ARTÍCULO ORIGINAL

Cinética multiplicativa de clones de Crithidia fasciculata (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en un sistema de cultivo in vitro

OLGER CALDERÓN-ARGUEDAS*, MISAEL CHINCHILLA**,
ADRIÁN AVENDAÑO*, y MARÍA JOSÉ CARVAJAL*

MULTIPLICATIVE KINETICS OF *Crithidia fasciculata* (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) CLONES IN AN *IN VITRO* CULTURE SYSTEM

The multiplicative kinetics in diphasic 40% blood-agar media was studied in five clones and the parental strain of Crithidia fasciculata (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). The clones were obtained from cultures in 40% blood-agar and were named as Ia, IIIa, IVa, Va and CAA. In each case, diphasic blood agar media with brain heart infusion broth 3,7% was inoculated with 10³ choanomastigotes. The concentration of parasites were estimated weekly during 12 weeks expressing these concentrations in choanomastigotes/mm³. The variability was evaluated by ANOVA tests for repeated measures (α :0,05). Electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecil sulfate (SDS-PAGE) was also performed to evaluate the protein profiles of the clones and parental strain. The results showed a short logarithmic growth phase before a long stationary phase. There were not significant statistical differences in the concentration of choanomastigotes/mm³ between the studied systems during each day of observation ($p > 0,05$). The polypeptide profiles of the extracts showed highly homogeneous patrons. These results could suggest that the minor evolutive pressures that suffer naturally C. fasciculata in its propagative cycle in insects could be related to the observed homogeneity but its needed more research in topics as immunology, biology and genetics in order to demonstrate this homogeneity.

Key words: *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosomatidae*, *monogenic trypanosomatid*.

INTRODUCCIÓN

Los kinetoplástidos son protozoarios parásitos que pueden presentar dos patrones en su ciclo de vida. Los kinetoplástidos monogénicos, cuyos representantes en parasitismo animal son los

géneros *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia* y *Leptomonas*, realizan un ciclo de vida monoxeno^{1,2}. En éste participan como hospedadores insectos de los órdenes Diptera, Hemiptera, Siphonaptera e Hymenoptera^{1,2}. Los kinetoplástidos digénicos describen un ciclo

* Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. E-mail: olgerc@cariari.ucr.ac.cr

** Laboratorio de Investigación. Universidad de Ciencias Médicas “Dr. Andrés Vesalio Guzmán”. San José, Costa Rica.

diheteroxeno en donde los hospedadores invertebrados están representados por dípteros o hemípteros y los vertebrados incluyen a mamíferos, reptiles y anfibios^{1,2}. En este grupo se ubican los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, importantes patógenos de humanos y animales superiores. Aunque en algunos parásitos como *Trypanosoma brucei* se han demostrado evidencias de intercambio genético, estos parásitos se multiplican por mecanismos asexuales. Lo anterior explica el por qué dichos organismos experimentan una propagación clonal en la naturaleza³.

Este tipo de propagación podría condicionar la ocurrencia de clones con propiedades biológicas particulares, cuya dominancia determinaría las características biológicas de las diferentes cepas en con contexto biogeográfico³.

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas, ha sido uno de los kinetoplástidos que más se han estudiado en este contexto y con él se ha podido demostrar el fenómeno de heterogeneidad clonal entre clones constitutivos y las respectivas cepas de donde provienen⁴⁻⁶.

Dada la proximidad filogenética entre *T. cruzi* y *Crithidia fasciculata* se decidió estudiar el fenómeno de heterogeneidad clonal como una primera aproximación al estudio de este fenómeno en kinetoplastidos monogénicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- **Cepa de *Crithidia fasciculata*:** Se utilizó la cepa de *C. fasciculata* del Departamento de Parasitología de la Facultad de Microbiología en la Universidad de Costa Rica. Esta cepa ha sido mantenida por medio de pasajes mensuales en medio difásico de Rugai utilizando como fase líquida solución salina estéril al 0,85% y antibióticos (penicilina 100 UI/mL, estreptomycin, 100 µg/mL).

2.- **Obtención de clones:** A partir de cultivos en fase de crecimiento logarítmico, se ajustaron inóculos de $3,5 \times 10^3$ parásitos, los cuales fueron dispensados en botellas de agar sangre 40%, preparadas de acuerdo con la metodología descrita previamente⁷.

Transcurridas tres semanas, las colonias fueron picadas con una aguja bacteriológica y sembradas en agar sangre 40% difásico de acuerdo con la metodología citada⁷ para

establecer las líneas clonales. Cinco clones fueron seleccionados para el experimento, los cuales fueron denominados arbitrariamente como Ia, IIIa, IVa, Va y CAA.

3.- **Cinética multiplicativa:** A partir de cada uno de los cultivos clonales y de la cepa parental se ajustaron inóculos de $3,5 \times 10^3$ parásitos los cuales fueron sembrados por triplicado en tubos de agar sangre al 40% con un 5,0 mL de fase líquida constituida por infusión cerebro corazón al 3,7%. Los cultivos fueron observados semanalmente durante doce semanas. En cada uno de los días de observación se realizó la determinación de la concentración parasitaria en el medio, utilizando un hemocitómetro de Neubauer y expresando la concentración en coanomastigotos/mm³. Cada una de las determinaciones fue hecha por triplicado.

Para estudiar la variabilidad en las concentraciones parasitarias en cada día de observación, se realizaron análisis de variancia (ANDEVA) para mediciones repetidas⁸, utilizando un coeficiente de confiabilidad del 95%. Adicionalmente, se realizaron pruebas de Tukey⁸ para poder estimar las diferencias verdaderamente significativas. Dichas pruebas fueron efectuadas mediante el paquete estadístico Statistica® 6.0.

4.- **Preparación de extractos y análisis electroforético de los clones:** Con el fin de estudiar la identidad electroforética de los sistemas obtenidos, se prepararon extractos proteicos a partir de cada uno de los clones y de la cepa parental. Para cada uno de los sistemas, 5×10^5 coanomastigotos fueron obtenidos a partir de agar sangre 40% difásico⁷ mientras experimentaban su fase de crecimiento logarítmico y se depositaron en tubos Eppendorf®, los cuales se refrigeraron por 15 minutos. Seguidamente se centrifugaron a 3.000 rpm a 10°C por 10 minutos. Los botones fueron lavados y resuspendidos en 1,0 mL de solución salina estéril; posteriormente, se hicieron dos ciclos de centrifugación a 3.000 y 4.000 rpm por 10 minutos a 10°C antes de ser resuspendidos en 1,0 mL de solución salina. Las suspensiones fueron transferidas a viales de criofractura en los cuales se realizaron cinco ciclos de congelación-descongelación. Cada ciclo implicó la colocación de las muestras durante un minuto en un nitrógeno líquido (-70°C) y seguidamente su transferencia a un baño maría a 37°C por un minuto. Finalmente, las muestras

fueron centrifugadas a 16.000 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes constituyeron los extractos a utilizar en la evaluación electroforética de los sistemas. La concentración proteica en estos sobrenadantes fue determinada siguiendo un método estandarizado⁹.

Las corridas electroforéticas fueron realizadas en geles de poliacrilamida al 12% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)¹⁰ para lo cual se cargaron 20 µg de proteína en cada pocillo. Posteriormente los geles fueron teñidos mediante un protocolo de tinción de plata¹¹.

RESULTADOS

Los cultivos, tanto de los clones como de la cepa parental, tuvieron una fase de crecimiento logarítmico muy acelerada que antecedió a una fase estacionaria que se prolongó hasta el final del período de observación fijado para el experimento (Figura 1). La morfología de las formas de cultivo permitió visualizar los coanomastigotos típicos de *C. fasciculata* (Figura 2).

Figura 2. Coanomastigotos de *Crithidia fasciculata* teñidos con colorante de Giemsa, procedentes de cultivos “in vitro” en agar sangre 40% difásico (barra: 10 mm).

Los análisis de variabilidad no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas (clones y cepa parental) en cada uno de los días de observación (Tabla 1) ($p > 0,05$). El análisis electroforético de los sistemas celulares estudiados permitió visualizar una gran homogeneidad en los perfiles proteicos correspondientes a los clones y la cepa parental (Figura 3).

Figura 1. Cinética multiplicativa de clones y cepa parental de *Crithidia fasciculata*.

Tabla 1. Tabla ANDEVA para mediciones repetidas relativa a los sistemas evaluados (α : 0,05).

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de la suma de cuadrado	Valor F	Valor P
Clones	$4,04 \times 10^{10}$	5	$8,09 \times 10^9$	1,87	0,17*
Error	$5,20 \times 10^{10}$	12	$4,33 \times 10^9$		
Semana	$2,36 \times 10^{11}$	11	$2,14 \times 10^{10}$	8,88	0,00
Semanas x Clones	$2,23 \times 10^{11}$	55	$4,06 \times 10^9$	1,68	0,01
Error	$3,18 \times 10^{11}$	132	$2,41 \times 10^9$		

* $p > 0,05$

Figura 3. Perfiles electroforéticos de los sistemas celulares estudiados. (PM: marcadores de peso molecular; Ia, IIIa, IVa, Va, CAA: clones evaluados; Crith: cepa parental de *Crithidia fasciculata*).

DISCUSIÓN

Aunque ciertas características de heterogeneidad en *Crithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas* han sido demostradas a nivel de cepas por diferentes métodos², no se conoce si esta heterogeneidad puede tener lugar en los clones constitutivos como sucede en *T. cruzi*. En los sistemas de cultivo *in vitro* los eventos multiplicativos de *T. cruzi* y *C. fasciculata* son similares, sin embargo, el presente estudio reveló un comportamiento homogéneo entre los clones y la cepa parental de *C. fasciculata* que se manifestó en la no ocurrencia de diferencias estadísticamente significativas en los análisis de variabilidad efectuados ($p > 0,05$). Este comportamiento resulta diferente al observado en *T. cruzi*. En un trabajo con *T. cruzi* y analizando los clones h1y h2 procedentes del aislamiento hSLU 239, derivado de una cepa cardiotrópica, y los clones m1, m2, m3 y m4 obtenidos a partir del aislamiento mSLU 142 procedente de un paciente con megaesófago, se encontró diferencias marcadas en la cinética multiplicativa de cada clon así como en su potencial de diferenciación a tripomastigotos metacíclicos en un sistema de cultivo *in vitro* con medio LIT⁴. En otro estudio⁵, las propiedades patogénicas de estos clones fueron estudiadas demostrándose un potencial patógeno y de virulencia particular para cada uno de ellos. A diferencia de lo que sucede con *T. cruzi*, el presente estudio permitió determinar un gran potencial multiplicativo en *C. fasciculata*, razón por la cual el crecimiento logarítmico ocurrió en un intervalo muy corto, pasando luego a una fase estacionaria sostenida. Este comportamiento relativamente uniforme sugiere una homogeneidad en cuanto a las propiedades de supervivencia y adaptación que muestran los diferentes clones ante las presiones selectivas derivadas del mismo crecimiento del protozooario en el medio. Los perfiles electroforéticos observados para cada uno de los sistemas evaluados no revelaron diferencias entre sí, por

lo que este hallazgo podría interpretarse como una expresión homogénea de las proteínas constitutivas en todos los sistemas celulares evaluados o podría representar que los diferentes clones aislados, en realidad corresponden a réplicas del mismo clon, lo que sustentaría la posibilidad de que la mayoría de la población del cultivo estuviera representada por uno o pocos clones dominantes con características similares, que podrían además ser el resultado del mantenimiento sostenido del protozooario en sistemas de cultivo *in vitro*.

Como ha sido documentado, *C. fasciculata* es un organismo monoxeno, el cual utiliza culícidos como sus hospedadores y su diseminación tiene lugar por coprofagia^{1,2,12}. Esta condición supone menores presiones selectivas en comparación con especies heteroxénicas de tripanosomátidos como *T. cruzi* y *Leishmania*. En estas últimas, la radiación adaptativa que ha podido tener lugar como resultado de las presiones selectivas representadas por los diferentes tipos de potenciales hospedadores, podría explicar los fenómenos de heterogeneidad y especiación en estos organismos. Llama la atención que a pesar de que los kinetoplastidos monoxenos han sido relacionados con sus hospedadores con base en sus respectivos aislamientos, estos suelen mostrar una baja especificidad por dichos hospedadores por lo que las infecciones en especies poco relacionadas filogenéticamente son probables^{2,12}. Este aspecto permite perfilar como improbable la evolución paralela del sistema hospedador parásito, lo que constituye un argumento adicional para soportar la idea de que las tendencias de especiación son mucho menores a las que han tenido lugar en los kinetoplastidos heteroxenos.

Aparte de contemplar el análisis de la cinética multiplicativa como una aproximación en el análisis de la aparente homogeneidad entre la cepa parental y los clones de *C. fasciculata* en un sistema *in vitro*, el estudio de aislamientos recientes donde se aborden además de las

características estudiadas otras de carácter inmunológico, biológico y genético son fundamentales para poder aceptar o descartar la homogeneidad perfilada en el presente estudio. Estos conocimientos podrían ser claves en la utilización de los tripanosomátidos monoxenos y sus clones como potenciales controladores biológicos o como candidatos a ser utilizados como organismos transgénicos en los cuales se puedan insertar genes que modulen ya sea la supervivencia del hospedador o la refractariedad que éste pueda mostrar a organismos infecciosos patógenos al ser humano y animales superiores como ha sido exitosamente ensayado con endosimbiontes de los vectores de la enfermedad de Chagas¹³.

RESUMEN

La cinética multiplicativa de la cepa parental y cinco clones de *Crithidia fasciculata* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) fue estudiada en agar sangre 40% difásico. Los clones fueron obtenidos de cultivos en agar sangre 40% y denominados Ia, IIIa, IVa, Va y CAA. En cada caso, tubos de agar sangre 40% difásico con infusión cerebro corazón 3,7 % como fase líquida fueron inoculados con 10³ coanostigotos de cada clon y la cepa parental. La concentración de parásitos fue estimada semanalmente durante 12 semanas expresando las concentraciones en coanostigotos/mm³. La variabilidad fue evaluada por análisis de variancia (ANDEVA) para mediciones repetidas (α :0,05) realizadas durante cada día de observación. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) fueron también efectuadas para evaluar los perfiles proteicos de los clones y la cepa parental. Los resultados mostraron una fase de crecimiento logarítmico muy corta que antecedió a una fase estacionaria prolongada. ($p > 0,05$). No hubieron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de coanostigotos/mm³ entre los sistemas estudiados durante cada día de observación. Los perfiles proteicos mostraron patrones altamente homogéneos en todos los sistemas estudiados. Los resultados sugieren que las menores presiones evolutivas que sufre naturalmente *C. fasciculata* en su ciclo propagativo podrían estar relacionadas con la homogeneidad observada, pero es requerida más información en tópicos

como inmunología, biología y genética para demostrar dicha homogeneidad.

REFERENCIAS

- 1.- LAKE J A, DE LA CRUZ V F, FERREIRA P G, et al. Evolution of parasitism: Kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 4779-83.
- 2.- PODLIPAEV S A. Insect trypanosomatids: the need to know more. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 517-22.
- 3.- TYBAYRENC M, AYALA F J. *Trypanosoma cruzi* populations: more clonal than sexual. *Parasitol Today* 1987; 3: 189-90.
- 4.- 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.
- 5.- 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.
- 6.- CALDERÓN O, TROYO A, VALERIO I, CHICHILLA M. Heterogeneidad clonal en epimastigotos de una cepa centroamericana de *T. cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitol Latinoam* 2002; 57: 40-5.
- 7.- TANURI P, ANDRADE P P, F DE ALMEIDA D. *T. cruzi*: Isolation of cloned strains and characterization of their infectivity. *J Parasitol* 1985; 71: 397-402.
- 8.- DANIEL W W. Análisis de la variancia. En: Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª Edic. Limusa Wiley. México. 2004. 755 pp.
- 9.- BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- 10.- Pharmacia©. Polyacrylamide gel electrophoresis in presence of SDS (SDS-PAGE). En: Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Laboratory Techniques. Pharmacia, Lab Separation Division. Uppsala, Sweden. 1987. 72 pp.
- 11.- HEUKESHOVEN J, DERNICK R. Simplified method for silverstaining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silverstaining. *Electrophoresis* 1985; 6: 103-12.
- 12.- STEVENS J R, NOYES H A, SCHOFIELD C J, GIBSON W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol* 2001; 48: 1-56.
- 13.- BEARD C B, CORDON-ROSALES C, DURVASULA R V. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas' disease transmission. *Annu Rev Entomol* 2002; 47: 123-41.

Agradecimientos: Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dra. Elizabeth Abrahams Sandí del Departamento de Parasitología en la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (UCR) por sus valiosos consejos durante la ejecución del presente trabajo, a Iván Coronado de la Sección de Artropodología Médica, Facultad de Microbiología (UCR) por su servicio asistencial y a la Vicerrectoría de Investigación (UCR) por su apoyo económico al proyecto 803-A4-017.