

ARTÍCULO ORIGINAL

Heterogeneidad clonal en epimastigotos de una cepa centroamericana de Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

OLGER CALDERÓN-ARGUEDAS¹, ADRIANA TROYO¹, IDALIA VALERIO² y MISAEL CHINCHILLA^{1,2}

CLONAL HETEROGENEITY OF A CENTRAL AMERICAN STRAIN OF *Trypanosoma cruzi* (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)

The clonal heterogeneity properties of a Central American (San Salvador) strain of T. cruzi was evaluated using a macrophage culture system. Four clones named Clon 9, Clon 10, Clon 11 and Clon 12 were obtained by culture in a semisolid agar medium from the wild T. cruzi strain. Each clone and the parental strain were sub-cultured in Schneider medium with 10% fetal bovine serum before the infection process. The macrophages were cultured on cover slides and infected with epimastigotes of each clone and the parental strain. The infection rate of the cells showed significant statistical differences ($p < 0.05$), but the parasite burden of the infected cells in each system was similar. The kinetics of the parasite multiplication had a growing pattern that was much higher at 96 hrs after infection in one of the clones ($p < 0.05$). The results prove that the interactions between parasite forms and target cells can differ in clones and the parental strain, and that the intracellular growing properties of T. cruzi in the individual clones can be different.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Trypanosomatidae, Chagas disease, Macrophages, Epimastigotes.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas es un parásito altamente variable. Mediante técnicas de electroforesis de isoenzimas, se han podido identificar varios zymodemes con características biológicas y patológicas particulares que le dan un carácter propio a la enfermedad de Chagas en las dife-

rentes regiones donde ésta es prevalente^{1,2}. De igual forma, el análisis de ADN ha podido revelar la existencia de schizodemes, que al igual que los zymodemes se pueden asociar con comportamientos biológicos particulares de los parásitos³. En un estudio, mediante el estudio de las características biológicas como la virulencia, la evolución de la parasitemia, el histotropismo y las formas celulares predomi-

¹ Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET). Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica.

² Laboratorio de Investigación. Universidad de Ciencias Médicas «Dr. Andrés Vesalio Guzmán». San José, Costa Rica.

nantes, se pudo diferenciar hasta tres grandes grupos de cepas de *T. cruzi* denominados biodesmes⁴.

La heterogeneidad ha sido observada a nivel de cepas o aislamientos y algunos trabajos han abierto la posibilidad de considerar un comportamiento diferenciado entre los clones constitutivos con respecto a su cepa parental^{5,6}.

Dado que el comportamiento de un parásito depende en gran medida de la respuesta fisiológica e inmunológica del hospedador, se decidió analizar el fenómeno de heterogeneidad en un modelo celular, donde el único reto para el parásito lo constituyen las defensas propias de la célula hospedadora, independientemente de otros mecanismos de protección del hospedador.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó una cepa de *T. cruzi* aislada en San Salvador (El Salvador) a partir de un vector infectado de la especie *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae). Este aislamiento se denominó arbitrariamente Cepa Salvador, la cual es mantenida por medio de pasajes mensuales en el medio difásico de Rugai.

Para la obtención de los clones se utilizó un sistema de cultivo en medio semisólido de agar de acuerdo con una metodología descrita previamente⁷. Luego de 5 semanas de incubación, se obtuvieron colonias de *T. cruzi*, a partir de las cuales se realizaron cultivos en medio Schneider⁸ suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibióticos (penicilina 100 UI/mL, estreptomycin, 100 µg/mL). Se pudieron obtener cuatro clones que se denominaron arbitrariamente Clon 9, Clon 10, Clon 11 y Clon 12.

La cepa en su forma parental también fue cultivada en medio Schneider en las mismas condiciones, previo a su utilización en el experimento.

a.- Obtención y preparación de los macrófagos. Se obtuvieron macrófagos a partir de ratones NGP (25–30 g) proporcionados por el Laboratorio de Ensayos Biológicos de la Universidad de Costa Rica, criados con alimento concentrado local y agua “*ad libitum*”. Para la preparación de las células, se siguió el método

básico de cultivo de macrófagos que ha sido publicado con anterioridad^{9,10}, con algunas variaciones. Brevemente, el exudado peritoneal de todos los animales fue obtenido lavando la cavidad con MEM suplementado con SFB al 10%, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (MEM-SFB). Los macrófagos se mezclaron para preparar un concentrado y posteriormente fueron contados en cámara de Neubauer para ajustar su concentración a 3×10^5 células/ml; 1×10^5 células contenidas en 0,3 ml de esta suspensión fueron sembradas directamente sobre cubreobjetos de 22 x 22 mm, los cuales fueron incubados por 24 horas a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5%.

b.- Infección de las células. Luego de la incubación, los macrófagos fueron lavados con MEM-SFB e infectados con epimastigotos de *T. cruzi* de cada uno de los clones en estudio, en una relación de 3 células por parásito (3×10^5 epimastigotos/ml) en un volumen final de 0,1 ml por cubreobjeto. Luego de 24 h de infección, los cubreobjetos se lavaron con MEM-SFB y se les agregó 300 µl de MEM-SFB. Luego de incubarlos bajo las mismas condiciones mencionadas con anterioridad, se estudiaron muestras a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores a la infección. Luego de cada uno de estos períodos, los cubreobjetos fueron fijados en alcohol metílico y teñidos con colorante de Giemsa para su posterior observación al microscopio de luz. Los recuentos y su análisis fueron hechos según métodos descritos con anterioridad^{9,10,11}. Para cada uno de los clones así como para la cepa parental se determinó el porcentaje de macrófagos infectados así como el número de parásitos por cada 100 células infectadas. Además se calculó la tasa de multiplicación la cual se obtuvo dividiendo el número de parásitos intracelulares después de 96 horas de incubación entre el número de parásitos después de 24 horas de incubación. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado.

c.- Análisis estadístico. La evaluación del porcentaje de las células infectadas con cada uno de los clones así como con la cepa parental fue realizada mediante un análisis de variancia (ANDEVA)¹², utilizando un coeficiente de confiabilidad del 95% ($\alpha:0.05$). Posteriormente se realizó una prueba de diferencias verda-

deramente significativas (DVS)12 con un nivel de significancia del 95% (α : 0,05). Las comparaciones de los niveles de formas parasitarias intracelulares a las 24 y a las 96 horas fueron realizadas por el mismo procedimiento citado anteriormente, utilizando una confiabilidad del 95% (α : 0,05).

RESULTADOS

Luego de la confrontación de los parásitos con las células blanco, se pudo observar que la eficiencia del proceso fagocítico, reflejado en el porcentaje de macrófagos infectados con cada uno de los clones y la cepa parental, mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 1).

A pesar de esto, la captación de parásitos por parte de las células que experimentaron el fenómeno de fagocitosis, mostró niveles de infección relativamente homogéneas (Figura 2). Si bien es cierto el análisis de variancia (ANDEVA) mostró diferencias significativas en este aspecto, las pruebas de DVS no identificaron a algún clon o cepa parental que presentara un comportamiento particularmente di-

ferente a los otros sistemas ($p < 0,05$).

La cinética de multiplicación parasitaria tuvo un comportamiento moderadamente creciente a lo largo del experimento, tanto en los clones como en la cepa parental. Cabe destacar que para las 96 horas post infección, el Clon 12 mostró niveles de multiplicación significativamente mayores a los otros sistemas en estudio (Figura3). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas tanto en el ANDEVA como en las pruebas de DVS con respecto a los otros sistemas evaluados. La tasa de multiplicación (Tabla 1) fue significativamente mayor en este clon en comparación con los otros sistemas en estudio ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

La heterogeneidad de *T. cruzi* ha sido un tópico de investigación desde hace varias décadas. A pesar de que los primeros estudios en este campo se dedicaron al análisis y comparación de cepas, diversas investigaciones han postulado la ocurrencia del fenómeno a nivel clonal^{5,6}. Dado que los datos obtenidos en diversas investigaciones muestran conclusiones

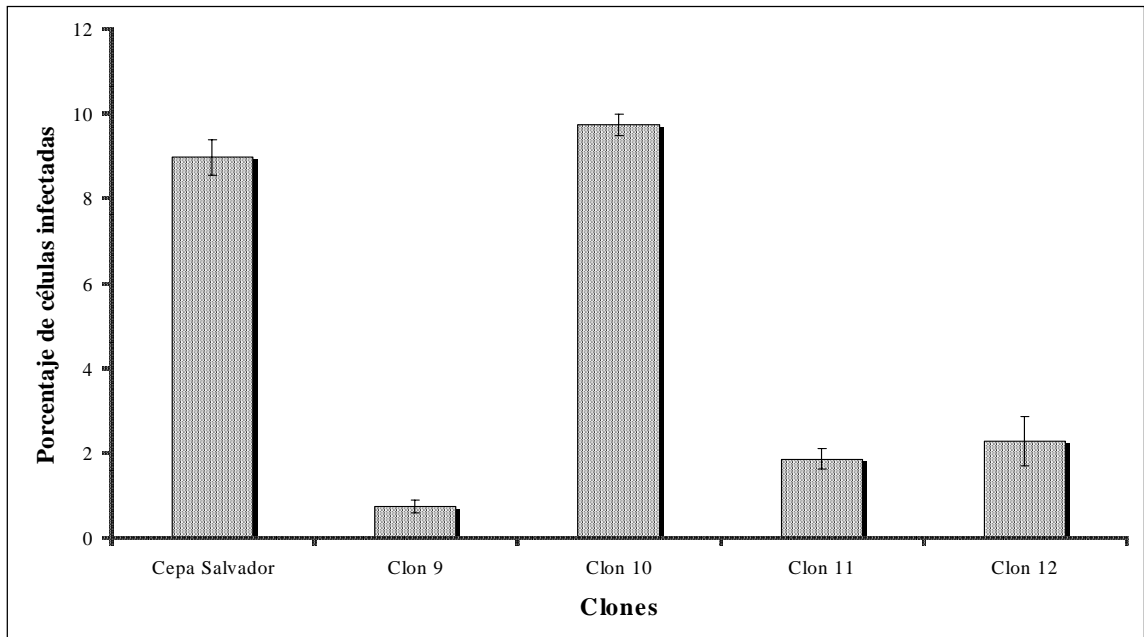


Figura 1. Porcentajes promedio de macrófagos infectados luego de 24 horas de exposición a los epimastigotos.

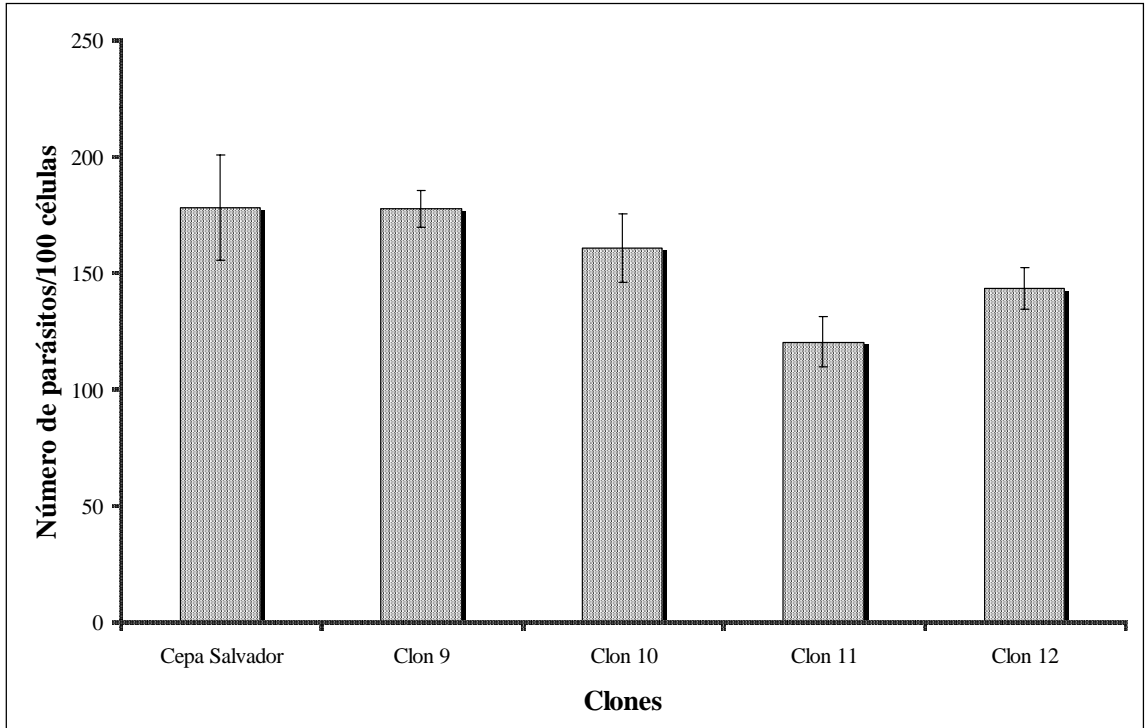


Figura 2. Promedios de formas parasitarias intracelulares por cada 100 macrófagos infectados.

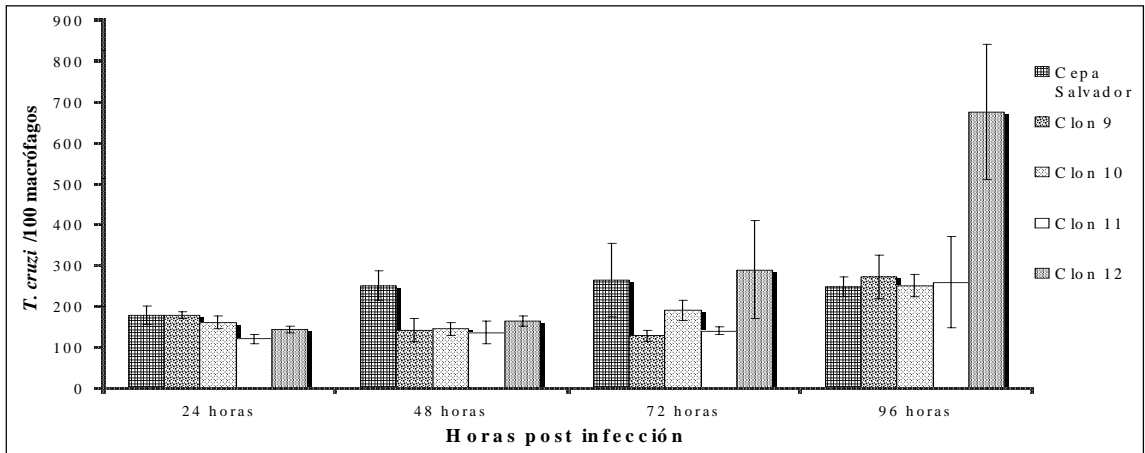


Figura 3. Promedio de formas intracelulares de *T. cruzi* por cada 100 macrófagos infectados.

* El comportamiento del clon 12 fue significativamente diferente en el análisis de variancia (ANDEVA)¹² y las pruebas de DVS¹².

diferentes^{6,13}, se decidió estudiar las características de varios clones así como de su cepa parental en un sistema de cultivo en macrófagos peritoneales de ratón, en el cual se utilizaron epimastigotos como formas infectantes.

Las diferencias observadas en los porcentajes de macrófagos infectados, ya sea con cada clon así como con la cepa evaluada (Figura 1) reflejaron un comportamiento no homogéneo en cada sistema. Esto podría estar condiona-

Tabla 1. Tasas de multiplicación promedio observadas al final del período de observación (96 horas post infección)

| Cepa/Clones | Tasa de multiplicación | Desviación Estándar |
|---------------|------------------------|---------------------|
| Cepa Salvador | 1,39 | 0,046 |
| Clon 9 | 2,29 | 0,33 |
| Clon 10 | 1,56 | 0,15 |
| Clon 11 | 2,21 | 1,10 |
| Clon 12* | 4,59 | 0,87 |

* La tasa de multiplicación observada en el Clon 12 mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros sistemas(α :0.05)

do por los diferentes procesos de interacción parásito-célula o la capacidad endocítica de las células blanco. Considerando que los macrófagos utilizados procedían de una mezcla de células homogéneas, se hubiera esperado que este último aspecto no fuera una fuente de variación en el experimento.

La interacción parásito-macrófago ha sido relacionada con los niveles de glicosilación que muestran las membranas parasitarias, donde los residuos de manosa parecen ser fundamentales en los procesos de reconocimiento e internalización¹⁴, por lo que los resultados obtenidos podrían sugerir que la eficiencia en los procesos de glicosilación no es la misma en cada clon, lo que de alguna manera podría condicionar las diferencias en los porcentajes de infección observados.

Otras interacciones como las mediadas por el epitopo Ssp-3¹⁵ o la proteína 60 kDa (penetrina)¹⁶ las cuales interactúan con la fibronectina de los macrófagos¹⁷, han sido descritas, pero no deberían ser consideradas por ser proteínas únicamente expresadas por los tripomastigotos. Llama la atención que aunque los porcentajes de infección fueron diferentes, las cargas parasitarias dentro de las células infectadas fueron comparables (Figura 2), lo que reafirma la idea de la paridad en cuanto al potencial fagocítico de las células blanco utilizadas.

La observación de la cinética multiplicativa intracelular permitió determinar, al final del período de observación, la replicación exacerbada del clon 12 (Figura 3), lo que demuestra un comportamiento diferente entre la cepa silvestre con respecto a los clones evaluados. El

predominio de clones con altas eficiencias multiplicativas podría tener implicaciones en las características de virulencia de las cepas. En un estudio de 2 clones de la cepa hSLU239 y 4 clones de la cepa mSLU142 se encontraron diferencias en la cinética multiplicativa de éstos en un sistema de cultivo en medio LIT¹⁸. En otro estudio se observó que el comportamiento biológico de estos clones tenía diferencias con respecto a su cepa parental¹⁹, donde salvo uno de los clones evaluados denominado h1, procedente de la cepa hSLU239, todos los demás mostraron parasitemias más altas que las cepas de origen.

En un trabajo se analizaron varios clones obtenidos de una cepa colombiana perteneciente al biodeme 3²⁰. En este estudio se encontró que los clones denominados C1, C3, C4 y C6 mostraron altos niveles de parasitemia, mientras que los clones C2, C5 y C7 mostraban bajas parasitemias a pesar de tener el mismo origen. También se pudo apreciar que los clones evaluados tenían heterogeneidad en sus características de virulencia, aunque los patrones biológicos generales como por ejemplo el histotropismo, mostraban características similares.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten apoyar las hipótesis relativas a la multiclonalidad^{5,6}, donde la presencia de clones dominantes podrían condicionar el comportamiento de las cepas circulantes.

Queda pendiente determinar si existen factores selectivos a nivel de hospedador vertebrado y hospedador invertebrado que condicionen la dominancia de ciertos grupos de clones.

RESUMEN

El fenómeno de heterogeneidad clonal fue evaluado en una cepa centroamericana de *Trypanosoma cruzi* (San Salvador) en un sistema de cultivo en macrófagos. Cuatro clones denominados Clon 9, Clon 10, Clon 11 y Clon 12 fueron obtenidos mediante cultivo en un medio semisólido de agar. Cada clon y la cepa parental, fueron subcultivados en medio Schneider suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% antes del proceso de infección. Los macrófagos se cultivaron en cubreobjetos y fueron infectados con formas de epimastigotos.

La tasa de infección de las células mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), pero la carga parasitaria de las células infectadas fue similar para cada uno de los sistemas. La cinética de multiplicación mostró un patrón creciente que fue bastante elevado a las 96 horas en uno de los clones ($p < 0,05$). Los resultados prueban que las interacciones entre las formas parasitarias y las células blanco pueden diferir entre los clones y la cepa parental y que las propiedades de multiplicación intracelular pueden ser diferentes entre los clones individuales

REFERENCIAS

- 1.- MILES M. Isozyme characterization. Rev Soc Bras Med Trop 1985; 18: 53-9.
- 2.- TYBAYRENC M, MILES M. A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *T. cruzi*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77: 79-83.
- 3.- DEANE M, JANSEN A, MANGIA R et al. Are our laboratory strains representative samples of *T. cruzi* populations that circulate in nature?. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 19-24.
- 4.- ANDRADE S, MAGALHAES J. Biodemes and zymodemes of *T. cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30: 27-35.
- 5.- TIBAYRENC M, AYALA F J. *T. cruzi* populations: more clonal than sexual. Paras Today 1987; 3: 189-90.
- 6.- DVORAK J. Single cell isolates of *T. cruzi*. How and why. Rev Soc Bras Med Trop 1985; 18: 29-38.
- 7.- TANURIP, F de ALMEIDA D. *T. cruzi*: Isolation of cloned strains and characterization of their infectivity. J Parasitol 1985; 71: 397-40.
- 8.- SIGMA©. Cell culture reagents. Schneider's insect medium. Catalog No S 9895. 1992.

- 9.- CHINCHILLA M, FRENKEL J K. Mediation of immunity to intracellular infection (*Toxoplasma* and *Besnoitia*) with somatic cells. Infec Immun 1978; 19: 999-1012.
- 10.- REYES L, FRENKEL J K. Specific and nonspecific mediation of protective immunity to *Toxoplasma gondii*. Infec Immun 1987; 55: 856-63.
- 11.- REYES L, CHINCHILLA M. Growth inhibition of *T. cruzi* in cultured murine myocardial cells mediated by a specifically induced lymphokine. Infec Immun 1987; 55: 1513-516.
- 12.- DANIEL W. Análisis de variancia. En: Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa, México. 1988. 667 pp.
- 13.- PENIN P, GAMALLO C, DE DIEGO J A. Biological comparison between three clones of *T. cruzi* and the strain of origin (Bolivia) with reference to clonal evolution studies. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 285-91.
- 14.- VILLALTA F, KIERSZENBAUM F. Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by *T. cruzi*. Bioch Biophys Acta 1983; 736: 39-44.
- 15.- SCHENKMAN S, JIANG MS, HART G W, NUSSENZWEIG V. A novel cell surface trans-sialidase of *T. cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. Cell 1991; 65: 1117-25.
- 16.- ORTEGA-BARRIA E, PEREIRA M E. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. Cell 1991; 67: 411-21.
- 17.- OUAISSI A. Molecular aspects of *T. cruzi* interaction with host cell and parasite differentiation mechanisms. Ann Soc Bel Med Trop 1992; 72: 23-5.
- 18.- LAURIA-PIRES L, SANTANA J M, TAVARES F S, TEIXEIRA A R. Diversity of *T. cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients: I- Behavioral characterization in vitro. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30: 187-92.
- 19.- LAURIA-PIRES L, TEIXEIRA A. Virulence and pathogenicity associated with diversity of *T. cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients. Am J Trop Med Hyg 1996; 55: 304-10.
- 20.- PAES-CAMANDAROB A, FIGUEIRA R, MAGALHAES J, ANDRADE S. Clonal structure of *T. cruzi* colombian strain (biodeme type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. Rev Soc Bras Med Trop 2001; 34: 151-7.

Agradecimientos: Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. Rafael Oswaldo Angel Belloso del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador por el suministro de la cepa de *T. cruzi*, al UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Disease (TDR) por el soporte al proyecto 980413 y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el apoyo económico a través del proyecto 803-97-251.