

# **UNIVERSITAS SCIENTIARUM**

## **REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**

Volumen 4 N° 1, Enero-Junio de 1997

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**





## ADAPTACIÓN DE LA CEPA MUNANTA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* AL CULTIVO *IN VITRO* EN CÉLULAS VERO

Carolina Velazco-Gamboa<sup>1</sup>, Fabiola Puentes-Corredor<sup>2</sup>, Alberto Moreno-García<sup>2</sup>,  
Manuel Patarroyo-Murillo<sup>2</sup> & Concepción Puerta-Bula<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana,  
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia, Cra. 7 # 43-82.

<sup>2</sup> Instituto de Inmunología - HSJD, Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia, Cra. 10, Clle 1ra.

### RESUMEN

La importancia de obtener los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi* para reconocer los antígenos involucrados en los procesos de invasión y replicación intracelular, hace necesario adaptar las cepas al cultivo tisular; más aún conociendo el elevado grado de variación biológica, bioquímica y genética que se presenta a nivel de cepas y clones del parásito. Dentro del anterior contexto, en este trabajo se adaptó la cepa colombiana Munanta de *T. cruzi* al cultivo en células Vero, obteniéndose las principales formas del parásito: tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes. Se observó que la liberación de los tripomastigotes ocurría a los siete días posinfección y la cantidad obtenida fue directamente proporcional al número de parásitos infectantes. Por otra parte, la mayoría de los tripomastigotes observados a las 48 horas de lavar la monocapa con cinco días de infección, eran de morfología gruesa, correspondiendo al inicio de la transformación de tripomastigotes a amastigotes.

### ABSTRACT

The importance of obtaining the different stages of *Trypanosoma cruzi* in order to recognize the antigens involved in the intracellular invasion and replication processes, makes it necessary to adapt these strains to tissue culture, especially considering the high level of biological, biochemical and genetic variation, which is found among the strains and clones of the parasite. Within the aforementioned context, in this study, the Colombian strain of *T. cruzi*, Munanta, was adapted to tissue culture in Vero Cells, obtaining the principal forms of the parasite: trypomastigotes, amastigotes and epimastigotes. It was observed that the liberation of the trypomastigotes occurred on the seventh day postinfection and the quantity obtained was directly proportional to the number of infecting parasites. On the other hand, the majority of the trypomastigotes observed 48 hours after washing the monolayer five days after infection, were had thick-looking shapes corresponding to the initiation of the transformation from trypomastigotes to amastigotes.

**PALABRA CLAVE:** Cultivo tisular, tripomastigotes, amastigotes, epimastigotes, *Trypanosoma cruzi*.

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, etiología que afecta a más de 15 millones de personas en América Latina (Who 1991), es causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Dicho parásito es altamente pleomórfico, presentando tres formas principales de desarrollo: los amastigotes, correspondientes al estadio replicativo

intracelular en el hospedero mamífero, los tripomastigotes, a las formas infectantes terminales, y los epimastigotes, a las formas replicativas presentes en el intestino del insecto-vector Reduviidae (Tanowitz *et al.* 1992).

*T. cruzi* presenta adicionalmente, un elevado grado de polimorfismo entre cepas (Zingales & Colli, 1985) y entre clones (De Tito & Araújo

1987), además de su capacidad de infectar un amplio rango de células mamíferas (Rivas *et al.* 1993). Es así como se ha visto que los procesos de invasión e interacción parásito-célula hospedadora, varían dependiendo de factores intrínsecos de la cepa y clon del parásito, así como de la línea celular involucrada en la infección (Procopio & Mortara 1995).

Dentro del anterior contexto, el objetivo del presente trabajo fue la adaptación de la cepa colombiana Munanta de *T. cruzi* al cultivo tisular *in vitro* en células Vero, como primer paso para el estudio de las interacciones específicas parásito-célula hospedadora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Parásitos

La cepa Munanta de *T. cruzi* fue aislada a partir de la materia fecal del vector *Rodnius prolixus*, capturado en la vereda Munanta del municipio de Guateque (Boyacá), por el grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS), Bogotá, D.C.-Colombia. Los parásitos fueron cultivados a 28°C, durante 8 días en medio LIT (Infusión de hígado y triptona), (Difco), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado, tiempo tras el cual, se les adicionó a los cultivos directamente un 40% de suero humano fresco, durante 2 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, con el fin de eliminar la población de epimastigotes presentes (Nogueira *et al.* 1975). Posteriormente, los cultivos fueron sometidos a centrifugación a 2500 rpm, 4°C, durante 20 min. e incubados por otras dos horas en las mismas condiciones, para permitir el ascenso de los tripomastigotes metacíclicos (infectantes) al sobrenadante. Finalmente dichos tripomastigotes fueron recuperados del sobrenadante mediante centrifugación a 3500 rpm, 4°C, durante 20 min. y contados en cámara de Neubauer.

### Células de mamífero

En este estudio se utilizaron fibroblastos de riñón de mono verde africano, pertenecientes a la línea celular Vero ATCC 149, las cuales fueron cedi-

das gentilmente por el Dr. Jairo Oviedo de la casa veterinaria VECOL, Bogotá, D.C., Colombia. Dichas células fueron mantenidas en medio MEM (Gibco-BRL) rico en glucosa, suplementado con 10% de SFB inactivado (MEM completo) y una solución de penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 mg/ml), a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, hasta la obtención de la monocapa con un 60-70% de confluencia. Para el repique y obtención de nuevas monocapas, se agregó 7 ml de una solución de tripsina al 1% en solución de Hanks (Gibco-BRL) a las monocapas ya formadas, dejándose actuar durante 10 min. Trascurrido este tiempo, se adicionaron 7 ml de MEM completo, se recogieron las células y se sometieron a centrifugación durante 5 min a 1500 rpm, 4°C. Finalmente, las células fueron contadas y ajustadas a una concentración de 1 X 10<sup>6</sup> / ml, sembrándose en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon).

### Infección de las células Vero

Los tripomastigotes metacíclicos resuspendidos en medio MEM incompleto (sin SFB), fueron adicionados a las monocapas de células Vero en una proporción de 3 parásitos / célula, dejándose interactuar por 24 h. Pasado este tiempo, la monocapa fue lavada con MEM incompleto y reconstituida con MEM completo e incubada a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante seis días. Finalmente, los cultivos fueron examinados diariamente al microscopio invertido para evaluar la aparición de tripomastigotes en el medio de cultivo.

### Obtención de tripomastigotes extracelulares derivados de cultivo tisular

Trascurridos 7 días posinfección, tiempo en el cual aparecieron los tripomastigotes en el sobrenadante de la monocapa, este fue retirado y la monocapa lavada con MEM incompleto. El sobrenadante obtenido, fue centrifugado en primer lugar a 2500 rpm y 4°C, durante 5 min, con el fin de retirar detritos celulares, de manera que el precipitado fue descartado y el sobrenadante (rico en amastigotes y tripomastigotes) fue nuevamente centrifugado a 3000 rpm, 4°C durante 20 min e incubado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 2 h, con el propósito de que los tripomastigotes

subieran al sobrenadante. Tiempo tras el cual, el sobrenadante fue centrifugado a 3500 rpm, 4°C, por 20 min., con la finalidad de recoger los tripomastigotes en el "pellet", el cual fue resuspendido en 1 ml de MEM incompleto. Los parásitos así obtenidos fueron contados finalmente y usados para infectar una nueva monocapa de células Vero (segundo y tercer pase). A la monocapa inicial, se le adicionó medio MEM completo y se llevó a incubar nuevamente, hasta la aparición de nuevos tripomastigotes en el sobrenadante (segunda y tercera recolección).

**Obtención de amastigotes extracelulares**

Los amastigotes fueron obtenidos a partir del "pellet" que quedó tras la incubación del sobrenadante de la monocapa exento de detritos celulares, durante 2 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Dicho "pellet" fue resuspendido en medio LIT suplementado con 10% de SFB e incubado a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 48 h, Tiempo tras el cual los tripomastigotes se diferenciaron a amastigotes. Finalmente los parásitos fueron lavados, contados y congelados en LIT 10% SFB y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma).

Parásitos	Recolección Infectantes (Millones)	Recolección		
		No. 1 (Millones)	No. 2 (Millones)	No. 3 (Millones)
PASE 1	2.0	4.6	11.6	3.2
PASE 2	4.6	8.0	11.2	4.0
PASE 3	8.0	8.2	10.0	-

Tabla 1. Número de tripomastigotes extracelulares de la cepa Munanta de *T. cruzi*.

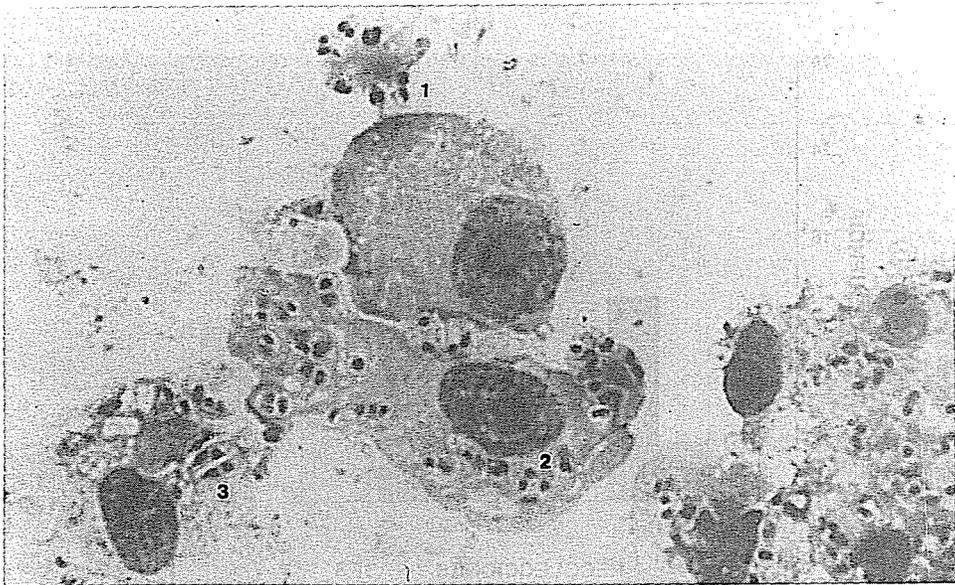


Figura 1. Células Vero infectadas con la cepa Munanta de *Trypanosoma cruzi*, coloreadas con Giemsa. 1) Parásitos interactuando con células no infectadas, b) Amastigotes intracelulares y c) Tripomastigotes saliendo de la célula.

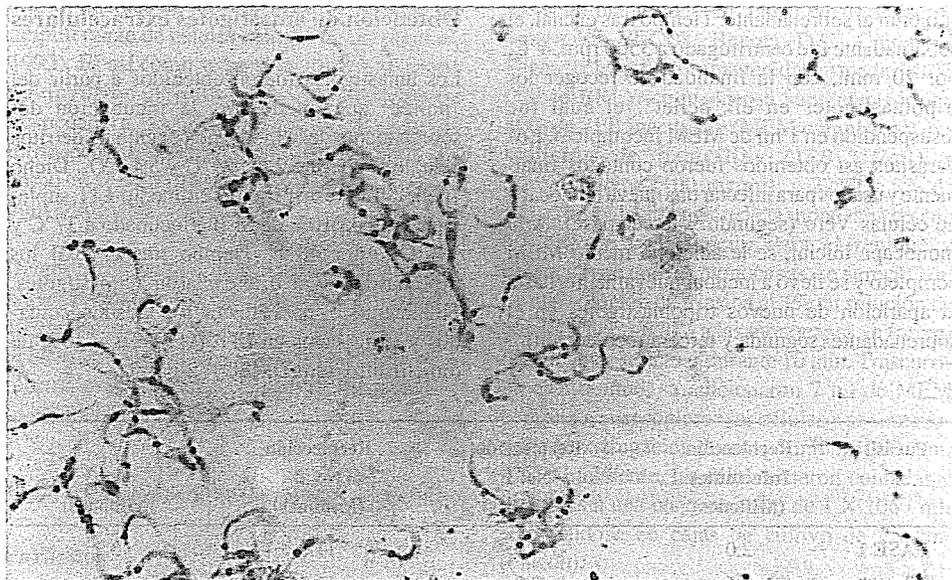


Figura 2. Tripomastigotes metacíclicos de la cepa Munanta de *T. cruzi*, coloreados con Giemsa.

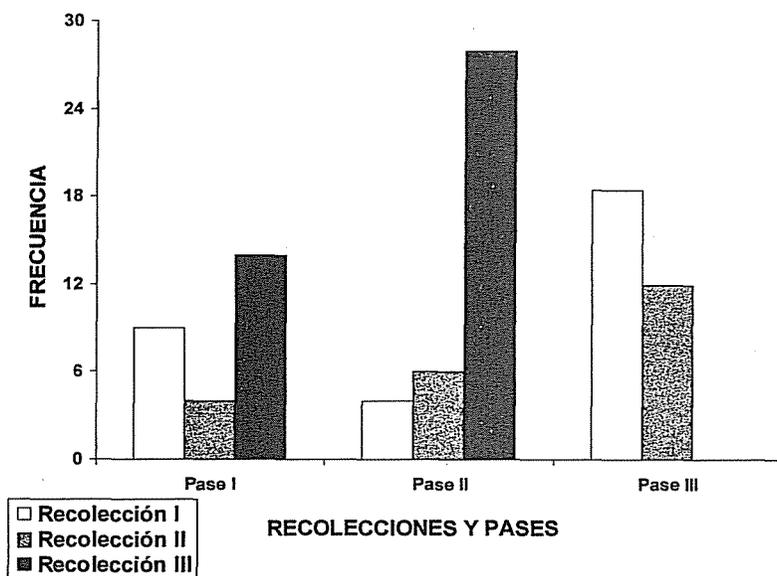


Figura 3. Frecuencia de tripomastigotes gruesos de la cepa Munanta de *T. cruzi*.

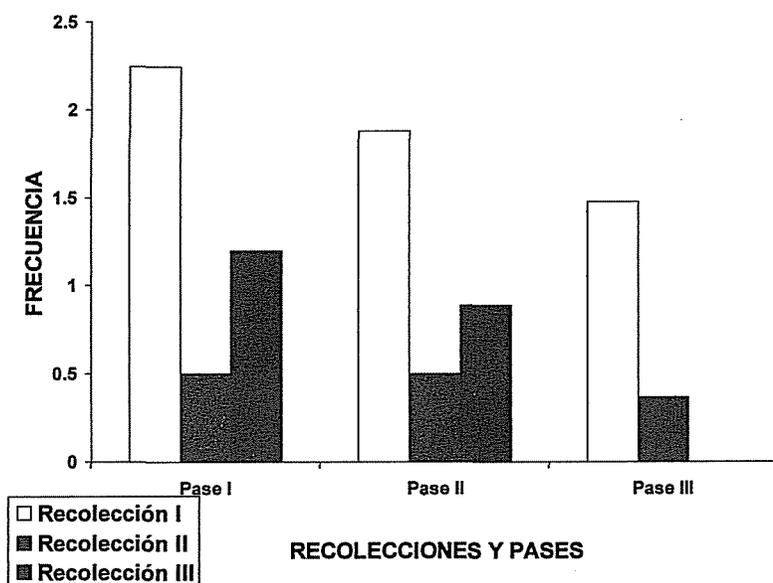


Figura 4. Frecuencia de tripomastigotes delgados de la cepa Munanta de *T. cruzi*.

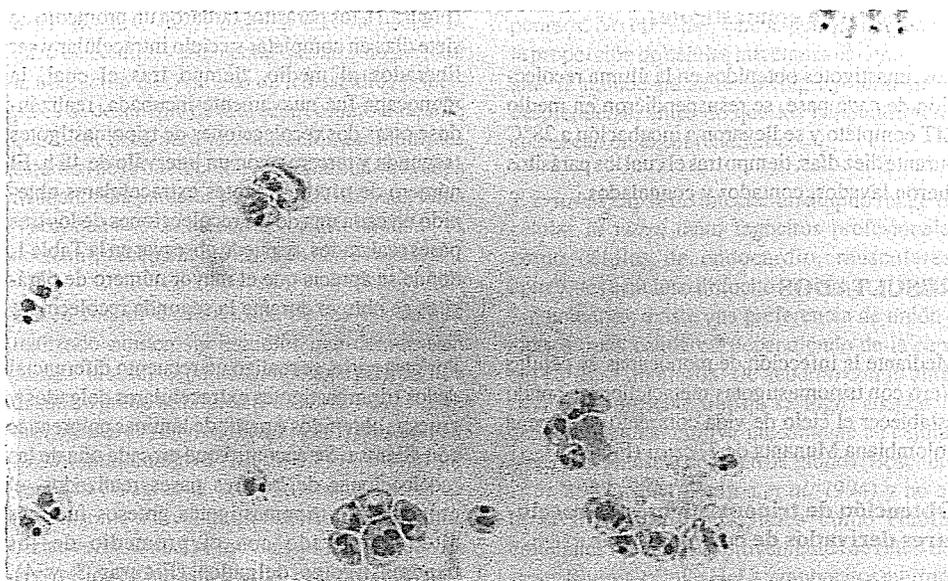


Figura 5. Amastigotes extracelulares de la cepa Munanta de *T. cruzi*, coloreados con Giemsa.

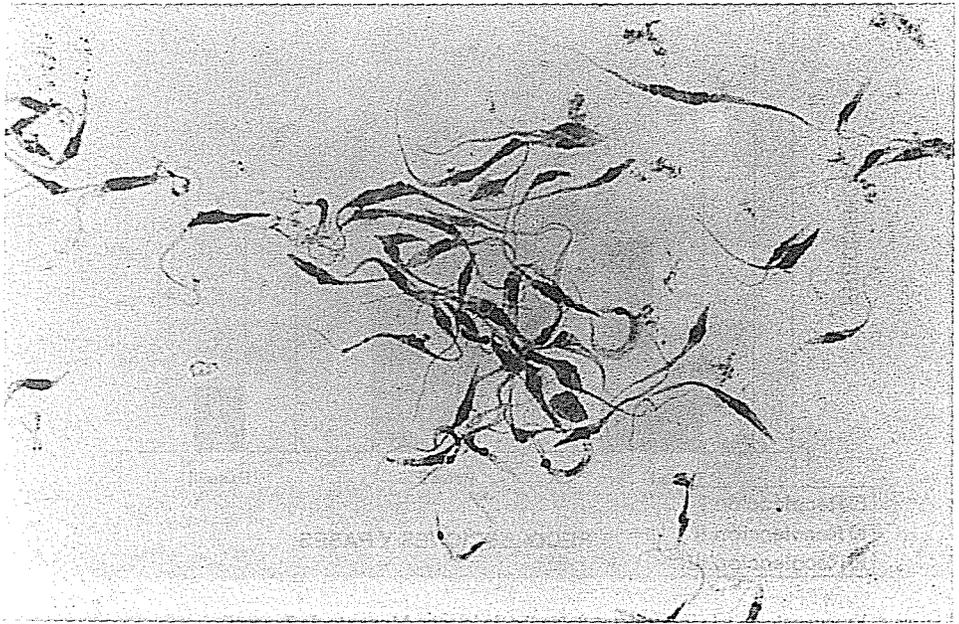


Figura 6. Epimastigotes de la cepa Munanta de *T. cruzi*, coloreados con Gremsa.

### Obtención de epimastigotes

Los amastigotes obtenidos en la última recolección de cada pase, se resuspendieron en medio LIT completo y se llevaron a incubación a 28°C durante diez días, tiempo tras el cual los parásitos fueron lavados, contados y congelados.

## RESULTADOS

Mediante la infección de monocapas de células Vero con tripomastigotes metacíclicos, se pudo establecer el ciclo de vida completo de la cepa colombiana Munanta de *T. cruzi* (Figura 1).

### Obtención de tripomastigotes extracelulares derivados de cultivo tisular

Al infectar la monocapa con tripomastigotes metacíclicos de la cepa Munanta de *T. cruzi*

(Figura 2), los parásitos tardaron un promedio de siete días en completar su ciclo intracelular y ser liberados al medio, tiempo tras el cual, la monocapa fue nuevamente incubada, realizándose otras dos recolecciones de tripomastigotes (segunda y tercera), con un intervalo de 48 h. El número de tripomastigotes extracelulares obtenido en cada una de las recolecciones de los tres pases realizados, se puede observar en la Tabla 1, donde se aprecia que el mayor número de parásitos se obtuvo durante la segunda recolección.

Por otra parte, se realizó un recuento diferencial de los tripomastigotes extracelulares delgados y gruesos obtenidos a partir de láminas coloreadas con Giemsa. Se encontró que en cada una de las recolecciones de los tres pases realizados, el promedio de tripomastigotes gruesos fue más alto, comparado con el promedio de los tripomastigotes delgados (Figuras 3 y 4). Adicionalmente, el análisis estadístico descriptivo realizado, basado en la prueba de ANAVA de

dos vías, demuestra con una  $p < 0.05$ , que las diferencias obtenidas en el número de tripomastigotes gruesos y delgados contados, en cada una de las recolecciones de los tres pases realizados, fueron estadísticamente significativas.

### Obtención de amastigotes y epimastigotes

En cuanto a la obtención de amastigotes a partir de tripomastigotes, este resultó ser un proceso eficiente, con una recuperación del 85-90% de pureza (Figura 5) y un tiempo de transformación de 48 h, que coincide con lo reportado en trabajos anteriores (Gamarro *et al.* 1985, Andrews *et al.* 1987).

Por el contrario, la transformación de amastigotes a epimastigotes (Figura 6), resultó ser menos eficiente, por cuanto del 40 al 50% de los parásitos presentes en el cultivo, se transformaban al siguiente estadio de tripomastigote. Lo anterior sugiere la necesidad de un seguimiento estricto, mediante elaboración de curvas de crecimiento, para establecer el momento de recolección ideal.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró la adaptación de la cepa Munanta de *T. cruzi* al cultivo tisular *in vitro* en células Vero, hecho que no sólo permite la obtención de cada uno de los estadios principales de desarrollo de esta cepa colombiana, sino que es la base para la realización de múltiples estudios de la interacción específica entre la cepa Munanta del parásito y las células hospedadoras Vero, que si bien no son de origen humano, se acercan estrechamente en la escala evolutiva.

Desde finales de la década de los 70, se han realizado numerosos estudios que demuestran como *T. cruzi* es un parásito altamente polimórfico desde un punto biológico (Pereira & Hoff 1986), bioquímico (Tybayrenc *et al.* 1986, Dvorak *et al.* 1988), inmunológico (Kirchhoff *et al.* 1984) y genético (Wagner & So 1990), tanto a nivel de cepas, como a nivel de clones. Adicionalmente, dicha variabilidad se asocia con la procedencia geográfica de los aislados del parásito (Milesma *et al.* 1981) y las diferentes presentaciones clíni-

cas de la enfermedad (cardiomegalias y megasíndromes intestinales). Los anteriores hechos realzan por consiguiente la importancia de la disponibilidad de manera eficiente de los diferentes estadios morfológicos de la cepa colombiana de *T. cruzi*, como punto de partida para futuras investigaciones; sobre todo si se tiene en cuenta la dificultad inherente a la obtención de amastigotes y tripomastigotes, estadios del parásito que se encuentran en contacto con el sistema inmune del hospedador, a partir de modelos animales.

De otra parte, es conocido como el tiempo de liberación de los tripomastigotes varía dependiendo de la cepa y clon del parásito usado, así como también de la línea celular (Proepopio & Mortara 1995). Es así como en el presente trabajo, el tiempo de liberación de los tripomastigotes posinfección, fue de siete días, coincidiendo con lo reportado por Gamarro *et al.* (1985), quienes también utilizaron células Vero, a diferencia de los 4 o 5 días reportados para completar el ciclo en células LLC-MK2 (Andrews *et al.* 1987).

En cuanto al número de tripomastigotes extracelulares obtenido, vemos como el nivel de infección determina el número de parásitos recuperados. No obstante, vale la pena anotar que si la proporción de células infectadas es demasiado alta, la monocapa se torna frágil y comienza a desprenderse, antes de que los tripomastigotes aparezcan en el sobrenadante.

*T. cruzi* es capaz de infectar un amplio rango de células *in vitro*, tanto fagocitos profesionales como células de endocardio, musculares, epiteliales e incluso linfocitos (Rivas *et al.* 1993). Sin embargo, existe una preferencia de unión a ciertos tipos celulares, dependiendo de la cepa del parásito implicada. De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo se logró adaptar la cepa Munanta al cultivo únicamente en células Vero (fibroblastos de riñón de mono) (Boschetti *et al.* 1987, Souto-Padron *et al.* 1994) y no en otras líneas ensayadas tales como células epiteliales LLC-MK2, provenientes de riñón del mono Rhesus, células HeLa y monocitos murinos J774, ampliamente usadas como hospederos de

*T. cruzi* (Andrews & Coli 1982, Hall *et al.* 1991). A este respecto, cabe destacar como según los anteriores resultados, más que el origen animal de la línea celular empleada, lo determinante en la interacción parásito-célula hospedadora, parece ser el tipo de célula implicada, ya que a pesar de que ambas células LLC-MK2 y Vero provienen de mono, no fue posible adaptar la cepa Munanta a cultivo en la línea LLC-MK2.

A partir de la observación de Brener (1973), de la existencia de tripomastigotes gruesos y delgados, diferentes autores han estudiado si dichas formas obedecen a estadios antigénicamente diferentes del parásito. Es así como Andrews *et al.* (1987), demuestran como las distintas morfologías gruesas y delgadas, obedecen a estadios secuenciales producto de la transformación de tripomastigotes a amastigotes, estando asociados estos cambios morfológicos con la aparición de antígenos de superficie exclusivos de tripomastigotes o amastigotes. Dentro de este contexto, los resultados obtenidos en este estudio, revelan un predominio de tripomastigotes gruesos sobre los delgados, en las recolecciones de los tres países realizados, coincidiendo por consiguiente, con el preámbulo de la transformación de dichos tripomastigotes a amastigotes. Estos resultados pueden explicarse en base al tiempo de recolección de 48h posinfección, tomado en este trabajo, en contraposición a las pocas horas de recolección posinfección reportadas por Andrews *et al.* (1987), tiempo en el cual predominan las formas delgadas sobre las gruesas.

Finalmente, vale la pena resaltar la importancia de los cultivos tisulares para la obtención de *T. cruzi* ya que (i) generalmente, *T. cruzi* produce una baja parasitemia en animales, (ii) la obtención a partir de modelos animales también se ve limitada por el paso obligatorio de separación de los parásitos de las células sanguíneas del animal, (iii) análisis inmunológicos demuestran cómo los países por ratón afectan el perfil antigénico de los parásitos (Santana, 1995) y (iv) siempre existe la posibilidad de que el parásito exponga anticuerpos derivados del hospedador.

Estos problemas pueden obviarse mediante el cultivo en masa en cultivos tisulares *in vitro*, en los cuales se obtiene un buen número de parásitos en corto tiempo. Siendo la principal limitante de esta última metodología, la habilidad para mantener la monocapa libre de contaminación.

## AGRADECIMIENTOS

A la Licenciada Almudena López del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (Granada, España), por su valiosa colaboración en la manipulación de los cultivos tisulares. A los Drs. Santiago Nicholls y Jairo Oviedo del INS y VECOL (Bogotá, D.C., Colombia) respectivamente, por el suministro de la cepa Munanta de *T. cruzi* y la línea celular Vero. A la sección de Inmunología del Instituto de Inmunología-HSJD (Bogotá, D.C., Colombia), por el apoyo logístico y científico prestado.

## LITERATURA CITADA

ANDREWS, N.W. & COLLI, W. 1982. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.* 29: 264-269.

ANDREWS, N.W., HONG, K., ROBBINS, E.S. & NUSSENZWEIG, V. 1987. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 64: 474-484.

BOSCHETTI, M.A., PIRAS, M.M., HENRIQUEZ, D. & PIRAS, R. 1987. The interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. *Mol. Biochemical. Parasitol.* 24: 175-184.

BRENER, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* 27: 347-382.

DE TITO, E.H. & ARAÚJO, F.G. 1987. Mechanism of cell invasion by *Trypanosoma cruzi* importance of sialidase activity. *Acta Trópica* 44: 273-282.

- DVORAK, J.A., ENGEL, J.C., LEAPMAN, R.D., SWYT, C.R. & PELLA, P.C. 1988. *Trypanosoma cruzi*: elemental composition heterogeneity of cloned stocks. *Mol. Biochem. Parasitol.* **31**: 19-26.
- GAMARRO, F., OSUNA, A., CASTANYS, S. & LÓPEZ, M.I. 1985. Isolation and purification of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* from cultured Vero cells. *Z. Parasitenkd.* **71**: 15-17.
- HALL, B.F., FURTADO, G.C., & JOINER, K.A. 1991. Characterization of host cell-derived membrane proteins of the vacuole surrounding different intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* in J774 cells. *J. Immunol.* **147**: 4313-4321.
- KIRCHHOFF, L.V., ENGEL, J.C., DVORAK, J.A. & SHER, A. 1984. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* differ in their expression of a surface antigen identified by a monoclonal antibody. *Mol. Biochem. Parasitol.* **11**: 81-89.
- MILESMA, A., MAOA, M., CEDILLO, R. & SOUZA, A. 1981. Two radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains cause venezuelan and brasilian forms of Chagas disease. *Lancet* **1**: 1338-1396.
- NOGUEIRA, N., BIANCO, C. & COHN, Z. 1975. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* **142**: 224-229.
- PEREIRA, M.E.A. & HOFF, R. 1986. Heterogeneous distribution of neuraminidase activity in strains and clones of *Trypanosoma cruzi* and its possible association with parasite myotropism. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**: 183-189.
- PROEOPIO, D. & MORTARA, R.A. 1995. The invasion of mamalian cells by two infective stage of *Trypanosoma cruzi* have distinct mechanism that also depend on the host cell cytoeskeleton. En: Resúmenes del VI Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Biología Celular. Oaxtepec- México.
- RIVAS, L.I., CHICHARRO, C. & DÍAZ, P. 1993. Sistemas de unión parásito-célula hospedadora en Trypanosomatidae. En: Rivas, L.I. & M.C. López (ed.). Nuevas tendencias de parasitología molecular. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. 185-216 pp.
- SANTANA, L.A. 1995. Caracterización de la cepa Munanta de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia.
- SOUTO-PADRON, T., ALMEIDA, T.I.C., DE SOUZA, W. & TRAVASSOS, L.R. 1994. Distribution of a-galactosyl-containing epitopes on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote and amastigote forms from infected Vero cells detected by chagasic antibodies. *J. Euk. Microbiol.* **41**: 47-54.
- TANOWITZ, H.B., KIRCHHOFF, L.V., SIMON, D., MORRIS, S.A., WEISS, L.M. & WITTNER, M. 1992. Chagas Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 400-419.
- TYBAYRENC, M., KJELBERG, F. & AYALA, F.J. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 115-119.
- WAGNER, W. & SO, M. 1990. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of multicopy genes. *Infect. Immun.* **58**: 3217-3224.
- WHO (World Health Organization). 1991. In: WHO technical report serie. *Geneva.* (811).
- ZINGALES, B., KATZIN, A.M., ARRUDA, M.V. & COLLI, W. 1985. *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. *Current Top. Microbiol. Immunol.* **117**: 129-152.