

# Infektividad en ratón de las formas de *Trypanosoma cruzi* diferenciadas por primocultivo en medio LIT.

Nelson López Eyzarguirre y Rosa D 'Jesús.

Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

## Resumen

Se acepta que *Trypanosoma cruzi* durante su ciclo de vida presenta diferentes formas, cada una con función definida, así la reproducción la cumplen el epimastigote en el invertebrado o en medios de cultivos y el amastigote intracelularmente en el vertebrado; mientras que los trypomastigotes tienen como función cambiar de ciclo, desde un hospedador a otro, son los infectantes. Estos al entrar en el invertebrado o en cultivos se transforman a epimastigote (no infectante), posteriormente vuelven a transformarse en trypomastigote (infectante). Cultivamos y aislamos, en los medios LIT y agar-LIT, las formas delgadas y gruesas de *T. cruzi* sanguícola proveniente de ratón. Observamos su desarrollo en ambos medios; en el LIT, el origen de diferentes formas y agrupaciones. Reaislando cada una de estas formas del parásito en agar-LIT e infectando ratones, hemos probado la infectividad de cada una de ellas en este vertebrado. Así observamos infección por todas las formas generadas por el trypomastigote sanguícola delgado y por el grueso respectivamente, no encontrando formas no infectantes. Se discute la diferenciación de formas, desde una infectante (trypomastigote) hasta otra, considerada como "no infectante" (epimastigote), pero que en nuestra experiencia se comportó como infectante.

Palabras clave: Infectividad, ratón, primocultivo, *Trypanosoma cruzi*, medio LIT.

## Abstract

### Mice infectivity of *Trypanosoma cruzi* forms differentiated by culture in LIT medium.

It is accepted that *Trypanosoma cruzi* during its life cycle presents different forms, each one with defined function, thus the cell division is fulfilled for the epimastigote either in the invertebrates or in the culture medium and for the amastigote intracellular in the vertebrates; while the trypomastigotes have as function to change of cycle, from a host to another and are the infectant. These forms, as soon as they penetrate in the invertebrate or culture medium are transformed into epimastigotes (non infective), later on they return to trypomastigotes (infectant). We grew and isolate, in LIT and agar-LIT media, slender and stout forms of sanguicobus *T. cruzi* from mice. We observed its development in both media; in LIT, different forms and cluster and in the agar-LIT strains, presented amastigotes, epimastigotes, trypomastigotes and cluster forms. We isolated each one of these forms of the parasite in agar-LIT we infected mice, therefore have proven in infectivity of each one of them in this vertebrate. Thus we observed infection by all the forms generated by slender and stout forms of sanguicobus trypomastigote, without finding non-infectant forms. We discussed the differentiated forms an infective (trypomastigote) until another, considered as "not infectant" (epimastigote), but that in our experience it behaved as infectant.

Key words: Infectivity, mice, culture, *Trypanosoma cruzi*, LIT medium.

## INTRODUCCIÓN

### *Trypanosoma cruzi* Chagas

El ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* es bastante complejo. El parásito pasa por una serie de estados de desarrollo denominados amastigotes, epimastigotes y trypomastigotes, (Wallace 1996, Hoare y Wallace 1966, Brack 1968), uno en el huésped invertebrado otros en el vertebrado. Según Díaz (1934) las formas desarrolladas en el invertebrado a lo largo del tracto digestivo son

irreversibles hasta llegar a la forma trypomastigote. Brener (1971) señala un comportamiento diferente entre los trypomastigotes sanguícolas gruesos y delgados de diferentes cepas, siendo las formas delgadas más aptas para penetrar los tejidos y menos resistentes a los mecanismos inmunitarios. Brener y Chian (1965) encuentran que las formas gruesas y delgadas in vitro presentaban diferente comportamiento evolutivo: cultivos con predominancia de formas gruesas regularmente cambian a amastigotes, los cuales se dividen y originan grandes colonias de parásitos redondos; los cultivos con predominancia de formas delgadas

cambian a epimastigotes y las formas redondas son escasas.

López (1985) describe el comportamiento de dos colonias de epimastigotes en agar-LIT, aisladas desde una misma población cultivada en medio LIT. En una no se generan trypomastigotes y en la otra sí, sin embargo ambas infectaron ratones.

La forma epimastigote ha sido considerada como no infectante. Sólo la forma metacíclica se considera infectante al vertebrado (Mshelbwala 1973).

En el presente trabajo, nos propusimos demostrar que si los trypomastigotes evolucionan hasta formas no infectantes, como se ha considerado a los epimastigotes, entonces debería haber entre ellas un momento y una forma evolutiva que marcará el cambio de infectividad, no infectando y dando origen al epimastigote. Para esto cultivamos y aislamos en agar-LIT (medio sólido) las formas delgadas y gruesas de *T. cruzi* provenientes de ratón; estas como cada una de las formas diferenciadas, fueron observadas durante su desarrollo en los medios líquido y sólido, en el líquido el origen de diferentes formas y agrupaciones y en el sólido el desarrollo de colonias, originándose:

amastigotes, epimastigotes, trypomastigotes y agrupaciones. Reaislando cada una de estas formas del parásito, hemos probado la infectividad de cada una de ellas en el vertebrado (ratón).

Así observamos infección, en ratón, por cada una de las formas generadas, en los medios LIT y agar-LIT por el trypomastigote delgado y por el grueso proveniente de sangre de ratón, no encontrando formas no infectantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico:** Usamos una de las cepas de *T. cruzi* "Y" y "EP": ambas cepas de parásitos mantenidas por pases sucesivos en ratones albinos.

**Animales experimentales:** Utilizamos ratones albinos de 4 semanas de edad para el mantenimiento de las cepas; y de 2 semanas, para pruebas de infectividad.

**Medios de cultivo:** Medio LIT (600m0s) (Camargo 1964, modificado por Boiso y Goitia 1982). Medio agar-LIT blando (Wittner 1982), en este medio se sumergen los parásitos para el aislamiento, pudiendo también dejarlos crecer, formándose así colonias sumergidas.

**Aislamiento y siembra de los parásitos:** Se

extrajo sangre, mediante punción cardiaca, de los ratones con parasitemia de 8 y 18 días, en este tiempo se consiguió (en las cepas utilizadas) la mayor densidad de trypomastigotes delgados y gruesos respectivamente (fig. 1).

Para obtener los parásitos libres de células sanguíneas, se lavaron con medio LIT (600m0s.), centrifugando a 400 rpm por 20 mm., se tomó el sobrenadante con los parásitos y se realizaron diluciones para obtener 500 a 700 parásitos por caja de aislamiento.

La siembra en Agar blando se realizó mezclando 0.1 ml de suspensión de parásitos con 2.5 ml de medio agar-LIT en tubos de vidrio, se agitó fuertemente (mecánicamente) para lograr una mezcla homogénea y se vertió en las cajas de aislamiento (frascos para cultivos de tejidos de marca FALCON ® de un volumen de 25 cm<sup>3</sup>); inmediatamente se colocaron a temperatura de 4<sup>o</sup>C durante 10 mm. para lograr un rápido enfriamiento del Agar y evitar algún daño a los parásitos inmersos en éste. Luego se observaron los parásitos sembrados mediante un microscopio invertido (NIKON dotado de un objetivo ZEISS de 40x, Ph2, larga distancia de trabajo) por medio del cual pudimos observar en toda la profundidad del Agar, por debajo y por encima de donde se encontraba un parásito y así se tuvo certeza de su aislamiento. Se identificaron por su forma como trypomastigotes gruesos, delgados u otra forma generada por éstos, entonces se procedió a marcar en ese sitio, un círculo de diámetro igual al campo del objetivo del microscopio, esto se hizo usando un marcador punta de diamante tipo objetivo de microscopio, marca Zeiss. Eso parásitos aislados o colonias, según el caso, se extrajeron mediante la succión con una pipeta Pasteur con la punta en ángulo recto, posteriormente se colocó el Agar contenido en la pipeta Pasteur en 0.1 ml de medio LIT y se agitó fuertemente con la finalidad de separar el agar de los parásitos aislados (inoculando ratones con éstos) o las diferentes formas de los parásitos entre sí para reaislar cada una de las diferentes formas de los parásitos aislados, se extrajeron y se colocaron en 0.1 ml de medio LIT para ser inoculados en ratones albinos de 2 semanas de edad, por vía subcutánea o intraperitoneal y probar así la infectividad.

Medida de la infectividad en el vertebrado:

**Infectividad:** La infectividad de todas las formas diferenciadas (agrupaciones, esféromastigotes, epimastigotes y trypomastigotes) e inoculadas en ratones, se determinó por la presencia de parásitos en la sangre y en los órganos (corazón, músculo esquelético).

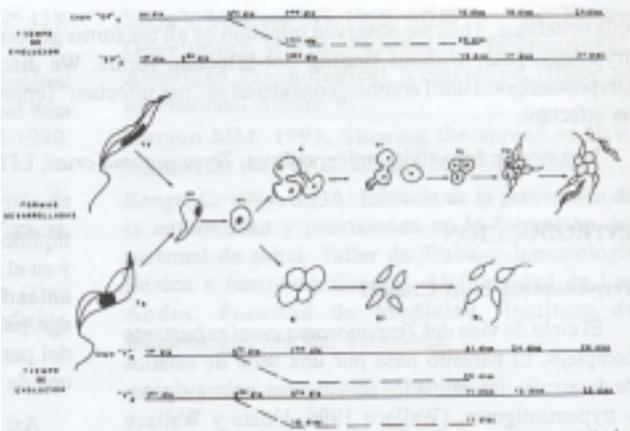


Fig. 1. Parasistema en Ratones de las cepas "Y" y "EP" de *Trypanosoma cruzi*.

## RESULTADOS

Las formas sanguíneas tanto grueso como delgado, al ser sembradas en el agar-LIT, desarrollaron formas semejantes (fig. 2). El trypomastigote sufre transformación y pasa a tener una forma redondeada con flagelo (pa) que posee movimiento, el cual transmite al cuerpo. Posteriormente se observa completamente esferoide (es) y sin movimiento. Más tarde alrededor de éste, se observan varios esferoides de menor tamaño, los cuales se encuentran separados los uno de los otros, pero presentado puentes citoplasmáticos entre sí (agrupación A). Uno de estos esferoides de menor tamaño, luego de 7 a 15 días, dependiendo de la forma y cepa usada, aumenta de tamaño y comienza a dividirse formando una nueva colonia o agrupación, caracterizada por presentar esferoides del mismo tamaño y unidos entre sí (no presentan puentes citoplasmáticos, a esta agrupación la denominamos A1). Aquellas A1 alrededor de las cuales se observaron parásitos con formas epimastigote, las denominamos agrupación A2. Finalmente observamos parásitos con formas trypomastigotes los cuales poseían gran movimiento, a esta agrupación la nombramos A3.

El desarrollo de formas a partir de los trypomastigotes gruesos y delgados, de las cepas usadas, fue semejante en cuanto a la morfología presentada. Sólo observamos diferencia en el tiempo de transición de una forma a otra (fig. 2).

Cuando realizamos las pruebas de infectividad en ratones, de las formas desarrolladas en cultivo y que provenían de los trypomastigote delgado y grueso, encontramos que todas (esferoides, agrupaciones A, A1 epimastigotes y trypomastigotes) produjeron infección en el ratón tanto en sangre como en tejido (Tablas 1 y 2), al igual que los trypomastigotes delgados y gruesos

de ambas cepas.

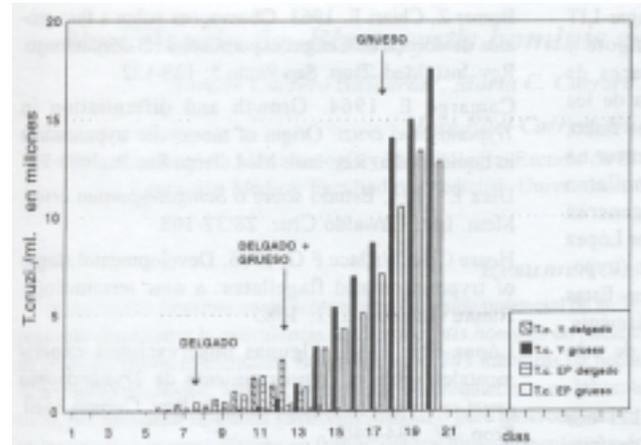


Fig. 2. Tiempo de Evolución morfológica del Trypomastigote sanguíneo delgado y grueso de las cepas "Y" y "EP" de *Trypanosoma cruzi* en medio agar-LIT

En la figura 2 se puede observar que el desarrollo de las diferentes agrupaciones ocurre en lapsos de tiempo iguales en el caso de la cepa "EP" tanto para la forma delgada (d) como para la gruesa (g). En el caso de la cepa "Y" los lapsos de tiempo fueron diferentes durante el desarrollo de las diferentes agrupaciones, pero el de la agrupación A3, donde se desarrollan los trypomastigotes es semejante en todos los casos, siendo entre 23 y 26 días.

Se observó también (fig. 2) una segunda línea de desarrollo de algunos trypomastigotes (2%) al alcanzar la forma esferoide (es) que dan origen a otros del mismo tamaño (agrupación B) semejantes a la A1, luego estos esferoides se separan y se mantienen, así, durante un tiempo, dependiendo de la cepa, a esta forma la llamamos (Bt) B transitoria.. Luego los esferoides desarrollan flagelos con movimiento. Esta agrupación, que hemos llamado B1, no desarrolló la forma trypomastigote delgado de la cepa "EP".

La forma delgada de la cepa "Y" desarrolló las diferentes agrupaciones más rápidamente que las otras, aún cuando el desarrollo de los trypomastigotes fue a tiempos semejantes a los de las otras agrupaciones, 23 días como media.

## DISCUSIÓN

Algunos autores, entre ellos Pereira Da Silva (1959) y Brener (1971), refieren que los trypanosomas delgados, provenientes de sangre de vertebrados, son destruidos en el tracto digestivo del insecto y que los trypanosomas gruesos son los que se transforman a lo largo del mismo.

Tabla 1. Infectividad de las formas desarrolladas por T. Cruzi "y" sanguinola en agar-lit.

Formas Aisladas En Agar-Lit	Delgado			Grueso		
	<b>Ratones Positivos en</b>					
	Sangre	corazón	músculo	sangre	corazón	músculo
Trypomastigote Delgado	3/3	3/3	3/3	-	-	-
Trypomastigote Grueso	-	-	-	1/3	1/3	1/3
Esferoides	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3
Agrupación A	3/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3
Agrupación A1	3/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3
Agrupación A2	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3
Esferoides A2	1/3	1/3	1/3	2/3	2/3	2/3
Epimastigote A2	2/3	2/3	2/3	1/3	-	-
Trypomastigote Agrupación B	2/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3
Epimastigotes B1	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3

Tabla 2. Infectividad de las formas desarrolladas por T. Cruzi "Ep" sanguinola en agar-lit.

Formas Aisladas En Agar-Lit	Delgado			Grueso		
	<b>Ratones Positivos en</b>					
	Sangre	corazón	músculo	sangre	corazón	músculo
Trypomastigote Delgado	3/3	3/3	3/3	-	-	-
Trypomastigote Grueso	-	-	-	1/3	1/3	1/3
Esferoides	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	2/3
Agrupación A	2/3	2/3	2/3	1/3	3/3	2/3
Agrupación A1	2/3	2/3	2/3	1/3	1/3	1/3
Agrupación A2	1/3	1/3	1/3	2/3	2/3	2/3
Esferoides A2	2/3	2/3	2/3	1/3	1/3	1/3
Epimastigote A2	2/3	2/3	2/3	1/3	-	-
Trypomastigote Agrupación B	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Epimastigotes B1	-	-	-	1/3	1/3	1/3

Por otra parte Vickerman (1965) y Brener (1973) señalan que el comportamiento del trypomastigote de sangre al entrar en el invertebrado es paralelo con su comportamiento cuando es sembrado en un medio de cultivo apropiado. Soares y De Souza (1991), dan evidencias sobre una organela, a la cual denominan "reservosoma" que está presente en las formas epimastigotes, proliferativos, en medio ricos en lípidos y proteínas, pero al ir agotándose estos compuestos aparecen los trypomastigotes que no proliferan y a los cuales no se les observa el reservosoma.

Nuestros resultados señalan que tanto el trypomastigote grueso como el delgado sufren transformaciones morfológicas semejantes cuando son sembrados en un medio de cultivo como el agar-LIT (esferomastigote, epimastigote, trypomastigote y agrupaciones A y B) y todas fueron capaces de infectar, inclusive la forma delgada y gruesa de los trypomastigote sanguicola. Esto indica que no hubo, en nuestra experiencia, evolución hacia formas no infectantes. En las agrupaciones B se desarrollaron formas tipo epimastigotes (B1) que no generan trypomastigotes, semejantes a las señaladas por López (1985) y a las cuales denominó Trypo negativo (trypo) para indicar que no generaban trypomastigotes. Estas formas deberían ser

estudiadas mas profundamente, buscando su significado en ciclo de vida de este parásito.

La siembra de parásitos en cajas de agar-LIT nos ha permitido analizar el desarrollo de un solo parásito y probar la infectividad de cada una de las formas generadas por el parásito (trypomastigote grueso y delgado) in vitro. Este estudio nos dará evidencias para proponer una mejor manera de entender el ciclo de vida *Trypanosoma cruzi*.

Financiamiento: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. Proyecto: C-234-84.

## REFERENCIAS

- Boiso JF, Goitia AM, 1982. Cultivo de *Trypanosoma cruzi* (cepa Elpidio Padrón) en un medio semidefinido. Efecto de algunas variaciones en la composición y condiciones del mismo. Act. Cient. Venezol. 33: 408.
- Brack C .1968. Elektronenmikroskopische untersuchungen zum lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. Acta tropica 25: 289-356.
- Brener Z. 1971. Life cycle of *Trypanozoma cruzi*. Rev. Med. Trop Sao Paulo. 13:171-178.
- Brener Z, Chiari E. 1963. Obsevações sobre a fase crónica de doença de Chagas experimental no camundongo. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 5:128-132
- Camargo E. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 6: 93.
- Diaz E. 1934. Estudio sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Mem. Isnt. Oswaldo Cruz. 28:32-108.
- Hoare C A, Wallace F 0. 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. Nature (London) 212:1385
- López EN. 1985. Algunas observaciones experimentales sobre el comportamiento de *Trypanosoma cruzi* cultivado en cajas con agar. Rev. Cubana Med. Trop. 37: 334-340.
- Mshelvala A S, Ormerod W E. 1973. Measurement of the infectivity of *Trypanosoma cruzi* in faces of Rhodnius prolixus for comparison of dose-response curves. J. Gen. Micro. 75: 3339-3350.
- Silva L H P da. 1959 Observações sóbre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 1: 99.
- Soares M, Souza W. 1991. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 77:461-468.
- Vickerman K. 1965 Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. Nature. 208: 762-766.
- Wallace F 0.1996. The Trypanosomatidae parasites of insects arid arachnids. Exper. Parasitol. 18:124. Wittner M, Squillante L, Nadler P, Anowitz H. 1982. *Trypanosoma cruzi*: Colony formation and clonal growth in agar. Exp. Parasit. 53: 255-261.