

Tesis de Posgrado

Diversidad de secuencia de los minicírculos del *Trypanosoma cruzi*

Macina, Roberto Aníbal

1990

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:

Macina, Roberto Aníbal. (1990). Diversidad de secuencia de los minicírculos del *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2347_Macina.pdf

Cita tipo Chicago:

Macina, Roberto Aníbal. "Diversidad de secuencia de los minicírculos del *Trypanosoma cruzi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2347_Macina.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DIVERSIDAD DE SECUENCIA DE LOS MINICIRCULOS DEL
TRYPANOSOMA CRUZI

ROBERTO ANIBAL MACINA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO CARLOS C. FRASCH

LUGAR DE TRABAJO: DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA. FACULTAD DE
MEDICINA. (U.B.A.) e INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
FUNDACION CAMPOMAR (U.B.A.-CONICET).

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

- 2347 -
y 21

1990

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Frasch por haberme permitido iniciarme en la investigación científica, por sus oportunos consejos y por la confianza depositada en mí.

Al Dr. Daniel Sánchez por guiar mis primeros pasos en la Biología Molecular.

A Beatriz Reyes por su eficaz colaboración en algunos experimentos descriptos en este trabajo de Tesis. Por su compañerismo y permanente buena predisposición.

Al Dr. Daniel Corach por su excelente y desinteresado trabajo fotográfico.

A los Dres. Daniel Corach y Hector Targovnick por su amistad, resistencia y permanente estímulo.

Al Dr. Oscar Campetella por cederme gentilmente el clon del gen de la enzima GDH-NADP dependiente.

A la Dra Silvia Arauzo por su colaboración en la preparación de los cultivos primarios de epimastigotes.

Al Dr. J. J. Cazzulo y a la Dra Berta F. de Cazzulo por cederme las instalaciones de cultivo y por su colaboración permanente.

A mis compañeros de la Cátedra de Química Biológica. Facultad de Medicina.

A mis compañeros del I.I.B. "Fundación Campomar". A los investigadores y a todo el personal del Instituto.

A mis padres por sus enseñanzas, apoyo y afecto. Su permanente estímulo y su dedicación hicieron posible que accediera a una formación profesional.

A mis hermanas Liliana y Berta por su amistad, compañerismo y apoyo incondicional.

A mi esposa Susana por el aporte realizado, que posibilitó la finalización de este trabajo. Por estar a mi lado en todo momento.

A mi amigo Hugo Beloso por el tiempo compartido y el permanente aliento.

Abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNk	ADN kinetoplástico o mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
IPTG	Isopropil tiogalactósido
kp o kpb	Miles de pares de bases
MOPS	Acido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
pb	Pares de bases
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano
X-gal	5-bromo,4-cloro,3-indolil, β -D-galacto- piranósido

A mi madre, que sigue estando con
nosotros

A mi padre

A mis hermanas, Lilliana y Berta

A mi esposa Susana
A mi hija Verónica

INDICE

INTRODUCCION.....	1
1.1 Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.1.1 Generalidades.....	2
1.1.2 Ubicación sistemática.....	3
1.1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> es un conjunto de poblaciones heterogéneas.....	4
1.1.4 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1.2 La enfermedad de Chagas.....	8
1.2.1 Descubrimiento del agente etiológico y descripción de la enfermedad.....	8
1.2.2 Enfermedad de Chagas aguda y crónica.....	8
1.2.3 Epidemiología.....	10
1.2.4 Quimioterapia.....	11
1.2.5 Vacunación.....	11
1.2.6 Diagnóstico.....	12
1.3 Clasificación e identificación de <i>T. cruzi</i>	14
1.3.1 Caracterización de <i>T. cruzi</i> por zimodemas.....	15
1.3.2 Caracterización de <i>T. cruzi</i> mediante análisis de ADN.....	17
1.3.3 Caracterización de <i>T. cruzi</i> por anticuerpos monoclonales.....	18
1.4 Organización y estructura del ADN mitocondrial.....	19
1.4.1 Maxicírculos.....	21
1.4.2 Minicírculos.....	23
1.4.2.1 Heterogeneidad de secuencia como herramienta epidemiológica.....	24
1.4.2.2 Función de los minicírculos.....	25
1.4.2.3 Evolución de los minicírculos.....	27
1.4.3 Replicación del ADNk.....	27
1.4.3.1 Replicación de minicírculos.....	28
1.4.3.2 Replicación de maxicírculos.....	28

1.5 Organización y estructura del ADN nuclear.....	29
1.5.1 Genes que codifican antígenos de <i>T. cruzi</i>	30
OBJETIVOS.....	32
MATERIALES Y METODOS.....	34
2.1 Materiales.....	35
2.1.1 Origen y calidad de los reactivos utilizados.....	35
2.1.2 Enzimas.....	35
2.1.3 Productos radiactivos.....	36
2.1.4 Medios de cultivo.....	36
2.1.5 Antibióticos.....	37
2.1.6 Cepas de bacterias utilizadas.....	37
2.1.7 Cepas y Clones de Parásitos.....	38
2.1.8 Plásmidos.....	38
2.1.9 Soluciones amortiguadoras utilizadas (Buffer)......	39
2.2 Cultivos de parásitos.....	39
2.2.A) Cultivos axénicos de parásitos.....	39
2.2.B) Cultivos primarios de parásitos.....	39
2.3 Técnicas comúnmente utilizadas para la purificación y concentración de ácidos nucleicos.....	39
2.3.1 Precipitación con etanol.....	39
2.3.2 Extracción con solventes orgánicos.....	40
2.4 Aislamiento y Purificación de ácidos nucleicos.....	40
2.4.1 Purificación de ADNk (kinetoplástico).....	40
2.4.2 Purificación de ADNn (nuclear).....	41
2.4.3 Prueba de calidad del ADN.....	42
2.4.4 Purificación de ADN plasmídico en pequeña escala.....	42
2.4.5 Purificación de ADN plasmídico en gran escala.....	43

2.4.6 Purificación de ADN simple cadena del fago M13.....	44
2.5 Métodos electroforéticos.....	44
2.5.1 Electroforesis de ácidos nucleicos.....	44
2.5.1.1 Electroforesis en geles de agarosa.....	44
2.5.1.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes.....	45
2.5.1.3 Elución de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	46
2.6 Autorradiografías.....	47
2.7 Clonado de fragmentos de ADN en plásmidos y bacteriófago M13.....	47
2.7.1 Preparación del vector para clonado.....	47
2.7.2 Preparación del inserto a ser clonado.....	47
2.7.3 Reacción de ligado.....	47
2.7.4 Preparación de bacterias competentes.....	48
2.7.5 Transformación de bacterias.....	49
2.8 Identificación de secuencias de ADN por hibridación.....	50
2.8.1 Identificación de colonias recombinantes.....	50
2.8.2 Identificación de fagos recombinantes.....	51
2.8.3 Identificación de secuencias de ADN específicas. Southern Blot.....	52
2.8.4 Hibridación.....	52
2.9 Modificaciones enzimáticas del ADN realizadas in vitro.....	53
2.9.1 Cortes con enzimas de restricción.....	53
2.9.2 Marcación de ADN por Nick translation.....	54
2.9.3 Desfosforilación de vectores con fosfatasa alcalina bacteriana (BAP).....	54
2.10 Secuenciación.....	55

2.11 Métodos de dosaje de ADN.....	56
2.11.1 Cuantificación de ADNk y ADNn.....	56
2.11.1 a) Cuantificación por absorbancia.....	56
2.11.1 b) Comparación con ADN de masa conocida en geles de agarosa.....	56
2.11.1 c) Comparación con ADN de concentración conocida en puntos.....	57
2.11.2 Cuantificación de subpoblaciones específicas de minicírculos.....	57
2.12 Identificación de clones recombinantes por resistencia a antibióticos.....	58
2.13 Análisis de agrupamientos.....	58
RESULTADOS.....	60
3 Polimorfismos en subpoblaciones de minicírculos homogéneos.....	61
3.1 Antecedentes y objetivos.....	61
3.2 Subpoblaciones homogéneas de minicírculos polimórficos.....	61
3.2.1 Clones de parásitos con ADNk con un patrón de digestión simple.....	61
3.2.2 Clonado de minicírculos homogéneos.....	63
3.2.3 Polimorfismos en subpoblaciones de minicírculos homogéneos.....	66
3.3 Estimación del número de copias de mini- círculos.....	67
4 Mecanismos que generan diversidad en la secuencia de los minicírculos de <i>T. cruzi</i>	68
4.1 Antecedentes y objetivos.....	68
4.2 Moléculas de minicírculos homólogas, con polimorfismos para enzimas de restricción.....	69
4.3 Comparación de las secuencias obtenidas.....	72

4.4 Características generales de la secuencia de los minicírculos de <i>T. cruzi</i>	75
4.4.1 Regiones conservadas.....	75
4.4.2 Repeticiones directas e invertidas.....	76
4.4.2.a Repeticiones directas.....	76
4.4.2.b Repeticiones invertidas.....	76
4.4.3 Marcos de lectura abiertos.....	76
4.4.4 Otras características.....	79
5 Utilización de sondas de ADN para agrupar aislamientos y cepas de <i>T. cruzi</i>	80
5.1 Antecedentes y objetivos.....	80
5.2 Minicírculos homogéneos específicos de aislamiento.....	82
5.3 Sondas de ADNk para la identificación de aislamientos de <i>T. cruzi</i>	82
5.3.1 Descripción general.....	82
5.3.2 Análisis de aislamientos de la provincia de Salta.....	84
5.3.3 Análisis de aislamientos de la región del Norte de Chile.....	85
5.3.4 Análisis de aislamientos, cepas o clones de diferentes orígenes.....	88
5.3.4.1 Análisis por sondas de ADNk.....	88
5.3.4.2 Análisis por esquizodemas.....	88
5.3.5 Ventajas y desventajas del método.....	91
5.3.6 Distribución geográfica de aislamientos de <i>T. cruzi</i> homólogos.....	96
5.3.7 Relación entre zimodemas y sondas de minicírculos.....	96
6 Análisis de la heterogeneidad del ADN nuclear en <i>T. cruzi</i>	97

6.1 Antecedentes y objetivos.....	97
6.2 Genes que codifican proteínas antigenicamente relevantes de <i>T.cruzi</i>	98
6.3 Genes que codifican proteínas conservadas.....	103
7 Análisis de los patrones de bandeo.....	107
7.1 Antecedentes y objetivos.....	107
7.2 Análisis con sondas de ADNk.....	109
7.3 Análisis con sondas de ADNn.....	109
7.3.1 Genes conservados.....	109
7.3.2 Genes de proteínas antigénicas.....	109
7.3.3 Medición de la distorsión.....	110
7.3.4 Comparación de clasificaciones: Congruencia taxonómica.....	112
DISCUSION	113
CONCLUSIONES	122
REFERENCIAS.....	124

INTRODUCCION

1.1 Biología de *Trypanosoma cruzi*.

1.1.1 Generalidades.

Los tripanosomas y las leishmanias son agentes causales de serias enfermedades en el hombre y en animales silvestres y domésticos, tanto en Africa como en América Latina. Pertenecen al Orden *Kinetoplastida* (Honigberg, 1963). Poseen kinetoplasto, que es una región especializada dentro de su única mitocondria, donde se localiza el ADN mitocondrial (ADNm). Son protozoos flagelados, en su mayoría parásitos. Algunos géneros del orden son patógenos de plantas (*Phytomonas*). Otros son parásitos de insectos, monogénéticos, con un ciclo de vida simple y se alojan sólo en un huésped invertebrado (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas*). Hay especies de vida libre, como las pertenecientes a la familia *Bodonidae*. Los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* son flagelados digenéticos, presentan un ciclo de vida complejo, con alternancia entre un huésped invertebrado y uno vertebrado. En este último, se aloja, dependiendo de la especie considerada, en el torrente sanguíneo o intracelularmente, en músculo cardíaco, células del sistema nervioso autónomo, sistema digestivo o sistema inmune. Los dos últimos géneros mencionados, concentraron la mayoría de las investigaciones realizadas sobre estos parásitos por su importancia sanitaria. Las leishmanias son responsables de distintas enfermedades en el hombre, como por ejemplo la leishmaniasis cutánea (*Leishmania tropica*: Botón de oriente), la leishmaniasis mucocutánea (*L. brasiliensis*: espundia) y la leishmaniasis visceral (*L. donovani*: Kala-azar). Estas enfermedades afectan a la población de las áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo. Distintas subespecies de *Trypanosoma brucei* producen la trypanosomiasis africana o enfermedad del sueño. *T. brucei rhodesiense* produce una enfermedad aguda y *T. brucei gambiense* una enfermedad crónica en el hombre. Por otro lado, *T. brucei brucei* produce una enfermedad equivalente (nagana) en animales domésticos y silvestres. Afecta grandes extensiones del continente africano haciéndolas inadecuadas para el desarrollo de la ganadería, produciendo la consecuente hambruna para los pueblos que habitan esas regiones. *T. cruzi* es

el agente causal de la enfermedad de Chagas-Mazza o tripanosomiasis americana. Afecta casi la totalidad de América Central y del Sur donde cerca de 20 millones de personas presentan serología positiva para este parásito. Todas las enfermedades mencionadas anteriormente afectan a millones de personas, especialmente en los países en vías de desarrollo. Hasta la fecha no se han encontrado tratamientos satisfactorios para la mayoría de las enfermedades producidas por los trypanosomátidos. La importancia médica y sanitaria de estos parásitos ha impulsado a numerosos grupos de investigación a invertir grandes esfuerzos para lograr un conocimiento más amplio en el área de la bioquímica clásica y la biología molecular de estos organismos.

En las últimas décadas se descubrieron varias características peculiares de los tripanosomas. Se describieron mecanismos nunca vistos anteriormente: un sistema de transcripción discontinua (De Lang y col., 1984), el mecanismo de variación antigénica en tripanosomas africanos (Cross, 1978 y Vickerman, 1978) y la edición de ARN mensajero (Benne y col., 1986). También se encontraron estructuras nuevas como la presencia de ADN kinetoplástico (ADNk) formando una gran malla de moléculas de ADN concatenadas (Borst y Hoeijmakers, 1979) y la posesión de una organela llamada glicosoma que posee nueve enzimas glicolíticas normalmente encontradas en el citoplasma de otras células (Opperdoes y Borst, 1977).

1.1.2 Ubicación sistemática.

Según una revisión realizada en el año 1980 por el Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoología (Levine y col., 1980) los tripanosomas son protozoos cuya ubicación taxonómica es la siguiente:

Phylum Sarcomastigophora: un tipo de núcleo; flagelo, pseudopodios o ambos.

Subphylum Mastigophora: uno o más flagelos; reproducción por fisión binaria; en algunos grupos reproducción sexual.

Clase Zoomastigophora: cloroplastos ausentes; uno o más flagelos.

Orden Kinetoplastida: uno a cuatro flagelos que emergen de una depresión; una única mitocondria que se extiende por toda la célula

semejando un tubo o una red de tubos; generalmente poseen una organela autorreplicante, el kinetoplasto; aparato de Golgi en la región de la depresión flagelar; hay especies parásitas y otras de vida libre.

Suborden Trypanosomatina: un solo flagelo libre o con membrana ondulante; kinetoplasto pequeño y compacto; parásitos.

Familia Trypanosomatidae: varios géneros monogenéticos: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas*, todos parásitos de invertebrados. Otros géneros digenéticos como *Leishmania* y *Trypanosoma* que alternan un huésped vertebrado y otro invertebrado. El género *Trypanosoma* se divide en dos grandes grupos según el sitio de producción de tripomastigotes metacíclicos en el insecto vector y el consecuente método de infección en el huésped vertebrado (Hoare, 1964).

Sección Salivaria: incluye tripanosomas cuyo ciclo de desarrollo en el vector invertebrado se completa en las glándulas salivales del insecto. Se transmite por inoculación mediante la picadura del insecto. Ej.: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense*

Sección Esterocoraria: comprende tripanosomas que completan su desarrollo en la región posterior del tubo digestivo del vector. Se transmiten por contaminación (excepto *T. rangeli*) a través de las heces del insecto. Ej.: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma lewisi*. La única especie de este grupo patógena para el hombre es *Trypanosoma cruzi*.

1.1.3 *Trypanosoma cruzi* es un conjunto de poblaciones heterogéneas.

Existe un considerable número de evidencias que indican que esta especie no es un grupo homogéneo de parásitos, sino que estaría compuesto por un conjunto de poblaciones heterogéneas de organismos que presentan diferentes características biológicas, bioquímicas e inmunológicas.

Poco después de su descubrimiento en 1909 se conoció la amplia distribución de *T. cruzi* en América Central y del Sur (Chagas, 1909). Se conocía la reproducción intracelular del parásito en varios tejidos diferentes de mamíferos así como el desarrollo completo del ciclo biológico en diferentes huéspedes vertebrados y vectores (Miles, 1979). Actualmente,

luego de intensos estudios y cientos de trabajos publicados sobre la enfermedad de Chagas se acumuló gran cantidad de datos sobre las características biológicas y epidemiológicas de *T. cruzi*. Esta información evidenció la existencia de distintas variedades de *T. cruzi* en la naturaleza. Se demostraron diferencias en la morfología de las formas sanguíneas en distintas cepas (Brener, 1965; Brener, 1973). Estas diferencias morfológicas podrían denotar diferencias fisiológicas (Brener, 1973). También se observaron diferencias en las curvas de parasitemia (Brener y col., 1974 y Avila y col., 1981), en la infectividad a distintos tipos de células (Doyle y col., 1984), en la patogenicidad en ratones (Postan y col., 1983), en la cinética de crecimiento (Dvorak y col., 1980), en las características de unión a anticuerpos monoclonales (Kirchhoff y col., 1984) y en la sensibilidad a distintas drogas (Brener y col. 1976; Freeman y col., 1975 y Avila y col., 1981). Desde un punto de vista bioquímico se encontraron diferencias en la composición antigénica (Nussensweig y col., 1963; Ketteridge, 1975; González y col., 1984 y Kirchhoff y col., 1984), en el metabolismo oxidativo y el contenido de diferentes enzimas (Engel y col., 1990), en los patrones de isoenzimas (Miles y col., 1977 y Tibayrenc y Ayala, 1988), en los patrones de fragmentos de restricción del ADN kinetoplástico (Morel y col., 1980), en el contenido de ADN por organismo (Dvorak y col., 1982 y Kooy y col. 1989) y en el cariotipo y localización cromosómica de distintos genes (Gibson y Miles, 1986; Engman y col., 1987 y Henriksson y col., 1990).

La variabilidad en *T. cruzi* no debe resultar sorprendente tratándose de un parásito con una amplia distribución geográfica y una gran diversidad de hábitats, huéspedes y vectores. La heterogeneidad en las poblaciones de parásitos probablemente sea la causa de la enigmática variabilidad en los síndromes clínicos producidos en las personas infectadas con *T. cruzi*. Por ello el estudio de las variaciones intraespecíficas tiene importancia para el desarrollo de métodos de diagnóstico y de tratamientos quimioterapéuticos e inmunológicos contra la enfermedad. Probablemente no todas las variedades del parásito sean susceptibles a una determinada droga o anticuerpo (Brener, 1985).

1.1.4 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosoma cruzi es un parásito digenético. Durante su ciclo de vida se aloja en dos huéspedes distintos: un insecto hematófago y un huésped definitivo vertebrado. El vector es normalmente un triatomineo de la familia *Reduviidae*, se infecta por ingestión de tripomastigotes presentes en la sangre periférica de un vertebrado infectado. Estas formas sanguíneas llamadas tripomastigotes (Fig. 1), son ingeridas por el insecto y sufren una serie de transformaciones morfológicas irreversibles diferenciándose a epimastigotes (Fig. 1). En el intestino, los epimastigotes en activa división, mantienen un estado permanente de infección en el insecto. En la ampolla rectal del vector, los epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, siendo esta forma (muy similar a los tripomastigotes sanguíneos) la que posee capacidad infectiva para el huésped mamífero. El vector infectado se alimenta sobre un huésped vertebrado, elimina sus heces durante o después de la ingesta de sangre y a través de esas heces se vehiculizan los tripomastigotes metacíclicos (Brener, 1973).

En 1968, Brack comunicó la existencia de una forma redondeada provista de un flagelo a la que denominó esferomastigote. Según este autor, los tripomastigotes sanguíneos se diferencian en esferomastigotes en el estómago del insecto. A partir de allí dos ciclos paralelos podrían ocurrir en el vector. En uno, las formas redondeadas se diferenciarían en tripomastigotes metacíclicos, mientras en el otro se transformarían en epimastigotes cortos (con capacidad de multiplicarse y diferenciarse en esferomastigotes) y en epimastigotes largos (con gran movilidad pero sin capacidad de multiplicarse ni diferenciarse). Los tripomastigotes metacíclicos eliminados con las heces penetran en la piel del huésped a través de microescoriaciones de la piel o de mucosas como la conjuntiva. Luego, invaden las células por un proceso de endocitosis iniciando la etapa intracelular de su ciclo biológico. *T. cruzi* se puede alojar en diferentes tipos celulares siendo las más comúnmente infectadas las fibras musculares y las células de la glía (Brener, 1973). En el interior de la célula parasitada se

produce la diferenciación a formas redondeadas, carentes de flagelo, llamadas amastigotes, que se multiplican por fisión binaria cada 12 horas

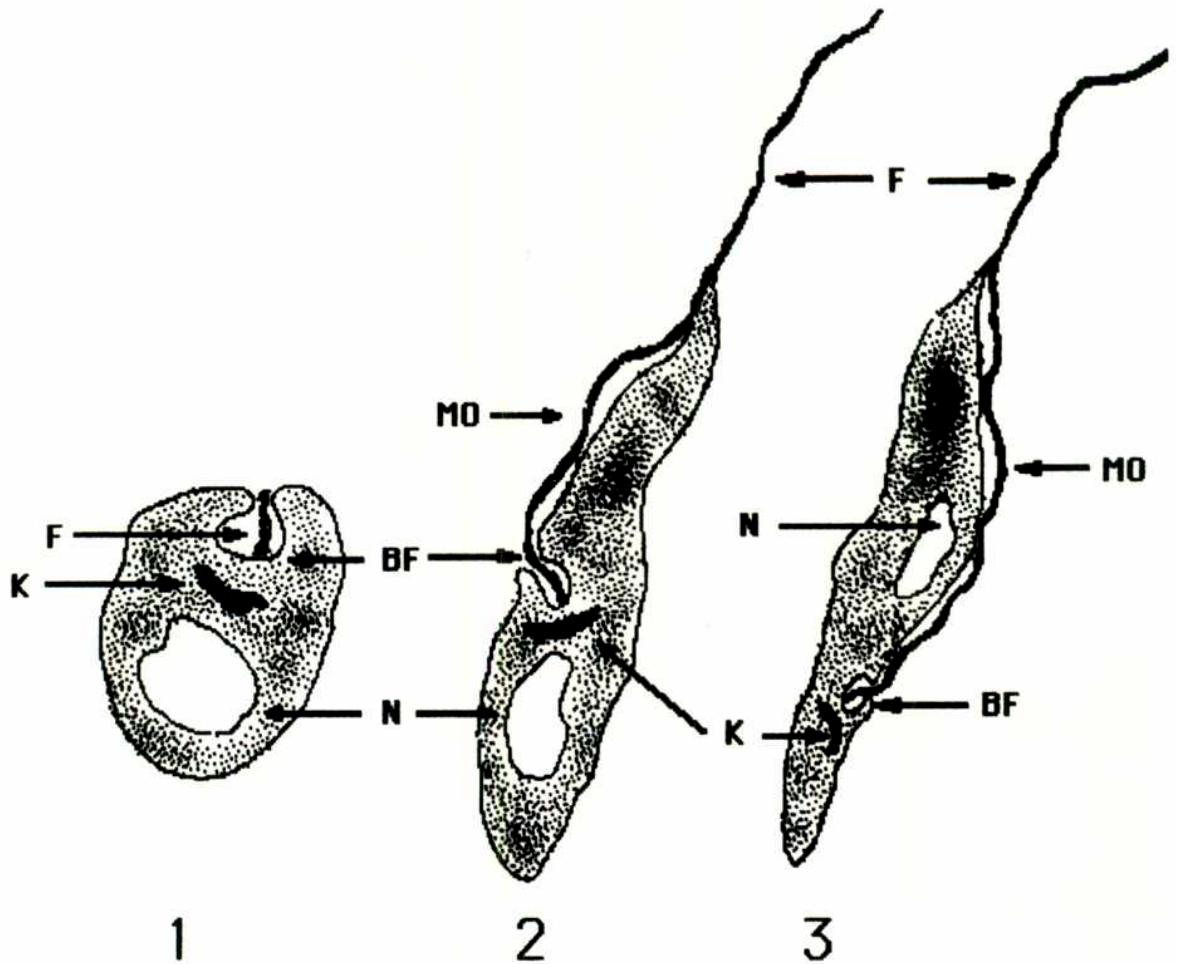


Figura 1. Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*. 1. Amastigote. 2. Epimastigote. 3. Tripomastigote. Bolsillo flagelar (BF), Flagelo (F), Kinetoplasto (K), Membrana ondulante (MO) y Núcleo (N).

aproximadamente (Fig. 1). Después de un determinado número de divisiones comienza la diferenciación hacia la forma tripomastigote que son liberados a la circulación por ruptura de la célula. Estos tripomastigotes invaden nuevas células reiniciando el ciclo amastigote-tripomastigote, perpetuando de esta manera la infección en el huésped vertebrado (Brener, 1973).

T. cruzi se aloja en una gran variedad de huéspedes, tanto invertebrados como vertebrados. Se encontraron naturalmente infectadas numerosas especies de triatomíneos pertenecientes a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Pastrongylus*. En cuanto al huésped vertebrado, se detectaron infecciones en varios mamíferos de diferentes órdenes, tanto en seres humanos como en monos, ratones, ratas, conejos, hamsters y perros. Por otro lado, tanto anfibios como aves son refractarios a las infecciones con este parásito.

1.2 La enfermedad de Chagas.

1.2.1 Descubrimiento del agente etiológico y descripción de la enfermedad.

Carlos Chagas en 1909 descubrió un parásito flagelado en el intestino del insecto hematófago *Pastrongylus megistus* muy común en las cabañas del estado de Minas Geraes en Brasil. En honor a su maestro Oswaldo Cruz llamó a este organismo *Trypanosoma cruzi*. El mismo autor también demostró la existencia de este protozoo en la sangre de un niño y de un gato descubriendo de esta manera, primero el agente etiológico y luego la enfermedad causada por él (Chagas, 1911). En estudios posteriores el mismo Carlos Chagas describió detalladamente las manifestaciones clínicas de la enfermedad a la cual denominó "trípanosomiasis americana" y que hoy se conoce como enfermedad de Chagas (Chagas, 1909 a; Chagas 1916; Chagas, 1916 a).

1.2.2 Enfermedad de Chagas aguda y crónica.

La enfermedad puede manifestarse en una variedad de formas clínicas y patológicas, cada una de ellas con características muy particulares. Al entrar el parásito al huésped comienza un período de latencia de aproximadamente 7 a 10 días, luego del cual aparecen los primeros síntomas de la infección siendo los más comunes fiebre, irritabilidad, cefalgias y mialgias. Estos síntomas se presentan en la etapa aguda de la enfermedad, que se caracteriza por una gran proliferación intracelular del parásito y por una parasitemia muy intensa por lo que los parásitos pueden ser fácilmente detectados en

circulación y en tejidos. Las manifestaciones clínicas más severas ocurren principalmente en niños de 0 a 2 años de edad. La mortalidad en la enfermedad de Chagas aguda siempre se correlaciona con grupos de corta edad. Los casos fatales presentan generalmente severos daños cardíacos y/o meningoencefalitis chagásica, principalmente en el primer mes de la enfermedad (Pinto Días, 1984). La infección puede cursar sin manifestaciones clínicas durante el período agudo. Se estima que sólo un 5% de los individuos afectados muestran síntomas clínicos que conducen a la detección de la enfermedad durante su etapa aguda. El 95% restante de los casos desarrollan directamente una forma crónica de la enfermedad.

La evolución de la etapa aguda, en el caso que la haya, dura entre 40-60 días, retrocediendo luego los signos y síntomas a la normalidad. La parasitemia disminuye hasta niveles prácticamente indetectables, entrando en el período crónico. En esta etapa, la infección puede permanecer sin manifestaciones clínicas por años o décadas. Algunos pacientes pueden desarrollar una forma crónica progresiva caracterizada por la aparición de miocarditis y/o hipertrofia y dilatación del tubo digestivo en la porción proximal o distal que resulta en megaesófago y/o megacolon respectivamente (Galvao-Castro y col., 1984). En nuestro país la patología crónica más frecuente es la miocarditis chagásica siendo los pacientes crónicos sintomáticos aproximadamente un 25% de los individuos infectados.

Los factores que determinan las diferentes manifestaciones clínicas y su relación con distintas áreas geográficas no están bien definidos. Se supone que se debe a la existencia de diferentes cepas del parásito en distintas regiones, interactuando con poblaciones de huéspedes que difieren en muchos aspectos (nutricionales, genéticos, etc.). La interacción huésped-parásito depende de las diferencias en uno u otro componente y de la asociación que se da entre una determinada población de parásitos y una población particular de huéspedes.

1.2.3 Epidemiología.

La enfermedad de Chagas es una de las parasitosis más importantes de América Latina. Las áreas endémicas se extienden desde México hasta la provincia de Río Negro en Argentina y el sur de Chile, encontrándose la mayor prevalencia en Brasil, Venezuela y Argentina. En las áreas de alta endemicidad se calcula que hay cerca de 90 millones de personas en peligro de ser infectadas por *T. cruzi*. Hay entre 16-18 millones de personas que se encuentran infectadas. En algunas comunidades de Bolivia o la provincia de Santiago del Estero en Argentina, la prevalencia excede el 70% de la población. En estudios serológicos recientes se encontró una prevalencia del 4,9% de infecciones con *T. cruzi* en inmigrantes centroamericanos al área de Washington DC en EE.UU., la cual no es una zona endémica (Kirchhoff, 1987). Actualmente se calcula una incidencia de 200.000 nuevos casos por año.

El mecanismo de infección humana más importante en las zonas endémicas es la transmisión de *T. cruzi* por sus vectores naturales. Hay una gran prevalencia de esta enfermedad en áreas donde los vectores se adaptaron a ambientes domésticos, favorecidos por la precariedad de las viviendas. Los insectos se alojan en las grietas de las paredes, emergiendo para alimentarse de los habitantes cuando éstos están durmiendo. *T. cruzi*, también puede transmitirse transplacentariamente y por transfusiones de sangre, esto último debido a que la supervivencia del parásito puede llegar hasta los 20 días posteriores a la extracción (Pinto Díaz, 1984). Existen casos descritos de infección por transplantes de órganos (Pinto Díaz, 1984) y de infecciones accidentales en laboratorios (Brener, 1984). Hay un alto riesgo de transmisión por transfusión en áreas donde los donadores de sangre presentan una alta probabilidad de estar infectados. Esto hace que sea prioritario poseer un método de diagnóstico confiable. Actualmente no se dispone de vacunas efectivas ni de drogas adecuadas para la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Chagas. El control de la enfermedad requiere la prevención de la infección mediante el desarrollo de campañas que incluyen el mejoramiento y la desinsectación de viviendas, educación de los pobladores de las zonas endémicas y el diagnóstico precoz. Sin embargo, se continúa investigando en

pos de obtener agentes quimioterapéuticos activos o medidas inmunológicas preventivas para reducir y controlar este flagelo.

1.2.4 Quimioterapia.

No hay ninguna droga enteramente adecuada para el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas. Las únicas drogas utilizadas actualmente son dos compuestos nitroheterocíclicos conocidos como "nifurtimox" y "benznidazol". Son sólo parcialmente efectivos en casos agudos de la enfermedad, tanto en infecciones por transfusión sanguínea, en las infecciones congénitas, como en las infecciones accidentales en el laboratorio. Las dos drogas son totalmente inefectivas en los casos crónicos. Ambos agentes quimioterapéuticos requieren un largo período de administración y tienen severos efectos colaterales tales como reacciones de hipersensibilidad, neuritis periférica, pérdida de peso y trastornos gastrointestinales. El tratamiento se recomienda, en los casos agudos, en algunos de los cuales ha sido posible eliminar la parasitemia totalmente. La eficacia de ambas drogas es baja y sólo un pequeño porcentaje de los pacientes tratados son curados (Brener, 1984).

La medicación ideal para el tratamiento de la enfermedad de Chagas debe curar tanto los casos agudos como los crónicos, debe ser efectiva por vía oral y en una única y pequeña dosis, debe carecer de efectos colaterales y teratogénicos, no debe requerir hospitalización y no debe generar resistencia en el parásito (WHO, 1981).

1.2.5 Vacunación.

Los intentos para prevenir la enfermedad de Chagas se basan en el control del vector mediante el uso de insecticidas (Oliveira-Filho, 1988), en la detección de muestras infectadas en los bancos de sangre en áreas endémicas y la eliminación de los parásitos por adición de cristal violeta a esa sangre (Docampo y col., 1988) y en el mejoramiento de las viviendas para la erradicación del vector de ellas.

Los intentos de vacunación realizados en animales no resultaron exitosos. En el mejor de los casos se obtuvo protección parcial frente a la

Infección experimental (Brener, 1986). Se utilizaron diferentes preparaciones de antígenos de *T. cruzi*: parásitos vivos atenuados o no proliferativos, parásitos muertos fijados, glicoproteínas de superficie purificadas y homogenatos celulares o fracciones subcelulares. Sólo serían aceptables aquellas vacunas que brinden protección total en los animales tratados ya que a menudo, aparecen tardíamente graves lesiones en distintos tejidos durante el transcurso de la enfermedad en humanos (10 a 20 años después de la infección). No se encontró correlación entre la seriedad de las lesiones y la gravedad de los estadios tempranos de la enfermedad.

Se piensa que existen antígenos de *T. cruzi* responsables de la resistencia del huésped. No hay garantías de que estos antígenos puedan inducir anticuerpos capaces de generar una protección estable contra el parásito ya que el tripanosoma desarrolló varios mecanismos de evasión ("capping", "fabulation", etc.) por los cuales puede escapar de la respuesta inmune (Krettl, 1980 y Schmuñis, 1980).

Para una vacuna efectiva sólo deberían considerarse aquellos antígenos que generen una protección total en el tiempo y que no produzcan ningún tipo de agresión autoinmune (Brener, 1986).

1.2.6 Diagnóstico.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se basa tanto en los signos clínicos como en los síntomas de afección cardíaca, megaesófago, megacolon y en la demostración de la presencia de parásitos en sangre. El hallazgo del parásito en sangre periférica es el método de elección en la fase aguda de la enfermedad. Existen tanto métodos directos como indirectos para identificar al parásito. Entre los métodos directos, el más utilizado es el examen de una película gruesa de sangre entre portaobjetos y cubreobjetos. El grado de sensibilidad del método depende del nivel de parasitemia del paciente y del cuidado y dedicación durante la observación. El método indirecto más empleado es el xenodiagnóstico: vinchucas sin infectar son alimentadas sobre pacientes que se sospecha están infectados y, luego de un cierto tiempo, se analizan las heces de los insectos para detectar la presencia de *T. cruzi*. La

efectividad demostró ser casi del 100% en casos agudos y sólo un 50% en casos crónicos.

También pueden obtenerse evidencias indirectas de la presencia de parásitos en sangre por distintos estudios serológicos que detectan anticuerpos específicos anti- *T. cruzi* generados en el curso de la infección, empleados especialmente en pacientes crónicos. Las técnicas más usadas son la reacción de fijación del complemento, las reacciones de hemoaglutinación, reacciones de inmunofluorescencia y las reacciones inmunoenzimáticas o ELISA. Para que el diagnóstico con estos métodos tenga valor, deben utilizarse por lo menos dos de las reacciones serológicas mencionadas (Storino, 1985).

En los estudios de inmunodiagnóstico se hace uso de poblaciones de antígenos heterogéneos y no estandarizados como extractos acuosos o suspensiones de parásitos, etc. (Krettli, 1982). Esto conduce a la aparición de falsos positivos y reacciones cruzadas con otras enfermedades parasitarias como leishmaniasis y toxoplasmosis (Kirchhoff, 1987). Actualmente varios laboratorios están abocados a la búsqueda de antígenos específicos de *T. cruzi* que sean únicamente reconocidos por sueros de pacientes chagásicos (Schechter, 1983, Araujo, 1985; Scharfstein, 1985; Ibañez y col., 1987; Lemsre, 1986 y Frasch y col., 1987; Levin y col., 1989 y Reyes y col., 1990). El uso de anticuerpos monoclonales ha mostrado ser una buena herramienta en la búsqueda de un método de diagnóstico efectivo (Lemsre, 1986). Los ensayos capaces de detectar la presencia de componentes del parásito en la sangre utilizando anticuerpos monoclonales proveen una evidencia de infección en el momento del estudio. En cambio, los métodos para detectar anticuerpos anti- *T. cruzi* mencionados anteriormente pueden no discernir entre una infección en curso y un caso de remisión por quimioterapia (Araujo, 1984).

Actualmente se está estudiando la posibilidad de utilizar sondas de ADN en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, en especial sondas de ADN kinetoplástico (ADNK) ya que *T. cruzi* posee gran cantidad de minicírculos (Morel y col., 1984 y Sánchez y col., 1984). Se encontraron secuencias repetidas en minicírculos de *T. cruzi* que están conservadas en cepas que presentan una gran diversidad biológica. La abundancia de estas secuencias las hace susceptibles de ser utilizadas en estudios de diagnóstico (Degrave,

1988). Actualmente se está utilizando el método de PCR (polymerase chain reaction) para amplificar selectivamente fragmentos de las regiones conservadas de los minicírculos del ADNk de *T. cruzi* (Sturm y col., 1989). Este método tiene una gran sensibilidad y, si se superan una serie de problemas metodológicos sería un método sumamente útil en la detección de parásitos en la sangre de pacientes que se sospecha están en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

1.3 Clasificación e identificación de *T. cruzi*.

El control de las enfermedades parasitarias requiere el uso de métodos para la caracterización de los agentes infecciosos. Hay organismos que son morfológicamente idénticos pero difieren marcadamente en su significancia epidemiológica para una determinada enfermedad.

Diferencias en la infectividad, patogenicidad, inmunogenicidad y sensibilidad a drogas de los parásitos, así como en la capacidad de alojarse en diferentes vectores y huéspedes definitivos son características importantes para tener en cuenta si se quiere determinar la prevalencia y la severidad de una enfermedad parasitaria en una comunidad determinada. El conocimiento de estas diferencias es fundamental para programar las estrategias de control. Se necesita caracterizar e identificar parásitos en el hombre, en los posibles huéspedes vertebrados y en los vectores intermediarios.

La variabilidad en las diversas características biológicas, bioquímicas, morfológicas e inmunológicas de *T. cruzi* probablemente sea la razón de la existencia de diferentes manifestaciones clínicas en la enfermedad de Chagas (Miles, 1979). Así, se pone en evidencia la importancia de disponer de métodos confiables para la identificación y clasificación de diferentes poblaciones de parásitos de relevancia epidemiológica.

Los primeros intentos para lograr una identificación positiva de la existencia del agente patógeno que produce la tripanosomiasis americana se basaron en criterios morfológicos. Esta metodología no era adecuada debido a la existencia de organismos no patógenos morfológicamente similares a *T. cruzi*.

Mediciones morfométricas indican heterogeneidad en tamaño y forma de distintos parásitos. A pesar de ello, los datos biométricos de las formas sanguíneas no justifican la división de los miembros del subgénero *Schizotrypanum* en grupos taxonómicos menores (Hoare, 1972 y Miles, 1980). Actualmente se emplean tres metodologías diferentes para los estudios epidemiológicos relacionados con la enfermedad de Chagas. Ellas son el uso de isoenzimas como marcadores genéticos, el análisis directo del ADN y la producción de anticuerpos monoclonales altamente específicos.

1.3.1 Caracterización de *T. cruzi* por zimodemas.

La caracterización de organismos por la movilidad electroforética de sus isoenzimas es una contribución importante para el entendimiento de la biología de poblaciones naturales. Electroforesis de isoenzimas aplicada al estudio de parásitos ayudó a dilucidar cuestiones epidemiológicas, a definir taxones y a detectar intercambio genético. Se denomina zimodema a poblaciones de parásitos que comparten su patrón isoenzimático y difieren de otras de la misma especie o subespecie en la movilidad electroforética de una o más de sus isoenzimas (Gibson y Miles, 1985).

Evidencias biológicas y clínicas indicaban que *T. cruzi* era un grupo complejo y heterogéneo de organismos. La aplicación de este método confirmó rápidamente la extraordinaria variabilidad de la especie (Miles y Cibulskis, 1986).

En condiciones controladas, diferencias en la movilidad de isoenzimas implica diferencias genéticas entre poblaciones de organismos. Analizando una cantidad suficiente de enzimas, la ausencia de diferencias de movilidad indican una estrecha relación entre los organismos analizados. Los primeros en utilizar datos de patrones electroforéticos de isoenzimas como base para la clasificación taxonómica de *T. cruzi* fueron Toyé y Miles (Toyé, 1974, Miles y col., 1977). Se dividió a la especie en tres grupos de cepas o zimodemas principales: zimodemas Z₁, Z₂ y Z₃ (Miles y col., 1980) analizando cepas de parásitos presentes en distintas áreas rurales de Brasil (Miles y col., 1977; Miles y col., 1978; Barret y col., 1980 y Ready y Miles, 1980). Los perfiles isoenzimáticos se usaron para determinar el grado de heterogeneidad

intraespecífico, la relación entre los ciclos de transmisión doméstico y selvático y para analizar si la distribución geográfica de las cepas está relacionada con diferencias en la patología producida por el parásito y la respuesta a tratamientos quimioterapéuticos.

Hay una pronunciada heterogeneidad en *T. cruzi*. Los tres grupos o zimodemas descritos presentan una gran variabilidad interna (Miles y col., 1984). En algunas localidades del este de Brasil y de Chile se encontró una clara relación entre zimodemas y tipo de ciclo de transmisión. Zimodema Z₁ se encontró asociado a ciclos de transmisión selvática, mientras Z₂ se encontró relacionado con ciclos domésticos (Miles y col., 1977; Miles, 1983 y Miles y col., 1984). Los parásitos pertenecientes a cada uno de los tres zimodemas descritos pueden infectar seres humanos (aunque los de Z₃ lo hacen con baja frecuencia) y todos pueden producir una enfermedad aguda (Miles y col., 1978).

En 1981, Miles sugirió que la existencia de distintas formas de la enfermedad de Chagas se debían a la presencia de diferentes agentes etiológicos. Analizó 316 aislamientos de *T. cruzi* recolectados de tres áreas geográficas distintas. En el centro y este de Brasil, donde la enfermedad se presenta asociada a megacarditis, megaesófago y megacolon, se encontró el zimodema Z₂. En Venezuela, donde la enfermedad no presenta los síntomas anteriormente descritos, no se encontró el zimodema Z₂. En cambio la mayoría de los parásitos analizados pertenecían al zimodema Z₁ y unos pocos al Z₃. En estudios más recientes, se demostró que no existía diferencias entre los síntomas clínicos de casos agudos de la enfermedad de Chagas producidos por parásitos de los zimodemas Z₁ y Z₂. Tanto los parásitos del zimodema Z₁ como los del Z₂ mostraron ser resistentes a benznidazol en pacientes con infecciones agudas tratados con esta droga (Luquetti y col., 1986). Aunque había evidencias de que las infecciones con parásitos del zimodema Z₂ predisponía a la aparición de mega-síndromes, actualmente se acepta que no existe correlación entre el zimodema al cual pertenece un parásito y la sintomatología clínica que éste produce (Miles y Cibulskis, 1986). Clones de parásitos pertenecientes al mismo zimodema difieren marcadamente en la virulencia y patogenicidad en ratones (Postan y col., 1983).

Otros autores utilizaron esta metodología para analizar la variabilidad de las diferentes poblaciones e interpretar los datos en términos de genética poblacional (Tibayrenc y Ayala, 1988). Los resultados obtenidos llevaron a proponer que *T. cruzi* es diploide (Tibayrenc y col., 1985) al igual que el resto de los miembros del orden *Kinetoplastida* (Tait, 1980 y Gibson y Miles, 1986). A diferencia de *T. brucei* donde se mostró sexualidad, *T. cruzi* carece o tiene una muy restringida reproducción sexual (Tibayrenc y col., 1985; Tibayrenc y col., 1986 y Tibayrenc y Ayala, 1988). Los 524 aislamientos analizados mostraron una gran variabilidad genética y sugieren una estructura clonal en las poblaciones de *T. cruzi* (Tibayrenc y Ayala, 1988). Las entidades llamadas zimodemas son clones naturales del parásito que se pueden diferenciar por técnicas electroforéticas (Tibayrenc y col., 1986 y Tibayrenc y Ayala, 1987).

Las evidencias indican que la evolución clonal es muy antigua en *T. cruzi* y la variabilidad genética refleja una prolongada evolución separada de los diferentes clones. Esta prolongada evolución clonal explicaría la variabilidad biológica y clínica del agente causal de la enfermedad de Chagas (Tibayrenc y Ayala, 1988).

1.3.2 Caracterización de *T. cruzi* mediante análisis de ADN.

Los tripanosomátidos poseen ADNn y ADNk, parte del cual (los maxicirculos) es equivalente al ADN mitocondrial de otros organismos eucariotes. Estudios del contenido de ADN cromosomal y de fraccionamiento de cromosomas por las modernas técnicas de electroforesis en pulsos alternados de campos eléctricos perpendiculares mostraron la variabilidad existente entre las diferentes poblaciones de *T. cruzi* (Engman y col., 1987; Kooy y col., 1989 y Henrickson y col., 1990). Debido a la complejidad del ADNn se hace difícil su utilización para la caracterización de diferentes aislamientos de parásitos. Por su complejidad más limitada y su fácil purificación, el ADNk es ampliamente usado para ese fin (Mattei y col., 1977; Morel y col., 1980; Frasch y col., 1981 y Carreno y col., 1987). El ADNk es digerido con enzimas de restricción, los fragmentos resultantes se separan por electroforesis en geles de agarosa y se visualizan por fluorescencia con bromuro de etidio. Se puede así caracterizar distintas poblaciones de *T. cruzi*

ya que sus ADNk presentan diferentes patrones de restricción. Morel propuso en 1980 una nueva terminología para clasificar a los tripanosomátidos. Utilizo el termino "esquizodema" para designar aquellas poblaciones de parásitos que presentan un patrón de restricción de ADNk similar o idéntico. Este tipo de análisis confirmó la heterogeneidad de *T. cruzi*. Los grupos formados concuerdan en general con los zimodemas; pero se pueden identificar subgrupos. Se observa mayor heterogeneidad que con los perfiles isoenzimáticos. Se pudo determinar la existencia de cepas de laboratorio heterogéneas. Analizando el ADNk de diferentes clones provenientes de una cepa se observaron diferentes patrones de restricción (Morel y col., 1980).

El análisis por esquizodemas mostro ser útil para demostrar que diferentes cepas de *T. cruzi* pueden coexistir simultáneamente en un mismo huésped vertebrado y que el método de aislamiento utilizado afecta la recuperación de determinadas cepas (Deane y col., 1984).

De un análisis de 80 clones diferentes de *T. cruzi*, Dvorak sugiere que algunas variaciones en la virulencia de los parásitos estarian dadas por diferencias en ciertos parámetros cuantitativos como velocidad de crecimiento *in vitro* y contenido de ADN. Los parámetros cualitativos como perfiles isoenzimáticos y esquizodemas tendrian un escaso valor en la predicción de la virulencia de la infección (Gibson y Miles, 1985). Sin embargo, existe una asociación entre los parámetros cuantitativos y cualitativos; diferentes zimodemas difieren claramente en contenido de ADN (Dvorak y col., 1982).

1.3.3 Caracterización de *T. cruzi* por anticuerpos monoclonales.

Un método alternativo para analizar la variación intraespecífica de *T. cruzi* es la reactividad que presentan diferentes parásitos a anticuerpos monoclonales. Esta metodología puede indentificar antígenos de importancia en la relación huésped-parásito. Se produjeron una serie de anticuerpos monoclonales contra clones de *T. cruzi* representantes de los principales zimodemas (Flint y col., 1984). Algunos de estos anticuerpos parecen ser específicos de especie o específicos de algún zimodema particular en ensayos de ELISA (Schechter y col., 1983 y Chapman y col., 1984).

Las técnicas descritas anteriormente no son excluyentes. Las tres se complementan entre sí y, sumadas a determinaciones cuantitativas, aportan una serie de parámetros sumamente útiles en la caracterización de diferentes poblaciones de *T. cruzi*.

1.4 Organización y estructura del ADN mitocondrial.

La característica distintiva de los flagelados kinetoplástidos es la posesión de una única mitocondria con grandes cantidades de ADNm. Poseen mucho más ADNm que otras células eucariotas, el que se localiza en la base del flagelo y se observa al microscopio óptico como una masa única visible con colorantes específicos para ADN. Al microscopio electrónico el ADNm se detecta como una cápsula densa con forma de disco ligeramente cóncavo y con una zona de finas fibrillas en la base del flagelo (Fig. 2) (Clark y Wallace, 1960). Esta zona basófila vista al microscopio óptico fue denominada kinetoplasto por Alexeieff en 1917. El kinetoplasto fue la primera estructura citoplasmática en la que se describió la presencia de ADN (Bresslau y Scremin, 1924). El ADNm de los tripanosomátidos es conocido como ADN kinetoplástico por encontrarse localizado en la región especializada conocida como kinetoplasto. Está constituido por dos tipos de moléculas circulares. Los maxicírculos, cuyo tamaño varía entre 13 y 40 kpb, según la especie y los minicírculos con tamaños que van desde 0,45 hasta 2,5 kpb en las distintas especies consideradas.

Los círculos están cerrados y tanto los maxi como los minicírculos están concatenados en una unidad estructural, ubicándose los círculos más grandes en la periferia (Fig. 3). Los maxicírculos son análogos al ADN mitocondrial de otros eucariotas ya que contienen genes estructurales que codifican diferentes funciones mitocondriales.

Figura 2. Fotografía de la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi* al microscopio electrónico. Flagelo (F), Kinetoplasto (K), Kariosoma (Ka), Mitocondria (M), Núcleo (N) y Vacuola citoplasmática (V). Barra= 1 μ m. Tomado de Kerschmann y col., 1989.



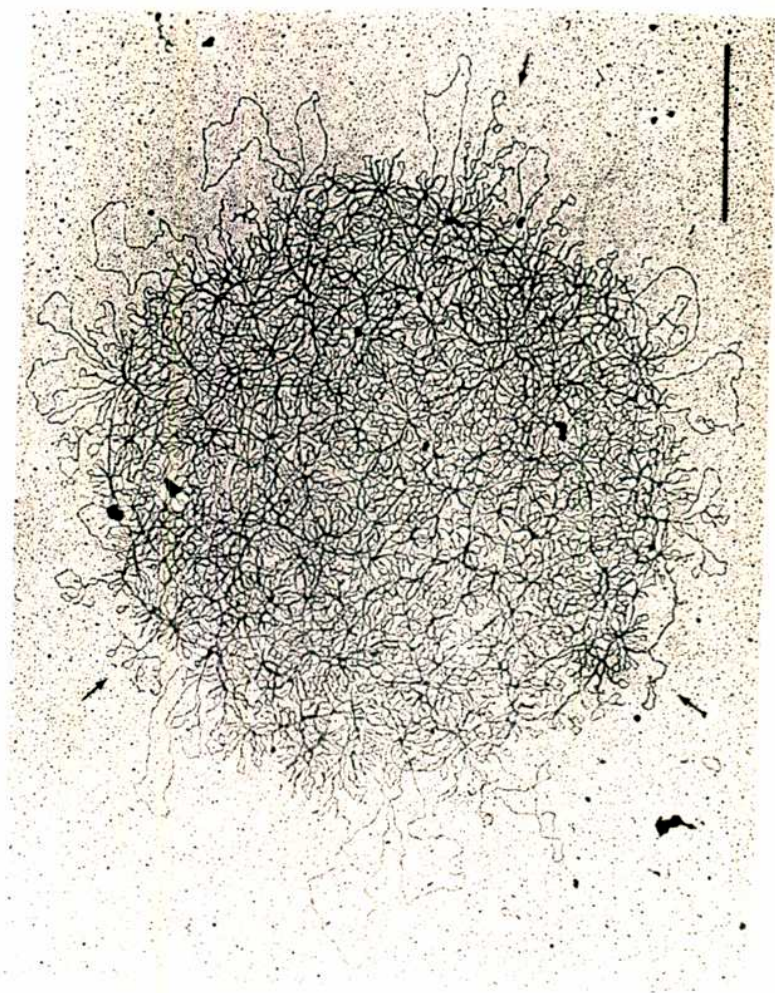
1.4.1 Maxicírculos.

El número de maxicírculos varía entre 20 y 50 por célula. Todas las moléculas de un organismo son homólogas entre sí. La organización básica de un maxicírculo consiste de una región informacional activamente transcrita, que contiene los genes para el ARN ribosomal y genes estructurales mitocondriales y una región variable o divergente que no se transcribe que posee secuencias repetidas de función desconocida.

Se conoce la secuencia nucleotídica de la región informacional y parte de las regiones divergentes de los maxicírculos de diferentes especies (Simpson y col., 1987 y Simpson, 1987). Se identificaron los siguientes genes estructurales: subunidades I, II y III de la citocromo oxidasa (Cox); citocromo b (Cyb); subunidades 1, 4 y 5 de la NAD deshidrogenasa (ND). Además se encontraron varios marcos de lectura abiertos que representan secuencias que codifican diferentes proteínas. Se los conoce como "ORF" (open reading frames). Se consideran genes funcionales ya que se transcriben y están conservados en diferentes especies como *Leishmania tarentolae* y *Trypanosoma brucei*. Los ARN ribosomales 9S y 12S son los ARN más abundantes y estables en fracciones de kinetoplastos purificados de varias especies diferentes (Simpson, L y Simpson, A; 1978). Ellos representan los ARN ribosomales más pequeños descritos hasta el momento, sus tamaños son de 658 y 1256 bases respectivamente (Eperon y col, 1983).

El gen de la Cox II presenta una organización especial. Hay un cambio de marco de lectura de una base en el aminoácido 170. Esta peculiaridad se observa en tres especies diferentes (Hensgens y col., 1984; Payne y col., 1985 y De la Cruz y col., 1984). Benne y col. en 1986 demostraron que el transcripto codificado por este gen poseía cuatro nucleótidos extra en la región del

Figura 3. Fotografía de una red de ADNk al microscopio electrónico. En el borde de la malla se encuentran los maxicírculos, algunos de los cuales están superenrollados (flechas). Barra= 1 μm . Tomado de Borst y Hoeijmakers, 1979.



cambio de marco de lectura. Estos nucleótidos que no están codificados en el ADN restauran el marco de lectura original y su agregado permite la síntesis de una proteína funcional. Este hallazgo permitió describir un nuevo mecanismo en la regulación de la expresión de genes llamado "editado de ARN". Este mecanismo fue posteriormente descrito en otros genes mitocondriales de los tripanosomatidos como Cyb y ORF 3 y en genes nucleares de mamíferos (Van der Spek y col., 1988; Benne, 1989 y Tennyson y col, 1989). Recientemente se demostró que el "editado de ARN" se puede realizar también mediante la delección de bases codificadas en el ADN mitocondrial de tripanosomátidos (Shaw y col., 1988).

1.4.2 Minicírculos.

Estas moléculas constituyen entre el 90 y el 95 % del ADNk de los tripanosomátidos. En cada malla de ADNk hay miles de minicírculos, entre 5×10^3 y 3×10^4 moléculas por célula. En la mayoría de las especies hay más de una clase de secuencia de minicírculo por célula. Los tamaños varían de acuerdo a la especie considerada; desde 465 pb en *Trypanosoma vivax* (Borst y col., 1985) hasta 2515 pb en *Crithidia fasciculata* (Birkenmeyer, 1985). Todos los minicírculos analizados demostraron tener el mismo tipo de organización genómica, pequeñas regiones conservadas y largas regiones variables. Las regiones conservadas tienen similitud de secuencia en todas las subpoblaciones de minicírculos de una cepa o especie. Las regiones variables son de diferente secuencia en las distintas subpoblaciones de minicírculos de un organismo. La organización más simple se encontró en *T. brucei*, *T. equiperdum* y *L. tarentolae*, donde hay una sola región conservada. Los minicírculos de 1 kpb de *T. brucei* poseen una sola región conservada de 130 pb muy similar a la encontrada en *T. equiperdum* (Barrois y col, 1981 y Jasmer y Stuart, 1986). Todos los minicírculos de *L. tarentolae* secuenciados mostraron tener una sola región conservada (Kidane y col., 1984). Los minicírculos de *C. fasciculata* tienen en cambio, dos regiones conservadas de 173 y 177 pb situadas a 180° una de la otra (Sugisaki y Ray, 1987). En *T. lewisi*, los minicírculos de 1 kpb poseen dos regiones

conservadas de 95 pb cada una (Ponzi y col., 1984). *T. cruzi* tiene minicírculos de 1,4 kpb de longitud que poseen cuatro regiones conservadas situadas a intervalos de 90° una de la otra (Leon y col., 1980; Frasch y col., 1984 y Sánchez, 1986).

La heterogeneidad de las regiones variables difieren de una especie a otra. El caso mas extremo es el de los tripanosomas africanos. *T. brucei* posee, al menos, 200 ó 300 clases de secuencias o subpoblaciones de minicírculos diferentes en la misma célula (Stuart, 1979). En una cepa de laboratorio de *C. fasciculata* se estimó que existen 13 subpoblaciones diferentes de minicírculos (Hoeijmakers y col., 1982). En cambio, en otra cepa diferente de la misma especie se determinó que el 90% de los minicírculos de una célula eran iguales (Birkenmeyer y col., 1985). Hay dos especies de kinetoplástidos que poseen poblaciones de minicírculos homogéneos en una célula. En *T. evansi* y en *T. equiperdum* la casi totalidad de los minicírculos presentes en un organismo son iguales en secuencia (Riou y Barrois, 1979; Frasch y col., 1980 y Barrois y col., 1982). Estas dos especies son probablemente variantes genéticas de *T. brucei* que perdieron la capacidad de desarrollarse en el insecto vector y por lo tanto se transmiten por contaminación o sexualmente. *T. evansi* carece de maxicírculos mientras *T. equiperdum* los tiene modificados (Fairlamb y col., 1978 y Frasch y col., 1980). Tal vez esta sea la razón de la presencia de minicírculos homogéneos en estas dos especies. En la mayoría de las especies la presencia de minicírculos heterogéneos en secuencia parece correlacionarse con maxicírculos funcionales.

1.4.2.1 Heterogeneidad de secuencia como herramienta epidemiológica.

La gran heterogeneidad observada en la secuencia de los minicírculos de una célula y entre diferentes cepas de una misma especie es una importante herramienta epidemiológica. Los tripanosomas africanos (*T. brucei*) poseen una gran complejidad en la secuencia de sus minicírculos, estas moléculas, por lo tanto, no son útiles para diferenciar distintas cepas o "stocks" de la misma especie. En *Leishmania* y *T. cruzi* el caso es diferente. Los

minicírculos tienen menor complejidad en su secuencia y se pueden usar como marcadores para diferenciar distintas cepas o aislamientos (ver 1.3.2)(Morel y col., 1980; Frasch y col., 1981; Lopes y Wirth, 1986)

1.4.2.2 Función de los minicírculos.

Durante muchos años se desconocía la función de los minicírculos en el ADN kinetoplástico. Las secuencias de minicírculos publicadas no presentan marcos de lectura abiertos largos (Chen y Donelson, 1980; Kidane y col., 1984; Ponzi y col., 1984; Jasmer y Stuart, 1986; Sugisaki y col., 1987). Los marcos de lectura abiertos vistos en diferentes especies no poseen secuencias de aminoácidos en común. Estas características llevaron a pensar que los minicírculos no codifican ninguna proteína estable y con una función común a todas las especies.

Se realizaron grandes esfuerzos para detectar la presencia de algún ARNm codificado por los minicírculos en diferentes especies de tripanosomátidos. La mayoría de los resultados fueron negativos (Hoeijmakers y Borst, 1982; Stuart y Gelvin, 1982 y Stuart, 1983). Sólo dos laboratorios describieron la presencia de transcritos específicos de minicírculos. Fouts y Wolstenholme en 1979 reportaron la existencia de un transcrito de 240 nucleótidos codificado por el minicírculo de 2500 pb de *C. acanthocephali*. Este transcrito se encontró en iguales concentraciones en el citoplasma y en la mitocondria del parásito. En 1987, Pietrzak Rohrer y col. describieron la presencia de un transcrito de 240 nucleótidos en *T. brucei*. El mensajero fue encontrado en ambos estadios del parásito y está enriquecido en preparados de mitocondrias puras. Los autores sugirieron que el transcrito hallado por ellos podría cumplir una función estructural o servir como un *primer* largo para el inicio de la replicación del minicírculo. Shlomani y Zadok en 1984 clonaron fragmentos de minicírculos de *Crithidia fasciculata* en vectores de expresión bacterianos. Sueros preparados contra una de las proteínas de fusión reaccionó específicamente contra antígenos de *Crithidia fasciculata*. Esta sería una evidencia indirecta de que los minicírculos se traducen y que el verdadero rol de ésta u otras proteínas en el ciclo biológico del parásito es desconocido. La mayoría de los estudios

sugieran que los minicírculos cumplirían un rol estructural en la mitocondria de los tripanosomátidos actuando como un esqueleto para los maxicírculos (Borst y Hoeijmakers, 1979), formando una malla involucrada en la segregación de los maxicírculos durante la división de la mitocondria (Hoeijmakers y Weijers, 1980) o en la regulación de la transcripción de los maxicírculos (Michelotti y Hajduk, 1987).

Una característica encontrada en los minicírculos de casi todas las especies estudiadas es la presencia de una curvatura en la molécula (Marini y col., 1982). Esta estructura altera la movilidad electroforética de una molécula de ADN cuando se corre en geles de poliacrilamida. Por ejemplo, una molécula que tiene un peso molecular aparente de 459 pb corrida en geles de agarosa 1%, cuando se la corre en un gel de poliacrilamida 12% migra como si tuviera 1380 pb (Marini y col., 1982). La secuenciación de esa molécula demostró que la misma tenía un tamaño de 414 pb (Marini y col., 1983). La curvatura se debe a una secuencia particular compuesta por corridas de 5-6 adeninas repetidas varias veces. El segmento repetido varias veces es CA₅₋₆T (Kidane y col., 1984). Cada unidad repetida produce una pequeña curvatura que sumadas dan la curvatura total de la molécula (Sook Koo y col., 1986). Esta estructura se encontró en minicírculos de las especies *T. brucei*, *Herpetomonas muscarum*, *C. fasciculata* y *T. equiperdum* (Ntambi y col., 1984). En los minicírculos de *T. cruzi* no se encontró curvatura alguna (Morel y col., 1980). La curvatura podría tener un papel importante en el empaquetamiento de los minicírculos en la malla del kinetoplasto o ser un sitio de unión para algunas proteínas (Marini y col., 1982). Si esto fuera cierto, los minicírculos de *T. cruzi* carecerían de esa función ya que no poseen curvatura alguna en toda su extensión.

Recientemente Sturm y Simpson demostraron que en *L. tarentolae* las regiones variables de los minicírculos codifican un ARN guía que sirve como templado para llevar a cabo el proceso de editado del transcripto que codifica la subunidad III de la Citocromo oxidasa mitocondrial (Sturm y Simpson, 1990).

1.4.2.3 Evolución de los minicírculos.

Se demostró que, en algunas especies de tripanosomátidos los minicírculos pueden evolucionar muy rápidamente, de manera que en pocos años se producen alteraciones en los perfiles de minicírculos de una cepa cortados por diferentes enzimas de restricción (Simpson y col., 1980; Borst y col., 1981 y Sánchez y col., 1984). Jasmer y Stuart en 1986 demostraron que los minicírculos de *T. brucei* contienen secuencias de 18 pb repetidas en forma invertida. Estas repeticiones flanquean un segmento de 102-110 pb conservado en las diferentes poblaciones de minicírculos. Ellos sugieren que estas secuencias parecidas a transposones jugarían un rol importante en el desarrollo de la diversidad de secuencia observada en este grupo de parásitos. Sin embargo, tales secuencias están ausentes en los minicírculos de *L. tarentolae*, *T. lewisi* y *T. cruzi*. Por lo tanto no representarían un mecanismo general para generar diversidad de secuencias en minicírculos. La recombinación, amplificación, deleción y las mutaciones puntuales contribuirían para originar esa diversidad (Jasmer y Stuart, 1986).

A pesar de la diversidad de secuencia entre los diferentes minicírculos de los tripanosomas africanos, la organización de las moléculas se mantiene aún entre diferentes especies (Jasmer y Stuart, 1986). Este hecho sugiere que la importancia biológica de los minicírculos radica en su estructura y no en una secuencia de nucleótidos específica (Marini y col., 1982). La organización de los minicírculos en una región conservada y una variable es una regla general de los tripanosomátidos. En *T. cruzi* hay cuatro regiones conservadas por molécula, lo que sugiere que los minicírculos de esta especie podrían haberse generado por duplicaciones de una molécula ancestral de tamaño mas pequeño en el curso de la evolución (Frasch y col., 1981).

1.4.3 Replicación del ADNk.

La síntesis del ADNk ocurre sólo durante un tiempo limitado en la fase S del ciclo celular y es sincrónica con la síntesis del ADNn (Cosgrove y Skeen, 1970).

1.4.3.1 Replicación de minicírculos.

Antes de la replicación, en la fase G_1 del ciclo celular, la malla de ADNk contiene miles de minicírculos concatenados, covalentemente cerrados. A esta malla se la llama Forma I (Englund, 1978). Cuando se inicia la fase S, se liberan de la malla minicírculos por acción de una "topoisomerasa". Los minicírculos liberados, covalentemente cerrados se replican como estructuras "theta" dando una progenie de dos minicírculos con un "nick" o un "gap". Luego de la replicación otra enzima, probablemente otra topoisomerasa devuelve las moléculas hijas a la malla. Las moléculas se vuelven a concatenar en la periferia de la malla de ADNk. La malla en replicación tiene dos zonas, una interna con minicírculos covalentemente cerrados, sin replicar y una externa con moléculas replicadas, vueltas a concatenar y con un "gap" o "nick". Los "gaps" o "nicks" actuarían como señal para que la topoisomerasa no vuelva a sacar un minicírculo ya replicado y éste se divida dos veces. Cuando concluye la fase S del ciclo celular, todos los minicírculos de una malla se replicaron y poseen un "gap" o "nick". La malla tiene el doble tamaño que la original y se denomina Forma II. En algún momento de la fase G_2 del ciclo celular se produce la separación física de las dos mallas hijas y el cerrado covalente de todas las moléculas de minicírculos. El resultado final son dos mallas de Forma I indistinguibles de la parental, que segrega una a cada célula hija durante la división celular (Englund, 1978; Englund, 1979 y Ryan y col., 1988).

1.4.3.2 Replicación de maxicírculos.

La replicación de los maxicírculos ocurre al mismo tiempo que los minicírculos y probablemente cada maxicírculo se replica una sola vez por generación. Los maxicírculos se replican por el mecanismo de círculo rodante mientras permanecen unidos a la malla de ADNk (Hajduk y col., 1984).

1.5 Organización y estructura del ADN nuclear.

Poco se conoce sobre la organización cromosómica en los tripanosomátidos. Una limitación importante en esta área de estudio es el hecho de que los cromosomas de los tripanosomátidos no se condensan en ninguna etapa del ciclo celular (Solari, 1980).

La utilización de la técnica de fraccionamiento de cromosomas por electroforesis de pulsos alternados de campos eléctricos perpendiculares (PFGE, Pulse Field Gel Electrophoresis) es una herramienta muy útil para estudiar el genoma de los tripanosomas (Schwartz y Cantor, 1984; Van der Ploeg y col., 1984). Con esta técnica se demostró que los cromosomas de algunos parásitos son mucho más variables que los del resto de los organismos eucariotes. En tripanosomas africanos los genes que codifican glicoproteínas de superficie se mueven de un cromosoma a otro durante su activación dando lugar a cambios de tamaños de los cromosomas involucrados en el reordenamiento (Van der Ploeg y col., 1984; Van der Ploeg y col., 1984a). En *Plasmodium falciparum* se observaron variaciones de tamaño en cromosomas genéticamente equivalentes de tres aislamientos de parásitos diferentes (Kemp y col., 1987). Los polimorfismos cromosómicos de *P. falciparum* parecen deberse a recombinación homóloga de secuencias repetidas subteloméricas (Corcoran y col., 1988). En *T. cruzi* hay una gran heterogeneidad en el tamaño de los cromosomas genéticamente equivalentes entre diferentes cepas y clones. Esto se observó tanto utilizando genes heterólogos (*T. brucei*) como genes homólogos (*T. cruzi*) (Gibson y Miles, 1986; Engman y col., 1987 y Henriksson y col., 1990).

Estudios de patrones isoenzimáticos sugieren la presencia de un genoma diploide tanto en *T. brucei* (Tait, 1980) como en *T. cruzi* (Tibayrenc y col., 1986). Análisis por PFGE indican que *T. brucei* es diploide (Gibson y col., 1985 y Gibson y Borst, 1986). Estudios llevados a cabo con esta técnica en *T. cruzi* sugieren diploidía también en este parásito. Para ello se usaron sondas de genes conservados de *T. brucei* (Gibson y Miles, 1986) o sondas de genes que codifican antígenos importantes en las infecciones naturales de *T. cruzi* (Henriksson y col., 1990).

1.5.1 Genes que codifican antígenos de *T. cruzi*.

Snary y Hudson en 1979 describieron la presencia de una glicoproteína mayoritaria en la superficie de *T. cruzi*. Encontraron la misma glicoproteína en los tres estadios del parásito. Actualmente, hay descritas varias proteínas de superficie de *T. cruzi*, muchas de las cuales son específicas de estadio (Yoshida, 1986; Teixeira y Yoshida, 1986). Se caracterizaron moléculas específicas de estadio involucradas en diferenciación (Sher y Snary, 1982), unión de parásitos a fibronectina (Ouaisi y col., 1986), penetración a células huésped (Andrews y col., 1984) y resistencia a lisis mediada por complemento. La composición antigénica de *T. cruzi* es muy compleja. Dilucidar esta complejidad ayudaría no sólo a conocer mejor la biología del parásito, sino a encontrar moléculas útiles para ser aplicadas a problemas prácticos como diagnóstico y vacunación.

En varios laboratorios utilizando técnicas de ingeniería genética se clonaron genes o secuencias parciales de genes que codifican antígenos de *T. cruzi*. Algunos genes codifican antígenos de superficie específicos del estadio tripomastigote (Peterson y col., 1986; Beard y col., 1986; Levin y col., 1989 y Takle y col., 1989). En nuestro laboratorio se aislaron diferentes clones que codifican antígenos de *T. cruzi* (Ibañez y col., 1987). Ocho de esos antígenos están formados por secuencias de aminoácidos repetidos en tandem (Ibañez y col., 1988). Algunos de los antígenos son reconocidos por un gran número de sueros de pacientes chagásicos obtenidos en Chile, Brasil y Argentina. Sueros de pacientes con Leishmaniasis o Toxoplasmosis no reconocen estos antígenos, lo que demuestra que son potencialmente útiles en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Frasch y col., 1987). A uno de los antígenos se lo denominó SAPA (Shed Acute Phase Antigen) ya que es secretado durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas (Affranchino y col., 1989). Anticuerpos contra SAPA están presentes en un 93% de los sueros de pacientes chagásicos con sintomatología aguda de la enfermedad. SAPA siendo un buen marcador de la fase aguda de la enfermedad; la detección de anticuerpos anti SAPA en el cordón umbilical de un recién nacido permite

diferenciar niños con una infección congénita de aquellos que no están infectados (Reyes y col., 1990).

OBJETIVOS

Los minicírculos del ADNk de *T. cruzi* demostraron ser heterogéneos en secuencia dando lugar a la presencia de varias subpoblaciones de minicírculos en un mismo parásito. El primer objetivo de nuestro trabajo fué estudiar la existencia de aislamientos o clones de parásitos que posean subpoblaciones homogéneas de minicírculos. Además se analizó la presencia de polimorfismos en esas subpoblaciones homogéneas.

En segundo lugar, se estudiaron los mecanismos responsables de la aparición de polimorfismos para sitios de enzimas de restricción en las subpoblaciones homogéneas de minicírculos. Ellos pueden ser el origen de la heterogeneidad característica en la secuencia de nucleótidos de los minicírculos de *T. cruzi*.

Se utilizaron minicírculos clonados y ADNk total como sondas radiactivas para agrupar aquellos aislamientos o clones de *T. cruzi* que poseen minicírculos homólogos entre sí. Se analizó la presencia de minicírculos específicos de aislamientos o clones de parásitos y se llevó a cabo un estudio epidemiológico de organismos de diferentes orígenes geográficos para estudiar la heterogeneidad de *T. cruzi* en la naturaleza.

Por último, se analizó el grado de conservación de diferentes genes nucleares en distintos aislamientos de *T. cruzi*. Se comparó la heterogeneidad encontrada en los minicírculos del parásito con los polimorfismos para sitios de enzimas de restricción existentes en los genes nucleares utilizados para este estudio.

Se utilizaron técnicas de taxonomía numérica para analizar los resultados con sondas de ADNk y de ADNn y se compararon los datos obtenidos para determinar la validez de la utilización de sondas de ADNk como criterio taxonómico.

MATERIALES Y METODOS.

2.1 Materiales.

2.1.1 Origen y calidad de los reactivos utilizados.

Los reactivos utilizados fueron de grado de pureza analítico, salvo en los casos en que fuera necesario un grado de pureza mayor, lo que se indica a continuación:

Acrilamida	BRL(purificada especialmente para electroforesis)
ADN de esperma de salmón	Sigma
Agarosa (baja Electroendosmosis)	Sigma o BRL (para electroforesis)
Ampicilina trihidrato	Sigma
Bacto triptona	Difco
Cloroformo	Merck
N'N'-metilen bisacrilamida	BRL(purificada especialmente para electroforesis)
Etanol	Merck
Ficoll 400	Sigma
IPTG	Sigma o BRL
Sephadex	Pharmacia
Sodio dodecil Sulfato (SDS)	BDH (especialmente puro)
Trizma base (Tris)	Sigma

2.1.2 Enzimas.

Las enzimas utilizadas se adquirieron en diferentes compañías.

ADN polimerasa I (fragmento Klenow)	BRL
DNAsa I	Sigma
Endonucleasas de restricción	BRL, IBI, Biolabs
Fosfatasa alcalina	BRL
Lisozima	Sigma
Mezcla para <i>Nick translation</i>	BRL, IBI

(DNAsal, Fragmento Klenow)	
Proteinasa K	Sigma
RNasa A	Sigma
T4 DNA ligasa	Promega

2.1.3 Productos radiactivos.

Todos los materiales radiactivos se adquirieron en New England Nuclear (NEN)

Los dNTPs ($\alpha^{32}\text{P}$) radiactivos se hallaban en solución acuosa, en una concentración de 10 mCi/ml; con una actividad específica de 3000 Ci/mM

2.1.4 Medios de cultivo.

A) Medios para cultivar bacterias (Maniatis y col., 1982).

-LB *Luria Broth*: 10 g de Bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl (Cloruro de sodio) en 1 litro de agua, se ajustó a pH 7,5 con NaOH (Hidróxido de sodio)

-LB *agar*: Al medio descrito anteriormente se le agregó 15 g de agar por cada litro de medio de cultivo

-LB *top agar*: Al medio descrito en primer término se le agregó 0,7 g de agar por cada litro de medio.

B) Medios para cultivar parásitos.

i) Medio para *T. cruzi*: Infusión cerebro-corazón, 33 g/l ; Triptosa (Difco), 3 g/l; $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, 4 g/l; KCl, 0,4 g/l y glucosa 0,3 g/l (además de los aproximadamente 1,7 g agregados como parte de la infusión cerebro-corazón).

El pH fue aproximadamente 7,5 sin necesidad de ajuste. Luego de la esterilización se agregó antibiótico (2.1.5.B), hemina (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(1 ml de una solución de hemina 2 g/l en NaOH 0,1N por cada litro de medio de cultivo) y se suplementó con 10% (v/v) suero fetal bovino inactivado por calor (45 min a 56° C)(Cazzulo y col., 1985).

ii) Medio bifásico: fase sólida compuesta por el medio descrito anteriormente con 2% (p/v) de agar, se autoclavó y luego se agregó 10% (v/v) de sangre desfibrinada de conejo con antibiótico. Se volcaron 3 ml en un vial y

se dejó gelificar. Luego se agregaron 3 ml del medio líquido descrito en la sección 2.1.4.B.1.

Todos los medios se esterilizaron en autoclave 15 min a 1,5 atmósferas.

2.1.5 Antibióticos.

A) Selección de bacterias. (Maniatis y col., 1982).

Las soluciones madres de antibióticos se esterilizaron por filtración a través de membranas Millipore de 0,44 μm de poro y se conservaron a -20°C . Estas soluciones se agregaron a los medios de cultivo esterilizados por autoclave. Luego de esterilizados, los medios se enfriaron hasta una temperatura de aproximadamente 50°C antes de agregar los antibióticos. Esto se realizó para impedir que los antibióticos se dañen por el calor excesivo. Las soluciones madres utilizadas tenían las siguientes concentraciones:

Ampicilina, 100 mg/ml en agua destilada. Se utilizó como antibiótico selectivo en una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Tetraciclina, 20 mg/ml en agua destilada. Se utilizó como antibiótico selectivo en una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$.

B) Prevención de infección en cultivos de parásitos.

Al medio líquido descrito en la sección 2.1.4.B.1 se le agregó penicilina (100 UI/ml) y estreptomycinina (100 $\mu\text{g/ml}$).

2.1.6 Cepas de bacterias utilizadas.

Todas las cepas fueron de la familia *Escherichia coli* K-12.

MC1061 (Casadaban y Cohen, 1980) F^{-} , ara D139, (ara leu) 7697,

$\Delta\text{lac X74}$, gal U^{-} , gal K^{-} ,

hsr $^{-}$, hsm $^{+}$, str A.

JM101 (Messing, 1979):

$\Delta(\text{lac-proAB})$, sup E, thi,

(F tra D 36, proAB, lac I q ,

Z M15)

HB101 (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969): F^{-} , hsd S20 (r_B^{-} , m_B^{-}),

rec A $_{13}$, $\Delta\text{ara-14}$, pro A $_2$

lacY1, gal K2, rps L20(Sm R),

Xyls, mt1-1, supE44, λ^-

2.1.7 Cepas y Clones de Parásitos.

En todos los experimentos se usó el estadio epimastigote de *T. cruzi*.

Se utilizaron las siguientes cepas:

CA1: aislado en diciembre de 1974 de un paciente con miocarditis chagásica crónica de la provincia de San Luis, República Argentina. Esta cepa no produce infecciones letales en ratón, produce la máxima parasitemia entre los 25 y 30 días post-infección, siendo detectable la presencia de parásitos aún 12-18 meses post-infección (González Cappa y col., 1980).

Por xenodiagnóstico de un perro infectado con la cepa CA1 se obtuvieron parásitos que se usaron para obtener clones (Engel y col., 1982).

Los clones utilizados en este trabajo fueron: CA1-65, 69, 70, 71, 72, 73 y 78.

Miranda: aislada de un paciente con infección asintomática crónica, de la provincia de Santiago del Estero, República Argentina. De esta cepa también se obtuvieron clones (Engel y col., 1982).

En este trabajo se utilizaron los clones:

Miranda-75, 77, 80, 81, 83, 84 y 88.

Los clones de parásitos de las cepas CA1 y Miranda fueron cedidos por el Dr. J.C.Engel.

Tulahuén (Tul 0): aislada de un triatomíneo de Chile (Pizzi, 1956).

AWP: aislada en Santiago del Estero en abril de 1970, de un niño con una infección aguda.

Las cepas Tul 0 y AWP fueron cedidas por el Dr. J.J. Cazzulo. El origen de las restantes cepas y clones de parásitos utilizados en esta tesis doctoral serán descritos oportunamente.

2.1.8 Plásmidos.

pBR322 (Bolivar y col., 1977).

M13mp18 (Yanish-Perron y col., 1985).

M13mp19 (Yanish-Perron y col., 1985).

2.1.9 Soluciones amortiguadoras utilizadas (*Buffers*).

20 x SSC: NaCl 3M, citrato de sodio 0,3 M.

10 x TBE: Tris-HCl 1 M, ácido bórico 1 M, EDTA 30 mM.

TE: Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM.

2.2 Cultivos de parásitos.

2.2.A) Cultivos axénicos de parásitos.

Los epimastigotes se cultivaron a 28^o C en el medio descrito en la sección 2.1.4.B.i (Cazzulo y col., 1985). Se sembraron a partir de precultivos en fase logarítmica en frascos Roux conteniendo 100 ml de medio de cultivo. Los parásitos se cosecharon en la fase logarítmica tardía del cultivo y se lavaron 3 veces con NaCl 0,15 M.

2.2.B) Cultivos primarios de parásitos.

Tanto a las vinchucas colectadas en el campo como a aquellas infectadas en los xenodiagnósticos se les extrajo el intestino, éste se dividió en dos partes y cada una de ellas se introdujo en un tubo con medio bifásico (2.1.4.B.ii). Los intestinos se incubaron a 28^oC hasta obtener una densidad de parásitos suficientes para pasar a medio líquido (aproximadamente 45 días). De aquí en más los cultivos se continuaron como se indica en 2.2.A.

2.3 Técnicas comúnmente utilizadas para la purificación y concentración de ácidos nucleicos.

2.3.1 Precipitación con etanol.

Los ácidos nucleicos en solución se recuperaron por precipitación con etanol (Maniatis y col., 1982). La solución acuosa se llevó a una concentración final de 0,3 M de acetato de sodio por el agregado de 0,1 volúmenes de una

solución madre 3 M (pH 5,2). Luego se agregó 2 volúmenes de etanol y los ácidos nucleicos se precipitaron durante 24 h a -20°C ó 30 min a -70°C . El ADN se centrifugó a 12.000 g, 30 min a 4°C . El precipitado se lavó con etanol 70% (v/v) para remover toda traza de sales, se secó y luego se resuspendió en amortiguador TE (2.1.9) o agua destilada.

2.3.2 Extracción con solventes orgánicos.

El ADN en solución se purificó de proteínas contaminantes por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:48:2, v/v) (Maniatis y col., 1982). A la solución acuosa de ADN se le agregó un volumen igual de 50% fenol/50% cloroformo (equilibrado en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, conservado en oscuridad a 4°C); la solución se mezcló con vortex por un período de 30 s. Luego se separaron las fases centrifugando 5 min en microcentrífuga y se tomó la fase acuosa (fase superior). Algunas veces se reextrajo la fase orgánica con un volumen igual de amortiguador TE. La fase acuosa se continuó extrayendo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para luego realizar una última extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v). El ADN se recuperó finalmente por precipitación con etanol (2.3.1).

2.4 Aislamiento y Purificación de ácidos nucleicos.

2.4.1 Purificación de ADNk (kinetoplástico).

La alta densidad de la malla de ADNk permite separarla fácilmente del ADNn por centrifugación diferencial luego de la ruptura y desproteización de los parásitos.

Los cultivos de epimastigotes se cosecharon por centrifugación diferencial a 3.000 g, 10 min a 4°C y se lavaron 3 veces con NaCl 0,154 M.

El precipitado de parásitos se resuspendió en solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM y EDTA 100 mM. Se utilizó 1 ml de solución por cada 100 mg de precipitado de parásitos. Los parásitos en suspensión se lisan por el agregado de SDS a una concentración final de 1%. El lisado de parásitos se incubó con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Proteinasa K durante 2 h a

37°C (con agitación suave cabeza-cola cada 15 min). El lisado proteico se extrajo varias veces con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico hasta la desaparición de proteínas en la interfase. Se realizó una última extracción con cloroformo:alcohol isoamilico. El ADNk se sedimentó por centrifugación diferencial a 20.000 g, 2 h a 4°C. El sobrenadante se guardó para la preparación de ADNn (2.4.2) mientras que el precipitado conteniendo ADNk se resuspendió en 1/10 del volumen original de solución amortiguadora TE. Se incubó nuevamente con SDS (0,5% final) y Proteinasa K (30 µg/ml final) durante 2 h a 37°C. Luego se extrajo nuevamente con solventes orgánicos (2.3.2). El ADNk se precipitó por el agregado de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C. Se colocó toda la noche a -20°C y luego se centrifugó a 12.000 g, 30 min a 4°C. El precipitado de ADNk se lavó con etanol 70% y se volvió a centrifugar en las condiciones descriptas anteriormente. Se volcó el sobrenadante y el precipitado se secó para luego ser resuspendido en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 0,1 mM (1/100 del volumen original).

2.4.2 Purificación de ADNn (nuclear).

Para obtener ADNn de tripanosomas se utilizó el protocolo descrito en la sección anterior hasta el paso de centrifugación diferencial. En ese punto al sobrenadante se lo desproteinizó incubandolo 2 h a 37°C con SDS (0,5 % final) y Proteinasa K (30 µg/ml final).

Luego se realizaron varias extracciones con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico, hasta desaparición de proteínas en la interfase. El ADNn se precipitó por el agregado de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó precipitar toda la noche a -20°C y posteriormente se centrifugó a 12.000 g, 30 min a 4°C. El precipitado de ADNn se lavó con etanol 70% y se volvió a centrifugar a 12.000 g, 30 min a 4°C. Se volcó el sobrenadante y el precipitado se secó para luego ser resuspendido en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 0,1 mM.

2.4.3 Prueba de calidad del ADN.

Para comprobar la ausencia de DNAsas contaminantes se incubó una alícuota del ADN en solución amortiguada para enzimas de restricción con el agregado de Mg^{2+} , 2 h a 37°C. El ADN tratado de esta manera se comparó por electroforesis en geles de agarosa con una muestra de ADN sin incubar para corroborar la ausencia de degradación. Para verificar la ausencia de impurezas, una alícuota del ADN se digirió con diferentes enzimas de restricción. Se comprobó la digestión del ADN por electroforesis en geles de agarosa 1%.

2.4.4 Purificación de ADN plasmídico en pequeña escala.

La purificación de ADN plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979).

Se incubaron 5 ml de medio LB (2.1.4.A) con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de concentración final) con una colonia de bacterias transformadas. Se incubó toda la noche a 37°C con agitación vigorosa para permitir una buena aireación. Posteriormente se centrifugó 1,5 ml del cultivo a 10.000 g, 1 min a temperatura ambiente. El resto del cultivo se guardó a 4°C. Se descartó el sobrenadante, dejando el precipitado lo más seco posible. Este se resuspendió con vortex en 100 μl de una solución previamente enfriada de glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8,0) y Lisozima 4 mg/ml (preparada en el momento). Se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 200 μl de una solución fría y recién preparada de NaOH 0,2 N, SDS 1%. Se mezcló por inversión 2 ó 3 veces y se incubó 5 min a 0°C. Luego a esta mezcla se le agregó 150 μl de una solución fría de acetato de potasio 5 M (pH aproximado 4,8). Se mezcló en vortex durante 10 s y se incubó 5 min en hielo. A continuación se centrifugó a 10.000 g, 5 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Se mezcló en vortex. Luego se centrifugó a 10.000 g, 2 min, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se le agregó 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente. Se dejó 2 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 10.000 g, 5 min a temperatura

ambiente. Se descartó el sobrenadante y se dejó el tubo en posición invertida sobre papel absorbente. Se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70%. Se volvió a centrifugar, se descartó el sobrenadante y el precipitado se secó para luego resuspenderlo en 50 μ l de una solución de TE conteniendo 20 μ g/ml de RNAsa A previamente calentada 15 min a 100 °C para eliminar cualquier posible contaminación con DNAsas. Se incubó 30 min a 37°C para que actúe la enzima y luego el ADN se precipitó (2.3.1), se resuspendió en 50 μ l de TE y se conservó a -20°C. El rendimiento aproximado fue de 1-1,5 μ g de ADN por ml de cultivo.

2.4.5 Purificación de ADN plasmídico en gran escala.

Cuando se requería una gran cantidad de ADN plasmídico y con un alto grado de pureza, se utilizó el método de lisis alcalina en gran escala, seguido de una centrifugación en gradiente de CsCl (Maniatis y col., 1982)

Se inocularon 10 ml de medio LB (2.1.4.A) con ampicilina (2.1.5) con una colonia de bacterias transformadas. Se incubó toda la noche con agitación vigorosa a 37°C. Se utilizó 5 ml de este cultivo para inocular 500 ml de LB con antibiótico en un erlenmeyer de 2 l. Este segundo cultivo se incubó con agitación vigorosa toda la noche a 37°C. El cultivo de bacterias se cosechó por centrifugación a 5.000 g, 20 min a 4°C. El método de purificación es esencialmente el mismo que el descrito en 2.4.4. Los volúmenes de trabajo son 100 veces mayores.

El ADN se resuspendió en un volumen de 5 ml de TE y se purificó por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio.

Se agregó 1 g de cloruro de cesio sólido y 100 μ l de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml en agua) por cada ml de solución. La densidad de la solución es de 1,55 g/ml y la concentración de bromuro de etidio es aproximadamente de 600 μ g/ml. Se mezcló bien y se ultracentrifugó en rotor 50 Ti a 40.000 rpm, 30-35 h a 20°C. La banda inferior conteniendo el plásmido se separó cuidadosamente y se extrajo varias veces (más de 5) con un volumen de butanol saturado en agua. La solución con ADN se dializó contra varios cambios de 1 l de TE. El rendimiento aproximado fue de 400 μ g de ADN por cada 500 ml de cultivo.

2.4.6 Purificación de ADN simple cadena del fago M13.

Se purificó ADN simple cadena del bacteriofago M13 a partir del sobrenadante de bacterias infectadas.

Se realizó un cultivo de toda la noche de bacterias JM101. Una gota de este cultivo se diluyó en 25 ml de medio LB y se alicuotó en viales de 1,5 ml. Cada alícuota se incubó con fagos de una placa de retardo independiente durante 5-6 h con agitación a 37°C. Se centrifugó a 12.000 g, 5 min a temperatura ambiente. El precipitado se guardó a -20°C para la obtención de ADN doble cadena. El sobrenadante se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se transfirió 1 ml de él a un nuevo tubo (el resto se guardó a 4°C como reserva de fagos para posteriores infecciones). Se agregó 250 µl de PEG 6.000 20% y NaCl 2,5 M. Se dejó 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 g, 15 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante cuidando que el precipitado quede lo más seco posible. Se resuspendió en 100 µl de TE con vortex. Se extrajo 2 veces con fenol saturado en Tris-HCl (pH 7,5) y 2 veces con éter. Se tomaron 90 µl de la fase acuosa y se le agregaron 10 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 270 µl de etanol 100%. Se dejó toda la noche a -20°C o 30 min a -70°C. Se centrifugó a 12.000 g, 15 min a temperatura ambiente. Se lavó el precipitado con etanol 70%. Se secó al vacío y se resuspendió en 25 µl de TE. La calidad del ADN obtenido se verificó en un gel de agarosa 0,7%. Como control se corrió ADN purificado a partir de una placa de retardo azul.

2.5 Métodos electroforéticos.

2.5.1 Electroforesis de ácidos nucleicos.

2.5.1.1 Electroforesis en geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN fueron fraccionados en geles de agarosa horizontales de distintos porcentajes, de acuerdo a su tamaño: geles 0,8%

para fragmentos de 10 a 0,8 kpb, geles 1,2% para fragmentos de 6 a 0,4 kpb y geles 2% para fragmentos de 3 a 0,1 kpb (Maniatis y col., 1982).

Todas las muestras se mezclan para su siembra con 0,1 volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 5% y Naranja G 2%. Las soluciones se preparan con la cantidad apropiada de agarosa en el buffer 1 x TBE (2.1.9) con bromuro de etidio (0,5 µg/ml final) tanto en el gel como en el buffer. Las condiciones de corrida fueron 3V/cm para los geles 0,8; 3-4 V/cm para los geles 1,2 ó 4-5 V/cm para los geles 2%. El ADN se visualizó por la fluorescencia inducida por luz U.V. en el bromuro de etidio intercalado. Se utilizó un transiluminador de luz U.V., sobre el que se fotografiaron los geles.

2.5.1.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes.

Los productos de las reacciones de secuenciación (2.10) se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes (Sanger y Coulson, 1978). Las electroforesis se realizaron en geles verticales de 0,3 mm de espesor, 45 cm de largo y 35 cm de ancho. Los geles fueron de un porcentaje de 6% (acrilamida:bisacrilamida, 19:1) y urea.7 M. La solución a polimerizar se preparó como sigue: urea 42 g, TBE (10x) 10 ml, sc. acrilamida:bisacrilamida (19:1) (24 %) 25 ml, persulfato de amonio (10%) 0,66 ml, TEMED 66 µl para cada 100 ml de solución. El TEMED y el persulfato de amonio se agregó justo antes de armar el gel. A la reacción de secuenciación (5 µl) se le agregó 3 µl de buffer de siembra. El buffer de siembra fue una solución de formamida deionizada 100% (v/v), EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,3% (p/v) y xylen cianol 0,3 % (p/v). Las muestras se calentaron 3 min a 95°C. Se sembró el gel y se comenzó la corrida, que se realizó a 45 mA constantes en buffer 1 x TBE. Al finalizar la electroforesis el gel se fijó 30 min en ácido acético glacial 10%. Se lavó con agua destilada, se transfirió a un papel Whatman 3 MM seco y se secó al vacío durante 1 h a 80°C. Se autorradiografiaron los geles por exposición a -70°C con pantallas intensificadoras (Biggin y col., 1983)

2.5.1.3 Elución de fragmentos de ADN de geles de agarosa:

Para la recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se utilizaron dos métodos alternativos.

a) Elución a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión.

(Maniatis y col., 1982)

Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Agarosa, Type VII, Low Gelling temperature, SIGMA). Luego de la corrida se cortó el trozo de agarosa que contenía la banda a purificar. Se depositó dentro de un tubo al cual se le agregó 5 volúmenes de Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM. Se calentó por 5 min a 65°C para fundir la agarosa. Se extrajo esta solución 3 veces con 1 volumen igual de fenol a temperatura ambiente, una vez con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y una vez con cloroformo:alcohol isoamílico. El ADN se recuperó del sobrenadante por precipitación con etanol (2.3.1).

b) Recuperación por el método de congelamiento descongelamiento (Tautz y Reuz, 1983).

El trozo de gel con la banda de interés se equilibró en oscuridad y a temperatura ambiente con 10 volúmenes de acetato de sodio 0,3 M (pH 7,0), EDTA 1mM. El tiempo de esta incubación varió de acuerdo al tamaño del fragmento de ADN y a la concentración del gel. Altas concentraciones de gel requieren tiempos prolongados, tomando la precaución de que los tiempos no sean tan largos como para perder los fragmentos de ADN por difusión. Los geles 2% con fragmentos de 500-1000 pb se equilibraron 30 min. Luego se colocó el trozo de agarosa en un tubo Eppendorf de 500 µl con un orificio recubierto con lana de vidrio siliconada. Se congeló 30 min a -70°C. Se centrifugó dentro de un tubo Eppendorf mayor (1,5 ml) a 12.000 g, 10 min a temperatura ambiente. Del líquido recogido en el tubo mayor se recupera el ADN por precipitación con etanol (2.3.1). La calidad y recuperación del ADN se verificó por electroforesis en geles de agarosa.

2.6 Autorradiografías.

Los geles de poliacrilamida y los filtros de nitrocelulosa se cubrieron con *Saran Wrap*®, se introdujeron en un cassette y se expusieron en contacto con películas Kodak X-OMAT®. Las exposiciones fueron a temperatura ambiente o a -70°C en presencia de pantallas intensificadoras (Dupont-Cronex®), para aumentar la sensibilidad del proceso.

2.7 Clonado de fragmentos de ADN en plásmidos y bacteriófago M13.

2.7.1 Preparación del vector para clonado.

Los vectores utilizados fueron el plásmido pBR322 y los bacteriófagos M13mp18 y M13mp19. El ADN a utilizar como vector se digirió con la/s enzima/s de restricción adecuada/s (2.9.1). En casos de corte con una sola enzima el ADN fue desfosforilado con la enzima fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) para evitar el religado de los extremos del vector (2.9.3). Luego se extrajo la enzima con solventes orgánicos (2.3.2) y se precipitó el ADN con etanol (2.3.1). El precipitado se resuspendió en TE a una concentración final de 200 ng/μl.

2.7.2 Preparación del inserto a ser clonado.

Los insertos a clonar se generaron por corte con la/s enzima/s de restricción adecuada/s. La mezcla de fragmentos se ligó directamente con el vector o en algunos casos se purificó el fragmento de interés a partir de un gel de agarosa (2.5.1.3 a y b).

2.7.3 Reacción de ligado.

Las ligaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μl, que contenía 1 μl de 10X buffer ligasa (Tris-HCl 200 mM (pH 7,5), MgCl₂ 100 mM, DTT 10 mM y rATP 2 mM). Se utilizó entre 20 y 40 ng de ADN vector (plásmido o fago M13 doble cadena). Para cada experimento de ligación se emplearon

varias relaciones de inserto a vector, en cuanto a cantidad de terminales de cada uno de ellos. En general se utilizaron relaciones de 1:1 y 10:1 de terminales de inserto:vector. Se mantuvo constante la masa de vector y se varió la masa de inserto.

Para la ligación de ADN con extremos romos (blunt end) se utilizó 0,5 μ l de enzima y las incubaciones se realizaron durante 12 h a temperatura ambiente. En el caso de ADN con extremos cohesivos (sticky ends) se usó 0,05 μ l de enzima y las incubaciones se realizaron durante 10 h a 14-16°C. La enzima utilizada fue la DNA ligasa de T4 (1 U/ μ l). Se incubó siempre un control de vector, sin inserto, como estimación del fondo del vector (ADN sin digerir o religado). Luego de la reacción de ligado se procedió inmediatamente a la transformación, o se guardaron las muestras a -20°C.

2.7.4 Preparación de bacterias competentes.

a) Preparación de bacterias JM101 (clonado en M13).

Se utilizó una modificación del método de Cohen y col., (1972). Se inocularon 50 ml de LB (2.1.4.A) con 0,5 ml de un cultivo bacteriano de toda la noche (cultivo estacionario). Se incubó a 37°C con agitación vigorosa (200 rpm) hasta una $DO_{600} = 0,3-0,4$ (aproximadamente 2 h). Las bacterias se dejaron 10 min en hielo y luego se centrifugaron a 4.000 g, 5 min a 4°C. El precipitado de células se resuspendió en la mitad del volumen de partida (25 ml) de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y $CaCl_2$ 50 mM. Se incubó 20 min en hielo y se centrifugó nuevamente a 4.000 g, 5 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1/15 del volumen original de la misma solución del paso anterior. Se incubó en hielo hasta el momento de la transformación. Estas células competentes se mantuvieron durante 24 h a 4°C sin pérdida de eficiencia de transformación.

b) Preparación de bacterias MC1061 y HB101.

Se utilizó el método desarrollado por Viesturus Simanis descrito en Hanahan (1986). Se inoculó una colonia aislada en 5 ml de medio LB y se cultivó a 37°C hasta que alcanzó una $DO_{550} = 0,3$. Con este cultivo se inocularon 100 ml de LB precalentado a 37°C. Se cultivó hasta $DO_{550} = 0,48$. Se enfrió en hielo 5 min y se centrifugó a 5.000 g, 5 min a 4°C. El precipitado se

resuspendió en 40 ml de RF1 (KAc 30 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, glicerol 15%, ácido acético 0,2 M hasta llevar a pH 5,8). Se dejó en hielo 5 min. Se centrifugó a 5.000 g, 5 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 4 ml de RF2 (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM, glicerol 15% y KOH hasta llevar a pH 6,5). Se dejó 15 min en hielo. Se fraccionó en alícuotas de 0,2 ml y se congeló a -70°C hasta el momento de su utilización. No se observa disminución de la eficiencia de transformación aún varios meses después de preparadas.

2.7.5 Transformación de bacterias.

a) Transformación de JM101 con bacteriofago M13.

Se pusieron en contacto 200 µl de bacterias competentes con el ADN recombinante proveniente de la reacción de ligación. Se mantuvo en hielo 30 min y luego se sometió a un shock térmico durante 2 min a 42°C. La muestra se mezcló con 3 ml de top agar (2.1.4 A) a 45 °C en un tubo de 7 ml. El top agar contenía 20 µl de IPTG (100 mM), 20 µl de BCIG (20 mg/ml) y 200 µl de bacterias del cultivo exponencial de JM101 (DO₆₆₀= 0,3-0,4). Esta mezcla se depositó sobre una placa de 9 cm de diámetro con LB agar 1,5% (2.1.4.A). Se dejó endurecer el top agar y se incubó toda la noche a 37°C.

Como control de transformación se utilizó 1 ng de ADN de la forma replicativa del fago M13mp18. Las transformaciones tuvieron una eficiencia promedio de 3×10^5 placas de retardo/µg de ADN control. En el caso de los fagos recombinantes la eficiencia decayó a 1×10^5 .

b) Transformación de HB101 y MC1061 con pBR322.

Se descongelaron las células a temperatura ambiente hasta recién descongeladas. Se dejó en hielo 10 min. En tubos pre-enfriados se agregaron 50 µl de bacterias y ADN hasta 2/5 del volumen de bacterias (20 µl) y no más de 25 ng. Se dejó 30 min en hielo. Luego se dejó 90 s a 42°C y por último 2 min en hielo. Se agregaron 200 µl de LB (a temperatura ambiente) y se incubó con agitación 1 h a 37°C. Este último paso es para expresar la resistencia al antibiótico (ampicilina). Se incluyeron controles de eficiencia de transformación (1 ng de pBR322 ó pUC19) y del vector (10 ng de plásmido cortado y religado). Se plaqueó sobre cápsulas de LB agar 1,5% con antibiótico.

En este caso se seleccionó resistencia a ampicilina. Las cápsulas se incubaron toda la noche a 37°C. La eficiencia de transformación fué de $1-5 \times 10^6$ colonias/ μg de ADN control y 1×10^5 colonias/ μg para los plásmidos recombinantes. En todos los casos la presencia de inserto en la mezcla de ligado aumentó la eficiencia obtenida con el vector religado.

2.8 Identificación de secuencias de ADN por hibridación.

2.8.1 Identificación de colonias recombinantes.

En algunos casos de clonado en plásmidos, se utilizó el método de hibridación *in situ* para la búsqueda del clon que contenía el inserto con la secuencia deseada (Grunstein y Hogness, 1975). Se hicieron réplicas en filtros de nitrocelulosa y estos se hibridaron con las sondas para localizar los clones de interés.

Las placas con colonias de 1-2 mm de diámetro, se dejaron 30 min a 4°C y luego se procesaron. Se colocaron filtros de nitrocelulosa marcados asimétricamente sobre el agar y en contacto con las colonias, hasta que estuvieron completamente húmedos. Se transfirieron las marcas a la base de la cápsula de Petri. Los filtros, con las colonias hacia arriba, se apoyaron 3 min sobre un papel de filtro embebido en 10 % de SDS para lisar las bacterias. Luego se apoyaron 5 min sobre un segundo papel de filtro embebido en NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M para desnaturalizar el ADN. A continuación, se apoyaron 5 min sobre un papel de filtro embebido en Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0), NaCl 1,5 M para su neutralización. Se lavaron los filtros de nitrocelulosa 15 min en 2 x SSC. Se secaron a temperatura ambiente y se calentaron 2 h a 80°C. Los filtros se hibridaron en las condiciones descritas en 2.8.4. Luego se expusieron con películas autorradiográficas. Se transfirieron las marcas asimétricas a las películas y estas marcas se alinearon con las marcas de la cápsula de Petri original para localizar los recombinantes positivos. Las colonias con los recombinantes buscados se tomaron con un palillo estéril y se depositaron en 1 ml de LB. Se cultivaron durante 5 h y luego se depositaron bacterias con un palillo sobre placas de Petri con LB agar 1,5%. Se volvió a

realizar el procedimiento de búsqueda descrito anteriormente y se tomó una colonia positiva para preparar ADN plasmídico (2.4.4).

2.8.2 Identificación de fagos recombinantes.

En los casos de clonado en bacteriófago M13 se utilizó el método de Benton y Davis (1977) para identificar la placa de retardo producida por el recombinante con el inserto de interés. Con este bacteriófago no se visualizan placas de lisis, sino placas de retardo de crecimiento bacteriano. Se incubaron las placas de Petri a 37°C hasta que las placas de retardo alcanzaron un diámetro de 1,5 mm. Luego se dejaron durante 1 h a 4°C. Se marcaron filtros de nitrocelulosa con símbolos asimétricos distinguibles. Cada filtro fue colocado sobre el top agar en contacto con las placas de retardo. Se dejó por un periodo de 60 s para permitir que se transfieran los fagos. Se transcriben las marcas asimétricas a la cápsula de Petri. El filtro duplicado se apoyó sobre el agar 90 s. Si se necesitaban más filtros, se aumentaba 30 s el tiempo de transferencia de fagos por cada filtro. Los filtros, con los fagos hacia arriba se embebieron con NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M, 5 min a temperatura ambiente. Luego se embebieron 5 min con Tris-HCl 0,5 M (pH 7,6), NaCl 1,5 M. Por último los filtros fueron sumergidos en 2 x SSC. Se secaron a temperatura ambiente y luego se calentaron 2 h a 80°C. Los filtros se hibridaron como se describe en 2.8.4.

Las placas de retardo que daban señales positivas de hibridación se localizaron como se describe en 2.8.1. Para aislar el recombinante deseado se tocó con un palillo estéril la placa de retardo y se inoculó 1,5 ml. de un cultivo exponencial de bacterias JM101. Se incubó durante 3-4 h a 37°C con agitación. Se centrifugó a 12.000 g, 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se utilizó como fuente de fagos recombinantes para posteriores infecciones de bacterias y purificación de ADN simple cadena (2.4.6) y ADN doble cadena (2.4.4)

2.8.3 Identificación de secuencias de ADN específicas. *Southern Blot.*

Se utilizó esta técnica para la identificación de secuencias homólogas a una sonda determinada (Southern, 1975). Para ADN genómico se corrieron geles de agarosa 0,8% con 5-10 μg de ADN por cada carril. En el caso de ADNk se corrieron geles de agarosa 2% con 1 μg de ADN por carril. Luego de la electroforesis, las muestras de ADN se transfirieron a filtros de nitrocelulosa, para luego ser hibridados con sondas de ADN marcado radiactivamente. Luego de la corrida, los geles se fotografiaron. Se sometieron a tratamiento alcalino durante 45 min en NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M. Esto desnaturalizó *in situ* al ADN. Se neutralizaron en Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5), NaCl 1,5 M durante 1 h a temperatura ambiente. Los geles se colocaron sobre un papel de filtro Whatman 3 MM en contacto con el buffer de transferencia (20 x SSC). Se les colocó encima el filtro de nitrocelulosa previamente embebido en 2 x SSC y sobre éste 2 hojas de papel de filtro Whatman también embebidos en 2 x SSC. A continuación se colocó 4-5 cm. de papel absorbente y un peso de 0,5 kg. La succión del papel absorbente provoca una corriente ascendente de líquido que transfiere el ADN del gel al filtro de nitrocelulosa, donde queda retenido. El conjunto se dejó toda la noche a temperatura ambiente. El filtro se lavó en 2 x SSC y se calentó 2 h a 80°C.

2.8.4 Hibridación.

Los filtros de nitrocelulosa obtenidos según los procedimientos descritos anteriormente (2.8.1, 2 y 3) fueron prehibridados en una mezcla de 3 x SSC, SDS 0,1%, Denhardt 5x (1x= Ficoll, polivinil pirrolidona, seroalbúmina bovina, 0,02% de cada una)(Denhardt, 1966) y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, durante 2 h a 62°C. Finalizado el período de prehibridación a la misma mezcla se le agregó la sonda radiactiva previamente calentada 15 min a 98°C (2.9.2). En general se utilizaron 20-30 ml de solución de hibridación. Para hibridación de colonias (2.8.1) y placas de lisis (2.8.2) se utilizó 5×10^5 cpm de sonda/ml de solución de hibridación. Para *Southern Blots* de ADN genómico se utilizó 10^6 cpm/ml.

Para *Southern blots* de ADNk se utilizaron dos condiciones diferentes: 5×10^5 cpm/ml si se utilizó como sonda un minicírculo clonado ó $1-2 \times 10^5$ cpm/ml

cuando se usó ADNk total marcado radiactivamente (2.9.2). La hibridación se realizó por 15 h a 62°C. Los lavados en condiciones relajadas se realizaron con 3 cambios de 30 min cada uno de una solución 3 x SSC, SDS 0,1% a 62°C. Los lavados en condiciones estrictas fueron en 0,1 x SSC, SDS 0,1%, también 3 cambios de 30 min a 62°C. Las condiciones de lavado relajadas permitieron detectar todas los minicírculos que comparten al menos las regiones conservadas. En cambio, las condiciones de lavado estrictas permitieron detectar solo los minicírculos que comparten tanto las regiones conservadas, como las regiones variables. Los filtros se expusieron con placas autorradiográficas a distintos tiempos (2.6)

2.9 Modificaciones enzimáticas del ADN realizadas *in vitro*.

2.9.1 Cortes con enzimas de restricción.

El corte con enzimas de restricción se realizó siguiendo las especificaciones de los fabricantes. Se utilizaron 5 unidades de enzima por μg de ADN. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 2 h a 37°C, salvo para la enzima TaqI que se incubó a 65°C. Los volúmenes finales de reacción variaron entre 20 y 100 μl y con una concentración de 2-20 μg de ADN/ml. El volumen de enzima agregado se reguló de manera de nunca superar una concentración final de glicerol del 5% v/v, teniendo en cuenta que la enzima se mantiene en glicerol 50% a -20°C.

Para asegurar un corte total del ADNk, se agregó 2 veces consecutivas un exceso de enzima. Se sacó una alícuota de la muestra a cada tiempo y se analizaron los patrones de restricción en electroforesis en gel de agarosa. Cuando no se observa modificaciones en el patrón de bandas de las distintas alícuotas se considera digestión total. Para el caso de ADN genómico, se sacó una alícuota del volumen total de digestión y se le agregó 100 ng de ADN de la forma replicativa del fago lambda. Se incubaron los dos tubos a la temperatura adecuada y luego se analizó la alícuota con el fago lambda por electroforesis

en gel de agarosa. Si se observó digestión total del ADN del fago, se considera que lo mismo sucedió con el ADN genómico en el tubo original. Esta es una evidencia indirecta de digestión total.

2.9.2 Marcación de ADN por *Nick translation*.

Las sondas utilizadas fueron marcadas radiactivamente con dNTPs ($\alpha^{32}\text{P}$) y alta actividad específica por el método descrito por Rigby y col.(1977). La mezcla de incubación contenía: ADN 100-200 ng, dATP, dGTP, dCTP, 1 nmol de cada uno, dCTP ($\alpha^{32}\text{P}$)(3.000 Ci/mmol) 20 μCi , Tris-HCl 50 mM (pH 7,4),

MgCl₂ 5 mM, 2 mercaptoetanol 10 mM, seroalbúmina bovina 50 $\mu\text{g/ml}$, DNAsal 400 pg, DNA polimerasa 5 U en 25 μl de volumen final. Se incubó 1 h a 16°C. Al finalizar este período la reacción se detuvo con 2,5 μl de EDTA 500 mM. 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 equilibrada con TE, saturada con ADN de esperma de salmón. Se recogieron fracciones de 200 μl . Se estimó la actividad de cada fracción en un contador de centelleo líquido (emisión por efecto Cerenkov). El pico de ADN eluía entre la cuarta y la octava fracción. Se juntaron estas fracciones, se desnaturalizó la sonda por calentamiento 15 min a 98°C y esta se utilizó para la hibridación (2.8.4). Las actividades específicas obtenidas fueron mayores o iguales a 10⁷ cpm/ μg de ADN.

2.9.3 Desfosforilación de vectores con fosfatasa alcalina bacteriana (BAP).

Los vectores cortados con una única enzima de restricción, se trataron con BAP para desfosforilar el extremo 5' antes de utilizarlos para el clonado. Se utilizó la enzima fosfatasa alcalina bacteriana (BRL) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se utilizó un volumen final de reacción de 100 μl . Se utilizó entre 5-10 μg de ADN plasmídico. El medio de incubación posee Tris-HCl 5 mM (pH 8,0), NaCl 60 mM y 100 unidades de enzima. La reacción se llevó a cabo durante 1 h a 65°C. Luego de la reacción se extrajo la proteína con solventes orgánicos y se precipitó el ADN con etanol. El plásmido

se resuspendió en el volumen adecuado para lograr una concentración de 200 ng/ μ l.

2.10 Secuenciación.

Los clones de M13 se secuenciaron por el método de terminación de cadena como lo describieron Sanger y col. (1977).

Una vez obtenidos los recombinantes deseados (2.7) se purificó ADN simple cadena de los fagos recombinantes (2.4.6) Este ADN simple cadena se usó como templado para la reacción de secuenciación. Se usó un "kit" de secuenciación BRL siguiendo las especificaciones del fabricante.

En un tubo Eppendorf de 1,5 ml se colocó 5 μ l de ADN templado simple cadena, 1 ng de *primer*, 1 μ l de amortiguador Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM y DTT 10 mM. Se dejó 1 min en agua en ebullición y luego hasta que el agua alcanzara la temperatura ambiente.

En cuatro tubos diferentes se prepararon las siguientes mezclas:

	A	C	G	T
ADN templado	1,4 μ l	1,4 μ l	1,4 μ l	1,4 μ l
<i>primer</i>				
N°	1 μ l A°	1 μ l C°	1 μ l G°	1 μ l T°
ddNTP	1 μ l ddATP (0,5 mM)	1 μ l ddCTP (0,23 mM)	1 μ l ddGTP (0,45 mM)	1 μ l ddTTP (1,3 mM)

Las mezclas A°, C°, G° y T° se prepararon de la siguiente manera:

	A°	C°	G°	T°
ddCTP 0,5 mM	20 μ l	1 μ l	20 μ l	20 μ l
ddGTP 0,5 mM	20 μ l	20 μ l	1 μ l	20 μ l
ddTTP 0,5 mM	20 μ l	20 μ l	20 μ l	1 μ l
buffer de reacción	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

En un tubo se preparó una mezcla con 10 μ Cl de dATP (α -³²P) con una actividad específica final de 400 Ci/mmol y 1 U de Klenow (fragmento mayor

de la ADN polimerasa I) en un volumen final de 5 μ l. Se agregó 1 μ l de esta mezcla a cada uno de los cuatro tubos de reacción (A, C, G y T) y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Se agregó a cada tubo 1 μ l de dATP 0,5 mM (para completar las cadenas interrumpidas por falta de dATP) y se incubó otros 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 3 μ l de buffer de siembra compuesto por xilen cianol 0,3%, azul de bromofenol 0,3%, EDTA 10 mM en 100 ml de formamida. Las muestras se calentaron 3 min a 95°C y se mantuvieron en hielo hasta el momento de sembrar el gel (2.5.1.2).

2.11 Métodos de dosaje de ADN.

2.11.1 Cuantificación de ADNk y ADNn.

Para calcular la concentración de ADNk se utilizaron tres métodos. Para ADNn sólo se utilizó el primero de ellos (2.11.1.a).

2.11.1 a) Cuantificación por absorbancia.

Se midió la concentración de ácidos nucleicos por absorbancia a 260 nm, considerando que 1 DO₂₆₀ equivale a 50 μ g/ml de ADN doble cadena (Maniatis y col., 1982). Como índice de pureza del ADN se midió la absorbancia a 280 nm y se estimó la relación DO₂₆₀/ DO₂₈₀. Se consideró un cociente de 1,8-2 como un índice de pureza adecuado. Esto indica que el ADN está libre de proteínas.

Para evitar sobreestimaciones por presencia de ARNm u otras moléculas de ADN, se utilizó el método de comparación con patrones de concentración conocida en geles de agarosa (2.11.1 b).

2.11.1 b) Comparación con ADN de masa conocida en geles de agarosa.

Se sembró en un gel de agarosa-BrEt cantidades crecientes del ADN en estudio (diferencias de un orden) y también cantidades crecientes de un ADN patrón de concentración conocida (forma replicativa de fago ϕ X174 o fago λ). Se corrió el gel y luego se compararon la intensidad de las bandas del ADN a

cuantificar con las del ADN patrón. Las bandas de igual intensidad de fluorescencia poseen la misma masa de ADN. La cantidad mínima detectada por banda fue de 10 ng de ADN.

2.11.1 c) Comparación con ADN de concentración conocida en puntos.

La cantidad de ADN en una muestra se puede estimar por comparación de la fluorescencia de la muestra con la obtenida con una serie de estándares (Maniatis y col., 1982). Con éste método se pudo detectar cantidades entre 1 y 5 ng de ADN.

Se colocó Parafilm™ sobre un transiluminador de luz ultravioleta. Sobre él se colocaron gotas de 3 µl del ADN en estudio, provenientes de distintas diluciones. Se colocó también una serie de gotas de estándares de concentraciones entre 0,5 y 20 µg/ml. A cada gota se le agregó TE con bromuro de etidio (2 µg/ml). Se fotografió y se estimó la concentración de ADN comparando la intensidad de fluorescencia de la muestra y las soluciones estándar.

2.11.2 Cuantificación de subpoblaciones específicas de minicírculos.

Para estimar la cantidad relativa de un dado minicírculo en el ADNk total se utilizó la técnica de *dot blot* utilizando como sonda los minicírculos clonados pTckM-84 y pTckM-88.

Los ADNk purificados de los clones Miranda-75, 84 y 88 se cuantificaron (2.11.1) y se depositaron en cantidades crecientes (1, 5, 10, 25 y 50 ng) sobre un filtro de nitrocelulosa. También se depositaron sobre ese filtro cantidades crecientes del minicírculo en estudio (pTckM-84 ó pTckM-88) y de un ADN control (1, 2, 5, 10, 20, 30 y 40 ng). El ADN de los filtros se desnaturalizó y luego se neutralizó. Se calentó el filtro 2 h a 80°C. El filtro con el ADN del minicírculo pTckM-84 se hibridó con éste marcado radiactivamente. Por otro lado el filtro con puntos del minicírculo pTckM-88 se hibridó con éste último marcado radiactivamente. Se cortaron los puntos y se contaron en contador de centelleo líquido. Se compararon las cuentas obtenidas en los puntos con ADNk

con aquellos con los minicírculos y de esta manera se estimó que porcentaje del ADNk total es cada minicírculo estudiado.

2.12 Identificación de clones recombinantes por resistencia a antibióticos.

Cuando se realizó el clonado de minicírculos en el sitio HpaII del vector pBR322 se analizó la presencia de recombinantes por resistencia a antibióticos. El clonado en el sitio HpaII hace que las bacterias con el plásmido recombinante sean resistentes sólo a ampicilina, mientras que las bacterias transformadas con plásmido sin inserto sean resistentes tanto a ampicilina como a tetraciclina. Luego de la transformación se tomó con un palillo estéril bacterias de cada colonia y se depositaron ordenadamente sobre 2 cápsulas de Petri, una con LB agar 1,5% con ampicilina y la otra con LB agar 1,5% con tetraciclina. Las colonias que crecen en el medio con ampicilina y no lo hacen en el medio con tetraciclina son las que poseen los plásmidos recombinantes.

2.13 Análisis de agrupamientos.

Se compararon los patrones de bandeo de los distintos aislamientos y clones utilizando un análisis de agrupamientos. El estudio se realizó tanto con los patrones obtenidos con sondas de ADNk, como con sondas de ADNn. El análisis de agrupamientos comprende técnicas que, siguiendo determinadas reglas, forman grupos de parásitos que se asocian por su grado de similitud.

Los patrones de bandeo obtenidos para cada parásito se utilizaron para calcular el coeficiente de asociación de Jaccard (Jaccard, 1908). Los valores de similitud calculados a partir de la aplicación de este coeficiente varían entre 0 (mínima similitud) y 1 (máxima similitud). El coeficiente se determinó para cada par de parásitos en estudio. Se calcula como el cociente entre el número de bandas comunes a ambos parásitos (a) y la suma de las bandas exclusivas de un parásito (b), más las bandas exclusivas del segundo parásito (c), más las bandas compartidas por ambos parásitos (a). La fórmula aplicada fué: $a/a+b+c$. Con los resultados obtenidos para todos los pares de parásitos en estudio se construyó una matriz de similitud. Esta matriz es

insuficiente para expresar las relaciones entre la totalidad de los aislamientos y clones analizados, pues sólo expone similitudes entre pares de parásitos. Hay una gran variedad de técnicas de análisis de matrices de similitud para sintetizar la información de la matriz y reconocer las relaciones entre la totalidad de los parásitos (Sneath y Sokal, 1973). Aquí se utilizó un análisis de agrupamientos aplicando la técnica de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA, unweighted pair-group method using arithmetic averages)(Nei, 1987).

RESULTADOS

3 Polimorfismos en subpoblaciones de minicírculos homogéneos.

3.1 Antecedentes y objetivos.

En la mitocondria de *T. cruzi* coexisten varias subpoblaciones de minicírculos, algunas son heterogéneas y otras homogéneas. Las subpoblaciones heterogéneas están compuestas por moléculas parcialmente homólogas, con un gran número de variaciones en la secuencia de nucleótidos. La segunda clase de subpoblaciones están compuestas por moléculas muy similares en la secuencia de nucleótidos, salvo por algunos polimorfismos en sitios de reconocimientos para enzimas de restricción (Sánchez, 1986).

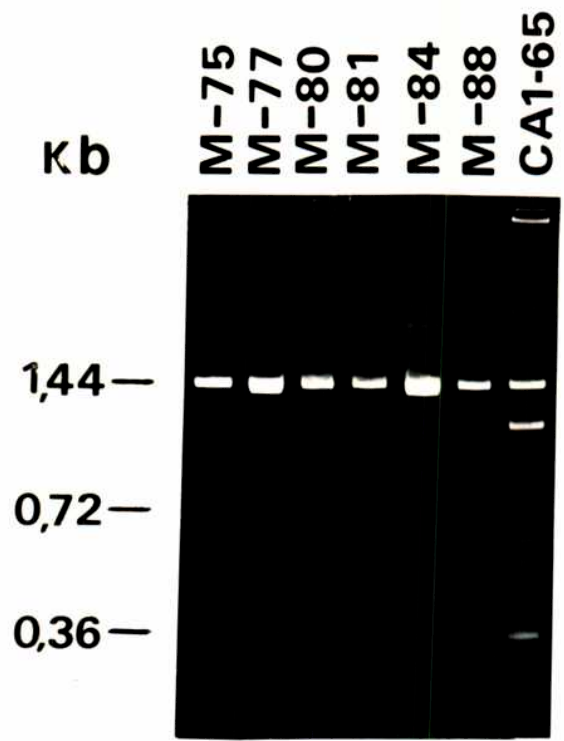
El primer objetivo de este trabajo fué corroborar la presencia de polimorfismos para enzimas de restricción en subpoblaciones homogéneas de minicírculos. Para esto, se clonaron moléculas de minicírculos utilizando parásitos cuyo ADNk presenta un patrón simple cuando se lo corta con distintas enzimas de restricción.

3.2 Subpoblaciones homogéneas de minicírculos polimórficos.

3.2.1 Clones de parásitos con ADNk con un patrón de digestión simple.

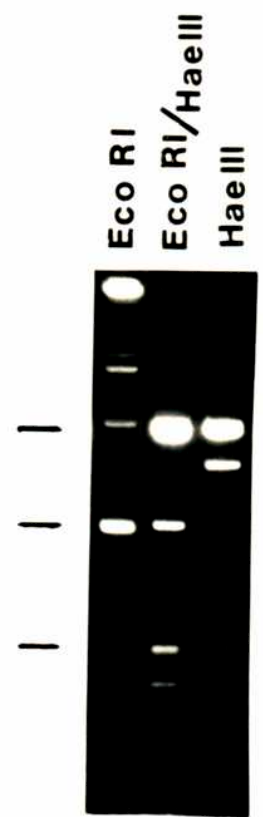
En la figura 4.A. (calle 7) se observa el patrón electroforético típico que se obtiene cuando se digiere el ADNk de *T. cruzi* con diferentes enzimas de restricción que cortan en la región constante de los minicírculos. El ADNk del clon de parásitos CA1-72 se digirió con la enzima HpaII. La presencia de varias bandas, cuyos tamaños son de 1,4, 1,05, 0,7 y 0,35 kpb se debe a la

Figura 4. Análisis del ADNk de seis clones de parásitos. Se digirió ADNk de los clones de parásitos Miranda-75,-77,-80,-81,-84 y-88 con la enzima de restricción HpaII (panel A) o EcoRI, EcoRI/HaeIII y HaeIII (panelB), y se corrió en geles de agarosa 2%.



HpaII

A



M-88

B

existencia de diferentes subpoblaciones heterogéneas de minicírculos en el ADNk de *T. cruzi*. Los fragmentos corresponden a minicírculos linealizados, 3/4, 1/2 y 1/4 de molécula respectivamente. La enzima usada corta en 1, 2, 3 ó 4 sitios, cada uno de ellos en una región constante diferente.

El ADNk de algunos aislamientos digerido con la enzima HpaII presenta un patrón de restricción muy diferente. En la figura 4.A. (calles 1 a 6) se muestra el patrón simple obtenido con seis clones diferentes de tripanosomas (Miranda-75,-77,-80,-81,-84 y-88). Hay una banda principal del tamaño de minicírculos linealizados y otras bandas de poca intensidad. También se observa un patrón simple cuando se utilizan otras enzimas de restricción (EcoRI y HaeIII) o digestiones dobles (EcoRI y HaeIII simultáneamente) (Fig. 4.B). El patrón simple de bandas se debe a la presencia de subpoblaciones homogéneas de minicírculos.

3.2.2 Clonado de minicírculos homogéneos.

Para analizar posibles variaciones en sitios para enzimas de restricción (polimorfismos) en los minicírculos muy similares en secuencia de nucleótidos, se clonaron moléculas de diferentes subpoblaciones homogéneas. Se usó como vector el plásmido pBR322. El clonado se realizó en el único sitio que posee el vector para la enzima ClaI. ADNk de los clones de parásitos Miranda-75,-84 y-88 se cortó con la enzima HpaII para obtener moléculas de minicírculos completos linealizados. Se aislaron 204 clones con insertos de 1,4 kpb. Al realizar reacciones de hibridación cruzada se determinó que se clonaron dos clases de moléculas diferentes. Se las denominó pTckM-84 y pTckM-88 pues se encontraron en mayor proporción en el ADNk de los clones de parásitos Miranda-84 y 88 respectivamente.

Se tomó un clon representativo de cada clase de molécula y se realizó un mapeo con enzimas de restricción para cada uno de ellos. Los mapas se realizaron mediante cortes simples y dobles del plásmido recombinante o de los insertos aislados. En la figura 5 se muestran los mapas de los clones pTckM-84 y pTckM-88.

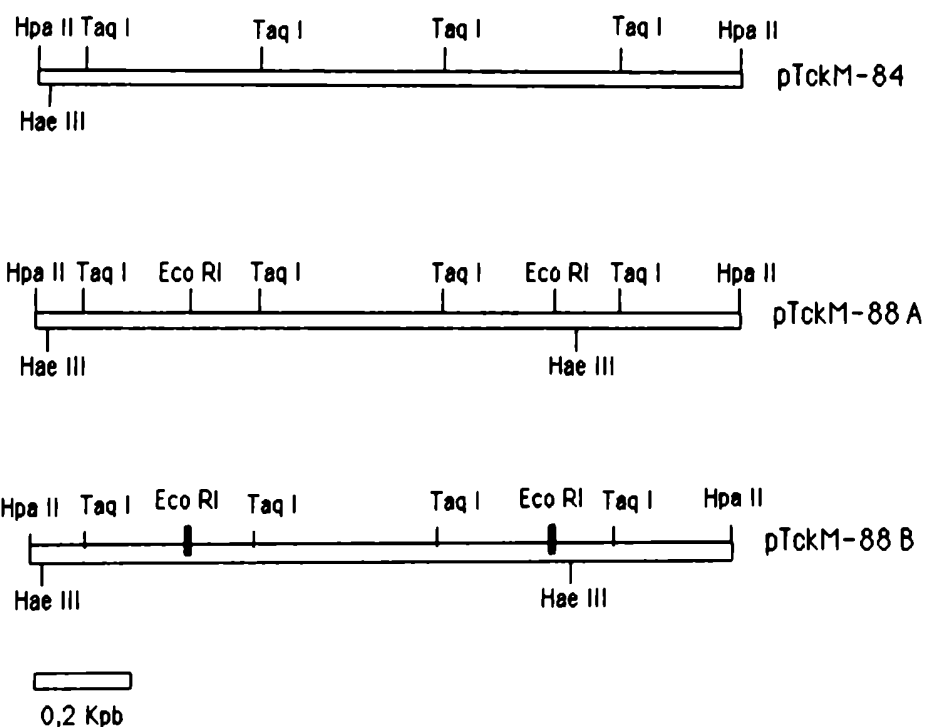
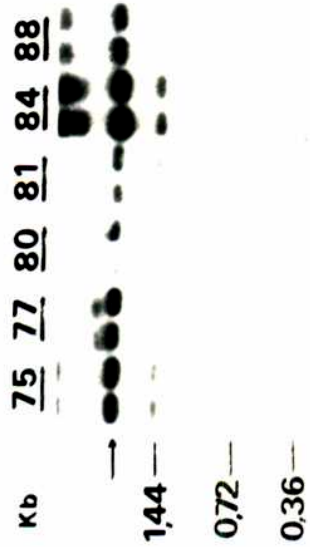


Figura 5. Mapa de restricción de los minicírculos clonados pTckM-84 y pTckM-88, y de las moléculas homólogas presentes en los diferentes clones de parásitos. Los sitios EcoRI marcados con trazos gruesos están ausentes en algunas de las moléculas del clon de parásitos Miranda-77. La molécula pTckM-84 está presente en los clones de parásitos Miranda75,-77,-80,-81,-84 y-88. La molécula pTckM-88 A está presente en los clones de parásitos Miranda75,-77,-80,-81,-84 y-88 y la molécula pTckM-88 B está presente en el clon de parásitos Miranda77.

Figura 6. Polimorfismos en las subpoblaciones de minicírculos pTckM-84 y pTckM-88. ADNk de los clones de parásitos Miranda-75,-77,-80,-81,-84 y -88 se digirió con un exceso de enzima HaeIII o EcoRI. Se sacó una alícuota a las dos horas, se agregó enzima y se digirió dos horas más. Las alícuotas correspondientes a los distintos tiempos de digestión se corrieron en paralelo en geles de agarosa 2%; se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se hibridaron con la sonda pTckM-84 (Panel A) y pTckM-88 (Panel B). La flecha indica multímeros de minicírculos que no poseen sitios para la enzima de restricción EcoRI.



Eco RI

Hae III

A



Hae III

B

3.2.3 Polimorfismos en subpoblaciones de minicírculos homogéneos.

Las moléculas de minicírculos clonadas se utilizaron como sondas para analizar polimorfismos en los sitios para enzimas de restricción de las subpoblaciones homólogas a ellas presentes en distintos clones de parásitos. ADNk total de los clones de parásitos Miranda-75,-77,-80,-81,-84 y-88 se digirió con las enzimas HaeIII o EcoRI. Se tomaron alícuotas a las dos horas de digestión, se agregó nuevamente un exceso de enzima y se continuó con la digestión por un lapso de otras dos horas. Este procedimiento se realizó para descartar que las señales positivas observadas se deban a digestiones parciales de las moléculas de minicírculos homólogas al clon estudiado. Las muestras extraídas a los tiempos indicados se corrieron en paralelo en un gel de agarosa 2%. Se transfirieron a filtros de nitrocelulosa los cuales se hibridaron con las sondas pTckM-84 y pTckM-88.

La subpoblación de minicírculos homóloga al clon pTckM-84 no posee polimorfismos para la enzima de restricción HaeIII. En todos los clones de parásitos analizados la sonda hibrida con una sola banda del tamaño de un minicírculo linealizado (Fig. 6.A). El mismo tamaño se obtiene cuando se digiere el minicírculo clonado pTckM-84 por la enzima HaeIII (Fig. 5). Sólo unas pocas moléculas de esta subpoblación poseen sitios de reconocimiento para la enzima EcoRI. Como se muestra en la figura 6.A, pTckM-84 da una señal muy débil con la banda de 1,44 kpb en todos los clones de parásitos analizados. Las moléculas de minicírculos sin digerir forman una malla que es retenida en el lugar de siembra o forman dímeros, trímeros o diferentes multímeros que migran menos que un minicírculo linealizado (ver flecha de la Fig. 6.A).

Las moléculas homólogas al clon pTckM-88 no poseen polimorfismos para la enzima HaeIII. La sonda detecta fragmentos de 1,05 (3/4) y 0,35 (1/4) kpb, que son los mismos fragmentos que se obtienen cuando se digiere el clon pTckM-88 por la enzima de restricción HaeIII (Figs. 6.B y 5). Sin embargo, la misma subpoblación de minicírculos demostró ser polimórfica para EcoRI en el clon de parásitos Miranda-77. La sonda detectó tres fragmentos. Uno de

ellos es de 0,70 kpb, que también aparece en los otros parásitos analizados y coincide con el mapa de restricción del clon pTckM-88 (Fig. 5). Los otros dos fragmentos tienen un tamaño de 1,44 kpb (un sitio para EcoRI), o mayor que 1,44 kpb (sin sitios para EcoRI). La última banda corresponde a un monómero o multímeros de moléculas de minicírculos cerrados, lo que demuestra la coexistencia de moléculas polimórficas para la enzima EcoRI en una subpoblación homogénea de minicírculos. Las moléculas polimórficas poseen dos, uno o ningún sitio para EcoRI (Fig. 6.B).

En la calle 1 del panel B, figura 6, se observa una banda positiva de 1,44 kpb. Esta banda corresponde a moléculas parcialmente digeridas ya que desaparece en la calle 2 cuando a esa misma muestra se la incubó dos horas más con un exceso de enzima.

Las condiciones de hibridación fueron tales que permitieron detectar sólo aquellas moléculas altamente homólogas a la sonda en toda su extensión (2.8.4).

3.3 Estimación del número de copias de minicírculos.

Confirmada la presencia de polimorfismos para sitios de enzimas de restricción, se deseaba saber si las subpoblaciones de minicírculos homogéneos podían variar en el número de moléculas considerando diferentes clones de tripanosomas. Para ello se determinó qué porcentaje de ADNk total está formado por cada subpoblación de minicírculo: pTckM-84 y pTckM-88. La determinación se realizó en los clones de parásitos Miranda-75,-84 y-88, por el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (2.11.2).

Se observó que la subpoblación homóloga al clon pTckM-84 estaba presente en mayor proporción que la subpoblación homóloga al clon pTckM-88. Mientras la subpoblación de pTckM-84 era el 47, 41 y 42% del ADNk total, la subpoblación de pTckM-88 formaba parte del 24, 11 y 17% del ADNk total de los clones de parásitos Miranda-75,-84 y-88 respectivamente (Tabla I). De los resultados se deduce que ambas subpoblaciones de minicírculos suman entre el 52% y el 71% del ADNk total en los diferentes clones y explica el patrón simple de endonucleasas de restricción mencionado anteriormente, para los clones de parásitos Miranda-75,-77,-80,-81,-84 y-88 (ver 3.2.1). Además, los

valores obtenidos para las dos subpoblaciones sugieren que existen otras moléculas de minicírculos no relacionadas a los clones pTckM-84 y-88 que formarían parte de las bandas minoritarias presentes en las digestiones con la enzima HpaI (Fig. 4.A).

TABLA 1

	Clon de parásito		
	Miranda-75	Miranda-84	Miranda-88
pTckM-84	47%	41%	42%
pTckM-88	24%	11%	17%

Los valores representan el porcentaje del ADNk total que corresponde a cada subpoblación de minicírculo.

4 Mecanismos que generan diversidad en la secuencia de los minicírculos de *T. cruzi*.

4.1 Antecedentes y objetivos.

Una característica de los minicírculos de *T. cruzi* es la heterogeneidad de su secuencia (Riou y Yot, 1977; Frasch y col., 1984). Por lo tanto, se hace imposible entender cómo se mantienen y evolucionan los minicírculos debido a la dificultad para seguir las variaciones de las moléculas en los diferentes parásitos. La heterogeneidad antes mencionada es originada por una evolución muy rápida de las moléculas de minicírculos (Stuart, 1983; Sánchez y col., 1984; Sánchez, 1986).

En *T. cruzi* la regla general es la presencia de subpoblaciones de minicírculos heterogéneos. Se demostró que en algunas cepas o aislamientos existen además subpoblaciones de minicírculos homogéneos (Frasch y col., 1984; Sánchez y col., 1984) siendo algunas subpoblaciones, específicas de determinados aislamientos (Sánchez y col., 1984; Sánchez y col., 1984 a). Las características mencionadas anteriormente llevaron a proponer un modelo de evolución de minicírculos en el cual se explica la aparición de subpoblaciones homogéneas (Sánchez, 1986). Debido a la rápida evolución de los minicírculos, constantemente se generan nuevas moléculas. Si alguno de estos minicírculos se replica preferentemente, aumentará su número de copias, generando así

una nueva subpoblación de minicírculos. Por lo tanto, la nueva subpoblación homogénea estaría compuesta por moléculas iguales entre si. Con el paso del tiempo se acumulan mutaciones, inserciones y/o deleciones y recombinaciones que llevarían a la aparición de polimorfismos para sitios de enzimas de restricción. Luego, la subpoblación en principio homogénea se convertiría gradualmente en una subpoblación heterogénea.

En trabajos previos se demostró la presencia de polimorfismos para sitios de enzimas de restricción en algunas moléculas de subpoblaciones homogéneas de minicírculos (Sánchez, 1986 y Capítulo III de esta Tesis Doctoral).

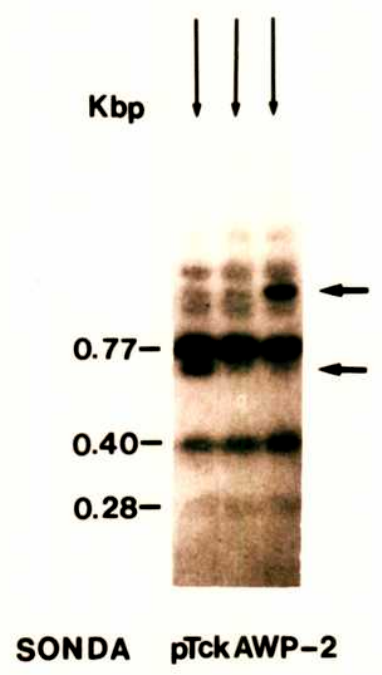
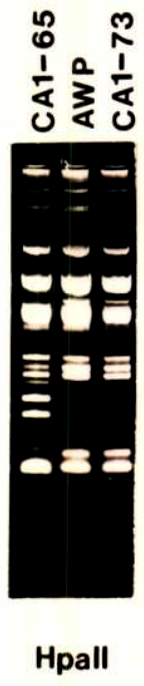
El objetivo del presente trabajo fué estudiar el fenómeno molecular responsable de la aparición de los polimorfismos para sitios de enzimas de restricción. Estos últimos serían los primeros cambios en la secuencia de la molécula de minicírculo. La acumulación de cambios en la secuencia de nucleótidos daría origen a la diversidad y heterogeneidad, característica en la secuencia de los minicírculos de *T.cruzi*. Para ello se secuenciaron tres moléculas de minicírculos homólogos en secuencia pero polimórficas, provenientes de tres parásitos diferentes. Dos provienen de clones de parásitos diferentes (CA1-65 y CA1-73) y la tercera de la cepa AWP.

4.2 Moléculas de minicírculos homólogas, con polimorfismos para enzimas de restricción.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se detectó una subpoblación homogénea de minicírculos que constituye el 10% de las moléculas presentes en la cepa AWP de *T.cruzi*. Uno de los miembros de esta subpoblación se clonó en pBR322 y se lo llamó pTckAWP2 (Sánchez, 1986).

En la figura 7.A se observa el patrón de restricción del ADNk total de los clones CA1-65, CA1-73 y de la cepa de parásitos AWP digeridos por la enzima HpaII.

Figura 7. Análisis de la subpoblación de minicírculos pTckAWP2 en los clones de parásitos CA1-65 y CA1-73, y en el aislamiento AWP. Se digirió ADNk de los parásitos con la enzima HpaII y se corrió en geles de agarosa 2% (Panel de la izquierda). Se transfirió el ADN a filtros de nitrocelulosa y estos se hibridaron con el minicírculo clonado pTckAWP-2 (Panel de la derecha).



En experimentos de hibridación, usando como sonda el minicírculo clonado pTckAWP2, se observa que esta molécula está presente en los tres parásitos mencionados anteriormente (Fig.7.B). Las condiciones de hibridación son tales que sólo se detectan moléculas altamente homólogas a la sonda utilizada.

En los tres parásitos analizados se detectaron los fragmentos esperados para la subpoblación de minicírculos homóloga a pTckAWP2 digerido por la enzima HpaII (Figs. 7.B y 8). Los fragmentos de 0,77, 0,40 y 0,28 kpb demuestran que los minicírculos homólogos a pTckAWP2 están conservados en la cepa AWP. En los clones de parásitos CA1-65 y CA1-73 no todos los minicírculos de la subpoblación en estudio están conservados. La mayoría de las moléculas presentan el patrón descrito anteriormente. La aparición en estos dos clones de parásitos de bandas nuevas demuestran la presencia de polimorfismos para sitios de reconocimiento de la enzima HpaII en esta subpoblación de minicírculos (Fig. 7.B.). En CA1-65 se observa una banda nueva de 0,66 kpb mientras que en CA1-73 la banda nueva es de 1,15 kpb. En nuestro laboratorio los Dres. D.O. Sánchez y C. Ruland clonaron ambas bandas, cuyos mapas se pueden ver en la figura 8. Al clon de 0,66 kpb se lo llamó pTckCA1-65 mientras que al de 1,15 kpb se lo llamó pTckCA1-73 debido al clon de parásitos del cual proviene cada uno de ellos. Cuando se los compara con pTckAWP2, al clon pTckCA1-65 le faltan un sitio para la enzima HpaII y otro para HindIII, mientras que a pTckCA1-73 le faltan un sitio para HaeIII y otro para HpaII (Fig. 8). A pesar de estos polimorfismos ambos clones (pTckCA1-65 y -73) demostraron ser altamente homólogos a pTckAWP2 ya que hibridan con este último clon aún en condiciones estrictas (Fig. 7.B). Para determinar cual es el mecanismo molecular que genera estos polimorfismos se secuenció totalmente el minicírculo clonado pTckAWP2 y las regiones relevantes de los clones pTckCA1-65 y -73 dónde se observaron los polimorfismos (Fig. 8).

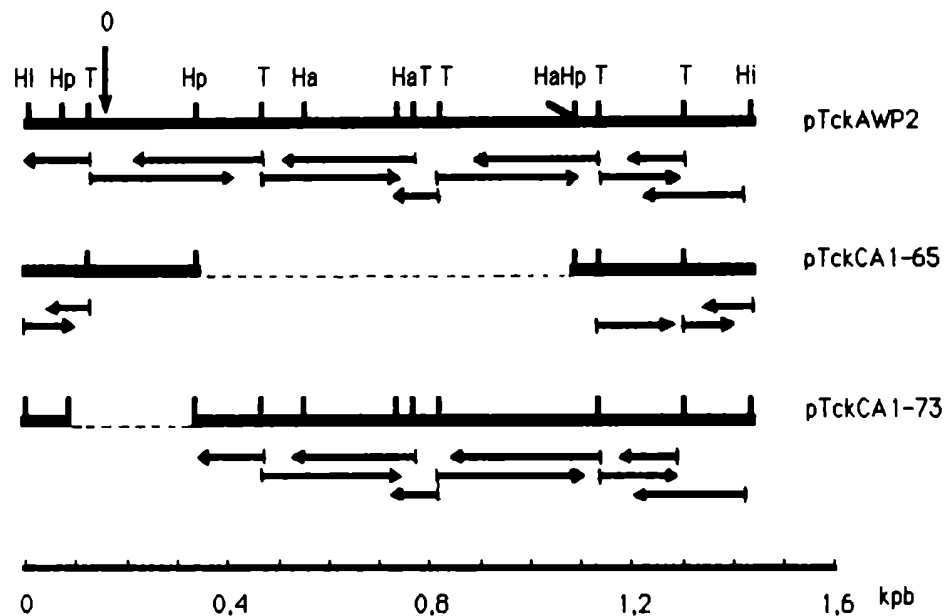


Figura 8. Mapa de restricción y estrategia de secuenciación del minicírculo pTckAWP2. Se muestra el mapa de restricción del minicírculo pTckAWP2 completo y de dos fragmentos HpaI-HpaI homólogos a pTckAWP2 aislados de los clones de parásitos CA1-65 (pTckCA1-65) y CA1-73 (pTckCA1-73). Ambos fragmentos carecen de dos sitios para enzimas de restricción que están presentes en pTckAWP2 (HpaI y HindIII en pTckCA1-65, HpaI y HaeIII en pTckCA1-73). Las flechas indican la estrategia de secuenciación para cada clon en estudio. La orientación de los fragmentos originados por la enzima TaqI se determinó utilizando los sitios de restricción HpaI y/o HaeIII. Los fragmentos que no poseen sitios HpaI o HaeIII se orientaron secuenciando a través del sitio TaqI. El punto 0 indica la primer base de la secuencia de la figura 9. Hp: HpaI; Ha: HaeIII; T: TaqI y Hi: HindIII.

4.3 Comparación de las secuencias obtenidas.

Los tres clones se secuenciaron por el método de terminación de cadenas por dideoxínucleótidos (Sanger, 1977). Previamente se realizó el subclonado de los mismos en el vector M13. En la figura 8 se muestran los mapas de restricción de los clones en estudio y la estrategia utilizada para obtener la secuencia de los mismos. En la figura 9 se observa la secuencia completa del clon pTckAWP2 y los fragmentos HpaI-HpaI de los clones pTckCA1-65 y 73. Entre los clones pTckCA1-65 y pTckCA1-73 suman 1479 pb secuenciadas.

10 20 30 40 50 60 70 80 90
 TGCAGAGAG TTTTAGGATT TTATTGGATG CGTATGTATG ATGTCGGTAC GGTGACTAT GAGTTGTTTCT TTAGTAGTGT TAATGTGATT

 100 110 120 130 140 150 160 170 180
 TGTATATT TGAATGTAT GCTGTATATT GTGTTACTA TAATTGATG GTGGTAGTGG TATATTGTTG GGAGTGTATGG TGAATGTTATT

 190 200 210 220 230 240 250 260 270
 GTTCAGAAA TTGTCGGAA AAATCCAGA AAATCCCTGAT TGGGGGGG GGGGAGAAI TGGGGGGGA AAATCAAGCA ICACCCCGI
 T- G A
 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 ACAATTTTT GGGGTTGCA CCGCGGGG GGGTTGAAI GGGTTGGG IAAATAGAC AGATTGTCA GAATGTTAA

 370 380 390 400 410 420 430 440 450
 TAGTGGTTT GATTATTGAA TGTATGTTCC GTGTTGTGAT GATTGATGTT GACGAGGCCA GAGTATAGGT TGTGAGGAT GTTATAGGA
 T- C T-AC
 460 470 480 490 500 510 520 530 540
 TTTTGATTGT ATAGTTAAA TGATAGTAT TATGTTATTA ATTTAATTA GGAGGTGGT AGGGTAGAAT ATATGGTTGT ATGGTTGAGG

 550 560 570 580 590 600 610 620 630
 ATGGATATAT GTTATTGGAT ATTGAGGGCT AAAATTACGT GAATGTTGTG TTTTGGAGG GGGGTTCAAA TTTGAGGGCC TAAATCAAG

 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 CAATCAACC GIACAAAT TATCGAAAT GGGATTTTT ACCAGGAGGT GGGGTTGAT TGGGTTGGI GIATATATAGA CAGAGTGTGG

 730 740 750 760 770 780 790 800 810
 GTTAAATGAT GGTATGTTT GTTTGAGTG CTATGATAGA TGTCTATAGA GACCTTGTAT GTATGAGAT GAGATCTAG TAAGTTTATG
 A

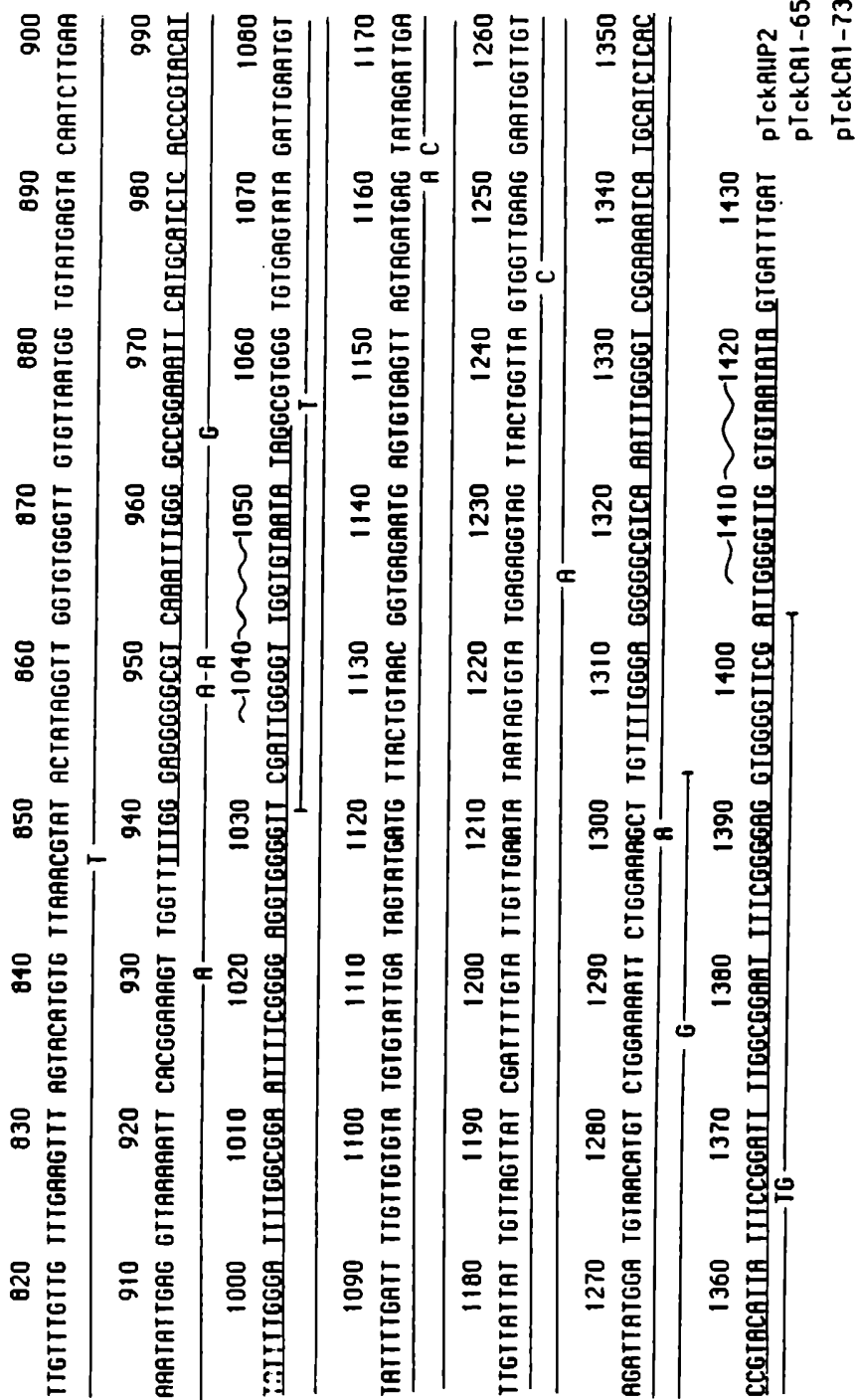


Figura 9. Secuencia de nucleótidos de los tres clones de minicírculo analizados. Se muestra la secuencia completa del minicírculo pTckAWP2. Las líneas indican las regiones secuenciadas en los minicírculos pTckCAI-65 (línea superior) y pTckCAI-73 (línea inferior). Sólo se indican las bases mutadas. La cabeza de flecha indica la única inserción de una sola base detectada en pTckCAI-73. Las cuatro regiones conservadas de 118 pb del minicírculo están subrayadas. Las líneas onduladas indican las secuencias de 13 pb presentes en todos los tripanosmátidos.

Comparando estas secuencias con el clon pTckAWP2 se encontraron 23 mutaciones puntuales, esto es una sustitución cada 64 pb. De las 23 sustituciones, 19 son transiciones y sólo 4 transversiones. Un segundo tipo de mutación detectada fué una inserción de una sola base en la posición 446 del clon pTckCA1-73.

4.4 Características generales de la secuencia de los minicírculos de *T. cruzi*.

4.4.1 Regiones conservadas.

Por análisis con endonucleasas de restricción se demostró que los minicírculos de *T. cruzi* y *T. rangeli* poseen cuatro regiones conservadas repetidas (Riou y Yot, 1977; Frasch y col., 1981). La secuencia obtenida en este trabajo confirma la presencia de cuatro regiones conservadas, de una longitud de 118 pb y que presentan entre un 80-90% de homología entre ellas. Las diferencias entre estas cuatro regiones de la molécula de pTckAWP2 son debidas a mutaciones puntuales. En este caso hay una preponderancia de las transversiones sobre las transiciones. Por ejemplo, comparando la región conservada de las posiciones 1304-1421, con las que se encuentran en la posición 936-1053 y 591-709, se observa que existen 6 transiciones y 15 transversiones. En una de las regiones conservadas se observó también una inserción de una sola base. Se necesita una deleción de una sola base alrededor de la posición 300-310 para obtener una buena homología entre esta región conservada con las otras tres.

En las cuatro regiones conservadas se encontró una secuencia de 13 pb (5' GGGTTGGTGTA3') que está presente en los minicírculos de todos los tripanosomátidos analizados hasta la fecha. Esta secuencia de trece nucleótidos se encontró en minicírculos de *T. brucei*, *T. equiperdum*, *T. lewisi* y *L. tarentolae* (Chen y Donelson, 1980; Barrois y col., 1981; Kidane y col., 1984 y Ponzi y col., 1984).

Si comparamos una de las regiones conservadas de *T. cruzi* con aquellas encontradas en otros tripanosomátidos se observan diferentes grados de

homología. La mayor homología (100%) siempre se encontró en la secuencia de 13 pb mencionada anteriormente. En la tabla II se muestra el porcentaje de homología de la región conservada de *T. cruzi* comprendida entre las bases 1304 y 1421 (Fig. 9) con las de otros tripanosomátidos. Allí se observa que la mayor homología se encontró con las regiones conservadas de *T. lewisi* (52-65%), un tripanosoma que pertenece a la sección Estercoraria, al igual que *T. cruzi*. Con los tripanosomas africanos *T. brucei* y *T. equiperdum*, miembros de la sección Salivaria se encontró una homología menor (42-48%). Las cuatro especies mencionadas anteriormente pertenecen al género *Trypanosoma*.

Con la región constante de los minicírculos de *L. tarentolae* (Género *Leishmania*) se observó el menor porcentaje de homología (34-38%).

4.4.2 Repeticiones directas e invertidas.

4.4.2.a Repeticiones directas.

En la secuencia de la figura 9 se encontraron 31 repeticiones directas de 8 pb cada una, 18 de 9 pb, 2 de 10 pb y 1 de 12 pb. En la tabla III se muestran todas las repeticiones directas salvo las de 8 pb. Allí se indica la posición en que se encontraron las secuencias repetidas.

4.4.2.b Repeticiones invertidas.

Se encontraron 12 repeticiones invertidas de 8 pb cada una. Las posiciones en que se encuentran se indican en la tabla III. Las cuatro regiones conservadas más las repeticiones directas e invertidas suman el 70% de la secuencia del minicírculo pTckAWP2.

4.4.3 Marcos de lectura abiertos.

En la secuencia del minicírculo pTckAWP2 que se muestra en la figura 9 se encuentran 13 marcos de lectura abiertos de más de 20 aminoácidos (10 en la cadena que se muestra en la figura 9 y 3 en la cadena complementaria). En la

figura 10 se muestran los marcos de lectura abiertos de más de 35 aminoácidos cada uno. El polipéptido más largo posible codificado por

TABLA II

Porcentaje de homología de la región conservada de los minicírculos de *T. cruzi* con las de otros tripanosomátidos

Organismo	Minicírculo	Ref.	Homología (%)
<i>L. tarantolae</i>		[1]	
	pKSRI (64-181)		38
	pLt 26 (447-564)		34
	pLt 154 (349-466)		39
<i>T. brucei</i>		[2]	
	A		44
	B		42
<i>T. equiperdum</i>	(700-817)	[3]	48
<i>T. lewisi</i>		[4]	
	A 1 (323-440)		65
	2 (882-999)		62
	B 1 (443-560)		58
	2 (884-1001)		52

Se utilizó la región conservada que se encuentra entre las posiciones 1304 y 1421 del minicírculo pTckAWP2 para buscar secuencias homólogas en los minicírculos de los tripanosomátidos indicados en la tabla. La designación de los minicírculos corresponde a la utilizada en las referencias: [1] Kidane y col., 1984; [2] Chen y Donelson, 1980; [3] Barrois y col., 1981 y [4] Ponzi y col., 1984. Los números entre paréntesis delimitan las regiones de los minicírculos que tienen homología con la región conservada de *T. cruzi*.

TABLA III

A.Repeticiones directas en el minicírculo pTckAWP2

Posición	Secuencia	Posición	Secuencia
14-446	TAGGATTTT	532-1242	TGGTTGAAG
21-552	TTATTGGAT	529-903	ATATTGAGG
36-113	GTATGATGT	694-857	GGTTGGTGT
77-871	GTGTTAATG	715-862	GTGTGGGTT
119-836	ATGTGTAA	809-816	TGTTGTTTG
173-549	ATGTTATTG	857-1038	GGTTGGTGT
375-1072	ATTGAATGT	880-1216	GTGTATGAG
450-1082	ATTTTGATT	500-674	AGGAGGTGGG
481-548	TATGTTATT	728-877	ATGGTGTATG
501-675-1019	GGAGGTGGG	1063-1157	TGAGTATAGATTGA
523-1253	ATGGTTGTA		

B.Repeticiones invertidas en el minicírculo pTckAWP2

Posición		Secuencia
Directa	Invertida	
15-447	217	AGGATTTT
194	1368	TCCGAAA
200	1015,1383	AAAATTCC
204	1296	TTCCACAA
334-705	768	TATAGAGA
495	626	AATTTAGG
763	770	TCTATAGA
951-1319	958,1326	CAAATTTG
962	1367	CCGAAAT
1009-1377	1291	GAATTTTC
1289	211	TTCTGGAA
1361	201	TTTCCGGA

En toda la molécula se buscaron las repeticiones directas e invertidas de 8 pb o más; sólo se muestran las repeticiones directas de 9 pb. No se incluyen las cuatro regiones conservadas del minicírculo mostrado en la Fig. 9 La posición corresponde a su localización en la cadena mostrada en la Fig. 9.

estas regiones es uno de 70 aminoácidos. Para poder realizar una comparación con los marcos de lectura abiertos de otras secuencias de minicírculos publicadas, se utilizó el código genético nuclear para determinar la secuencia de aminoácidos de los posibles polipéptidos. Se comparó el marco de lectura abierto más largo del minicírculo pTckAWP2 con otros de *T.brucei* (Chen y Donelson, 1980), *T.equiperdum* (Barrois y col., 1981), *L.tarentolae* (Kidane y col., 1984) y *T.lewisi* (Ponzi y col., 1984). Se alinearon los posibles polipéptidos a partir de la primer metionina y no se encontró una homología significativa entre los polipéptidos comparados (18% o menos). Tampoco se encontró homología significativa si se comparan entre ellos los posibles polipéptidos codificados por los marcos de lectura abiertos del minicírculo secuenciado pTckAWP2 (17% o menos). En este último caso dos presuntas proteínas comparten un 34% de homología debido a que ambos marcos de lectura comienzan en el mismo sitio en dos regiones conservadas (Fig. 10, los dos marcos de lectura que se leen de derecha a izquierda).

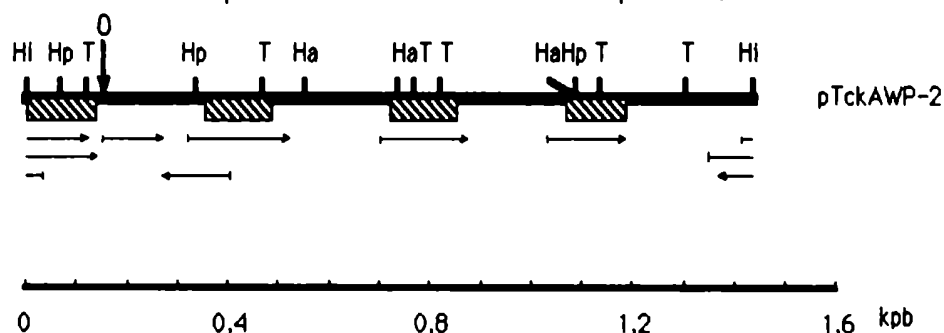


Figura 10. Localización de los marcos de lectura abiertos (ORFs) en el minicírculo pTckAWP2. Se indican los mismos sitios para enzimas de restricción que en la figura 8. Las cajas rayadas indican las regiones conservadas. Se muestran sólo los ORFs de más de 35 aminoácidos.

4.4.4 Otras características.

El contenido de A+T de pTckAWP2 es del 62%. Este valor es menor que el observado en tripanosomas africanos (72%) (Chen y Donelson, 1980).

Existe una polaridad en la composición de G y C en la molécula secuenciada (Fig.9). La hebra mostrada en esta figura posee un 31% de G y sólo un 8% de C.

5 Utilización de sondas de ADN para agrupar aislamientos y cepas de *T. cruzi*.

5.1 Antecedentes y objetivos.

T. cruzi es un grupo complejo y heterogéneo de organismos. Cepas, clones y aislamientos de parásitos difieren en propiedades biológicas, bioquímicas, morfológicas y en manifestaciones clínicas de la enfermedad que ellos producen (Brener, 1985 y Prata, 1985). Debido a esta gran diversidad es importante disponer de métodos confiables para clasificar y agrupar cepas y aislamientos de parásitos. Uno de los métodos más ampliamente utilizado es el patrón electroforético de isoenzimas (zimodemas) (ver 1.3). Originalmente se describieron tres grupos principales de cepas, denominados zimodemas Z₁, Z₂ y Z₃ (Miles y col., 1980). Resultados posteriores pusieron de manifiesto una gran heterogeneidad en esos tres grupos, sugiriendo que las distintas poblaciones de *T. cruzi* tienen un origen multiclonal complejo (Tibayrenc y col., 1986). Otro método de identificación se basa en el análisis del patrón electroforético de los fragmentos de ADN digerido por distintas enzimas de restricción (esquizodemas) (Morel y col., 1980). Los minicírculos evolucionan muy rápidamente (Stuart, 1983; Sánchez y col., 1984; Sánchez, 1986) debido principalmente a mutaciones puntuales (ver 4.3). La rápida divergencia de las secuencias de ADN, hacen que el patrón de restricción de diferentes cepas y aislamientos difieran de alguna manera, aún cuando los parásitos estén muy relacionados. Esto hace difícil adoptar un criterio simple para agrupar parásitos por este método.

En el capítulo 4 se muestra que los minicírculos de *T. cruzi* poseen dos tipos de secuencias en cada molécula. Hay una región conservada de 118 pb repetida cuatro veces por molécula y cuatro regiones divergentes intercaladas entre las repeticiones mencionadas anteriormente.

La secuencia de las regiones conservadas es similar tanto entre las 30.000 moléculas presentes en un parásito como entre las moléculas de diferentes cepas y aislamientos (Goncalves y col., 1984). Las regiones divergentes son diferentes tanto entre las moléculas pertenecientes a distintas subpoblaciones como entre las cuatro regiones de una misma molécula (Goncalves y col., 1984; Frasch y col., 1984). Los minicírculos pertenecientes a una subpoblación determinada son iguales en la totalidad de su secuencia. En cambio los minicírculos de diferentes subpoblaciones comparten la secuencia de las cuatro regiones conservadas, pero difieren en la secuencia de las regiones divergentes.

En nuestro laboratorio se demostró que diferentes cepas de *T. cruzi* poseen subpoblaciones específicas de minicírculos que pueden usarse para su identificación (Sánchez y col., 1984 a). El método utilizado para la identificación de cepas o aislamientos se basa en el siguiente razonamiento: a) Debido a las regiones conservadas todos los minicírculos hibridan entre sí cuando se utilizan condiciones no muy estrictas de hibridación. Sin embargo, cuando se realiza la hibridación en condiciones tales que sólo se detectan las moléculas con una alta homología, no hibridan todos los minicírculos. En este último caso, sólo se detectan aquellas moléculas que pertenecen a la misma subpoblación que el minicírculo utilizado como sonda. Estas moléculas son homólogas en secuencia de nucleótidos en toda su longitud. Las condiciones de hibridación para detectar moléculas con alta o baja homología se describen en Materiales y Métodos (2.8.4). b) Los minicírculos evolucionan muy rápidamente. Dos cepas o aislamientos que comparten minicírculos pertenecientes a una subpoblación dada, están, evolutivamente hablando más emparentados que aquellas cepas que no posean minicírculos homólogos.

El primer objetivo de este capítulo fué demostrar que los clones de minicírculos pTckM-84 y pTckM-88 son específicos de algunos clones de parásitos y están ausentes en otros. En segundo lugar se utilizaron estos y otros minicírculos como sonda para analizar varios aislamientos, clones y cepas de parásitos provenientes de pacientes infectados o insectos. Los parásitos provienen de lugares geográficos muy distantes: Argentina, Chile, Bolivia, Brasil y Honduras. De esta manera se puso de manifiesto la diversidad de parásitos presente en la naturaleza y se determinó que los minicírculos

pueden utilizarse como sondas de ADN para formar grupos de parásitos relacionados. Se relacionaron los resultados obtenidos con el análisis de diferentes aislamientos por zimodemas. Se intentó demostrar la validez del método propuesto y su posible utilización como complemento del análisis por zimodemas y esquizodemas para la identificación de parásitos.

5.2 Minicírculos homogéneos específicos de aislamiento.

En la figura 11 se muestra el análisis por Southern, de la presencia de minicírculos homólogos a los clones pTckM-84 y-88 en cinco clones y cinco cepas diferentes de parásitos. Se cortó ADNk de los diez parásitos por la enzima de restricción HpaII. En el panel A de la figura 11, se observa que sólo el ADNk del clon de parásitos Miranda-80 hibrida con la sonda pTckM-84. El ADNk de las demás cepas y clones no poseen moléculas de minicírculos homólogas al clon pTckM-84. El minicírculo clonado pTckM-88 también demostró ser específico de aislamiento (Fig. 11.B). Esta sonda hibrida sólo con el ADNk del clon de parásitos Miranda-80. Los otros cuatro clones y cinco aislamientos analizados no reaccionan con el minicírculo clonado pTckM-88. Tanto el clon pTckM-84 como el pTckM-88 demostraron estar presentes en los clones del parásito Miranda-75,-77,-80,-81,-84 y-88. (Figs. 6.A y 6.B).

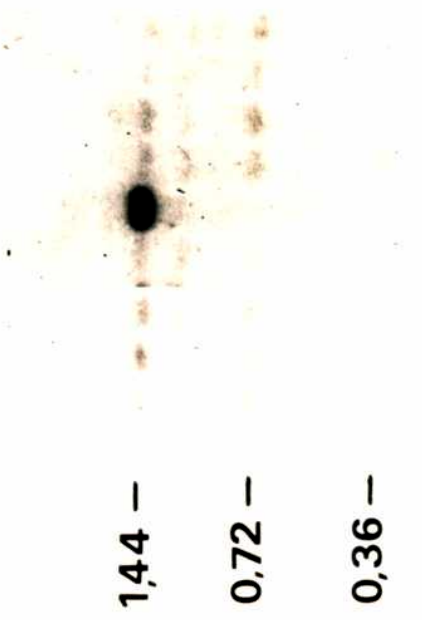
5.3 Sondas de ADNk para la identificación de aislamientos de *T. cruzi*.

5.3.1 Descripción general.

El procedimiento general para la identificación de aislamientos de *T. cruzi* fué: ADNk total de los parásitos a analizar se digiere por la enzima de restricción HaeIII. Se corren geles de agarosa con las muestras en estudio, se transfieren a filtros de nitrocelulosa y éstos se hibridan con la sonda indicada

Figura 11. Análisis de la presencia de las subpoblaciones de minicirculos pTckM-84 y pTckM-88 en diferentes parásitos. ADNk de los clones y aislamientos de parásitos indicados se digirió con la enzima HaeIII, se corrió en geles de agarosa 2%, se transfirió a filtros de nitrocelulosa y se hibridó con los minicirculos clonados pTckM-84 y pTckM-88. M, clones Miranda. CA1, clones CA1, AWP, Tul 0, RA, UP y Y, diferentes aislamientos.

Kb
 1,44 -
 0,72 -
 0,36 -
 Y
 UP
 RA
 Tu10
 M-83
 M-80
 CAI-78
 CAI-71
 CAI-70
 AWP



pTckM-84

pTckM-88

Se analizaron 52 aislamientos, 3 cepas de laboratorio y 6 clones de *T. cruzi*. Los parásitos estudiados provienen de diversas regiones geográficas. 17 aislamientos y 2 cepas de laboratorio de Chile; 25 aislamientos, 1 cepa de laboratorio y 3 clones de Argentina; 6 aislamientos de Bolivia; 1 aislamiento y 3 clones de Brasil y 3 aislamientos de Honduras (Tablas IV, V y VI). En el análisis se incluyen parásitos tomados de pacientes chagásicos crónicos, animales infectados (cuises) o distintos huéspedes invertebrados, los vectores *Triatoma infestans* y *Triatoma spinolai*.

Al iniciar el estudio no se conocía absolutamente nada sobre la relación entre los distintos parásitos analizados. Por ello comenzamos nuestro trabajo utilizando como sonda dos minicírculos clonados definidos: pTckAWP2 (cedido por el Dr. D.O. Sánchez, Sánchez, 1986) y pTckM-84 (ver 3.2.2 de esta Tesis Doctoral). Un aislamiento, la cepa y dos de los tres clones de Argentina, dos aislamientos de Honduras, tres aislamientos de Bolivia, todos los parásitos de Brasil y las dos cepas de Chile dan positivo con el minicírculo clonado pTckAWP2. Con la sonda pTckM-84 se detectaron seis aislamientos y un clon de Argentina, ocho aislamientos de Chile y tres de Bolivia (Figs. 12, 13 y 14).

5.3.2 Análisis de aislamientos de la provincia de Salta.

Con el minicírculo pTckM-84 se identifican cinco de 14 aislamientos de *T. infestans* y uno de tres aislamientos tomados de pacientes chagásicos crónicos (Fig. 12 y Tabla IV). Ninguno de los parásitos de esta región es reconocido por la sonda pTckAWP2. Para saber si los demás aislamientos de esta región eran iguales entre sí, se realizaron experimentos de hibridación cruzada, utilizando como sonda ADNk total del aislamiento 3₂ proveniente de una vinchuca (*T. infestans*). Con esta sonda se detectaron la mayoría de los parásitos de esta región que no reaccionaron con pTckM-84. Ocho de los catorce aislamientos de parásitos tomados de vinchucas silvestres, así como los siete aislamientos provenientes de cuises silvestres reaccionaron con la sonda 3₂ (Fig. 12 y Tabla IV). Cuatro de los veinticinco aislamientos de esta región no se detectaron con ninguna de las dos sondas utilizadas. Se usó como sonda ADNk total de uno de los aislamientos (2538-1) contra ADNk de todos los demás y sólo da señal positiva con su propio ADNk (Fig. 12)

Varios aislamientos de esta región se obtuvieron de una vivienda y sus alrededores (N.R. de la Tabla IV). Los parásitos de siete cuises que habitan un canal situado a 30 metros de la casa y de cinco vinchucas silvestres capturadas en la zona reaccionan con la sonda 3₂. La persona que habita en esta casa está infectada con una población de parásitos diferente (aislamiento 2538-1 de la Tabla IV).

En un caso se analizaron parásitos de dos vinchucas independientes tomadas del xenodiagnóstico realizado a un paciente (Paciente C.O. Tabla IV). La sonda pTckM-84 detectó los parásitos provenientes de una de las vinchucas (2566-1), pero no los de la otra vinchuca del mismo xenodiagnóstico (2566-4). Esto sugiere que este paciente está infectado al menos con dos aislamientos de *T.cruzi* diferentes (Tabla IV).

5.3.3 Análisis de aislamientos de la región del Norte de Chile.

Se analizaron 17 aislamientos de esta región, de los cuales ocho se detectaron con la sonda pTckM-84 (Fig.13.E). Los parásitos provenientes del vector *Triatoma spinolai* dieron positivo cuando se usó como sonda ADNk total de un aislamiento obtenido de un paciente con una infección aguda en la provincia de Santiago del Estero, Argentina (SEBV) cedido por el Dr. D. O. Sánchez (Fig.13.B). Utilizando como sonda ADNk total del aislamiento MXCH46 (Tabla V) se detectaron otros tres parásitos además de él mismo (Fig.13.D). Tres parásitos no pudieron ser detectados con las sondas usadas hasta aquí. ADNk de uno de ellos (MXCH88; Tabla V) se utilizó como sonda pero reaccionó sólo consigo mismo (Fig.13.C.; Tabla V).

Figura 12. Detección de aislamientos de *T. cruzi* de la provincia de Salta (Argentina). ADNk de cada aislamiento se digirió con la enzima HaeIII y se corrió en geles de agarosa 2% (A). El ADNk transferido a filtros de nitrocelulosa se hibridó con el minicirculo clonado pTckM-84 (B), o ADNk total de los aislamientos 2538-1 (C) ó 3₂ (D). Los nombres de los aislamientos y su origen se indican en la tabla IV.

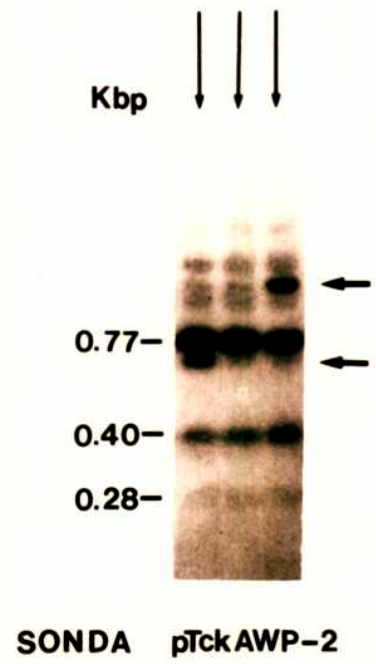
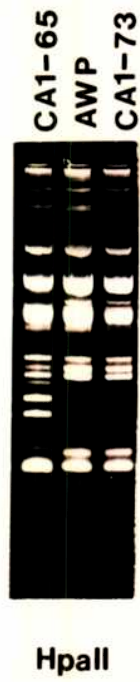


TABLA IV
Análisis de los aislamientos de la provincia de Salta

Aislamiento o clon	Huésped o vector	Región de la que proviene	Minic. o ADNk utilizado como sonda			
			pTckM-84	3 ₂	2538	SE8V
a 10A	<i>T. infestans</i>	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
b 10-2	<i>T. infestans</i>	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
c 3 ₁	<i>T. infestans</i>	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
d 3 ₂	<i>T. infestans</i>	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
e 13-A	<i>T. infestans</i>	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
f 49-5	<i>T. infestans</i>	El Galpón	-	+	-	-
g Secl 2	<i>T. infestans</i>	Seclantas	-	-	-	-
h 2566-4	I. C. H.(c.o.)	Colonia Sta. Rosa	-	-	-	-
i 73-74-E	I. C. H.(p.T.)	Tartagal	-	-	-	-
j 11-A	<i>T. infestans</i>	Valles Calchaquiles	+	-	-	-
k 17	<i>T. infestans</i>	Cafayate	-	+	-	-
l 40-2	<i>T. infestans</i>	Cafayate	+	-	-	-
m 40-3	<i>T. infestans</i>	Cafayate	+	-	-	-
n 40-4	<i>T. infestans</i>	Cafayate	+	-	-	-
o 47-2	<i>T. infestans</i>	El Galpón	+	-	-	-
p 49-3	<i>T. infestans</i>	El Galpón	-	+	-	-
q 2783-2	Cuises	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
r 2785-5	Cuises	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
s 2768-5	Cuises	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
t 2675-1	Cuises	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
u 2670-1	Cuises	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
v 2770-2	Cuises	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
w 2771-3	Cuises	Casa de N.R. Cobos	-	+	-	-
x 2538-1	I. C. H. (N.R.)	Cobos	-	-	+	-
y 2566-1	I. C. H. (c.o.)	Colonia Sta. Rosa	+	-	-	-

Se indican los nombres de los aislamientos y clones de parásitos usados en este estudio, así como la región donde se aislaron y el huésped o vector del cual provienen. (+) o (-) indican presencia o ausencia de un minicirculo o de secuencias homólogas al ADNk utilizado como sonda. N.R., C.O. y P.T. son las iniciales de los nombres de los pacientes a partir de los cuales se obtuvieron los aislamientos de parásitos. I. C. H. = Infección crónica humana.

5.3.4 Análisis de aislamientos, cepas o clones de diferentes orígenes.

5.3.4.1 Análisis por sondas de ADNk.

El minicírculo pTckM-84 detectó ADNk de tres de seis aislamientos de Bolivia y uno de tres clones de parásitos de Argentina (Fig.14 y Tabla VI). Los otros tres aislamientos de Bolivia y los dos clones restantes de Argentina dieron señal positiva con la sonda pTckAWP2, igual que dos cepas de laboratorio de Chile, una de Argentina, una de Brasil, tres clones de Brasil y dos de tres aislamientos de Honduras. El ADNk del tercer aislamiento de Honduras (CL) utilizado como sonda se detecta a si mismo, a los otros dos parásitos de Honduras, un clon y dos aislamientos de Argentina, tres aislamientos de Bolivia y una cepa de Chile (resultados no mostrados). ADNk total de un clon de Brasil (MS) detectó a los otros dos clones y a la cepa de Brasil, además de todos los parásitos detectados por la sonda CL, salvo un aislamiento de Argentina (RA) y el aislamiento CL con los cuales dió negativo (resultados no mostrados).

5.3.4.2 Análisis por esquizodemas.

En la figura 15 se muestra el patrón de restricción obtenido cuando se digiere ADNk de los clones y aislamientos de la tabla VI con la enzima HaeIII y se corre en geles de agarosa 2%. Se observa una acentuada heterogeneidad: parásitos que son vistos por la misma sonda en los experimentos con sondas de ADNk presentan diferentes patrones de restricción. Los parásitos de los carriles 7, 9, 15 y 21 se detectan con la sonda pTckM-84 y por este criterio

Figura 13. Detección de aislamientos de *T. cruzi* de la región norte de Chile. ADNk de cada aislamiento se digirió con la enzima HaeIII y se corrió en geles de agarosa 2% (A). El ADNk transferido a filtros de nitrocelulosa se hibridó con ADNk total de los aislamientos SEV8 (B), MXCH-88 (C), MXCH-46 (D) o con el minicírculo clonado pTckM-84 (E) Los nombres de los aislamientos y su origen se indican en la tabla V.

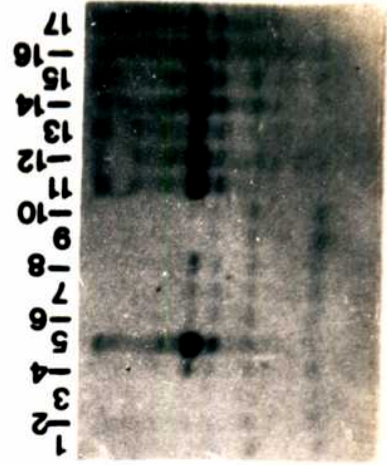
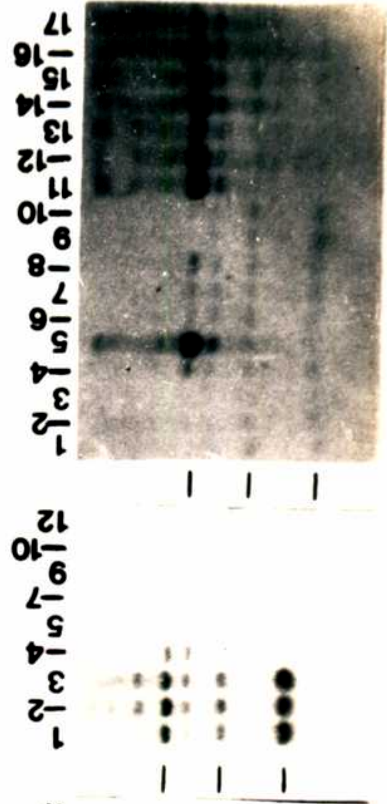
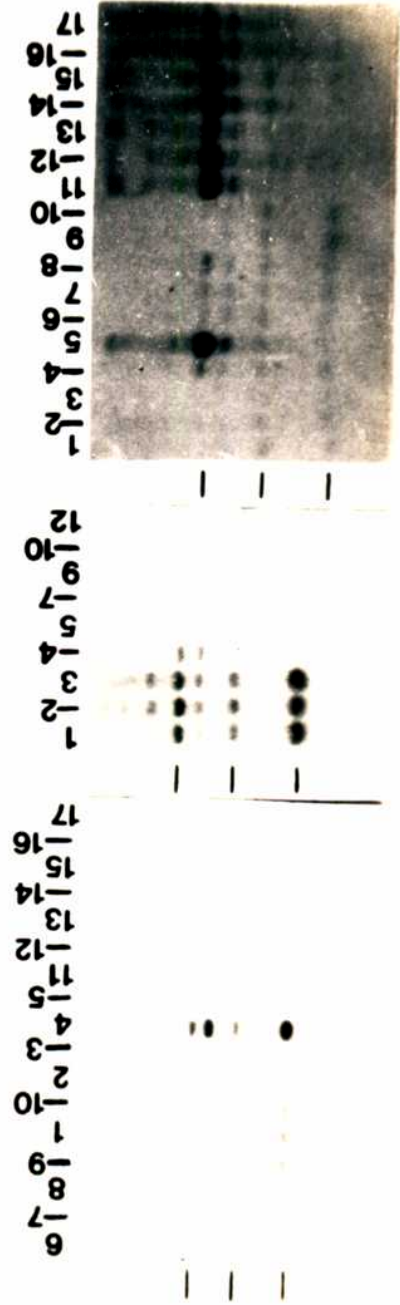


TABLA V
Análisis de los aislamientos del norte de Chile

Aislamiento o clon	Huésped o vector	Región de la que proviene	Minicirculo o ADNk utilizado como sonda				
			pTckM-84	MXCH-46	MXCH-88	SE8V	3 ₂ 2538-1
1 MXCH-89	I. C. H.	Illapel	-	+	-	-	-
2 MXCH-80	I. C. H.	Chanaral Alto	-	+	-	-	-
3 MXCH-46	I. C. H.	Salamanca	-	+	-	-	-
4 MXCH-88	I. C. H.	Cuncumen	-	+	-	-	-
5 MXCH-24	I. C. H.	Cuncumen	-	-	-	-	-
6 Ch1 22	<i>T. spinolai</i>	Flor del Valle	-	-	-	+	-
7 Wall F	<i>T. spinolai</i>	Flor del Valle	-	-	-	+	-
8 Bug 1649	<i>T. spinolai</i>	Flor del Valle	-	-	-	+	-
9 Bug 1738	<i>T. infestans</i>	Las Ramadas	-	-	-	-	-
10 MCH3	<i>T. infestans</i>	Arrayán	-	-	-	-	-
11 85	<i>T. infestans</i>	Monte Grande	+	-	-	-	-
12 89	<i>T. infestans</i>	Campanario	+	-	-	-	-
13 98	<i>T. infestans</i>	Campanario	+	-	-	-	-
14 101	<i>T. infestans</i>	Las Breas	+	-	-	-	-
15 102	<i>T. infestans</i>	Las Breas	+	-	-	-	-
16 31X	<i>T. infestans</i>	Monte Grande	+	-	-	-	-
17 V2X	<i>T. infestans</i>	Monte Grande	+	-	-	-	-

Se indican los nombres de los aislamientos y clones de parásitos usados en este estudio, así como la región donde se aislaron y el huésped o vector del cual provienen. (+) o (-) indican presencia o ausencia de un minicirculo o de secuencias homólogas al ADNk utilizado como sonda. I. C. H. = Infección crónica humana.

pertenecerían a un mismo grupo de parásitos (Fig. 14). En cambio por esquizodemas sólo se asemejan entre sí los parásitos de los carriles 7 y 9, presentando estos un patrón de restricción diferente al de los parásitos de los carriles 15 y 21, siendo estos dos últimos a su vez diferentes entre sí.

Un segundo grupo de parásitos detectado por la sonda de ADNk pTckAWP2 también presentan patrones de restricción diferentes cuando se los analiza por esquizodemas. Los parásitos de los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19 y 22 se detectan con la sonda pTckAWP2 (Fig. 14) pero presentan un patrón de restricción diferente entre ellos (Fig. 15).

Queda en evidencia la heterogeneidad de los patrones de restricción de diferentes clones y aislamientos de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos con sondas de ADNk, no presentan una heterogeneidad tan notoria.

5.3.5 Ventajas y desventajas del método.

Los minicírculos clonados usados como sonda, detectan sólo minicírculos homólogos a ellos, pertenecientes a la misma subpoblación. El clon pTckM-84 tiene un sólo sitio para HaeIII. Al hibridarlo con ADNk digerido por HaeIII da una sólo banda ya que este clon pertenece a una subpoblación homogénea de minicírculos (Figs. 12, 13 y 14). El clon pTckAWP2 da varias bandas ya que posee más de un sitio HaeIII y además presenta polimorfismos para esta enzima de restricción en los diferentes aislamientos, cepas o clones de parásitos (Fig. 14). Las subpoblaciones de minicírculos homólogos a pTckAWP2 son más heterogéneas que aquellas homólogas a la sonda pTckM-84. Por otro lado, cuando se utiliza como sonda ADNk total se detectan varias bandas. En la sonda coexisten varias subpoblaciones de minicírculos, las que deben tener más de un sitio para la enzima HaeIII (Fig. 14).

Figura 14. Detección de aislamientos de *T. cruzi* provenientes de diferentes regiones geográficas. ADNk de cada aislamiento se digirió con la enzima HaeIII y se corrió en geles de agarosa 2%. El ADNk transferido a filtros de nitrocelulosa se hibridó con los minicírculos clonados pTckM-84 (A) o pTckAWP2 (B), o con ADNk total de los aislamientos 3₁ (C) o SEV8 (D). Los nombres de los aislamientos y su origen se indican en la tabla VI.

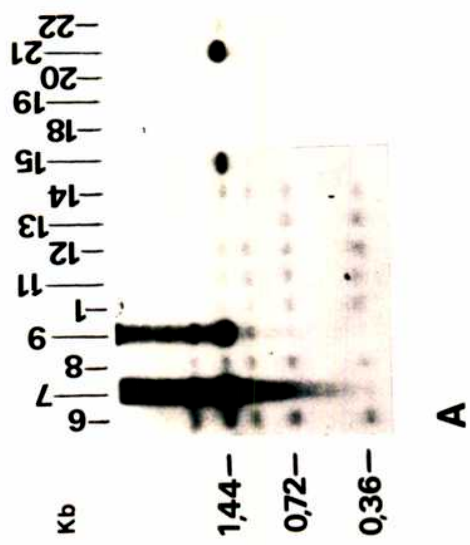
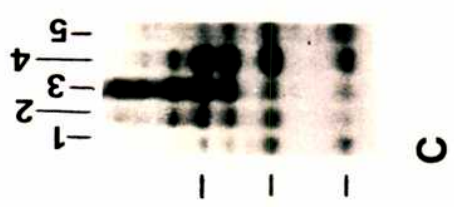
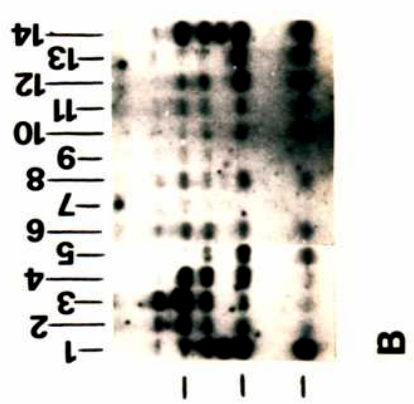
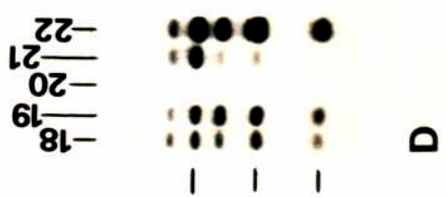


TABLA VI
Análisis de aislamientos y clones de diferentes regiones geográficas

Aislamiento o clon	Huésped o vector	Región de la que proviene	Minicirculo o ADNk utilizado como sonda			
			pTckM-84	3 ₂	SE8V	pTckAWP2
1 CA1-72(C)*	I. C. H.	San Luis (Arg.)	-	-	+	+
2 T ₀ *	<i>T. infestans</i>	Chile	-	-	-	+
3 T ₂ *	derivada de T ₀	Chile	-	+	-	+
4 3 ₁ *	<i>T. infestans</i>	Salta (Arg.)	-	+	-	+
5 RA*	Infec. humana aguda	La Pampa (Arg.)	-	+	-	+
6 P ₁₁ *	I. C. H.	Cochabamba (Bol.)	-	-	+	+
7 P ₁₈₅ *	I. C. H.	Cochabamba (Bol.)	+	-	-	-
8 P ₂₀₉ *	I. C. H.	Sucre (Bolivia)	-	-	+	+
9 P ₂₅₅ *	I. C. H.	Sucre (Bolivia)	+	-	-	-
10 MS*	I. C. H.	Brasil	-	-	-	+
11 AC*	I. C. H.	Brasil	-	-	-	+
12 GER*	I. C. H.	Brasil	-	-	-	+
13 Y*	I. C. H.	Brasil	-	-	-	+
14 CA1-69(C)*	I. C. H.	San Luis (Arg.)	-	-	+	+
15 M-80 (C)*	I. C. H.	Sgo. del Est. (Arg.)	+	-	-	-
16 Dm28c (C)	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17 CA1-65(C)	I. C. H.	San Luis (Arg.)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18 CH13	-	Honduras	-	-	+	+
19 CH14	-	Honduras	-	-	+	+
20 CL	-	Honduras	-	-	-	-
21 P ₂₅₄	I. C. H.	Sucre (Bolivia)	+	-	-	-
22 JR	I. C. H.	Sucre (Bolivia)	-	-	+	+

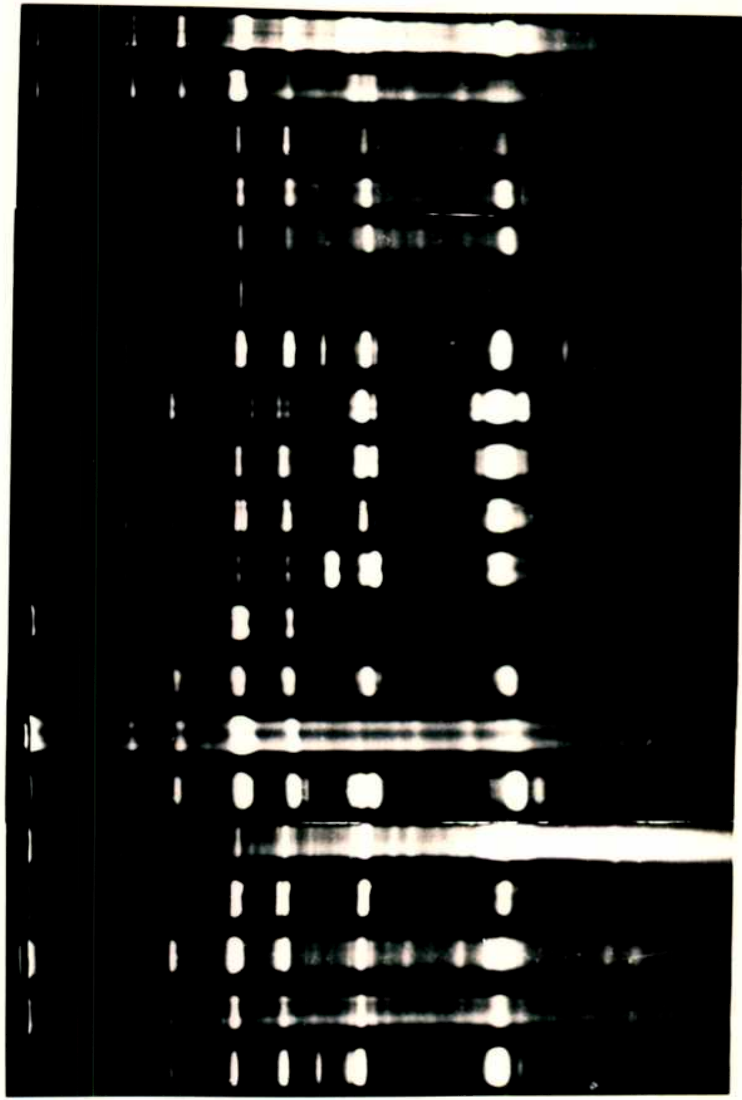
Se indican los nombres de los aislamientos y clones de parásitos usados en este estudio, así como la región donde se aislaron y el huésped o vector del cual provienen. (+) o (-) indican presencia o ausencia de un minicirculo o de secuencias homólogas al ADNk utilizado como sonda. N.D. significa que no se realizó la determinación. I. C. H.= Infección crónica humana.

Debido a la alta velocidad de evolución de los minicírculos, se puede asumir que dos aislamientos de *T. cruzi* que comparten una subpoblación de minicírculos, tienen propiedades biológicas y bioquímicas similares. Las secuencias de nucleótidos de los minicírculos serían una de las primeras cosas que cambiarían cuando se generan diferentes parásitos de *T. cruzi* a partir de un antecesor común. Utilizando sondas de minicírculos se pueden detectar similitudes entre aislamientos de parásitos, pero nada se puede decir sobre aquellos aislamientos que no poseen homología entre sus minicírculos. Pueden ser similares en otras propiedades a pesar de no ser similares en secuencia de nucleótidos de sus minicírculos. En casi todos los casos se obtuvieron señales positivas claramente diferenciables del fondo. No hay dudas sobre la identificación de aquellos aislamientos similares o idénticos (Figs. 12, 13 y 14).

En las áreas endémicas, tanto el insecto vector como el huésped vertebrado pueden estar infectados simultáneamente por más de un aislamiento de *T. cruzi*. Un ejemplo de ello es el mencionado en 5.3.2 donde se encontraron dos aislamientos diferentes en un mismo paciente (Fig. 12 y Tabla IV). Si los parásitos se aíslan por xenodiagnóstico de un mamífero, puede haber una selección de parásitos por el vector utilizado. Situación semejante a lo que sucede en la naturaleza. El próximo paso para el aislamiento de parásitos es la obtención de material suficiente para los experimentos mediante el cultivo de los parásitos *in vitro* en el medio adecuado. Los tripanosomas presentes en una vinchuca no están en cantidad suficiente para llevar a cabo el estudio. En este paso se puede seleccionar artificialmente un determinado tipo de parásito. Este es un problema importante para cualquier método de clasificación de parásitos donde se requiere la amplificación de los tripanosomas. Se puede decir que el parásito detectado con este método, estaba presente en el insecto vector o en el mamífero del cual se extrajo la muestra. No se puede descartar que el insecto o el mamífero estuviera infectado simultáneamente por otro tipo de parásito.

Figura 15 Esquizodemas de ADNk de aislamientos y clones de *T. cruzi* provenientes de diferentes regiones geográficas. El ADNk de los parásitos se digirió con la enzima de restricción HaeIII y se corrió en geles de agarosa 2%.

— 22
— 21
— 20
— 19
— 18
— 15
— 14
— 13
— 12
— 11
— 10
— 9
— 8
— 7
— 6
— 5
— 4
— 3
— 2
— 1



— 1,44 —

— 0,72 —

— 0,36 —

Kb

Este último tipo de parásito se pudo haber perdido en alguno de los pasos de amplificación. Los parásitos identificados con la sonda pTckM-84 crecen relativamente lento en medio de cultivo (Engel y col., 1982) lo que induce a pensar que probablemente no hubo una selección artificial importante.

5.3.6 Distribución geográfica de aislamientos de *T. cruzi* homólogos.

La utilización de sondas de ADN mitocondrial demostró ser un método altamente sensible para la identificación de parásitos (Sánchez y col., 1984 a). Dado el posible origen multiclonal de las poblaciones de *T. cruzi*, se esperaría encontrar una gran diversidad entre aislamientos tomados al azar en diferentes regiones geográficas (Tibayrenc y col., 1986). Sin embargo, la mayoría de los aislamientos de *T. cruzi* estudiados pueden ser agrupados con dos de las sondas utilizadas (Tablas IV, V y VI). La sonda pTckM-84 detectó aislamientos en tres regiones geográficas diferentes, norte de Chile, provincia de Salta y Bolivia, tanto en parásitos aislados de insectos como de pacientes chagásicos. Se aislaron parásitos relacionados en regiones distantes más de 1.000 km una de otra y separadas por importantes barreras geográficas como la cordillera de Los Andes (Tablas IV, V y VI). El ADNk de parásitos que infectan a un paciente chagásico crónico de la provincia de Santiago del Estero en la Argentina, reconoció aislamientos tomados del vector *Triatoma spinolai* en el norte de Chile (Tabla V). El clon pTckAWP2 detectó aislamientos de Bolivia, Honduras y Brasil, cepas de Chile y Brasil y clones de Argentina. Los parásitos se tomaron tanto de vinchucas como de pacientes chagásicos crónicos. Con esta sonda también es posible agrupar aislamientos que provienen de regiones muy alejadas entre ellas.

5.3.7 Relación entre zimodemas y sondas de minicírculos.

Algunos de los aislamientos estudiados aquí, fueron clasificados por otros autores utilizando análisis de zimodemas: 19 clones de parásitos derivados de dos pacientes chagásicos crónicos (CA1 y Miranda) mostraron la existencia de dos tipos de parásitos. Los nueve clones de CA1 y tres de

Miranda (76, 78 y 83) pertenecen al zimodema Z_1 de Bolivia. Los otros siete clones Miranda pertenecen al zimodema Z_2 de Bolivia (Montamat y col., 1987). En nuestro laboratorio se demostró que los clones pertenecientes al zimodema Z_1 reaccionaban con el clon pTckAWP2, mientras que los clones pertenecientes al zimodema Z_2 dan positivo con la sonda pTckM-84. En la figura 14 y la Tabla VI se muestran los resultados para los clones CA1-72, CA1-69 y Miranda 80.

De todos los aislamientos obtenidos en Chile sólo aquellos que pertenecían al zimodema boliviano Z_2 reaccionaron con el clon pTckM-84.

6 Análisis de la heterogeneidad del ADN nuclear en *T. cruzi*.

6.1 Antecedentes y objetivos.

La tipificación de cepas y aislamientos de *T. cruzi* por análisis de patrones de restricción de ADNk (esquizodemas), mostró una gran heterogeneidad de parásitos en la naturaleza (Sánchez y col., 1984; Morel y col., 1986; Carreno y col., 1987). Cuando se utilizan sondas de ADNk en experimentos de hibridación, la heterogeneidad es mucho menor. Hay aislamientos de parásitos que presentan un patrón de restricción de minicírculos muy diferente y sin embargo todos comparten alguna subpoblación de minicírculos, dando una señal positiva con la misma sonda de ADNk (Sánchez, 1986) (Figs. 14 y 15). Los dos métodos pueden complementarse entre sí así como con el método de caracterización de cepas por zimodemas. Los resultados obtenidos con el patrón de isoenzimas se correlaciona con la tipificación por sondas de ADNk (5.3.7) Los minicírculos de *T. cruzi* evolucionan muy rápidamente (Sánchez y col., 1984). A pesar del mecanismo descrito recientemente por Sturm y Simpson probablemente la evolución de la secuencia de nucleótidos de los minicírculos no sufre presión de selección fenotípica. En consecuencia, esa sería la causa por la cual la secuencia de nucleótidos evoluciona rápidamente.

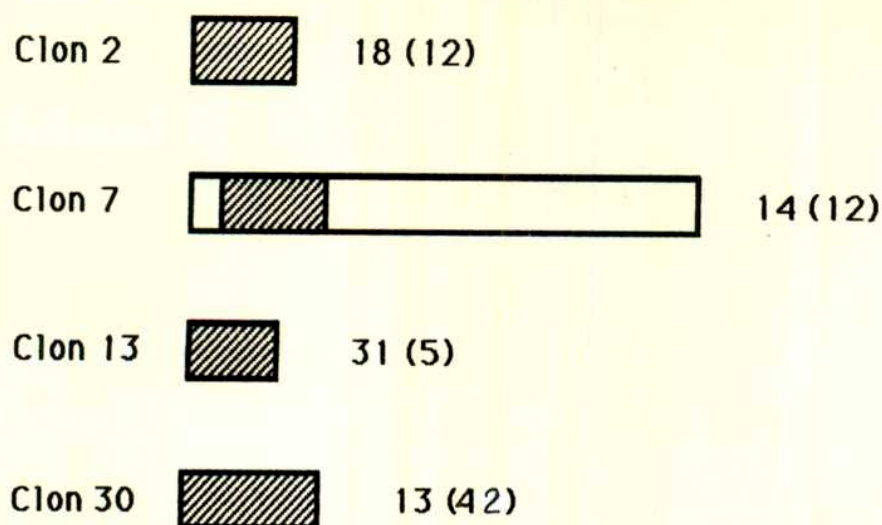
Los minicírculos son útiles como marcadores taxonómicos. Es importante corroborar si las diferencias observadas con estas sondas genéticas reflejan realmente las distancias evolutivas que separan a distintos aisla-

mientos del parásito. También es importante saber si los parásitos agrupados utilizando sondas de ADNk poseen patrones de restricción similares a nivel de ADNn.

El objetivo de este capítulo fué analizar el grado de conservación de varios genes nucleares en diferentes aislamientos de *T.cruzi*. Se estudiaron polimorfismos para fragmentos de restricción en los distintos genes. Se analizaron genes que codifican proteínas antigénicamente importantes del parásito, cuyo grado de conservación es desconocido (Ibañez y col., 1987). También se estudiaron polimorfismos para enzimas de restricción en dos genes nucleares que codifican proteínas altamente conservadas en la naturaleza: el gen que codifica la Actina y el que codifica la Glutamato Deshidrogenasa NADPH dependiente.

6.2 Genes que codifican proteínas antigénicamente relevantes de *T.cruzi*.

T.cruzi posee una composición antigénica muy compleja. Ya se mencionó la heterogeneidad en la composición glicoproteica de la superficie de diferentes aislamientos (ver 1.5.1). En nuestro laboratorio se clonaron fragmentos de distintos genes de *T.cruzi* cuyos productos proteicos son detectados por sueros de pacientes chagásicos (Ibañez y col., 1987; Frasch y col., 1987). Se decidió utilizar cuatro de estos clones para estudiar el grado de conservación de los genes en diferentes aislamientos y clones. El análisis se llevó a cabo mediante *Southern's* de ADN nuclear de quince aislamientos diferentes digeridos por distintas enzimas de restricción (Tabla VI, aislamientos y clones marcados con un asterisco). Los filtros de nitrocelulosa se hibridaron en condiciones estrictas, de manera de detectar sólo la presencia de secuencias altamente homólogas a las sondas utilizadas. Las sondas fueron cuatro clones que contienen fragmentos de genes que codifican proteínas antigénicas. Tres de las sondas están compuestas exclusivamente por secuencias repetidas en tandem cabeza-cola, ellos son los clones #2, #13 y #30 (Ibañez y col., 1988). La sonda #7 posee sólo una región con repeticiones en tandem, el resto del clon no posee secuencias repetidas



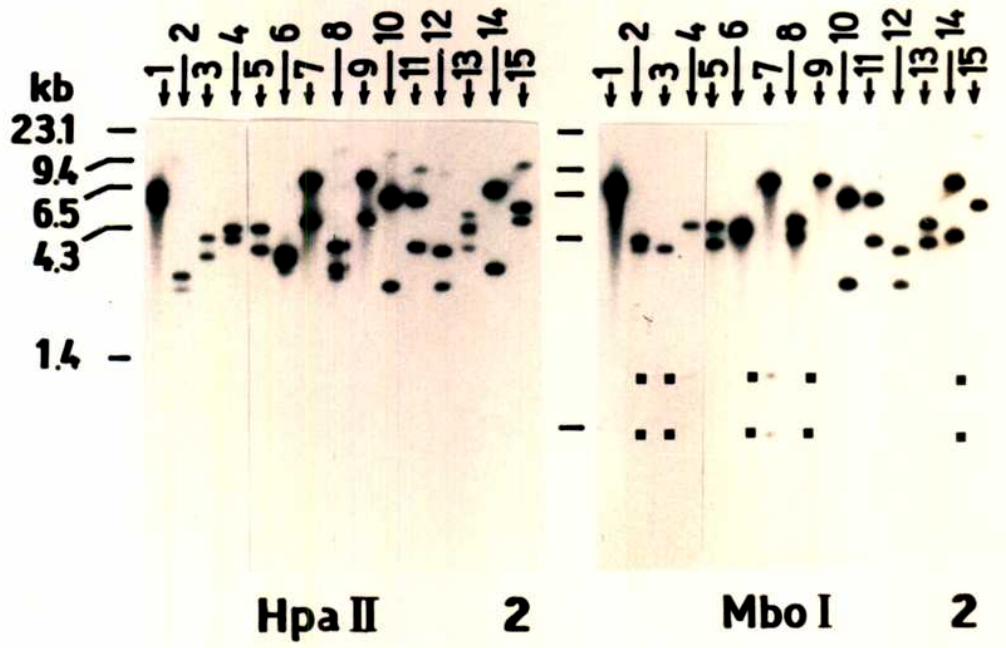
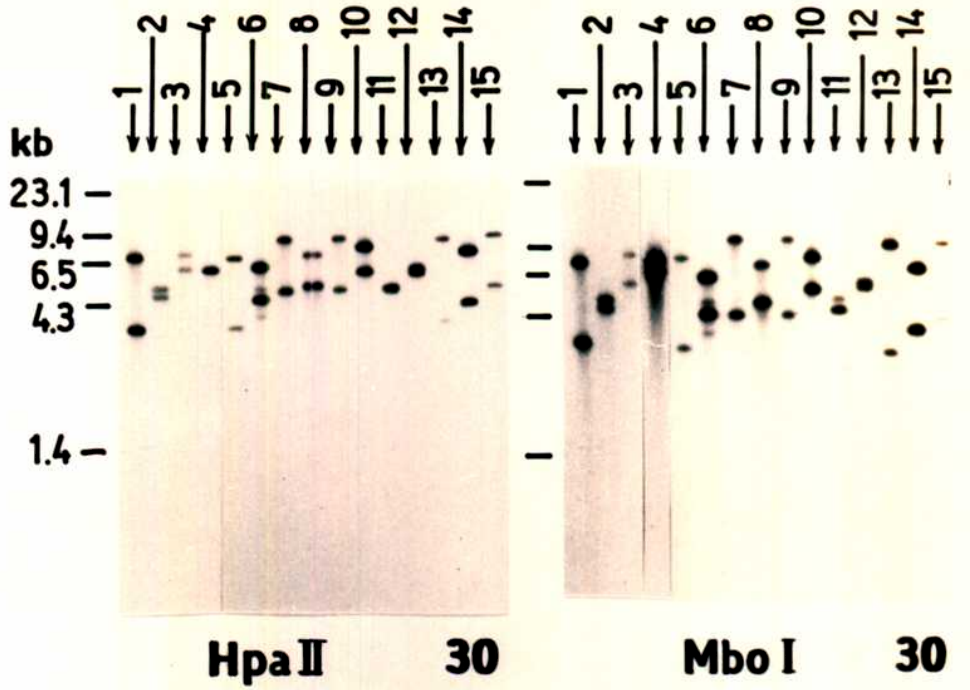
—
100 pb

Figura 16. Estructura de los insertos de los clones utilizados como sonda en los experimentos de ADNn. Las zonas rayadas indican las secuencias repetidas en tandem, las zonas blancas indican regiones sin repeticiones. Se indica el número de repeticiones que posee cada clon y entre paréntesis el tamaño de la unidad repetitiva, en pb.

(Ibañez y col., 1988). Los mapas de todos los clones utilizados como sonda se muestran en la figura 16.

El clon #2 detectó genes con repeticiones homólogas en los quince aislamientos estudiados (Fig. 17). Debido a las condiciones estrictas utilizadas en la hibridación se puede decir que esta secuencia está muy conservada en diferentes parásitos. Se observó una gran heterogeneidad en el patrón de enzimas de restricción. Hay polimorfismos para fragmentos

Figura 17. Patrón de hibridación de ADNn de diferentes clones y aislamientos de *T. cruzi* utilizando los clones #2 y #30 como sonda. ADNn de todos los parásitos se digirió por las enzimas indicadas, se corrió en geles de agarosa 0,8% y se transfirió a filtros de nitrocelulosa. Los filtros se hibridaron por los clones #2 ó #30 marcados radiactivamente. Los nombres de los aislamientos y su origen se indican en la tabla VI.



originados por corte con enzimas de restricción RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfisms). Los únicos aislamientos que presentan el mismo patrón son P₁₈₅ y P₂₅₅ de Bolivia. Se utilizaron las enzimas de restricción HpaII y MboI. En la secuencia repetida usada como sonda no existen sitios de reconocimiento para ninguna de las dos enzimas. Ambas reconocen una secuencia de corte de cuatro nucleótidos, son enzimas de corte frecuente (en promedio cada 256 pb). Con las dos enzimas se observa un patrón de bandas muy similar para cada aislamiento (Fig. 17). El hecho de usar como sonda una secuencia repetida junto a las consideraciones anteriores sugiere que cada banda observada en la figura 17 corresponde a un bloque de repeticiones en tandem, flanqueado por sitios de corte para las enzimas usadas. Todos los aislamientos poseen dos bloques, los que corresponderían a la presencia de dos genes homólogos a la sonda utilizada. En los aislamientos T₂, P₁₈₅ y P₂₅₅ así como en el clon Miranda 80, la enzima MboI corta uno de los bloques de repeticiones en dos fragmentos. En la figura 17 se observa una banda de gran tamaño y dos fragmentos pequeños (señalados con un cuadrado) en los cuatro parásitos mencionados.

El clon #30 presenta características similares al #2. Está presente en todos los aislamientos estudiados (Fig. 17). Los genes detectados por este clon también presentan una gran diversidad, se observan patrones de restricción diferentes (RFLP) para casi todos los parásitos estudiados. Cada banda también correspondería a un bloque de repeticiones en tandem y a un gen. Para este análisis también se utilizaron las enzimas HpaII y MboI (Fig. 17).

Los clones #7 (SAPA) y #13 presentan un patrón de enzimas de restricción mucho más complejo. Cuando el ADN nuclear de los diferentes aislamientos se digiere con enzimas de restricción que no cortan en las repeticiones, se observa un patrón de varias bandas en cada parásito

Figura 18. Patrón de hibridación de ADNn de diferentes clones y aislamientos de *T. cruzi* utilizando el clon #7 (SAPA) como sonda. ADNn de todos los parásitos se digirió por las enzimas indicadas, se corrió en geles de agarosa 0,8% y se transfirió a filtros de nitrocelulosa. Los filtros se hibridaron por el clon #7 (SAPA) marcado radiactivamente. Los nombres de los aislamientos y su origen se indican en la tabla VI.

15 →
14 →
13 →
12 →
11 →
10 →
9 →
8 →
7 →
6 →
5 →
4 →
3 →
2 →

15 →
14 →
13 →
12 →
11 →
10 →
9 →
8 →
7 →
6 →
5 →
4 →
3 →
2 →

15 →
14 →
13 →
12 →
11 →
10 →
9 →
8 →
7 →
6 →
5 →
4 →
3 →
2 →

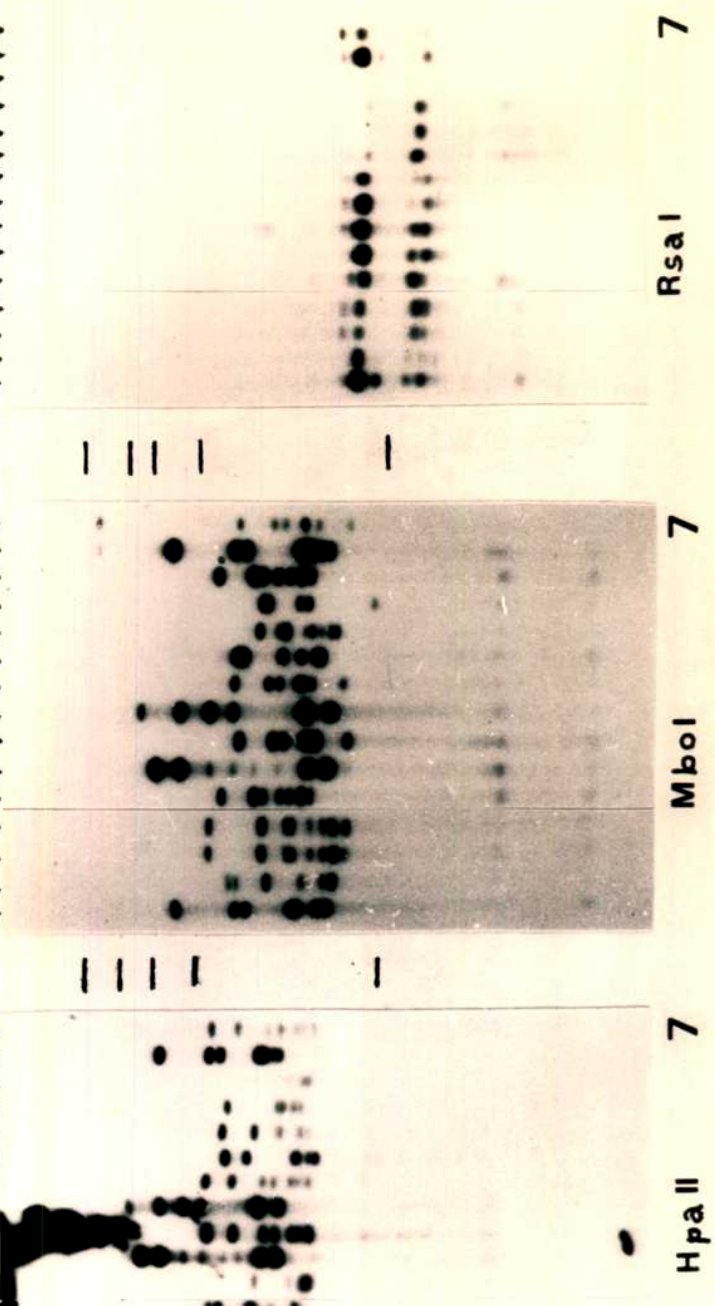
Kb

23.1 —
9.1 —
6.5 —
4.3 —
1.4 —

Rsa I 7

Mbo I 7

Hpa II 7



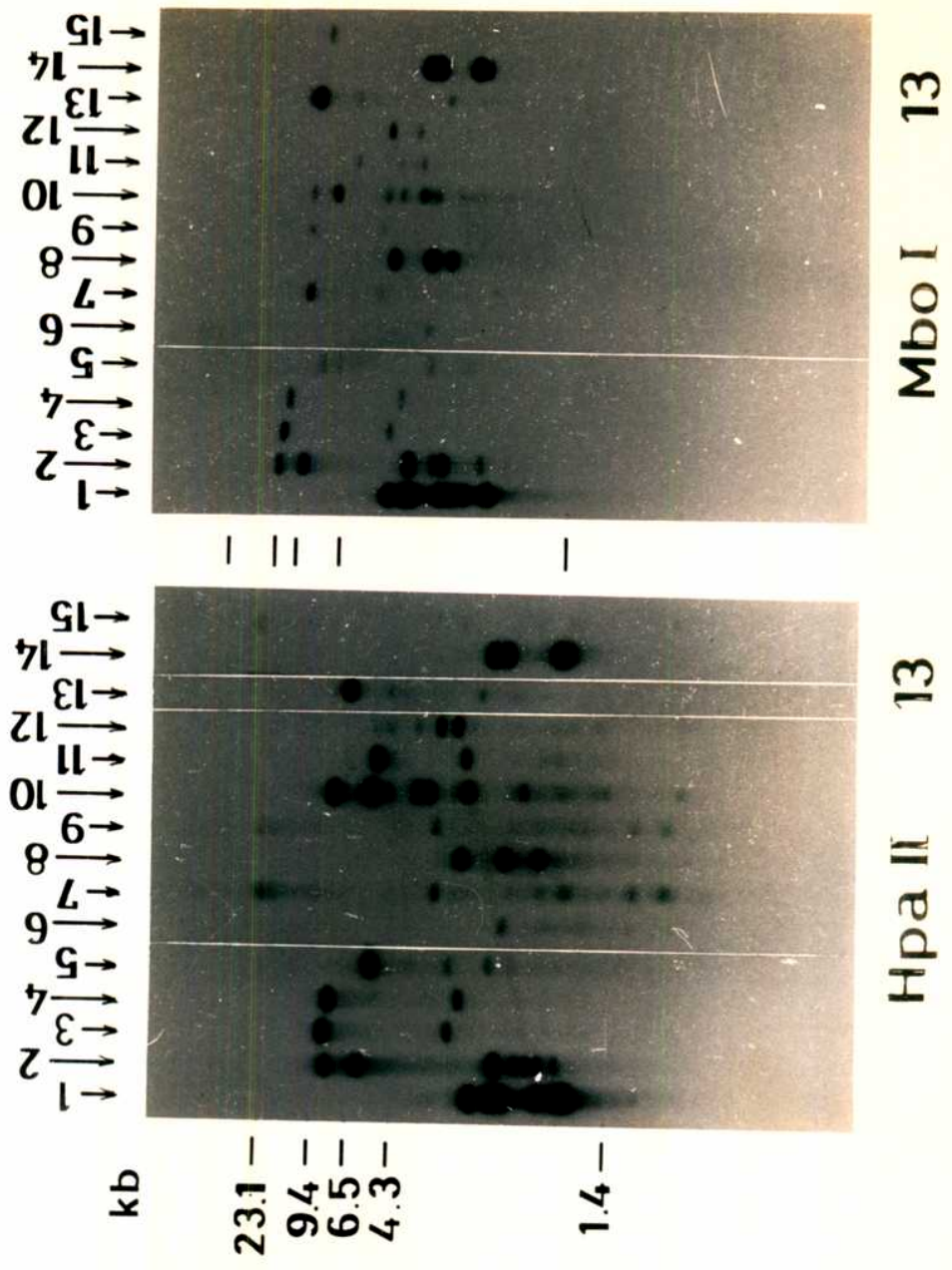
(Figs. 18 y 19). Ese es el caso para las enzimas HpaII y MboI, tanto para el clon #7 como para el clon #13. Cada una de las bandas corresponde a un bloque de repeticiones. El clon #7 detecta en cada aislamiento varios genes homólogos a él, los que corresponderían a una familia de genes (Fig. 18). Al igual que con los clones #2 y #30 hay una gran heterogeneidad en el patrón de restricción (RFLP) comparando los parásitos entre sí (Fig. 18.A). Con el clon #13 se observan las mismas características, también se detecta una familia de genes (Fig. 19). Cuando se digiere el ADN nuclear de diferentes parásitos con una enzima que corta en la unidad repetitiva del clon #7 (RsaI) se observa que desaparecen los polimorfismos vistos con las otras enzimas (Fig. 18. B). La sonda posee no tan solo las repeticiones en tandem, sino también las regiones flanqueantes a las mismas. En la figura 18.B las bandas corresponden a las zonas que flanquean las repeticiones de los genes. El hecho que las regiones flanqueantes sean del mismo tamaño sugiere que los polimorfismos vistos con las otras dos enzimas (HpaII y MboI) se deben a distinto número de repeticiones en tandem en cada uno de los genes. Esto último fue confirmado en nuestro laboratorio mediante el clonado de los fragmentos homólogos al clon #7 del clon de parásitos CA1-72.

Analizando genes nucleares que codifican proteínas antigénicas se observa una gran variabilidad entre diferentes aislamientos y clones de *T. cruzi*. Esta heterogeneidad es mayor a la observada por sondas de ADNk (Figs. 14, 17, 18 y 19). La diversidad encontrada con sondas de ADN nuclear se correlaciona con aquella vista por análisis de esquizodemas (Comparar las figuras de ADNn con la Fig. 15)

6.3 Genes que codifican proteínas conservadas.

Viendo la variabilidad encontrada en genes que codifican proteínas antigénicas, se decidió estudiar el grado de conservación de dos genes que

Figura 19. Patrón de hibridación de ADNn de diferentes clones y aislamientos de *T. cruzi* utilizando el clon #13 como sonda. ADNn de todos los parásitos se digirió por las enzimas indicadas, se corrió en geles de agarosa 0,8% y se transfirió a filtros de nitrocelulosa. Los filtros se hibridaron por el clon #13 marcado radiactivamente. Los nombres de los aislamientos y su origen se indican en la tabla VI.



codifican proteínas altamente conservadas en otros organismos. Uno es el gen que codifica la Actina y el otro el que codifica la enzima Glutamato Deshidrogenasa NADPH dependiente. Para el análisis del gen de la actina se utilizó una sonda heteróloga. Se usó un clon cedido por el Dr. Maurice Steinert, que posee un fragmento de la región 5' codificante del gen de la Actina de *T. brucei*.

Para el análisis del gen de la enzima GDH-NADPH dependiente se usó un clon tomado de una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* en λ gt11. La proteína de fusión sintetizada por el clon reacciona con un suero policlonal de conejo específico contra la enzima purificada. No se conoce el mapa de restricción del inserto, pero este posee un fragmento del gen para la enzima en estudio. Este clon fué cedido por el Dr. Oscar E. Campetella.

En la figura 20 se observa que el gen que codifica la Actina está altamente conservado. Cuando se utiliza la enzima PstI, once de los doce parásitos analizados presentan el mismo patrón. Diez de estos parásitos son detectados por la sonda de ADNk pTckAWP2 (calles 1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 12, 14 y 17 de las Figs. 14 y 20), mientras el clon restante (calle 16 de las mismas figuras) no fué analizado por sondas de ADNk. El clon Miranda 80 (calle 15 de las Figs. 14 y 20) es el único que presenta un patrón de restricción diferente para el gen de la Actina y es detectado por el minicírculo clonado pTckM-84. Con la enzima de restricción EcoRI el patrón de restricción es un poco más complejo. El clon Miranda 80 (calle 15; Fig. 20) da una banda diferente a la de todos los demás parásitos. Los once parásitos vistos por el minicírculo pTckAWP2 se pueden separar en tres grupos. Un grupo en el que se visualiza una banda de 4,3 kpb (calles 1, 2, 14, 16 y 17; Fig. 20), un segundo grupo que presenta una banda de 6,5 kpb (calles 5, 6, 10, 11 y 12; Fig. 20) y un tercer grupo donde se observan ambas bandas (calle 3; Fig. 20).

Figura 20. Patrón de hibridación de ADNn de diferentes clones y aislamientos de *T. cruzi* utilizando el clon de Actina como sonda. ADNn de todos los parásitos se digirió por las enzimas indicadas, se corrió en geles de agarosa 0,8% y se transfirió a filtros de nitrocelulosa. Los filtros se hibridaron por el clon de Actina de *T. brucei* marcado radiactivamente. Los nombres de los aislamientos y su origen se indican en la tabla VI.

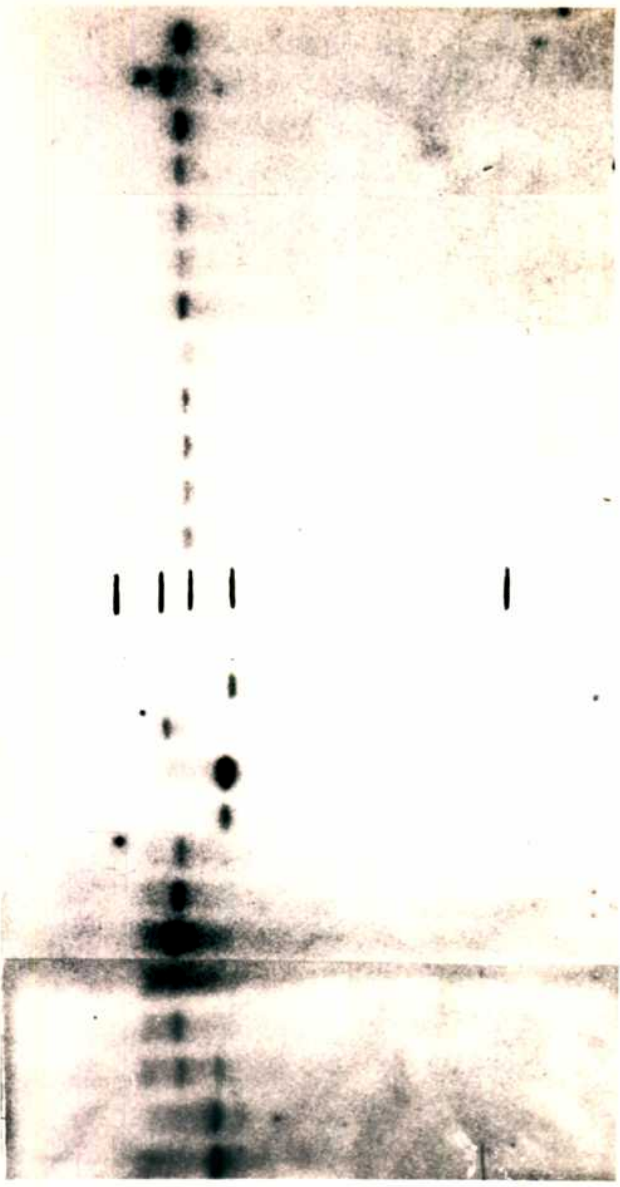
16
15
14
17
12
11
10
6
5
3
2
1

16
15
14
17
12
11
10
6
5
3
2
1

kb

231—
94—
65—
43—

14—



Actina

Pst I

Actina

Eco RI

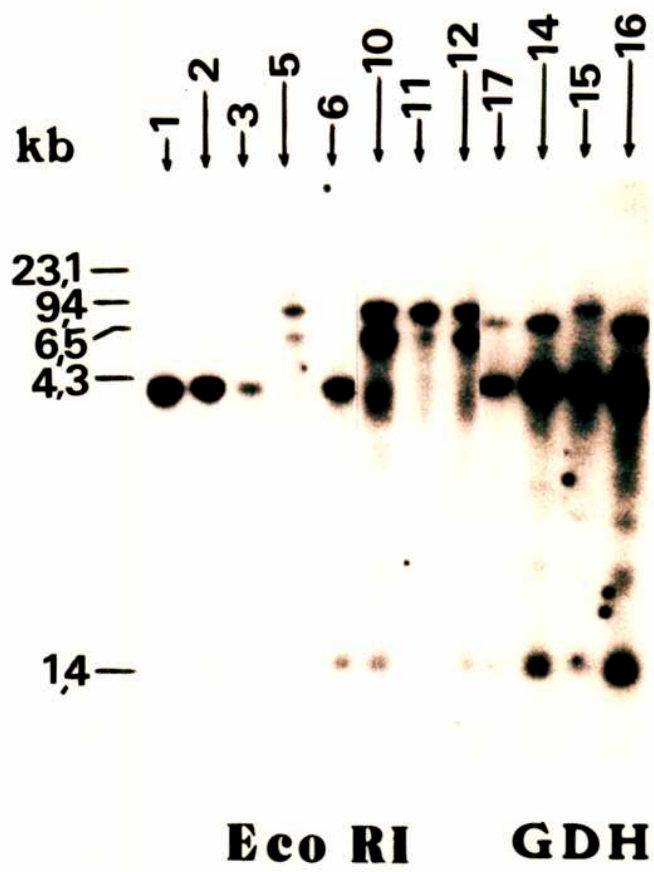
En la figura 21 se muestran los resultados obtenidos cuando se analiza el gen que codifica la enzima Glutamato Deshidrogenasa NADPH dependiente. Nuevamente, el clon Miranda 80 presenta un patrón diferente al de los demás parásitos (calle 15; Fig. 21). Los once parásitos restantes, se pueden separar en diferentes grupos. Los parásitos de las calles 1, 2 y 6 detectan una sola banda; los de los carriles 14, 16 y 17 muestran la banda del grupo anterior y otra de mayor tamaño; los de las calles 5, 10 y 12 muestran dos bandas diferentes a todas las descritas hasta ahora. El parásito del carril 11 tiene una sola banda, del tamaño de la mayor del grupo anterior. Por último el parásito de la calle 3 da un patrón de tres bandas, una igual a la del primer grupo de parásitos y las otras dos iguales a las del tercer grupo. Con la enzima Pst I se observan patrones muy similares a los descritos hasta aquí. Este gen muestra una heterogeneidad mayor a la del gen de la Actina. Sin embargo esta heterogeneidad no llega a ser tanta como la observada con los genes que codifican proteínas antigénicas.

7 Análisis de los patrones de bandeo.

7.1 Antecedentes y objetivos.

Diferentes técnicas de taxonomía numérica han sido utilizadas para estudiar subespecies de *T. brucei* y varias especies del género *Naegleria* (Clark y col., 1989 y Hide y col., 1990). Para analizar los patrones de bandeo detectados en los diferentes clones y aislamientos de *T. cruzi* se utilizó la técnica de análisis de agrupamientos (cluster analysis). Esta técnica permite agrupar aquellos parásitos que poseen patrones de bandeo similares (2.13). Se usaron distintas características para realizar estudios independientes. Se analizaron tanto los resultados obtenidos con las sondas de ADNk, como los

Figura 21. Patrón de hibridación de ADNn de diferentes clones y aislamientos de *T. cruzi* utilizando el clon de la Glutamato deshidrogenasa NADP dependiente como sonda. ADNn de todos los parásitos se digirió por las enzimas indicadas, se corrió en geles de agarosa 0,8% y se transfirió a filtros de nitrocelulosa. Los filtros se hibridaron por el clon de la Glutamato deshidrogenasa NADP dependiente marcado radiactivamente. Los nombres de los aislamientos y su origen se indican en la tabla VI.



patrones de restricción observados con los diferentes genes nucleares. En este último caso se analizaron por un lado los genes que codifican proteínas antigénicas de *T.cruzi*, y por separado los genes que codifican proteínas conservadas. Se compararon los fenogramas obtenidos para determinar que correlación existía entre los diferentes caracteres utilizados para el estudio taxonómico.

7.2 Análisis con sondas de ADNk.

Por este criterio los parásitos estudiados se pueden dividir en dos grandes grupos que no poseen ninguna similitud entre ellos. Un grupo está formado por los parásitos P185, P255 y M-80 que no se pueden diferenciar entre sí por este criterio. El otro grupo es más heterogéneo, está formado por todos los demás parásitos, quienes presentan diferentes grados de similitud (Fig. 22). En este agrupamiento hay parásitos de Argentina, Bolivia, Brasil y Chile.

7.3 Análisis con sondas de ADNn.

7.3.1 Genes conservados.

Esta característica también separa a los aislamientos y clones estudiados en dos grupos con un 0% de similitud entre ellos. Un grupo está formado por el clon M-80 de Argentina, mientras que el segundo grupo está representado por varios parásitos con diferentes grados de similitud entre ellos (Fig.23).

7.3.2 Genes de proteínas antigénicas.

El análisis de agrupamientos utilizando los patrones obtenidos con los genes que codifican antígenos relevantes de *T.cruzi* muestra una marcada heterogeneidad entre los clones y aislamientos estudiados. En la figura 23 se observa que el fenograma obtenido con la utilización de este criterio separa

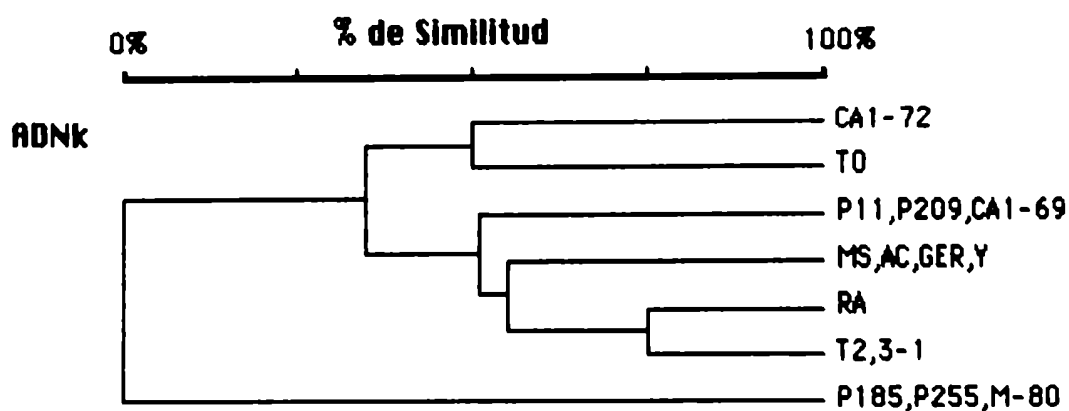


Figura 22. Fenograma mostrando los grupos obtenidos utilizando el metodo de analisis de agrupamientos (Sneath y Sokal, 1973) empleando los datos de ADNk. Las distancias horizontales indican porcentaje de similitud.

los quince parasitos estudiados en entidades diferentes con diversos grados de similitud. Los aislamientos P185 y P255 de Bolivia, son los que presentan el mayor porcentaje de similitud (87,7%). Todos los demás aislamientos y clones son diferentes por este criterio variando las similitudes encontradas entre un 51% y un 8,9%. Para el análisis se emplearon los patrones de bandeo de las figuras 17, 18 y 19 además de aquellos patrones obtenidos con otras dos sondas de genes que codifican antígenos de *T. cruzi* (clones *1 y *10, Ibañez y col., 1988).

7.3.3 Medición de la distorsión.

Para la construcción de los fenogramas se utilizan los datos de similitud obtenidos con la fórmula de Jaccard (ver 2.13). Estos datos se vuelcan en una matriz de similitud. Es imposible que el fenograma sea un reflejo exacto de la matriz. Algunas de las relaciones de similitud serán distorsionadas al realizar una representación bidimensional. Para medir el grado en que el fenograma representa los valores de la matriz se puede utilizar el coeficiente de correlación cofenética. Consiste en construir una nueva matriz de similitud a partir de los valores del fenograma que se

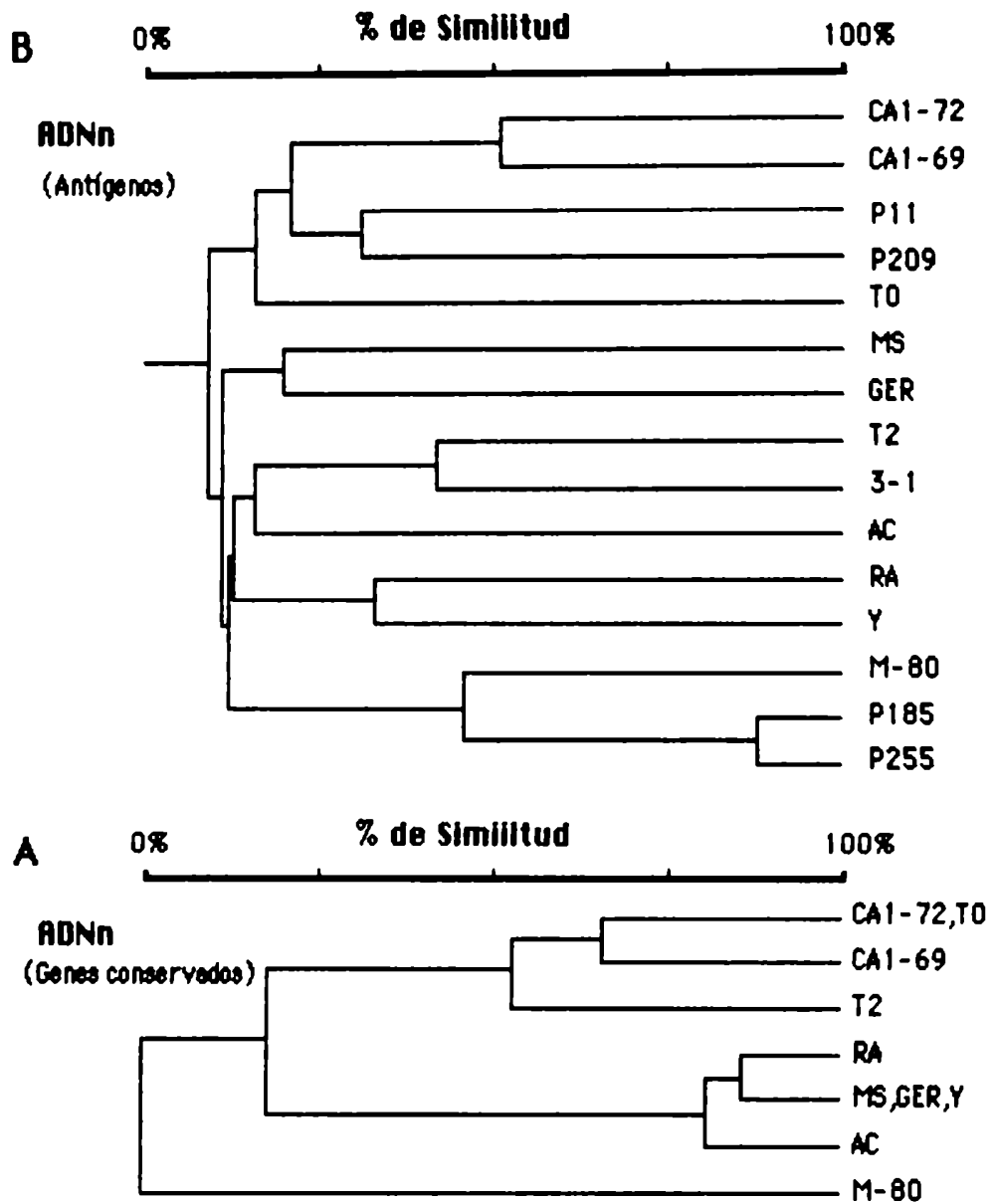


Figura 23. Fenograma mostrando los grupos obtenidos utilizando el método de análisis de agrupamientos (Sneath y Sokal, 1973), empleando los datos de ADNn. Las distancias horizontales indican porcentaje de similitud. Se muestran los fenogramas obtenidos con los patrones de los genes conservados y aquellos obtenidos con los genes de antígenos parasitarios.

denomina "matriz cofenética". Se determina entonces el coeficiente de correlación entre ambas matrices. Se demostró empíricamente que valores superiores a 0,8 indican una buena representación de la matriz de similitud por parte del fenograma (Crisci y López Armengol, 1983). Se determinó el coeficiente de correlación cofenética para los tres fenogramas. Los valores fueron: sondas de ADNk, $r=0,987$; genes conservados, $r= 0,977$ y genes de antígenos, $r= 0,995$. Estos valores indican una buena representación de la matriz de similitud por parte del fenograma.

7.3.4 Comparación de clasificaciones: Congruencia taxonómica.

Congruencia taxonómica es el grado de correspondencia entre diferentes clasificaciones de un mismo conjunto de organismos. Dos clasificaciones de un mismo conjunto de organismos son congruentes si postulan los mismos agrupamientos. Para evaluar la congruencia taxonómica se puede emplear el coeficiente de correlación entre las matrices obtenidas con la utilización de diferentes caracteres. En nuestro caso se determinó el coeficiente de correlación entre las tres matrices. La matriz obtenida con sondas de ADNk dió un coeficiente de 0,851 con la matriz de datos de genes conservados. Por otro lado, dió un coeficiente de 0,626 con la matriz de datos de genes de antígenos. El coeficiente entre las matrices de datos de genes conservados y genes de antígenos dió un valor de 0,673. La mayor congruencia se observa entre los resultados obtenidos con sondas de ADNk y genes conservados.

DISCUSSION

Los minicírculos de los tripanosomátidos, salvo raras excepciones, poseen un alto grado de heterogeneidad. Es difícil seguir las posibles variaciones de las moléculas en y entre parásitos y es imposible entender cómo se mantienen y evolucionan los minicírculos. Sánchez y col. en 1984 demostraron que algunos aislamientos o cepas de parásitos poseen poblaciones de minicírculos homogéneos. El minicírculo clonado pTck-14 demostró ser homogéneo en los aislamientos de parásitos CA1, RA, UP y Tul 0. El 5% de las moléculas de minicírculos presentes en el ADNk de estos parásitos son homólogos a pTck-14 (Sánchez y col., 1984 y Sánchez, 1986). Los minicírculos clonados pTckAWP2 y 3 forman poblaciones de aproximadamente el 10 y 15% en el ADNk total de diferentes clones de parásitos (Sánchez, 1986). En el presente trabajo se clonaron dos clases de minicírculos diferentes en secuencia de nucleótidos: pTckM-84 y pTckM-88 (Fig. 5). Ambos se obtuvieron de un grupo de seis clones de tripanosomas que se caracterizan por dar un patrón de restricción simple cuando su ADNk se digiere por distintas enzimas de restricción (Fig. 4.A.). Este bandeo sugiere la presencia de subpoblaciones homogéneas de minicírculos. La cuantificación de las subpoblaciones de minicírculos homólogas a pTckM-84 y pTckM-88 confirman la presencia de subpoblaciones mayoritarias de minicírculos homólogos. En los clones de parásitos Miranda -75,-84 y -88 las dos clases de minicírculos o subpoblaciones representan el 52-71% del ADNk total (Tabla 1). Se desconoce la causa de que existan distintos niveles de heterogeneidad en los minicírculos de diferentes clones de *T. cruzi*. Los tripanosomas africanos *T. evansi* y *T. equiperdum* tienen una sola clase de minicírculos homogéneos en su ADNk (Frasch y col., 1980; Barrois y col., 1981). *T. evansi* no posee maxicírculos (Fairlamb y col., 1978) y *T. equiperdum* tiene maxicírculos modificados no funcionales (Frasch y col., 1980). Las dos especies perdieron la habilidad de desarrollarse en el insecto vector y se transmiten por contaminación o sexualmente. En la mayoría de las especies de tripanosomas se encontró una estrecha relación entre la presencia de maxicírculos funcionales y minicírculos heterogéneos en secuencia. Esto no debe ser cierto para los clones de *T. cruzi* con minicírculos homogéneos, pues ellos dependen de la presencia de

mitocondrias funcionales para sobrevivir en el insecto vector. Es sugestivo que los clones de parásitos con un patrón de restricción simple en su ADNk (Miranda-75,-77,-80,-81,-84 y-88) crecen mas lentamente en cultivo que otros clones de *T. cruzi* con minicírculos heterogéneos, analizados en un estudio comparativo realizado por Engel y col. en 1982. El análisis de la estructura de los maxicírculos de estos parásitos demostraron que la región codificante es igual a la de otros clones de *T. cruzi* salvo por algunos polimorfismos para enzimas de restricción (Affranchino y col., 1986). Sin embargo, la región divergente tiene escasa homología con las de otros grupos de parásitos de la misma especie. Parece ser que las diferencias en el patrón de restricción de los minicírculos se correlaciona con la presencia de regiones divergentes de distinta secuencia de nucleótidos en los maxicírculos (Affranchino y col., 1986).

Las moléculas homólogas a los clones de minicírculo pTckM-84 y pTckM-88 están muy conservadas en los seis clones de parásitos analizados. La subpoblación o clase de secuencia de minicírculos homóloga al clon pTckM-88 presenta polimorfismos para el sitio de reconocimiento Eco RI sólo en el parásito Miranda-77 (Figs. 6.B y 5). La existencia de subpoblaciones de minicírculos homogéneos con sitios de restricción polimórficos ya fue descripta por el Dr. Sánchez en 1986.

Se comparó la secuencia de nucleótidos de tres moléculas de minicírculos homólogos pero polimórficos provenientes de tres parásitos distintos. Se encontraron 24 mutaciones independientes (Fig 9) La alteración más frecuente fueron mutaciones puntuales (principalmente transiciones), encontrándose en un caso una inserción o deleción de una sola base. No se encontraron grandes reordenamientos. La presencia de gran cantidad de secuencias repetidas directas o invertidas sugiere que ellas tal vez esten involucradas en algún mecanismo recombinatorio responsable de la generación de la diversidad de secuencia en los minicírculos. La alta homología entre las tres moléculas secuenciadas induce a pensar que las mutaciones puntuales son los eventos moleculares tempranos que contribuyen a crear la heterogeneidad de secuencia. Estos resultados concuerdan con las variaciones encontradas en eucariotas superiores cuando se comparan individuos de una misma especie. La mayoría de las mutaciones observadas en organismos

superiores fueron sustituciones o inserciones/delecciones pequeñas, pero nunca se vieron grandes reordenamientos (Brown, 1981; Olivo y col., 1983; Brown y Des Rosiers, 1983 y Monnat y Loeb, 1985). La mayoría de las sustituciones encontradas fueron transiciones (Olivo y col., 1983). El error más frecuente durante la replicación del ADN es la transición en un par de bases (Loeb y Kunkel, 1982). El que no se hayan encontrado mecanismos de reparación en el ADN mitocondrial (Clayton y col., 1974) sugiere que los errores en la replicación son los responsables de los polimorfismos encontrados y por lo tanto de la variación en la secuencia de los minicírculos. No se puede descartar que haya otros mecanismos que actúen en la generación de la diversidad de secuencia de los minicírculos.

Previamente (ver 4.1) se describió un posible mecanismo de evolución de minicírculos. Según ese modelo la replicación preferencial o la segregación desigual de una subpoblación de minicírculos llevaría a la generación de subpoblaciones homogéneas (Sánchez, 1986). Si esto fuera así, la mayoría de los tripanosomas tendrían moléculas homogéneas, pero esto no es cierto en *T. cruzi*. Las subpoblaciones de minicírculos homogéneos originados según este modelo se verían afectadas por una rápida velocidad de replicación. Se generaría una frecuencia de mutación muy alta por acumulación de errores durante la replicación, manteniéndose así la heterogeneidad de secuencia característica de los minicírculos de *T. cruzi*. Las tres moléculas analizadas aquí tendrían un origen común. Las mutaciones puntuales se acumularon independientemente en cada molécula y representarían los primeros errores que llevaron a la diversificación de una población homogénea. Borst y col. (1987), sugirieron que la recombinación genética entre distintos parásitos, descrita en el estadio de *T. brucei* presente en el insecto, es la que genera la heterogeneidad de secuencia de los minicírculos. No hay evidencias directas de que esto sea cierto y tampoco hay indicios de que *T. cruzi* sufra algún mecanismo de recombinación genética en algún estadio de su ciclo de vida.

La secuenciación de minicírculos confirmó la presencia de cuatro regiones conservadas por molécula. Lo mismo sucede en los minicírculos de *T. rangeli* (Frasch y col., 1981). En las cuatro regiones conservadas se encontraron las trece pares de bases conocidas como secuencia "universal"

por encontrarse en los minicírculos de todas las especies de tripanosomátidos estudiados hasta la fecha (Fig. 9) (Chen y Donelson, 1980; Barrois y col., 1981 y Kidane y col., 1984). Esta secuencia es el origen de replicación de los minicírculos (Ntambi y Englund, 1985). Existen algunos plásmidos que poseen más de un sitio de inicio de replicación, siendo uno sólo de ellos el utilizado (Scott, 1984). Quedará por probar si sucede lo mismo en los minicírculos de *T. cruzi* y *T. lewisi* o si este ADN de tripanosomas utiliza un mecanismo de replicación más sofisticado. El porcentaje de homología encontrado entre las regiones conservadas de minicírculos de diferentes tripanosomátidos es de utilidad como criterio taxonómico. La mayor homología de *T. cruzi* se encontró con *T. lewisi* que también pertenece a la sección Esterocoraria; menor homología se observó entre *T. cruzi* y *T. brucei*, miembro de la sección Salivaria. La menor homología se encontró entre *T. cruzi* y *L. tarentolae* que pertenece a un género diferente (Tabla II) De esta manera, la secuenciación de las regiones conservadas de los minicírculos constituye una manera simple de clasificar a los miembros del orden *Kinetoplástida*.

Una de las características de los parásitos de este orden es la existencia de subpoblaciones de minicírculos específicas de especie. Se demostró para distintas especies del género *Leishmania* (Wirth y Mc Mahon Pratt, 1982; Barker y Butcher, 1983 y Kennedy, 1984). También se demostró la existencia de subpoblaciones específicas para determinados clones o aislamientos de *T. cruzi* (Frasch y col., 1984; Sánchez y col., 1984 y Sánchez, 1986). La presencia de estos minicírculos específicos de aislamiento puede explicarse mediante el modelo de evolución descrito anteriormente (4.1). Sánchez y col. en 1984 propusieron utilizar clases de secuencias de minicírculos específicos como sondas radiactivas para la identificación rápida de diferentes aislamientos de *T. cruzi*. Utilizaron un método similar al empleado para la identificación de distintas especies del género *Leishmania* (Wirth y Mc Mahon Pratt, 1982).

En la figura 11 se demuestra que los minicírculos clonados pTckM-84 y pTckM-88 son específicos de aislamiento. Los resultados del Capítulo 5 muestran la validez de la utilización de sondas de ADNk para agrupar parásitos. Se observa una buena correlación entre los parásitos identificados

con la sonda pTckM-84 y la clasificación realizada en dos laboratorios diferentes de varios clones y aislamientos de *T. cruzi* pertenecientes al zimodema Z₂ de Bolivia (5.3.7). El método de identificación utilizado permitió demostrar que un grupo de parásitos (reconocido por la sonda pTckM-84) está ampliamente distribuido en Argentina, Chile y Bolivia, mientras que otro grupo identificado por la sonda pTckAWP2 se distribuye en Argentina, Bolivia, Brasil y Honduras. Los dos grupos de parásitos probablemente sean de una gran importancia epidemiológica. Otras poblaciones de parásitos están geográficamente restringidos como las que dan señal positiva con la sonda de ADNk total 3₁. Es probable que este último grupo no tenga la relevancia epidemiológica de los dos anteriores. La sensibilidad de los minicírculos como sondas de ADN hace que puedan transformarse en el futuro en una herramienta bioquímica importante para estudios epidemiológicos. Se pueden usar como sonda tanto minicírculos clonados como ADNk total (Sánchez y col., 1984; Sánchez, 1986).

La tipificación de cepas por análisis de patrones de restricción de ADNk (esquizodemas) y por sondas de ADNk no siempre dan los mismos resultados. Los patrones de restricción de ADNk pueden ser diferentes aún si las cepas estudiadas están íntimamente relacionadas entre sí (Fig. 7). Las técnicas de hibridación con minicírculos son de utilidad para agrupar cepas relacionadas aunque existan diferencias en los patrones de restricción debido a la rápida evolución de los minicírculos (Fig. 14 y 15).

Las distintas metodologías utilizadas para clasificar las diferentes cepas y clones de parásitos mostraron una gran diversidad, que se correlaciona con la heterogeneidad en las características biológicas, bioquímicas y morfológicas de diferentes poblaciones de *T. cruzi*. El análisis de patrones de restricción de ADNk de 15 muestras diferentes mostró una gran heterogeneidad en parásitos que por sondas de ADNk sólo se dividen en tres grupos diferentes (Figs. 14 y 15). El análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) de varios genes que codifican proteínas antigénicas de *T. cruzi* mostraron una gran diversidad, dando patrones diferentes en todos los parásitos analizados, salvo para dos aislamientos bolivianos (P₁₈₅ y P₂₅₅, calles 7 y 9 en las figuras 17, 18 y 19). Todos los genes analizados están compuestos por secuencias

repetidas varias veces en tandem cabeza-cola. Las diferencias de tamaños de las bandas probablemente corresponden a variaciones en el número de unidades repetitivas. Cada parásito tiene dos o más genes. Los polimorfismos observados en y entre los parásitos se deben a diferencias en el número de repeticiones que tiene cada copia del mismo gen. Walsh (1987), propuso un modelo en el que señala que las repeticiones en tandem pueden variar su longitud por procesos de recombinación desigual durante la replicación. Este tipo de fenómeno molecular puede llevar a la pérdida de las secuencias involucradas. La presencia de una presión de selección natural importante debida a la función biológica de cada una de las proteínas antigénicas probablemente sea la causa por la cual estos genes con repeticiones en tandem se encuentran en todos los aislamientos de *T. cruzi* analizados. De no ser así sería de esperar que algunas secuencias con repeticiones en tandem se pierdan por el fenómeno descrito anteriormente. La heterogeneidad observada con los genes para antígenos se asemeja a la vista con esquizodemas (Figs. 15, 17, 18 y 19). También se realizó el análisis de RFLP en genes que codifican proteínas altamente conservadas en la naturaleza. Son genes mucho más conservados. Aislamientos que presentaban patrones diferentes con los genes para antígenos, presentan el mismo patrón de restricción cuando se usan como sonda los clones de los genes de GDH-NADP dependiente y Actina (comparar Figs. 17, 18 y 19 con las Figs. 20 y 21).

Ya se describieron anteriormente polimorfismos en genes de *T. cruzi* que codifican proteínas conservadas.

El análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) es una herramienta muy utilizada para evaluar la variación intraespecífica e interespecífica de una gran variedad de organismos (Hayasaka y col., 1988; Yatskievych y col., 1988 y Clark y col., 1989). Las especies poco relacionadas se pueden estudiar utilizando genes que codifican productos altamente conservados en la naturaleza, cuyas secuencias divergen lentamente. Por otro lado, las relaciones entre cepas o aislamientos muy relacionados entre sí, se pueden estudiar utilizando genes menos conservados o regiones espaciadoras.

Lake y col. (1989), compararon la secuencia de los genes 9S y 12S del ARN ribosomal mitocondrial de cinco especies pertenecientes a cuatro

géneros diferentes del orden *Kinetoplastida*. Con los datos obtenidos construyeron un árbol filogenético en el cual reeditaron la historia de estos protozoos. En dicho árbol, la especie monogenética *C. fasciculata* resultó ser la más antigua, seguida por *Leptomonas spp.* Las tres especies digenéticas analizadas (*T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana*) son más recientes y se desprenden de la línea de las *Leptomonas spp.* Los autores observaron que la ubicación de las especies en el árbol filogenético se correlacionaba con evidencias biológicas como el ciclo de vida de estos organismos, así como con distintas evidencias bioquímicas.

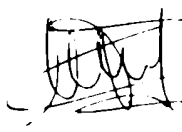
El estudio de polimorfismos de fragmentos de restricción de ADNn (ver 6.2 y 6.3) y el análisis con sondas de ADNk (ver 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4), permitió evaluar la variabilidad intraespecífica de *T. cruzi*. Los fenogramas obtenidos de los análisis de agrupamientos realizados no muestran la distancia evolutiva entre dos organismos sino el grado de similitud entre ellos. El fenograma de la figura 22 muestra dos grupos diferentes de parásitos con un 0% de similitud entre ellos. Un grupo está compuesto por dos aislamientos de Bolivia (P₁₈₅ y P₂₅₅) y un clon de Argentina (M-80); los tres parásitos son indistinguibles por sondas de ADNk. El segundo grupo está compuesto por parásitos con diferentes grados de similitud (entre un 40% y un 100%). Hay parásitos de Argentina, Chile, Brasil y Bolivia. Dos aislamientos de Bolivia (P₁₁ y P₂₀₉) son indistinguibles de un clon de Argentina (CA1-69) por este criterio. Es importante tener en cuenta que parásitos de regiones geográficas muy distantes comparten sondas de ADNk y demuestran ser muy similares por este criterio de clasificación. En la figura 23 se observan dos fenogramas, uno obtenido con los datos de patrones de restricción de genes conservados (Fig.23.A) y el segundo con los patrones de restricción de genes que codifican antígenos de *T. cruzi* (Fig. 23.B). No se pudieron obtener datos de bandeo de genes conservados para los aislamientos de Bolivia por falta de ADNn. A pesar de ello, los datos de los demás aislamientos, clones y cepas demuestran que este criterio taxonómico permite formar grupos de parásitos similares a los obtenidos con ADNk (comparar el fenograma de la figura 22 con el de la figura 23.A). Estos resultados sugieren que el ADNk y los genes nucleares están ligados de alguna manera. El mismo tipo de relación que se pone de manifiesto con el estudio de

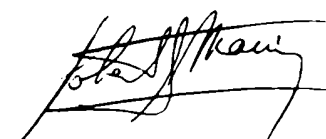
esquizodemas, sondas de ADNk y variabilidades isoenzimáticas (Tibayrenc y Ayala, 1988). El fenograma obtenido con los patrones de restricción de los genes que codifican antígenos mostró un agrupamiento muy diferente. Las similitudes entre todos los parásitos son menores que las mostradas por los otros dos caracteres utilizados. Hay una heterogeneidad más acentuada: parásitos indistinguibles por sondas de ADNk, como P₁₈₅, P₂₅₅ y M-80 ahora presentan una similitud que varía entre el 70% y el 45%. MS, AC, GER e Y son indistinguibles por sondas de ADNk (Fig. 22). Los genes conservados permiten diferenciar AC de los otros parásitos (Fig. 23.A), mientras que utilizando genes de antígenos son todos diferentes (Fig. 23.B). A pesar de que los cuatro parásitos provienen de Brasil, las similitudes por este criterio son sólo del 20%. Tibayrenc y Breniere (1988), mostraron que los zimodemas y esquizodemas pueden ser considerados clones naturales (o familias de clones relacionados) de parásitos. Algunos clones se encontraron en amplias regiones geográficas y fueron considerados por lo tanto "clones mayores". Tanto con sondas de ADNk como con genes conservados se encuentran parásitos relacionados en regiones geográficas muy distantes. Es importante conocer las características médicas y epidemiológicas de estos clones o grupos de parásitos ampliamente representados en la naturaleza. Existen otros grupos de parásitos de menor relevancia epidemiológica, ya que se encuentran en regiones geográficas muy limitadas.

Los resultados presentados permiten definir grupos de cepas, clones y aislamientos de *T. cruzi* en base al grado de similitud entre ellos. La correlación entre los resultados obtenidos con sondas de ADNk y genes conservados, confirma la validez de la utilización de sondas de ADNk como criterio taxonómico para agrupar parásitos relacionados.

CONCLUSIONES

- _ Existen subpoblaciones homogéneas de minicírculos en la mitocondria de algunos aislamientos de *T. cruzi*
- _ Las moléculas que componen estas subpoblaciones homogéneas son homólogas en secuencia de nucleótidos salvo por algunos polimorfismos para sitios de enzimas de restricción.
- _ Los polimorfismos son generados por mutaciones puntuales, transiciones, transversiones o inserciones/delecciones
- _ Existen minicírculos específicos de clones o aislamientos de parásitos.
- _ La utilización de minicírculos clonados o ADNk total demostró ser una herramienta importante en estudios epidemiológicos.
- _ Genes nucleares que codifican proteínas antigénicas relevantes en la enfermedad de Chagas son altamente polimórficos en diferentes aislamientos de *T. cruzi*.
- _ Genes nucleares que codifican proteínas conservadas en la naturaleza también presentan polimorfismos. Son mucho menos polimórficos que los genes mencionados anteriormente.
- _ Las técnicas utilizadas y los criterios empleados sirven para confirmar la heterogeneidad de las distintas poblaciones de T. cruzi en la naturaleza.
- Los análisis de agrupamientos demuestran la existencia de grupos de parásitos ampliamente distribuidos en la naturaleza y otros de localización más restringida.
- Los grupos de parásitos formados utilizando sondas de ADNk se corresponden bien con los obtenidos mediante el análisis de genes nucleares conservados.


FRASCH


ROBERTO ANIBAL MAC NA

REFERENCIAS

- Affranchino, J. L., Ibañez, C. F., Luquetti, A. O., Rossi, A., Reyes, M.B., Macina, R. A., Åslund, L., Pettersson, U. y Frasc, A. C. C. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 221-228.
- Affranchino, J. L., Sánchez, D. O., Engel, J. C., Frasc, A. C. C. y Stoppani, A. O. M. (1986) *J. Protozool.* 33, 503-507.
- Alexeieff, A. (1917) *Comp. Rend Soc. Biol* 80, 358-361.
- Andrews, N. M., Katzin, A. M y Colli, W. (1984) *Eur. J. Biochem.* 140, 599-604.
- Araujo, F. G. (1985) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 242-245.
- Araujo, F. y Guptill, D. (1984) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 362-371.
- Avila, J. L., Avila, A. y Muñoz E. (1981) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 769-774.
- Barker, D. C. y Butcher, J. (1983) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 285-297
- Barret, T. V., Hoff, R. H., Mott, K. E. y col. (1980) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 84-90.
- Barrois, M., Riou, G. y Galibert, F. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 3323-3327.
- Beard, C. A., Wrightsman, R. A. y Manning, J. E. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 28, 227-234.
- Benne, R. (1989) *Biochim. Biophys. Acta.* En prensa.
- Benne, R., Van Den Burg, J., Brakenhoff, J.P.J., Sloof, P., Van Boom, J.H. y Tromp, M.C. (1986) *Cell* 46, 819-826.
- Benton, W, y Davis, R. (1977) *Science* 196, 180-182.
- Biggin, M. D., Gibson, T. J. y Hong, G. F. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3963-3965.
- Birkenmeyer, L., Sugisaki, H. y Ray, D. S. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 7107-7118.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979) *Nucleic Acids. Res.* 7, 1513-1523.

- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L. y Boyer, H.W. (1977) *Gene* 2, 95-113.
- Borst, P. y Hoeljmakers, J. H. J. (1979) *Plasmid* 2, 20-40.
- Borst, P., Fase-Fowler, F. y Gibson, W. C. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 23, 31-38.
- Borst, P., Fase-Fowler, F., Weijers, P., Barry, J., Tetley, L. y Vickerman, K. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 15, 129-142.
- Borst, P., Hoeljmakers, J. H. J. y Hadjuk, S. L. (1981) *Parasitology* 82, 81-93.
- Boyer, H.W. y Roulland-Dussoix (1969) *J. Mol. Biol.* 41, 459-472.
- Brack, C. (1968) *Acta Tropica* 25, 289-356.
- Brener, Z. (1965) *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 59, 19-26.
- Brener, Z. (1973) *Ann. Rev. Microbiol.* 27, 347-383.
- Brener, Z. (1984) *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual* (Ed. C. Morel), UNDP/WHO/FIOCRUZ, 13, 2-40.
- Brener, Z. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 149-155.
- Brener, Z. (1985) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18(supl), 1-8.
- Brener, Z. (1986) *Parasitol. Today* 2, 196-197.
- Brener, Z., Chiari, E. y Alvarenga, N. J. (1974) *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 16, 32-36.
- Brener, Z., Costa, C.A.G. y Chiari, C. (1976) *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 18, 450-455.
- Bresslau, E. y Scremin, L. (1924) *Arch. Protistenk.* 48, 509-515.
- Brown, G. G. y Des Rosiers, L. J. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 6699-6708.
- Brown, W. M. (1981) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 361, 119-134.
- Burnette, W. N. (1981) *Anal. Biochem.* 112, 195-203.

- Carreno, H., Rojas, C., Aguilera, X., Apt, W., Miles, M. A. y Solari, A. (1987) *Exp. Parasitol.* 64, 252-260.
- Casadaban, M. J. y Cohen, S. N. (1980) *J. Mol. Biol.* 138, 179-207.
- Cazzulo, J. J., Cazzulo, B. M. F., Engel, J. C. y Cannata, J. J. B. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 329-343.
- Chagas, C. (1909 a) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159-218.
- Chagas, C. (1909) *An. Acad. Med. Río de Janeiro* 72, 188.
- Chagas, C. (1911) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3, 219.
- Chagas, C. (1916 a) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 8, 3-36.
- Chagas, C. (1916) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 8, 37-65.
- Chapman, M. D., Snary, D. y Miles, M.A. (1984) *J. Immunol.* 132, 3149-3153.
- Chen, K. K. y Donelson, J. E. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2445-2449.
- Clark, C. G., Cross, G. A. M. y De Jonckheere, J. F. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 281-296.
- Clark, T. B. y Wallace, F. G. (1960) *J. Protozool.* 7, 115-124.
- Clayton, D. A., Doda, J. N. y Friedberg, E. C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 2777-2781.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. y Hsu, L. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 2110-2114.
- Corcoran, L. M., Thompson, J. K., Walliker, D. y Kemp, D. J. (1988) *Cell* 53, 807-813.
- Cosgrove, W. B. y Skeen, M. J. (1970) *J. Protozool.* 17, 172-177.
- Crisci, J. V. y López Armengol, M. F. (1983) *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica.* (Editado por la Organización de los Estados Americanos) Washington, D.C.
- Cross, G. A. M. (1978) *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* 202, 55-72.

- De la Cruz, V. F., Neckelmann, N. y Simpson, L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 15136-15147.
- De Lange, T., Michels, P. A. M., Veerman, H. J. G., Cornelissen, A.W.C.A. y Borst, P. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 3777-3790.
- Deane, M., Sousa, M., Pereira, N., Goncalves, A., Momen, H. y Morel, C. (1984) *J. Protozool.* 31, 276-280.
- Degrave, W., Frogoso, S. P., Britto, C., Heuverswyn, H. V., Kidane, G. Z., Cardoso, M. A. B., Mueller, R. V., Simpson, L. y Morel, C. M. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 63-70.
- Denhardt, D. T. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 641-646.
- Docampo, R., Moreno, S. N. J. y Cruz, F. S. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 241-248.
- Doyle, P. S., Dvorak, J. A. y Engel, J. C. (1984) *J. Protozool.* 31, 280-283.
- Dvorak, J. A., Hall, T. E., Crane, M. S. J., Engel, J. C., Mc Daniel, J. P. y Uriegas, R. (1982) *J. Protozool.* 29, 430-437.
- Dvorak, J. A., Hartman, D. L. y Miles, M. A. (1980) *J. Protozool.* 27, 472-474.
- Engel, J. C., Doyle, P. S. y Dvorak, J. A., (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 39, 69-76.
- Engel, J. C., Dvorak, J. A., Segura, E. L. y Crane, M. St. J. (1982) *J. Protozool.* 29, 555-560.
- Englund, P. T. (1978) *Cell* 14, 157-168.
- Englund, P. T. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4895-4900.
- Engman, D.M., Reddy, L.V., Donelson, J. E. y Kirchhoff, L.V. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 22, 115-123.
- Eperon, I., Janssen, J., Hoeljmackers, J. H. J. y Borst, P. (1983) *Nucleic Acid Res.*, 11, 105-125.
- Fairlamb, A., Weislogel, P., Hoeljmackers, J. H. J. y Borst, P. (1978) *J. Cell. Biol.* 76, 293-309.

- Flint, J. E., Schechter, M., Chapman, M. D. y Miles, M. A. (1984) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 193-202.
- Fouts, D. L. y Wolstenholme, D. R. (1979) *Nucleic Acids Res.* 6, 3785-3804.
- Frasch, A. C. C., Affranchino, J.L., Ibañez, C. F., Macina, R. A., Reyes, M. B., Camargo, M. E., Åslund, L y Pettersson, U. (1987) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82, 238-251.
- Frasch, A. C. C., Goijman, S. G., Cazzulo, J. J. y Stoppani, A. O. M. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* 4, 163-170.
- Frasch, A. C. C., Hajduk, S. L., Hoeljmakers, J. H. J., Borst, P., Brunel, F. y Davison, J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 607, 397-410.
- Frasch, A. C. C., Sánchez, D. O. y Stoppani, A. O. M. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 782, 26-33.
- Freeman, F., Wilson, P. L. y Kazan, B. H. (1975) *Exp. Parasitol.* 38, 181-190.
- Galvão-Castro, B., Sá-Ferreira, J. A. y Pirmez, C. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 69-76.
- Gibson, W. C. y Borst, P (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 18, 127-140.
- Gibson, W. C. y Miles, M. A. (1985) *Br. Med. Bull.* 41, 115-121.
- Gibson, W. C. y Miles, M. A. (1986) *EMBO J.* 5, 1299-1305.
- Gibson, W. C., Osinga, K. A., Michels, P. A. M. y Borst, P. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 231-242.
- Goncalvez, A. M., Chiarí, E., Deane, M. P., Carneiro, M., Romanha, A. J. y Morel, C. (1984) *Application of Biochemical and Molecular Biology Techniques to problems of Parasite and Vector Identification*, pp. 253-274, World Health Organization.
- González Cappa, S. M., Chiale, P., Del Prado, G. E., Katzin, A. M., Martini, G. W. de, Isola, E. D. de, Abramo Orrego, L. y Segura, E. L., (1980) *Medicina (Bs.As.)* 40, 63-68.
- González, N. S., Sánchez, D. O., Frasch, A. C. C. y Algranati, I. D. (1984) *Mol. Cell. Biochem.* 63, 157-164.

- Grunstein, M. y Hogness, D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3961-3965.
- Hajduk, S. L., Klein, V. A. y Englund, P. T. (1984) *Cell* 36, 483-492.
- Hanahan, D. (1986) *DNA cloning. Vol. I. A practical approach.* (Editado por D. M. Glover) p 109-135, IRL Press.
- Hayasaka, K., Horai, S., Gojobori, T., Shotake, T., Nozawa, K. y Matsunaga, E. (1988) *Mol. Biol. Evol.* 5, 270-281.
- Henriksson, J. Aslund, L., Macina, R. A., Franke de Cazzulo, B., Cazzulo, J. J., Frasch, A. C. C. y Pettersson, V. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* (en prensa).
- Hensgens, L. A. M., Brakenhoff, J., De Vries, B. F., Sloof, P., Tromp, M. C., Van Boom, J. H. y Benne, R. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 7327-7344.
- Hide, G., Cattand, P., LeRay, D., Barry, J. D. y Tait, A. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 39, 213-226.
- Hoare, C. A. (1964) *J. Protozool.* 11, 206-207.
- Hoare, C. A. (1972) *The Trypanosomes of Mammals.* (Editado por Blackwell), Oxford.
- Hoeijmakers, J. H. J. y Borst, P. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 521, 407-411.
- Hoeijmakers, J. H. J. y Weijers, P. J. (1980) *Plasmid* 4, 97-116.
- Hoeijmakers, J. H. J., Weijers, P., Brakenhoff, C. y Borst, P. (1982) *Plasmid* 7, 221-229.
- Honigberg, B.M. (1963) *Progress in Protozoology* (Editado por J.Ludvik; J.Lom y J.Vavra) p. 68. Academic Press, Londres y New York.
- Ibañez, C. F., Affranchino, J. L. y Frasch, A. C. C. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 25, 175-184.
- Ibañez, C. F., Affranchino, J. L., Macina, R. A., Reyes, M. B., Leguizamón, S., Camargo, M. E., Aslund, L., Pettersson, U. y Frasch, A. C. C. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 27-34.
- Jaccard, P. (1908) *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 44, 223-270

- Jasmer, D. y Stuart, K. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 18, 257-270.
- Jasmer, D. y Stuart, K. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 18, 321-332.
- Kemp, D. J., Thompson, J. K., Walliker, D. y Corcoran, L. M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7672-7676.
- Kennedy, W. P. K. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.* 12, 313-325.
- Kerschmann, R. L., Wolfson, J.S., McHugh, G. L., Dickerson, G. R., Hooper, D. C. y Swartz M. N. (1989). *J. Protozool.* 36, 14-20.
- Ketteridge, D. (1975) *Acta Trop.* 32, 173-189.
- Kidane, G. Z., Hughes, D. y Simpson, L. (1984) *Gene* 27, 265-277.
- Kirchhoff, L. V. y col., (1987) *Am. J. Med.* 82, 915-920.
- Kirchhoff, L. V., Engel, J. C., Dvorak, J. A. y Sher, A. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.* 11, 81-89.
- Kirchhoff, L. V., Gam, A. A., Gusmao, R. D'A., Goldsmith, R. S., Rezende, J. M. y Rossi, A. (1987) *J. Infect. Dis.* 155, 561-564.
- Kooy, R. F., Ashall, F., Van der Ploeg, M. y Overdulve, J. P. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 73-76.
- Krettli, A. U. (1982) *Afr. J. Clin. Exp. Immunol.* 3, 327-345.
- Krettli, A. U., Thomas, N y Eisen, H. (1980) *INSERM* 97, 553-558.
- Laemli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-682.
- Lake, J. A., de la Cruz, V. F., Ferreira, P. C. G., Morel, C. y Simpson, L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4779-4783.
- Lemsre, J. L., Afchain, D., Orozco, O., Loyers, M., Brechiere, F. S., Desjensc, P., Carlin, Y., Martin, V., Nogueira-Queiroz, J. A., Le Ray, D. y Capron, A. (1986) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 86-93.

- Leon, W., Frank, A., Hoeijmakers, J. H. J., Fase-Fowler, F., Borst, P. y col. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 607, 221-231.
- Levin, M. J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P. A., Ruiz, A. M., Kahn, A., Rosembaun, M. B., Torres, H. N. y Segura, E. L. (1989) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 530-538.
- 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., Spragne, V., Vassa, J. y Wallace, F. G. (1980) *J. Protozool.* 27, 37-54.
- Loeb, L. A. y Kunkel, T. A. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 52, 429-457.
- Lopes, V. y Wirth, D. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 77-84.
- Luquetti, A. O. y col. (1986) *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 80, 217-225.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marini, J. C., Levene, S. D., Crothers, D. M. y Englund, P. T. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7664-7668.
- Marini, J. C., Levene, S. D., Crothers, D. M. y Englund, P. T. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 7678.
- Mattei, D. M., Goldenberg, S., Morel, C., Azevedo, H. P. y Roitman, J. (1977) *FEBS Lett.* 74, 264-268.
- Messing, J. (1979) *Recombinant DNA Technical Bulletin* 2, 43-48.
- Michelotti, E. M. y Hajduk, S. L. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 927-932.
- Miles, M. A. (1979) *Biology of the Kinetoplast* (Editado por W.H.R. Lumsden y D.A. Evans) p.117-196. Academic Press, Londres y New York.
- Miles, M. A. (1983) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 5-23.
- Miles, M. A. y Cibulskis, R. E. (1986) *Parasitol. Today* 2, 94-97.

- Miles, M. A., Apt, W. B., Widmer, G., Póvoa, M. y Schofield, C. J. (1984) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 526-535.
- Miles, M. A., Lanham, S. M., de Souza, A. A. y Póvoa M. (1980) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 221-237.
- Miles, M. A., Póvoa, M. M., Prata, A., Cedillos, R. A., de Souza, A. A. y Macedo, V. (1981) *Lancet*, 1338-1340.
- Miles, M. A., Souza, A., Póvoa, M. M., Schaw, J. J., Lainson, R. y Toyé, P. J. (1978) *Nature* 272, 819-821.
- Miles, M. A., Toyé, R. J., Oswald, S. C. y Godfrey, D. G. (1977) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 217-225.
- Monnat, R. J. y Loeb, L. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 2895-2899.
- Montamat, E. E., Arauzo, S., Cazzulo, J. J. y Subías, E. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 417-422.
- Morel, C., Goncalves, A. M. y Simpson, L. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79, 51-53.
- Morel, C., Chiari, E., Plessman Camargo, E., Mattel, D. M., Romanha, A. J. y Simpson, L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 6810-6814
- Morel, C., Deane, M. P. y Goncalves, A. M. (1986) *Parasitol. Today*, 2, 97-100.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Ntambi, J. y Englund, P. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 5574-5579.
- Ntambi, J., Marini, J. C., Bangs, J. D., Hajduk, S. L., Jiminez, H. E., Kitchin, P. A., Klein, V. A., Ryan, K. A. y Englund, P. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.* 12, 273-286.
- Nussensweig, V., Deane, L. M. y Kloetzel, J. (1963) *Exp. Parasitol.* 14, 221-232.
- Oliveira-Filho, A. M. (1988) *Rev. Arg. Microbiol.* 20, 39-48.

- Olivo, P. D., Van de Walle, M. J., Laipis, P. J. y Hauswirth, W. W. (1983) *Nature* 306, 400-402.
- Opperdoes, F. R. y Borst, P. (1977) *FEBS Lett.* 80, 360-364.
- Ouaiissi, A. M., Cornette, J. y Capron, A. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 19, 201-211.
- Payne, M., Rothwell, V., Jasmer, D. P., Feagin, J. E. y Stuart, K. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 15, 159-170.
- Peterson, D. S., Wrightsman, R. A. y Manning, J. E. (1986) *Nature* 322, 566-568.
- Pietrzak Rohrer, S., Michelotti, E. F., Torri, A. F. y Hajduk, S. L. (1987) *Cell* 49, 625-632.
- Pinto Díaz, J. C. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 85-91
- Pizzi, T. (1956) *Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Monografías de la Univ. de Chile.* p.183.
- Ponzi, M., Birago, C. y Battaglia, P. A. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.* 13, 111-119.
- Postan, M., Mc Daniel, J. P. y Dvorak, J. A. (1983) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 497-506.
- Prata, A. (1985) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 8, 9-16.
- Reedy, P. D. y Miles, M. A. (1980) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 238-242.
- Reyes, M. B., Lorca, M., Muñoz, P. y Frasch, A. C. C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 2846-2850.
- Rigby, P. W. J., Dickman, M., Rhodes, C. y Berg, P. (1977) *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.
- Riou, G. y Barrois, M. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 405-409.
- Riou, G. y Yot, P. (1977) *Biochemistry* 16, 2390-2396.
- Rohrer, S. P., Michelotti, E. F., Torri, A. F. y Hajduk, S. L. (1987) *Cell* 49, 625-632.
- Ryan, K. A., Shapiro, T. A., Rauch, C. A. y Englund, P. T. (1988) *Ann. Rev. Microbiol.* 42, 339-358.

- Sánchez, D. O. (1986) Tesis Doctoral. FCEN-UBA.
- Sánchez, D. O., Frasch, A. C. C., Carrasco, A. E., González Cappa, S. M., Isola, E. D. de y Stoppani, A. O. M. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.*, 11, 169-178.
- Sánchez, D. O., Madrid, R., Engel, J. C. y Frasch, A. C. C. (1984 a) *FEBS.Lett.* 168, 139-142.
- Sanger, F. y Coulson, A. R. (1978) *FEBS Lett.* 87, 107-110.
- Sanger, F., Nicklens, S. y Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467.
- Scharfstein, J., Luquetti, A., Murta, A. C. M., Senna, M., Rezende, J. M., Rossi, A. y Mendonca-Previato, L. (1985) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 1153-1160.
- Schechter, M., Flint, J. E., Voller, A., Guhl, F., Marinkelle, C. J. y Miles, M. A. (1983) *Lancet* 2, 939-941.
- Sher, A. y Snary, D. (1982) *Nature* 300, 639-640.
- Schlomai, J. y Zadok, A. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 8017-8028.
- Schmuñis, G. A. (1980) *Exp. Parasitol.* 50, 90-102.
- Schwartz, D. C. y Cantor, C. R. (1984) *Cell* 37, 67-75.
- Scott, J. N. (1984) *Microbiol. Rev.* 48, 1-23.
- Shaw, M. J., Feagin, J. E., Stuart, K. y Simpson, L. (1988) *Cell* 53, 401-411.
- Shlomai, J. y Zadok, A. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 8017-8028.
- Simpson, L. (1987) *Ann. Rev. Microbiol.* 47, 363-382.
- Simpson, L. y Simpson, A. (1978) *Cell* 14, 169-178.
- Simpson, L., Neckelmann, N., de la Cruz, V., Simpson, A. M., Feagin, J. E., Jasmer, D. P. y Stuart, K. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 6182-6196.
- Simpson, L., Simpson, A. M., Kidane, G., Livingston, L. y Spithell, T. W. (1980) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 1053-1063.

- Snary, D. y Hudson, L. (1979) FEBS Lett. 100, 166-170.
- Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco, Ca., XV.
- Solari, A. J. (1980) Chromosoma 78, 239-255.
- Sook Koo, H., Wu, H.-M. y Crothers, D. M. (1986) Nature 320, 501-506.
- Southern, E. M. (1975) J. Mol. Biol. 98, 503-517.
- Storino, M. (1985) Miocardiopatía Chagásica Crónica. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.
- Stuart, K. (1979) Plasmid 2, 520-528.
- Stuart, K. (1983) Mol. Biochem. Parasitol. 9, 93-104.
- Stuart, K. y Gelvin, S. (1982) Mol. Cell. Biol. 2, 845-852.
- Sturm, N. R. y Simpson, L. (1990) Cell 61, 879-884.
- Sturm, N. R., Degraeve, W., Morel, C. y Simpson, L. (1989) Mol. Biochem. Parasitol. 33, 205-214.
- Sugisaki, H. y Ray, D. (1987) Mol. Biochem. Parasitol. 23, 253-264.
- Tait, A. (1980) Nature 287, 536-538.
- Takle, G. B., Young, A., Snary, D., Hudson, L. y Nicholls, S. C. (1989) Mol. Biochem. Parasitol. 37, 57-64.
- Tautz, D. y Reuz, M. (1983) Anal. Biochem. 132, 14-19.
- Tennyson, G., Sbatos, C., Higuichi, K., Meglin, N. y Brewer, H. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 500-504.
- Teixeira, M. M. G. y Yoshida, N. (1986) Mol. Biochem. Parasitol. 18, 271-282.
- Tibayrenc, M. y Ayala, F. J. (1987) Parasitol. Today. 3, 189-190.

- Tibayrenc, M. y Ayala, F. J. (1988) *Evolution* 42, 277-292.
- Tibayrenc, M. y Breniere, S. F. (1988) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83, 249- 255.
- Tibayrenc, M., Carioca, M. L., Solignac, M., Dedet, J. P., Pock, O. y Desjensc, P. (1985) *Genetica* 67, 223-230.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A. y Ayala, F. J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 115-119.
- Towbin, H., Stahelin, T. y Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354.
- Toyé, P. J. (1974) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68, 147.
- Van der Ploeg, L. H. T., Cornelissen, A. W. C. A., Michels, P. A. M. y Borst, P. (1984 a) *Cell* 39, 213-221.
- Van der Ploeg, L. H. T., Schwartz, D. C., Cantor, C. R. y Borst, P. (1984) *Cell* 37, 77-84.
- Van der Spek, H., Van den Burg, J., Croiset, A., Van den Brock, M., Sloof, P. y Benne, R. (1988) *EMBO. J.* 7, 2509-2514.
- Vickerman, K. (1978) *Nature* 273, 613-617.
- Walsh, J. B. (1987) *Genetics* 115, 553-567.
- W.H.O. Bulletin (1981).
- Wirth, D. F. y Mc Mahon Pratt, D. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 6999-7003.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985) *Gene* 33, 103-119.
- Yatskievych, G., Stein, D. B. y Gastony, G. J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2589-2593.
- Yoshida, N. (1986) *Exp. Parasitol.* 61, 184-191.