esa subpoblación.

Por otra parte algunos clones tenían sitios de restricción polimórfica característicos no presentes en otros clones (ver Fig. 12).

Debido al hecho de que muchas moléculas de la misma subpoblación

de mc presentaban sitios polimórficos idénticos es probable que estos polimorfismos aparecieran en la subpoblación en una etapa temprana de su evolución (Fig. 18) o bien estas mutaciones podrían ser traslocadas a otras moléculas de la subpoblación a través de un mecanismo de conversión génica (141) u otro similar.

Si el polimorfismo es producido por mutaciones, inserciones/deleciones u otras alteraciones, no puede ser respondido hasta el presente. Sin embargo, la secuenciación de un mc realizada recientemente en nuestro laboratorio indica que las principales alteraciones son mutaciones puntuales.

Los resultados presentes en la Fig. 14, muestran que determinados clones de mc, así como ADN-k son útiles como sondas para identificar cepas y clones de T. cruzi. El hecho de que en esta técnica se puedan sembrar parásitos enteros sobre los filtros de nitrocelulosa permite que este método sea simple y rápido para el trabajo con un número grande de muestras. Cuando se usaron mc clonados como sondas, algunos de ellos fueron más específicos (por ej, pTck-14), mientras que los menos específicos podrían explicar el fondo observado en las hibridaciones realizadas con ADN-k. Por otra parte, la hibridación específica de ADN-k con determinadas cepas se puede explicar por la presencia de subpoblaciones de mc homogéneas comunes entre esos aislamientos.

Aunque las cepas AWP, CA-1 y Miranda presentan un patrón de restricción de mc diferentes, todas tienen una subpoblación homogénea de mc en común (pTck AWP-2) (Fig. 14). Este último hecho demuestra que la tipificación de cepas por análisis de patrones de restricción de ADN-k

y por hibridación no siempre dan los mismos resultados, pero pueden complementarse entre sí. Por una parte los patrones de restricción de ADN-k pueden detectar variaciones menores incluso si las cepas en estudio están relacionadas entre sí y por otra, las técnicas de hibridación con mc específicos pueden ser más útiles para agrupar cepas relacionadas aunque existan pequeñas diferencias debidas a la rápida evolución de los mc.

La existencia de mc específicos de especie parece ser una característica de los parásitos del orden kinetoplastida. Recientemente distintos autores han llegado a la misma conclusión para algunas especies del género Leishmania (142-144). Sin embargo, los intentos para establecer si distintos aislamientos de la misma especie de Leishmania tienen diferentes mc no han tenido éxito(145). Si la continua generación de nuevas familias de mc es un fenómeno general en el ADN-k, el uso de mc clonados y condiciones de hibridación estrictas permitirá la localización de mc específicos de aislamiento en todos los tripomátidos. Por otra parte, este tipo de sondas es de gran utilidad en los trabajos con fines taxonómicos ya que evitan las complicaciones derivadas del uso de perfiles de restricción de ADN para tipificar aislamientos de la misma especie (103, 145-146).

La Enfermedad de Chagas presenta una gran variedad de formas clínicas (147). Las causas de esta amplia diversidad de manifestaciones, se desconocen, pero podrían estar relacionadas con diferencias en el parásito, en el huésped humano o en ambos. El análisis de isoenzimas (148-149), ADN-k (103, 146) y de algunas características biológicas (16,

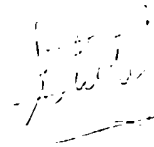
147, 150) han demostrado que T. cruzi es un complejo y heterogéneo conjunto de organismos. También se ha demostrado la existencia de aislamientos de T. cruzi con diferente virulencia y patogenicidad en animales de laboratorio (147).

Si diferentes parásitos son responsables de las distintas formas de la Enfermedad de Chagas en el hombre, entonces sería importante contar con marcadores específicos para poder diferenciarlos, con el objeto de determinar el curso de la enfermedad en un paciente, analizar su distribución geográfica, determinar el número de grupos relacionados con una determinada patología, etc. Con este propósito se realizó el estudio de distintos aislamientos del parásito, obtenidos de casos agudos y crónicos de la Enfermedad de Chagas, utilizando diferentes sondas de ADN-k. Dos de las sondas (pTck M-84 y -88) detectaron parásitos aislados de casos crónicos y uno de los dos casos congénitos, no detectando ninguno de los casos agudos. Por otra parte ADN-k aislado de parásitos provenientes de dos casos agudos, detectaron en conjunto todos los casos agudos, un caso congénito y un caso crónico, no detectados con la sonda anterior. Estos resultados permiten dividir a los aislamientos estudiados en dos grandes grupos en base a diferencias detectadas en su ADN-k con sondas específicas. Uno de los grupos compuesto por parásitos que tienen en común los mc Tck M-84 y -88 y el otro por parásitos que tienen homología con ADN-k aislado de parásitos de casos agudos. Por otra parte, estos resultados también sugieren que el primer grupo está relacionado exclusivamente con formas crónicas de la enfermedad, mientras que el segundo

se relacionaría con formas agudas y crónicas.

Algunos clones de parásitos de dos aislamientos estudiados previamente (CA-1 y Miranda) comparten el mc Tck AWP-2 (Fig. 12), el cual no es detectado en otros aislamientos (Fig. 16, panel B), indicando que constituyen un grupo de parásitos diferente a los anteriores.

Tomados en conjunto estos resultados sugieren la existencia de grupos distintos de T. cruzi que pueden presentar diferentes potencialidades patógenas y que han divergido lo suficiente como para ser diferenciados a través de sondas específicas de ADN-k.



BIBLIOGRAFIA

1. Vickerman, K. En *Biology of the Kinetoplastida*, ed. W.H.R. Lumsden, D.A. Evans, 1:1-34. London , 1976
2. Hoare, C.A. En *The Trypanosomes of Mammals*. A. Zoological Monograph. Oxford:Blackwell. 1972
3. Walsh, J.A., Warren, K.S.N. *Engl. J. Med.* 301:967-974 (1979)
4. Goodman, H.C. *Ann. Immunol.* 129c:267-274 (1978)
5. Opperdoes, F.R. and Borst, P. *FEBS Lett.* 80:360-364 (1977)
6. Cross, G.A.M. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* 202:55-72 (1978)
7. Vickerman, K. *Nature* 273:613-617 (1978)
8. De Lang, T., Michels, P.A.M., Veerman, H.J.G. Cornelissen, and Borst, P. *Nucl. Acids Res.* 12:3777-3790 (1984)
9. Chagas, C. *An. Acad. Med. Río de Janeiro* 72:188 (1909)
10. Chagas, C. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3:219 (1911)
11. Rosenbaum, M.B. y Cerisola, J.A. *Prensa Med. Argentina* 44:2713 (1957)
12. Bonet, A.H., Cichero, J.A., Kuschnir, E., Grand, J.C. y Segura, E.L. *La Sem. Med.* 133:581 (1968)
13. Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Devoux, G., Grain, J. Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Polzansky, G., Sprague, V., Varra, J. and Wallace, F.G. *J. Protozool.* 27(1):37-58 (1980)
14. Hoare, C.A. *The classification of mammalian trypanosomes*. *Ergebn. Mikrobiol.*, 39:43-63 (1966).
15. Gorgas Memorial Laboratory. *Forty-third Annual Report*, U.S. Govt. Printing Office, Washington, D.C. (1972)

16. Engel, J.C., Dvorak, J.A., Segura, E.L. and Crane, M. J. *Protozool.* 29(4):555-560 (1982)
17. Brener, Z. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 59:19-26 (1965)
18. Bice, D.E. and Zeledon, R. *J.Parasitol.* 56:663-670 (1970)
19. Nussenzweig, V. and Goble, F.C. *Exp.Parasitol.* 18:224-230 (1966)
20. González Cappa, S.M. and Kagan, I.G. *Exp.Parasitol.* 25:50-57 (1969)
21. Medina, M. y Chaves, J. *Acta Cient.Venez.* 21:65-67 (1970)
22. Brener, Z. Chagas'disease. PAHO, Sci.Publication N°347 N.Y. (1977)
23. Sánchez, D.O. and González Cappa, S.M. *Medicina (Bs.As.)* 43:41-46 (1983)
24. Zeledon, R. Chagas'disease. PAHO, Sci.Publication N°347 N.Y. (1977)
25. Brack, C. *Acta Trópica* 25:289 (1968)
26. Ouaisi, M.A., Afchain, D., Capron, A. and Grimaud, J.A. *Nature* 308:380-382 (1984)
27. Vickerman, R. and Preston, T.M. *J.Cell.Sci.* 6:365-383 (1970)
28. Solari, A.J. *Chromosoma* 78:239-255 (1980)
29. Lanar, D.E., Levy, L.S. and Manning, J.E. *Mol.Biochem.Parasitol.* 3:327-341 (1981)
30. Castro, C., Craig, S.P. and Castañeda, M. *Mol.Biochem.Parasitol.* 4:273-282 (1981)
31. Tait, A. *Nature* 287:536-538 (1980)
32. Rubio, J., Rosado, Y. and Castañeda, M. *Can.J.Biochem.* 58:1247-1251 (1980)
33. Spartaco, A.F., Cezar, M.D. and Eugen, S.G. *Mol.Biochem.Parasitol.* 1:45-53 (1980)

34. Belnat, P., Paoletti, J. and Riou, G. *Mol.Biochem.Parasitol.* 2:167-176 (1981)
35. Michels, P.A.M., Bernards, A., Van der Ploeg, L.H.T. and Borst, P. *Nucl.Acids.Res.* 10:2353-2366 (1982)
36. Van der Ploeg, L.H.T., Liu, A.Y.C. and Borst, P. *Cell* 36:459-468 (1984)
37. Bernards, A., Michels, P.A.M., Lincke, C.R. and Borst, P. *Nature* 303: 592-597 (1983)
38. Borst, P., Fase-Fowler, F., Frasch, A.C.C., Hoeijmakers, J.H.J. and Weijers, P.J. *Mol.Biochem.Parasitol.* 1:221-246 (1980)
39. Steinert, M. and Van Assel, S. *Exp.Cell Res.* 96:406-409 (1975)
40. Borst, P. *En"Biochemistry and Physiology of Protozoa"* 2nd ed.(1979)
41. Frasch, A.C.C., Hajduk, S.L., Hoeijmakers, J.H.J., Borst, P., Brunel, F. and Davison, J. *Biochim.Biophys.Acta* 607:397-410 (1980)
42. González, A., Prediger, E., Huecas, M.E., Nogueira, A. and Lizardi, P.M. *Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 81:3356-3360 (1984)
43. Sloof, P., Menke, H.M., Caspers, M.P.M. and Borst, P. *Nucl.Acids Res.* 11:3889-3901 (1983)
44. Frasch, A.C.C., Carrasco, A.F., Goijman, S.G. and Sánchez, D.O. *Mol. Biochem.Parasitol.* 8:227-239 (1983)
45. Jordan, R.R., Jourdan, R. and Jacq, B. *J.Mol.Biol.* 101:85-105 (1976)
46. Leon, W., Fouts, D.L. and Manning, J. *Nucl.Acids Res.* 5:491-504 (1978)
47. Hasan, G. Turner, M.J. and Cordingley, J.S. *Nucl.Acids Res.* 10:6747-6761 (1982)
48. Castro, C., Hernandez, R. and Castañeda, M. *Mol.Biochem.Parasitol.* 2:219-233 (1981)
49. Cordingley, J.S. and Turner, M.J. *Mol.Biochem.Parasitol* 1:91-96 (1980)

50. Gray, M.W. *Mol.Cell Biol.* 1:347-357 (1981)
51. Hernández, R., Nava, G. and Castañeda, M. *Mol.Biochem.Parasitol.* 8:297-304 (1983)
52. Hernández, R. and Castañeda, M. *Mol.Biochem.Parasitol.* 8:305-315 (1983)
53. Cross, G.A.M. *Parasitology* 71:393-417 (1975)
54. Hoeijmakers, J.H.J., Frasc, A.C.C., Bernard, A., Borst, P. and Cross, G.A.M. *Nature* 284:78-80 (1980)
55. Capbern, A., Giroud, C., Baltz, T. and Mattern, P. *Exp.Parasitol.* 42:6-13 (1977)
56. Van der Ploeg, L.H.T., Valerio, D., De Lange, T., Bernard, A., Borst, P. and Grosveld, F.G. *Nucl.Acids Res.* 10:5905-5923 (1982)
57. Williams, R.O., Young, J.R. and Majiwa, P.A.O. *Nature* 299:417-421 (1982)
58. Borst, P. and Cross, G.A.M. *Cell* 29:291-303 (1982)
59. Liu, A.Y.C., Van der Ploeg, L.H.T., Rijsewijk, F.A.M. and Borst, P. *J.Mol.Biol.* 167:57-75 (1983)
60. Borst, P., Frasc, A.C.C., Bernard, A., Van der Ploeg, L.H.T., Hoeijmakers, J.H.J., Arnberg, A.C. and Cross, G.A.M. *Cold.Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* 45:935-943 (1981).
61. Michels, P.A.M., Liu, A.Y.C., Bernard, A., Sloof, P., Van der Bijl, M.M.W., Schinkel, A.H., Menke, M.M., Borst, P. Veeneman, G.H., Tromp, M.C. and Van Boom, J.H. *J.Mol.Biol.* 166:537-556 (1983)
62. Borst, P. Bernard, A., Van der Ploeg, L.H.T., Michels, P.A.M., Liu, A.Y.C., De Lange, T., Sloof, P., Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. *En Gene Expression UCLA Symp. on Molecular and Cellular Biology, New Series, 8.* D.Hamer and M.Rosenberg, eds. (New York:Liss) pp. 413-435 (1983)

63. Young, J.R., Shah, J.S., Matthyssens, G. and Williams, R.O. *Cell* 32: 1149-1159 (1983)
64. Borst, P., Bernardts, A., Van del Ploeg, L.H.T., Michels, P.A.M., Liu, A.Y.C., De Lange, T. and Sloof, P. En *Proc.Cetus-UCLA Meeting on Molecular Biology of Host-Parasite Interactions*. N.Agabian and H. Eisen, eds. (New York:Liss) (1984)
65. Nelson, R.G., Parson, M., Barr, P.J., Stuart, K., Selkink, M. and Agabian, N. *Cell* 34:901-909 (1983)
66. De Lange, T., Liu, A.Y.C., Van del Ploeg, L.H.T., Borst, P., Tromp, M.C. and Van Boom, J.H. *Cell* 34,891-900 (1983)
67. De Lange, T., Michels, P.A.M., Veerman, H.J.G., Cornelissen, A.W.C. and Borst, P. *Nucl.Acids Res.* 12:3777-3790 (1984)
68. Borst, P., Bernardts, A., Van der Ploeg, L.H.T., Michels, P.A.M., Liu, A.Y.C., De Lange, T. and Kooter, J.M. *Europ.J.Biochem.* 137:383-389 (1983)
69. De Lange, T., Berkvens, T.M., Veerman, H.J.G., Frasch, A.C.C., Barry, J.D. and Borst, P. *Nucl.Acids Res.* 12:4431 (1984)
70. Bresslau, E. and Scremin, L. *Archiv.Fur Protistenkunle* 48:509-515 (1924)
71. Vickerman, K., *J.Cell Sci.* 5:163-193 (1969)
72. Vickerman, K. and Preston, T.M. En "*Biology of the kinetoplastida*" (W.H.R. Lumsden and D.A. Evans, eds.) Vol.1, pp. 35-130, Acad.Press, London(1976)
73. Cheng, D. and Simpson, L. *Plasmid* 1:297-315 (1978)
74. Hoeijmakers, J.H.J. and Borst, P. *Biochim.Biophys.Acta* 521:407-411 (1978)
75. Hoeijmakers, J.H.J., Snijders, A., Janssen, J.W.G. and Borst, P. *Plasmid* 5:329-350 (1981)

76. Masuda, H., Simpson, L., Rosenblatt, H. and Simpson, A.M. *Gene* 6:51-73 (1979)
77. Simpson, L. and Simpson, A.M. *Cell* 14:169-178 (1978)
78. Simpson, A.M. and Simpson, L. *J.Mol.Biochem.Parasitol.* 2:93-108 (1981)
79. Eperon, I.C., Janssen, J.W.G., Hoeijmakers, J.H.J. and Borst, P. *Nucl. Acids Res.* 11:105-125 (1983)
80. Hoeijmakers, J.H.J., Schoutsen, B. and Borst, P. *Plasmid* 7:199-209 (1982)
81. Simpson, A.M., Simpson, L. and Livingston, L. *Mol.Biochem.Parasitol.* 6:237-252 (1982)
82. Simpson, L., Spithill, T. and Simpson, A.M. *Mol.Biochem.Parasitol.* 6: 253-264 (1982)
83. Johnson, J.B., Hill, G.C., Fox, T.D. and Stuart, K. *Mol. Biochem.Parasitol.* 5:381-390 (1982)
84. de la Cruz, V.F., Neckelmann, N. and Simpson, L. *J.Biol.Chem.* 254: 4876-4883 (1984)
85. Hajduk, S.L., Klein, V.A. and Englund, P.T. *Cell* 36:483-492 (1984)
86. Borst, P., Hoeijmakers, J.H.J. and Hadjuk, S.L. *Parasitology* 82:81-93 (1981)
87. Simpson, L., Simpson, A.M., Kidane, G., Livingston, L. and Spithill, T.W. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 29:1053-1063 (1980)
88. Maslov, D.A., Kolesnikov, A.A. and Zaitsera, G.N. *Mol.Biochem.Parasitol.* 12:351-364 (1984)
89. Muhich, M.L., Neckelmann, N. and Simpson, L. *Nucl.Acids Res.* 13(9): 3241-3260 (1985)
90. Borst, P., Fase-Fowler, F., Hoeijmakers, J.H.J. and Frasch, A.C.C. *Biochim. Biophys.Acta* 610:197-210 (1981)

91. Goddard, J.M. and Wolstenholme, D.R. Nucl.Acids Res. 8:741(1980)
92. Kim, R. and Ray, S. Gene 29:103-112 (1984)
93. Borst, P. and Hoeijmakers, J.H.J. Plasmid 2:20-40 (1979)
94. Englund, P.T. En "Biochemistry and Physiology of Protozoa" (M.Levandowsky and S.M. Hutner, eds.) 2nd ed., Vol.4, Acad.Press, New York, pp.333-383 (1981)
95. Fairlamb, A.H., Weislogel, P.O., Hoeijmakers, J.H.J. and Borst, P. J.Cell.Biol. 76:293-309 (1978)
96. Kleisen, C.M., Borst, P. and Weijers, P.J. Eur.J.Biochem. 64:141-151 (1976)
97. Challberg, S.S. and Englund, P.T. J.Mol.Biol. 138:447-472 (1980)
98. Kidane, G.Z., Hughes, D. and Simpson, L. Gene 27:265-277 (1984)
99. Steinert, M. and Van Assel, S. Plasmid 3:7-17 (1980)
100. Chen, K.K. and Donelson, J.E. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 77(5): 2445-2449 (1980)
101. Gray, A.R. J.Gen.Microbiol. 41:195-213 (1965)
102. Riou, G. and Barrios, M. Biochem.Biophys.Res.Commun. 90:405-409 (1979)
103. Frasc, A.C.C., Goijman, S.G., Cazzulo, J.J. and Stoppani, A.O.M. Molec.Biochem.Parasitol. 4:163-170 (1981)
104. Leon, W., Frasc, A.C.C., Hoeijmakers, J.H.J., Fase-Fowler, F., Borst, P., Brunel, F. and Davidson, J. Biochim.Biophys.Acta 607:221-231 (1980)
105. Riou, G.F. and Yot, P. Biochemistry 16:2390-2396 (1977)
106. Riou, G.F. and Gutteridge, W.E. Biochimie 60:365-379 (1978)
107. Van Heuverwyn, H., Muller, R., Calcagnotto, A.M., Cardoso, M.A.B., Pereira, J.L.A. y Morel, C.M. III Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, Argentina, Agosto 1982. Resumen N°152.

108. Brack, C. and Delain, E. J. *Cell Sci.* 17: 287-306 (1975)
109. Borst, P., Fase-Fowler, F., Weijers, P.J., Barry, J.D., Tattley, L. and Vickerman, K. *Mol. Biochem. Parasitol.* 15:129-142 (1985)
110. Brunel, F., Davison, J., Thi, V.H. and Merchez, M. *Gene* 12:223-234 (1980)
111. Fouts, D.L. and Wolstenholme, D.R. *Nucl. Acids Res.* 6:3785-3804 (1979)
112. Fouts, D.L., Wolstenholme, D.R. and Boyer, H.W. *J. Cell. Biol.* 79:329-341 (1978)
113. Shlemai, J. and Zadol, A. *Nucl. Acids Res.* 12(21):8017-8028 (1984)
114. Marini, J.C., Levene, S.D., Crothers, D.M. and Englund, P.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:7664-7668 (1982)
115. Simpson, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:1585-1588 (1979)
116. Ntambi, J.M., Marini, J.C., Bangs, J.D., Hajduk, S.L., Jimenez, H.E., Kitchin, P.A., Klein, V.A., Ryan, K.A. and Englund, P.T. *Mol. Biochem. Parasitol.* 12:273-286 (1984)
117. Wu, H.M. and Crothers, D.M. *Nature* 308:511-513 (1984)
118. Arnot, D.E. and Barker, D.C. *Molec. Biochem. Parasit.* 3:47-56 (1981)
119. Barrois, M., Riou, G. and Galibert, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3323-3327 (1981)
120. Manning, J. and Wolstenholme, A.J. *Cell Biol.* 70:406-418 (1976)
121. Ponzi, M., Birago, C. and Battaglia, P.A. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13: 111-119 (1984)
122. Chance, M.L. *Symp. Br. Soc. Parasitol.* 17:55 (1979)
123. Warren, L.G. *J. Parasitol.* 46:529-538 (1960)
124. Isola, E.L.de, Sánchez, D.O., Lammel, E.M., Katzin, A.M. and González Cappa, S.M. *Rev. Arg. Microbiol.* 14:147-154 (1982)

125. Pizzi, T. En *Inmunología de la Enfermedad de Chagas*. Monografía Univ. de Chile (ed) p. 183(1956)
126. González Cappa, S.M., Katzin, A.M., Añasco, N., Lajmanovich, S. *Medicina (Bs.As.)* 41:549-555 (1981)
127. Brener, Z. and Chiari, E. *Rev.Inst.Med.Trop.San Paulo* 5:220-222 (1963)
128. González Cappa, S.M., Chiale, P., Del Prado, G.E., Katzin, A.M., Martini, G.W.de, Isola, E.D.de , Abramo Orrego, L., Segura, E.L. *Medicina (Bs. As.)* 40 (Supl. 1): 63-68 (1980)
129. Peacock, A.C. and Dingman, C.W. *Biochemistry* 6:1818-1827 (1967)
130. Bolívar, F. *Gene* 4:121-136 (1978)
131. Mandel, M. and Higa, A. *J.Mol.Biol.* 53:154 (1970)
132. Rigby, P.W.J., Dickman, M., Rhodes, C. and Berg, P. *J.Mol.Biol.* 113: 237-251 (1977)
133. Southern, E.M. *J.Mol.Biol.* 98:503-517 (1975)
134. Denhardt, D.T. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 23:641-646 (1966)
135. Grunstein, M. and Hogness, D. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 72:3961 (1975)
136. Birnboim, H.C. and Daly, J. *Nucl.Acids Res.* 7:1513-1523 (1979)
137. Kuhn, S., Anitz, H.J., Starlinger, P. *Molec.Gen.Genet.* 167:235-241 (1979)
138. Hoeijmakers, J.H.J., Weijers, P.J. , Brakenhoff, G.S. and Borst, P. *Plasmid* 7:221-229 (1982)
139. Simpson, L., Simpson, A.M. and Wesley, R.D. *Biochim.Biophys.Acta* 349: 161-172 (1974)
140. Englund, P.T. *J.Biol.Chem.* 254:4895-4900 (1979)
141. Baltimore, D. *Cell* 24:592-594 (1981)

142. Wirth, D.F. and Mc Mahon Pratt, D. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 79:
6999-7003 (1982)
143. Kennedy, W.P.K. Mol.Biochem.Parasitol. 12:313-325 (1984)
144. Barker, D.C. and Butcher, J. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 77:285-297 (1983)
145. Spithill, T.W. and Grumont, R.J. Mol.Biochem.Parasitol. 12:217-236 (1984)
146. Morel, C.M., Chiari, E., Plessman Camargo, E., Mattei, D.M., Romanha, A.J.
and Simpson, L. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 77:6810-6814 (1980)
147. Brener, Z. and Andrade, Z. En "T. cruzi e Doença de Chagas" pp.214-218,
Guanabara Koogan, Ríó de Janeiro (1979)
148. Gibson, W.C. and Miles, M.A. Br.Mod. 3. 41:115-121 (1985)
149. Breniere, S.F., Tibayrenc, M., Antezama, G., Pabon, J., Carrasco, R.,
Sclaes, H. and Desjeus, P.C.R. Acad.Sci.Paris 300:555-558 (1985)
150. Doyle, P.S., Dvorak, J.A. and Engel, J.C. J.Protozool. 31:280-283 (1984).