

***Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo**

A. ZAIDENBERG,* H. A. TOURNIER, G. R. SCHINELLA Y H. O. BUSCHIAZZO

Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata.
Calle 60 y 120. (1900) La Plata. Argentina

* Autor para la correspondencia: schidelm@infovia.com.ar

ABSTRACT. This work describes a protocol to obtain pure populations of extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. The amastigote stage was obtained by means of temperature changes and human plasma added to the culture medium. Epimastigotes (clon BraC15C2) were first grown in F69 medium at 27°C during 96 h and then at 36.5°C. After three subcultures of 96 h each at the latter temperature a subsequent incubation in the presence of 5% human plasma, was needed to obtain a population of amastigotes that could be maintained indefinitely in the F69 or F29 media. This amastigote population was similar morphologically to that obtained through other methods. The kinetic of growth depended on the culture medium used (F29 or Brain-Heart Infusion, BHI). When culture was incubated at 27°C in both media, the pre-exponential and logarithmic phases of growth were observed at 72-96 h and 24-48 h respectively. The change in stage from amastigote to epimastigote depended whether amastigotes were subcultured or not. The growth of amastigotes in BHI medium at 36.5 °C did not occurred. The growth of amastigotes was similar to those observed at 27°C when F29 medium was used although the transformation to epimastigotes did not take place at this temperature. A population over 99 % of amastigotes were maintained at 36.5°C indefinitely by means of subcultures in F29 medium.

Key words: Amastigotes, *Trypanosoma cruzi*

RESUMEN. El presente trabajo describe un protocolo para la obtención de poblaciones puras y estables de amastigotes extracelulares de *Trypanosoma cruzi*. El mismo está basado en un mecanismo de selección de estadios por efectos combinados de cambios térmicos y presencia de plasma humano en el medio de incubación. Epimastigotes (clon Bra C15C2) se incubaron a 27°C durante 96 h y subcultivados cada 96 h a 36.5°C en el medio definido F69. Luego de 3 subcultivos a 36.5°C y posterior incubación en presencia de 5% de plasma humano normal durante el mismo lapso, se obtuvo una población de parásitos constituida principalmente por amastigotes que pudo ser mantenida durante tiempo indefinido por subcultivos en medios F69 y F29. Los estudios morfológicos de dichos amastigotes mostraron estructuras similares a los obtenidos por otros métodos. La cinética de crecimiento de amastigotes dependió de la temperatura de incubación y del medio de cultivo utilizado (F29 ó infusión cerebro corazón BHI). La incubación en el medio F29 a 27°C mostró las fases pre-exponencial y logarítmica de 72-96 h y 24-48 h respectivamente. Se obtuvieron resultados similares utilizando el medio BHI. Cultivos con o sin recambio de medio, sufrieron transformación a epimastigotes al cabo de 16 días. A 36.5°C, la cinética de crecimiento en el medio F29 fue similar, aunque no se observó transformación a epimastigotes. El medio BHI no fue apto para el crecimiento de amastigotes a esta temperatura. En tanto, el F29, por subcultivos, permitió el mantenimiento de amastigotes con una pureza superior al 99% durante tiempo indefinido.

Palabras clave: Amastigotes, *Trypanosoma cruzi*

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es un parásito que cumple su ciclo de vida en un insecto vector hematófago y diferentes especies de mamíferos. Tres estadios morfológicos se presentan durante dicho ciclo.⁵ Tripomastigote, estadio infectivo no replicativo que se encuentra en el insecto vector y en la sangre de mamíferos infectados. Los estadios proliferativos de epimastigote y amastigote se presentan en el insecto vector y en el interior de células de mamíferos respectivamente.^{2,3}

Aunque definido como intracelular obligado, el estadio amastigote también puede ser hallado en el insecto vector durante la fase temprana de la infección,⁸ en sangre de ratones infectados¹ y en cultivos libres de células.¹³ Los cultivos axénicos de amastigotes son útiles para el estudio de propiedades estructurales y comportamientos fisiológico y bioquímico del parásito, evitando los inconvenientes que puedan derivar de su aislamiento a partir de cultivos de tejidos.

Engel y Dvorak⁶ han descrito un método para aislar y mantener amastigotes extracelulares durante tiempos pro-



longados y realizaron estudios sobre su comportamiento a 27°C.

En este trabajo describimos un protocolo para la obtención de poblaciones puras y estables de amastigotes extracelulares a 36.5°C basado en un mecanismo de selección de estadios por efecto combinado de cambios térmicos y agregado de plasma humano al medio de cultivo. Presentamos además los resultados del comportamiento de estos amastigotes en diferentes condiciones de cultivo.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de parásitos. Epimastigotes de *T. cruzi* clon Bra C15C2¹⁵ fueron mantenidos en medio NNN modificado¹¹ a 27°C. El inóculo para la obtención de amastigotes se obtuvo a partir de una población de epimastigotes en fase estacionaria cultivados y subcultivados en el medio químicamente definido F69¹³ adicionado con 10 % de suero fetal bovino a 27°C (Tablas 1, 2, 3).

Este cultivo (0.5 ml conteniendo aproximadamente 1 x 10⁶ células) fue transferido a tubos conteniendo 10 ml de medio F69 e incubados a 36.5°C durante 96 h y subcultivados en las mismas condiciones. Luego de 3 subcultivos realizados cada 96 h, se realizó un subcultivo a la misma temperatura en presencia de 5 % de plasma humano normal libre de infección por *T. cruzi*, determinada por reacción de fijación del complemento,⁷ seguido por subcultivos sucesivos efectuados cada 4 días en ausencia de plasma. En algunos experimentos el plasma humano fue agregado

Tabla 1. Composición del medio F69 utilizado para cultivo de *Trypanosoma cruzi*.

1 Agua destilada	22.0 ^a
2 Medio 199 (concentrado 10 x)	10.0
3 Glucosa (0.8 %)	25.0
4 Piruvato de sodio (0.1 M)	2.0
5 Tripticasa (5 %)	10.0
6 Mezcla vitamínica (ver Tabla 2)	1.0
7 Biotina (2 mg / 100 ml)	1.0
8 Acido fólico (2 mg / 100 ml)	5.0
9 Vitamina B12 (1 mg / 100 ml)	1.0
10 Metilcelulosa (4 %)	5.0
11 Hemina (50 mg / 100 ml en 0.1 N Na OH)	5.0
12 Penicilina G y Estreptomina (100,000 U/ml)	0.1
13 ATP, ADP, AMP en solución (ver Tabla 3)	10.0
14 NaHCO ₃ (4.2 %)	3.0
Total	100.1

Tabla 2. Composición de la mezcla de vitaminas para el medio de cultivo F69

1 Acido p-aminobenzoico	30 ^a
2 D-Pantotenato de Ca	40
3 Cloruro de colina	30
4 Inositol	30
5 Nicotinamida	50
6 Acido nicotínico	20
7 Piridoxal – HCl	20
8 Piridoxina – HCl	20
9 Piridoxamina – 2 HCl	20
10 Fosfato sodico de Rivo flavina	4
11 Tiamina	20
12 Agua destilada csp.	100 ml

^a los valores son expresados en miligramos.

Tabla 3. Composición de la solución ATP–ADP–AMP para el medio de cultivo F69.

1 ATP	50 ^a
2 ADP	10
3 AMP	10
4 Glutación reducido	20
5 Cisteína – HCl	5
6 Acido ascórbico	5
7 Agua destilada csp.	100 ml

^a los valores son expresados en miligramos.

previo a la elevación de la temperatura. Con ambos tipos de experimentos se obtuvieron resultados similares. Al cabo de este tiempo se obtuvo una población de amastigotes con una riqueza superior al 99%, que pudo ser mantenida a 36.5°C por repique en los medios F69 ó F29¹² (Tabla 4) indistintamente durante tiempos prolongados.

Comportamiento de amastigotes en cultivos axénicos. Se estudió el crecimiento de cultivos de amastigotes (inóculo inicial 1 x 10⁵ células/ml) en el medio definido F29 y en un medio no definido que contiene infusión de cerebro-corazón, BHI (Difco)¹⁷ a 27°C y 36.5°C. El crecimiento relativo de la población celular, determinado por la relación entre el número de células al tiempo “t” (Nt) y el

Tabla 4. Composición del medio F29 utilizado para cultivo

1	Medio base		
	Medio F199 (10x)	10 ml	
	Glucosa (0.8%)	25	
	Tripticasa (5.0%)	10	
	NaHCO ₃ (2.8%)	1	
	Agua destilada	54	85 ^a
2	Suero fetal bovino		10
3	Hemina (50 mg/ml en NaOH 0.04%)		5

^a v/v/v %

número de células al inicio del experimento (No), se determinó cada 24 h sobre alícuotas de cada medio de cultivo (0.2 ml) mediante conteo con cámara de Neubauer.

Estudios morfológicos. Se llevaron a cabo mediante microscopía óptica (previa coloración con Wrigth Giemsa) y microscopía electrónica de transmisión y barrido. Para microscopía de transmisión, los parásitos se fijaron en solución de glutaraldehído al 2.5%, paraformaldehído al 2% y tetróxido de osmio al 1%. La tinción se realizó con acetato de uranilo-citrato de plomo y para la observación se utilizó un microscopio JEM 1200 xII. Para la microscopía de barrido se utilizó un microscopio JEOL T 100, previa fijación de la muestra con glutaraldehído al 2.5%, ultrafiltración (Millipore® 0.6 µm) y deshidratación seriada en etanol de diferentes concentraciones (50-100 %).

Los parásitos fueron clasificados como amastigotes, tripomastigotes o epimastigotes de acuerdo a Hoare.⁹

RESULTADOS

El tipo de experimento descrito que combina cambios térmicos y agregado de plasma humano a los medios de cultivo permitió la obtención de poblaciones puras y estables del estadio intracelular de *Trypanosoma cruzi*. Cuando los epimastigotes fueron cultivados a 36.5°C en el medio F69 se pudo observar transformación al estadio amastigote. Luego de 3 subcultivos realizados cada 96 h, la población de parásitos consistía en 80 % de epimastigotes, 5 % de tripomastigotes y 15 % de amastigotes. El subcultivo en presencia de plasma humano permitió la selección del estadio amastigote, resistente al plasma y la lisis de las formas sensibles. Al cabo de 4 días se obtuvo una población pura de amastigotes que pudo ser mantenida a 36.5°C por subcultivos en los medios F69 ó F29¹² indistintamente durante tiempos prolongados.

Los estudios morfológicos de estos amastigotes axénicos mostraron una estructura semejante a los obtenidos por otros métodos.¹⁴ Bajo microscopía óptica los amastigotes aparecen como organismos redondeados u ovals de un

diámetro promedio de 4.5 µm destacándose cinetoplastos en forma de canasta o redondos. (Fig. 1A).

Mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión se puede observar una estructura esferoidal propia del estadio amastigote (Fig. 1B) y la estructura fina de los amastigotes mostrando el núcleo con prominente cariosoma y un cinetoplasto con las dos hebras características del ADN (Fig. 1C).

El análisis de la cinética de crecimiento mostró diferencias de acuerdo a la temperatura de incubación y al medio de cultivo utilizado. Los resultados que se detallan son el producto de un experimento considerado como tipo (Fig. 2).

A 27°C, las curvas de crecimiento en los medios F29 y BHI fueron similares hasta el décimo día del cultivo (Fig. 2A) con una fase pre-exponencial de 72-96 h y una fase de crecimiento logarítmico de 24-48 h. La fase estacionaria comienza alrededor del día 6 del cultivo a partir del cual se observó transformación al estadio epimastigote. En estos cultivos sin renovación del medio el crecimiento del mismo a partir del día 11 se realizó a expensas del estadio epimastigote y al cabo de 16 días de cultivo, la población de parásitos consistía en 82% de epimastigotes y 18% de amastigotes (Fig. 2A). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores.⁶ La renovación del medio de cultivo cada 96 horas no impidió la transformación de los amastigotes.

La Fig. 2B, muestra los resultados del comportamiento de amastigotes a 36.5°C utilizando el medio F29. En estas condiciones se observó una fase pre-exponencial de aproximadamente 48-72 h y una fase de crecimiento logarítmico similar a la observada a 27°C. Luego de una fase estacionaria de 24 a 36 h, la concentración de parásitos disminuye y a diferencia de lo observado a 27°C, si no se renueva el medio, el cultivo se agota como amastigotes, no observándose en ningún momento la presencia de epimastigotes. El medio BHI no parece ser una alternativa apropiada para el crecimiento de amastigotes a esta temperatura de incubación (Fig. 2B).

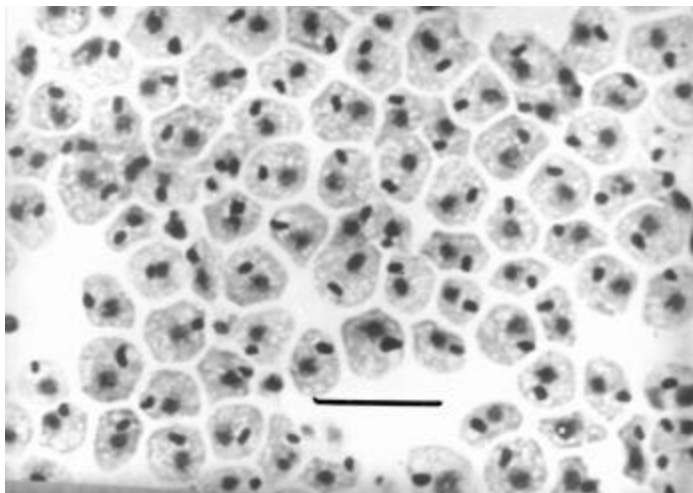
DISCUSION

Las transformaciones que se producen durante el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* en cultivos libres de células pueden ser inducidas o inhibidas por cambios de la temperatura y de la composición de los medios de cultivo. La transformación de tripomastigotes a amastigotes ocurre tanto *in vivo* como *in vitro* con una velocidad que depende de la temperatura¹⁰ o la adición de plasma humano o de pollo al medio de cultivo.¹⁸

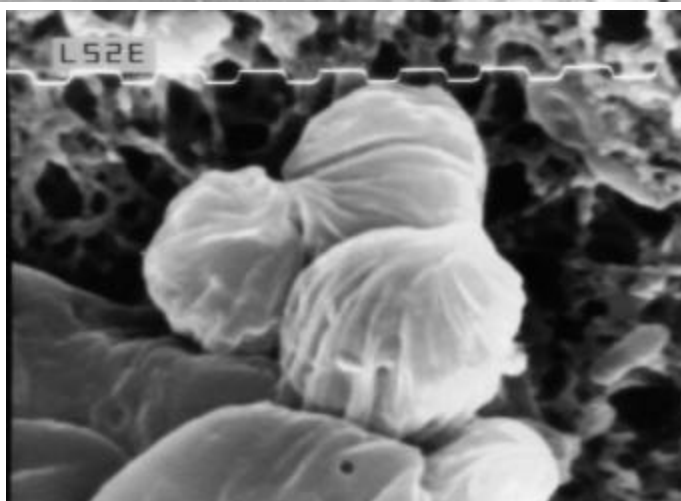
La diferencia de temperatura entre los huéspedes del parásito, insecto vector y mamíferos, induce la diferenciación de promastigotes a amastigotes en *Leishmania mayor* a través de la inducción de las llamadas "proteínas de choque térmico".¹⁸ Este grupo de proteínas está conservado en



A



B



C

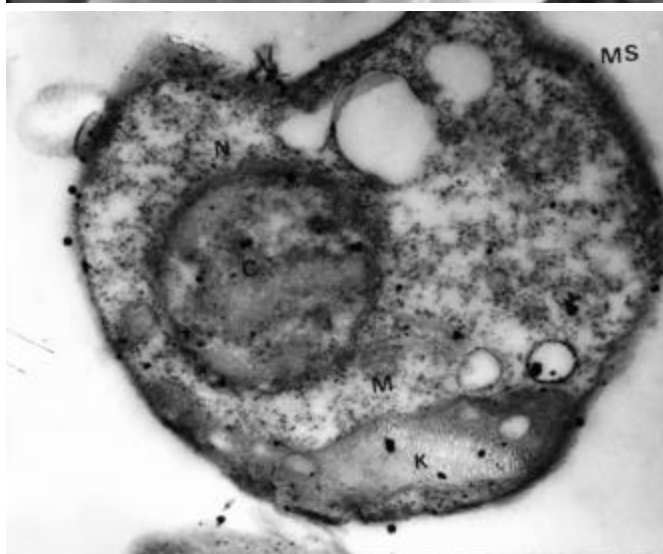


Fig. 1. Amastigotes extracelulares de *Trypanosoma cruzi*. La fase se obtuvo mediante el protocolo descrito en Material y Métodos y se mantuvieron en medio F29. A, Microscopía óptica. Fotografía panorámica de un cultivo de amastigotes teñidos por la coloración de Wright Giemsa (barra = 10 μ m); B, Microscopía electrónica de barrido. Fotografía que muestra la estructura esferoidal del estadio amastigote (X 10,000); C, Microscopía electrónica de transmisión. Se observan estructuras características del estadio amastigote: núcleo (N), cariosoma (C), mitocondria (M), microtúbulos subpeliculares (M) y kinetoplasto (K) (barra=500 nm).

Figura 2.

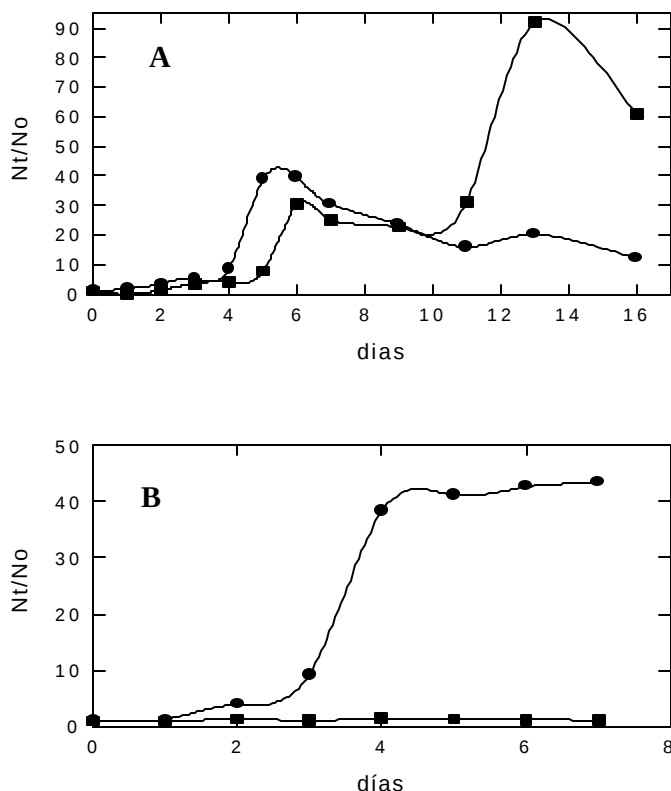


Fig. 2. Cinética del crecimiento de amastigotes extracelulares. Amastigotes extracelulares (1×10^5 células/ml de medio de incubación), obtenidos como se describe en Material y Métodos fueron incubados a 27°C (A) y a 36.5 °C (B) en los medios F29 (círculos) y BHI (cuadrados). El crecimiento poblacional relativo de parásitos (N_t/N_0) se determinó cada 24 h sobre alícuotas de 0.2 ml de cada medio de incubación.

Trypanosoma cruzi e inducido por aumento de temperatura^{4,16} y podría ser en parte responsable de la morfogénesis de epimastigotes observada en nuestros experimentos cuando la temperatura se eleva de 27°C a 36.5°C.

Por otra parte, el plasma de diversas especies produce por un lado lisis y por otro transformación de epimastigotes a amastigotes vía tripomastigote.^{13,19} Se ha demostrado la presencia de epimastigotes en proceso de transformación a tripomastigotes, en poblaciones de epimastigotes en fase estacionaria.¹⁰ El agregado de plasma humano a estos cultivos de epimastigotes produce la selección de las formas resistentes a la lisis que evolucionan luego a amastigotes. La combinación de estos dos factores, cambio térmico y presencia de plasma humano en el medio de incubación constituye la base del método de obtención del estadio amastigote de *Trypanosoma cruzi* en cultivos libres de células.

El comportamiento de los amastigotes en los medios de

cultivo incubados a 27°C sigue un patrón similar a lo observado previamente por otros autores. En contraste con los amastigotes intracelulares que se diferencian a tripomastigotes,^{8,20} los extracelulares lo hacen a epimastigotes.⁶ Este hecho se comprueba en nuestros experimentos sin cambio de medio de cultivo donde al cabo de 16 días de incubación, la población de parásitos consistía principalmente de epimastigotes. En los experimentos de Engel,⁶ la transformación a epimastigotes fue inhibida por cambios del medio de cultivo. En contraste, en nuestros experimentos a 27°C, el estadio de amastigote no pudo ser mantenido aún cambiando el medio de cultivo, sugiriendo que la diferencia observada podría ser debida a diferencias de cepa.

El comportamiento de los amastigotes extracelulares a 36.5°C en el medio F29 mostró diferencias significativas con lo observado a 27°C. En este caso en ningún momento se observó transformación a epimastigotes y el cambio de medio en ausencia de plasma permitió el crecimiento y



mantenimiento de la población de amastigotes a 36.5°C durante tiempo indefinido. Estos resultados permiten sugerir que el fenómeno de morfogénesis de amastigotes no dependería del medio de cultivo empleado sino de cambios térmicos y del tipo de cepa utilizada.

Pan¹⁵ fue capaz de obtener amastigotes extracelulares a partir de epimastigotes utilizando un medio altamente enriquecido en vitaminas y con un requerimiento de nucleótidos de adenina en alta concentración, particularmente ATP. El tiempo requerido para la obtención de poblaciones puras de amastigotes era de aproximadamente 40 días. En nuestros experimentos hemos utilizado ese medio durante el proceso de transformación, pero luego de obtenidos, los amastigotes pudieron ser mantenidos durante tiempo indefinido mediante sucesivos subcultivos en el medio F29, carente de los compuestos citados. Nuestro método presenta ventajas sobre el desarrollado por Pan, una de ellas es el menor tiempo requerido para la obtención de poblaciones puras del estadio intracelular del parásito (aproximadamente 16 días). Otra ventaja reside en el menor costo para el mantenimiento de dicho estadio en un medio que no requiere la presencia de vitaminas y nucleótidos de adenina.

La ventaja del presente protocolo con respecto al método desarrollado por Engel⁶ consiste en poder mantener y estudiar el crecimiento de amastigotes extracelulares a temperatura similar a la del huésped humano.

Por lo expuesto consideramos que el protocolo descrito en este trabajo constituye una alternativa para la obtención y mantenimiento de poblaciones puras y estables de amastigotes de *Trypanosoma cruzi* en cultivos axénicos y el estudio de su comportamiento a 36.5°C.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la colaboración de la Lic. Patricia Sarmiento del servicio de microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata y al Sr. Daniel Fioravanti por su asistencia técnica. Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires y la Fundación FEMEBA. Los Dres. A. Zaidenberg, H. Tournier y G. Schinella son Miembros de la Comisión de Investigación Científica de la Provincia de Buenos Aires.

REFERENCIAS

1. Andrews, N. W., E. S. Robbins, V. Ley, S. Hongk y V. Nussenzweig. 1988. Developmentally related phospholipase C-mediated release of three major surface glycoprotein of amastigotes. *J. Exp. Med.* 167:300-314.
2. Brenner, Z. y E. Chiari. 1965. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. *J. Parasitol.* 51:922-926.
3. Brenner, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* 27:347.
4. Carvalho, T. U. y W. de Souza. 1986. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 28:205-212.
5. de Souza, W. 1984. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.* 86:197-283.
6. Engel, J.C. y J. A. Dvorak. 1988. *Trypanosoma cruzi*: Cell biological behavior of epimastigote and amastigote forms in axenic cultures. *J. Protozool.* 35:513-518.
7. Freitas, J. L. 1961. De reacao de fixacao do complemento para diagnostico da molestias de Chagas pe la tecnica quantitativa. *Arch. Hyg. Saude Publica* 16:55-94.
8. Gutteridge, W. E., B. Cover y M. Gaborak. 1978. Isolation of blood and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* from rats and other rodents and preliminary studies of their metabolism. *Parasitology* 76:153-176.
9. Hoare, C. A. y F. C. Wallace. 1966. Developmental stages of trypanosomatids flagellate: A new terminology. *Nature* 212:1385.
10. Kimura, E., W. H. Lay y J. F. Fernandes. 1978. Extracellular in vitro evolution of metacyclic trypomastigotes isolated from *Trypanosoma cruzi* cultures. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 20:133-138.
11. Pan, S. C. 1968. Cultivation of the leishmaniforme stage of *Trypanosoma cruzi* in a cell free medium at different temperatures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 17:823-832.
12. Pan, S. C. 1971. Cultivation and morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* in improved liquid media. *J. Protozool.* 18:556-560.
13. Pan, S. C. 1978. *Trypanosoma cruzi*: Intracellular stages grown in a cell free medium. *Exp. Parasitol.* 45:215-224.
14. Pan, S. C. 1978. *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructure of morphogenesis in vitro and in vivo. *Exp. Parasitol.* 46:92-107.
15. Pan, S. C. 1982. Establishment of clones of *Trypanosoma cruzi* and their characterization in vivo and in vitro. *Bull. W. H. O.* 60:101-107.
16. Rondinelli, E. 1994. Conservation of heat shock proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 10:172-176.
17. Stoka, A. M. 1996. Activity of Juvenile Hormone and Juvenile Hormone analogues on the growth of *Trypanosoma cruzi*. *J. Steroid. Mol. Biol.* 59:495-600.
18. Van der Ploeg, L. H. T., S. Giannini y C. Cantor. 1985. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science* 228:1443-1445.
19. Zaidenberg, A. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Extracellular amastigote resembling forms induced by chicken and human plasma. *Exp. Parasitol.* 60:211-228.
20. Zaidenberg, A., H. Tournier, G. Schinella y H. Busch-izzo. 1995. *Trypanosoma cruzi*: Influencia del plasma humano en la morfogénesis de tripomastigotes sanguíneos en un medio de cultivo acelular. *Rev Lat-Amér. Microbiol.* 37:71-77.