ARTÍCULO ORIGINAL

Heterogeneidad en la metaciclologénesis in vitro de clones derivados de una cepa costarricense de Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

ADRIÁN AVENDAÑO*, OLGER CALDERÓN-ARGUEDAS*,
IDALIA VALERIO** y MISAEL CHINCHILLA**

HETEROGENITY IN THE IN VITRO METACYCLOGENESIS OF CLONES DERIVED
FROM A COSTA RICAN STRAIN OF *Trypanosoma cruzi*
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)

*The in vitro metacyclogenesis was evaluated in three clones derived from the Costa Rican TC-4 strain of **Trypanosoma cruzi** as a criterion of biological heterogeneity between clones and their parental strain. The clones were obtained from colonies that resulted from culturing the **T. cruzi** strain in 40% blood agar. These clones were named TC-4 α , TC-4 β , and TC-4 π and were maintained in diphasic 40% blood agar with 3,7% brain hearth infusion as the liquid phase. The metacyclogenesis was induced by incubating epimastigotes in triatomine artificial urine supplemented with proline (TAU + P) at a constant temperature (27°C). The progress in the metacyclogenesis was monitored daily and the ratio of metacyclic trypomastigotes/epimastigotes, the percent of trypomastigotes, and the concentration of metacyclic trypomastigotes (MT/mL) were determined. Variability was evaluated using ANOVA tests for repeated measures (α : 0,05). The indicators of metacyclogenesis showed the highest values between 72 and 96 hours after the beginning of the experiment. In this interval there were significant statistical differences between some of the cellular systems ($p < 0,05$). These observations could suggest that the clonal composition of each strain of **T. cruzi** can determine the infectivity for the vertebrate host.*

Key words: *Trypanosoma cruzi* , trypomastigote, epimastigotemetacyclogenesis, infectivity.

INTRODUCCIÓN

El *Trypanosoma cruzi*, parásito diheteroxeno de reduvídeos y mamíferos, ha sido reconocido por su diversidad en relación con sus características de patogenicidad, histotropismo y ambientes epidemiológicos donde es prevalente, los cuales incluyen relaciones estrechas entre vectores y

reservorios para estos entornos¹.

Con base en lo anterior se ha tratado de sistematizar esta heterogeneidad basándose en perfiles isoenzimáticos y proteicos (zymodemes² y peptidemes³ respectivamente), análisis de restricción del ADN mitocondrial (schysodemes⁴), características inmunológicas⁵ y tipificaciones biológicas (biodemes⁶).

* Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

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

Con base en métodos genético-moleculares que incluyen RAPDs, comparación de secuencias de genes de mini exón y espaciadores ribosomales intergénicos, entre otros, las cepas de *T. cruzi* son categorizadas actualmente en dos linajes denominados Linaje I, que incluye cepas que tienen la tendencia a describir ciclos selváticos y Linaje II, las cuales se asocian con ciclos domiciliarios¹.

A pesar de la diversidad a nivel de cepas, algunos investigadores proponen que dada la estructura clonal de las poblaciones de *T. cruzi*, el comportamiento de los clones constitutivos de las cepas podrían mostrar propiedades biológicas particulares para cada uno de estos clones⁷.

La metaciclologénesis, entendida como el proceso de diferenciación de las formas de epimastigoto a tripomastigoto metacíclico infectante constituye uno de los eventos más importantes en el ciclo biológico de *T. cruzi* ya que permite su propagación en hospedadores vertebrados a partir de los vectores⁸. Por esta razón se decidió analizar la ocurrencia de este proceso en clones derivados de una cepa costarricense de *T. cruzi*, así como en su cepa parental mediante un sistema *in vitro* con el fin de advertir posibles patrones de heterogeneidad en estos sistemas celulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPA DE *T. cruzi* Y CLONES: Se trabajó con la cepa costarricense de *T. cruzi*, denominada TC-4, la cual fue aislada de un triatmino de la especie *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), y se mantiene por pasajes mensuales en medio difásico de Rugai y ratones C₃H en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Se trabajaron tres clones parasitarios, los cuales fueron obtenidos a partir de un sistema de cultivo en medio semisólido de agar con sangre humana al 40%⁹. Los clones fueron denominados arbitrariamente TC-4 α , TC-4 β y TC-4 π .

INDUCCIÓN DE LA METACICLOGÉNESIS: La inducción de la metaciclologénesis fue llevada a cabo siguiendo una metodología descrita previamente¹⁰. Para tal efecto se inocularon 10⁶ epimastigotos de *T. cruzi* los cuales procedían de la fase de crecimiento logarítmico en un sistema de cultivo en medio esencial mínimo (MEM)

con suero fetal bovino (SFB) al 10% en 1,0 mL de orina artificial de triatmino (OAT) (NaCl 190 mM, KCl 17 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, solución amortiguadora de fosfatos 8 mM y pH 6.0) por un período de 2 horas.

Finalizada la incubación se realizó una concentración de los parásitos por medio de un proceso de centrifugación a 10 000 rpm a 4°C para luego ser resuspendidos en OAT suplementado con bicarbonato de sodio 2,5% (V/V) y L-prolina 10 mM (OAT+P). La concentración final fue de 5,0 x 10⁵ parásitos/mL. Dichas suspensiones parasitarias fueron colocadas en una incubadora a temperatura controlada (27°C).

La metaciclologénesis fue evaluada de forma diaria utilizando métodos hemocitométricos convencionales y tinciones con colorante de Giemsa de acuerdo a una metodología propuesta por otros investigadores¹¹. El progreso en la metaciclologénesis fue expresado mediante el cálculo de los siguientes indicadores: radio tripomastigotos/epimastigotos, porcentaje de tripomastigotos metacíclicos y concentración de tripomastigotos metacíclicos (TM/mL).

Todas las observaciones fueron realizadas por triplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: La variabilidad de los indicadores relativos al progreso de la metaciclologénesis fue evaluada mediante análisis de variancia (ANDEVA) para mediciones repetidas¹², utilizando un coeficiente de confiabilidad del 95%. Posteriormente, se realizó una prueba de Tukey para poder estimar las diferencias verdaderamente significativas¹². El coeficiente de confiabilidad para esta prueba fue también del 95%. Para la realización de estas pruebas se utilizó el paquete estadístico Statistica® 6.0.

RESULTADOS

La inducción del proceso de metaciclologénesis fue efectiva tanto en los clones como en la cepa parental (Figura 1). La observación de formas metacíclicas fue francamente manifiesta a las 24 horas a partir del inicio del proceso de incubación de los parásitos en OAT+P, sin embargo, desde este momento la cepa parental mostró un mayor potencial de diferenciación respecto a los clones derivados de la misma (Figura 1). Este potencial

Figura 1. Indicadores de progreso en la metaciclo­gé­ne­sis. a: radio tripomastigotos/epimastigotos, b: porcentaje de tripomastigotos metacíclicos, c: tripomastigotos/mL.

de diferenciación se manifestó en los tres índices utilizados para estimar el progreso en la metaciclo­gé­ne­sis. La mayor diferenciación tuvo lugar entre las 72 y las 96 horas post incubación. En este intervalo, los ANOVA para mediciones repetidas y la subsiguiente prueba de Tukey mostraron diferencias estadísticamente signifi­cativas en lo referente a la razón tripomas­ti­go­tos/epimastigotos ($F_{3,8} = 5,76$, $p < 0,05$) y en el porcentaje de tripomastigotos metacíclicos en varios de los sistemas celulares ($F_{3,8} = 8,09$, $p < 0,05$) (Tabla 1, Figuras 1a, b).

Aun­que la misma tendencia se observó en la con­cen­tra­ción de tripomastigotos metacíclicos (TM/mL), la variabilidades intrínsecas de los sistemas concier­nen­tes a cada clon y cepa parental no permitieron demostrar diferencias estadísticamente signifi­cativas en las mediciones relativas a este indicador (Figura 1c).

Ocho días luego del inicio del período inducción de la metaciclo­gé­ne­sis (168 horas), la con­cen­tra­ción de tripomastigotos metacíclicos fue mínima, tanto en los clones como en la cepa parental.

DISCUSIÓN

La metaciclo­gé­ne­sis, evento que tiene lugar en la ampolla rectal de los insectos vectores, constituye un paso crucial en el ciclo de vida del parásito ya que garantiza su propagación del hospedador invertebrado al hospedador vertebrado. La metaciclo­gé­ne­sis se ha asociado con condiciones de estrés nutricional que promueven la expresión de ciertos genes, entre los cuales figuran el MET I y el MET II, los cuales codifican por proteínas propias de las formas metacíclicas de *T. cruzi*¹³.

Diversos estudios han probado metodologías para inducir el proceso de metaciclo­gé­ne­sis en condiciones artificiales^{10,14-17}. Algunos de estos métodos utilizan sistemas de cultivo químicamente

Tabla 1. Sistemas que mostraron diferencias estadísticamente signifi­cativas en los indicadores de metaciclo­gé­ne­sis de acuerdo a la prueba de Tukey¹²

Indicador	Tiempo de observación	
	72 horas	96 horas
Radio Tripomastigotos/Epimastigotos	TC-4 y TC-4α TC-4 y TC-4β	TC-4 y TC-4α
% de Tripomastigotos metacíclicos	TC-4 y TC-4α TC-4 y TC-4β	TC-4 y TC-4α TC-4 y TC-4β
Tripomastigotos/mm ³	-	-

definidos¹⁰, en tanto que otros han fundamentado su efecto en el suplemento de medios base con extractos orgánicos como homogenizados intestinales de triatominos¹⁷. No obstante, otro estudio se basó en la incubación de epimastigotos de *T. cruzi* en orina artificial de triatomo (OAT), probaron que la L-prolina es uno de los metabolitos responsables en la inducción efectiva del proceso¹⁰.

Utilizando este medio como inductor de la metaciclologénesis se pudo verificar que todos los sistemas celulares estudiados pudieron experimentar el fenómeno de diferenciación donde la cepa parental mostró el mayor potencial de diferenciación (Figura 1). Contreras y colaboradores¹⁰ observaron, con la metodología empleada, que ocho cepas de *T. cruzi* de diferentes orígenes experimentaron el pico de diferenciación entre el tercero y sexto día después de iniciado el proceso de inducción. En el presente modelo los indicadores para verificar el progreso de la metaciclologénesis tuvieron sus valores más elevados entre las 72 y 96 horas que equivalen al tercero y cuarto día. Lo anterior demuestra reproducibilidad en la eficiencia del procedimiento aún cuando las cepas de *T. cruzi* utilizadas sean diferentes. En este mismo intervalo de tiempo tuvo lugar la ocurrencia de diferencias estadísticamente significativas entre varios sistemas celulares (Tabla 1), lo que podría indicar que las metaciclologénesis es una de las propiedades biológicas que pueden mostrar variabilidad entre los clones constitutivos de las cepas de *T. cruzi*.

La heterogeneidad en la constitución clonal de las cepas de *T. cruzi* ha sido demostrada desde principios de los años ochenta^{7,18} y desde entonces se han realizado ensayos que han podido demostrar la implicación biológica de esta heterogeneidad. En este sentido se ha podido visualizar diferencias en características como virulencia y patogenicidad en 2 y 4 clones derivados de los aislamientos hSLU239 y mSLU 142 respectivamente, los cuales fueron aislados de casos clínicos de cardiopatía chagásica y megaesófago¹⁹. Por otro lado, los investigadores de este último estudio pudieron observar un comportamiento diferenciado en lo referente a metaciclologénesis espontánea que mostraban estos clones en un sistema de cultivo *in vitro*²⁰. De forma conexa en otro ensayo se estudió la cinética multiplicativa de los clones de una cepa

salvadoreña de *T. cruzi* en cultivos de macrófagos y se demostró la ocurrencia de heterogeneidad en los sistemas celulares analizados²¹. Por otro lado, Penin y col²² realizaron un estudio donde investigaron características biológicas como parasitemia, morfología, virulencia e histopatología en una cepa boliviana de *T. cruzi* y en tres clones derivados de la misma. Aunque encontraron algunas diferencias en las características, concluyen que las propiedades biológicas más relevantes son compartidas tanto por los clones como por la cepa parental.

Como se pudo observar en el presente estudio, el hecho de que se dé un comportamiento particular en los indicadores de metaciclologénesis relativo a los sistemas celulares estudiados podría explicar las diferencias de infectividad que tienen lugar entre las diferentes cepas de *T. cruzi*, considerando que el comportamiento de una determinada cepa podría estar condicionado por la dominancia de ciertos clones constitutivos, los cuales pueden ser naturalmente seleccionados en su trayecto por el intestino del vector donde se ha demostrado la ocurrencia de presiones selectivas como factores hemolíticos y lectinas⁸.

RESUMEN

La metaciclologénesis *in vitro* fue evaluada en la cepa costarricense de *Trypanosoma cruzi* denominada TC-4 y en tres clones derivados de la misma como un criterio de heterogeneidad biológica entre clones y cepa parental. Los clones fueron obtenidos de colonias, resultado del cultivo de los parásitos en agar sangre al 40%. Estos clones fueron denominados TC-4 α ; TC-4 β y TC-4 π y fueron mantenidos en agar sangre difásico 40% con infusión cerebro-corazón al 3,7% como fase líquida. La metaciclologénesis fue inducida por incubación de los parásitos en orina artificial de triatomo suplementada con L-prolina (OAT+P) a temperatura constante (27°C). El progreso en la metaciclologénesis fue diariamente monitoreado determinando el radio tripomastigotos/epimastigotos, el porcentaje de tripomastigotos metacíclicos y la concentración de tripomastigotos metacíclicos (TM/mL). La variabilidad fue evaluada mediante pruebas de ANDEVA para mediciones repetidas (α : 0,05).

Los indicadores de metaciclologénesis mostraron sus valores máximos entre las 72 y 96 horas después del inicio del experimento, intervalo

donde se observaron diferencias estadísticamente significativas entre algunos de los sistemas celulares ($p < 0,05$). Estas observaciones pueden sugerir que la composición clonal de cada cepa de *T. cruzi* puede determinar la infectividad del parásito para el hospedador vertebrado.

REFERENCIAS

- 1.- MILES M A, FELICIANGELI M D, ROJAS DE ARIAS A. American trypanosomiasis (Chagas's disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* 2003; 326: 1444-8.
- 2.- MILES M A. The epidemiology of South American trypanosomiasis-biochemical and immunological approaches and their relevance to control. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1983; 77: 5-23.
- 3.- TAYLOR A, EDWARDS Y, SMITH V, et al. The polypeptide profiles of strains of *T. cruzi* sub genera *Schyzotrypanum* and *Trypanosoon*, peptideme characterization. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1983; 77: 354-62.
- 4.- MOREL C, CHIARI E, PLESSMAN-CAMARGO E, et al. Strains and clones of *T. cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Aca Sci* 1980; 77: 6810-4.
- 5.- BONGERTZ V, DVORAK J A. *T. cruzi*: antigenic analysis of cloned stocks. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 716-22.
- 6.- ANDRADE S, MAGALHAES J B. Biodemes and zymodemes of *T. cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30: 27-35.
- 7.- ENGEL J C, DVORAK J A, SEGURA E L, CRANE M S J. *T. cruzi*: Biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid médium. *J Protozool* 1982; 29: 555-60.
- 8.- GARCÍA E, AZAMBUJA P. Development and interactions of *T. cruzi* within insect vector. *Parasitol Today* 1991; 7: 240-4.
- 9.- TANURI J, DE ANDRADE P P, DE ALMEIDA D F. *T. cruzi*: isolation of cloned strains and characterization of their infectivity. *J Parasitol* 1985; 71: 397-402.
- 10.- CONTRERAS V T, SALLES J M, THOMAS N, et al. *In vitro* differentiation of *T. cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 16: 315-27.
- 11.- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A, CARVALHO-MOREIRA C J. *In vivo* differentiation of *T. cruzi*. 1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Mem Inst Osw Cruz* 1994; 89: 603-18.
- 12.- DANIEL W W. Análisis de la variancia. En: Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4º Edic. Limusa Wiley. México. 2004. 755 pp.
- 13.- RODRÍGUEZ-AVILA A, DALLAGIOVANNA B, YAMADA-OGATTA S F, et al. Stage-specific expression during *T. cruzi* metacyclogenesis. *Genetic Mol Res* 2003; 2: 159-68.
- 14.- DUSANIC D G. *In vitro* production of metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi*. *J Parasitol* 1980; 66: 1046-9.
- 15.- SULLIVAN J J. Metacyclogenesis of *T. cruzi* *in vitro*: A simplified procedure. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1982; 76: 300-3.
- 16.- CASTELLANI O, RIBEIRO L V, FERNÁNDEZ J F. Differentiation of *T. cruzi* in culture. *J Protozool* 1968; 14: 447-51.
- 17.- ISOLA E L D, LAMMEL E M, KATZIN V J, GONZÁLEZ-CAPPA S M. Influence of organ extracts of *T. infestans* on differentiation of *T. cruzi*. *J Parasitol* 1981; 67: 53-8.
- 18.- TIBAYRENC M, AYALA F J. *T. cruzi* populations: more clonal than sexual. *Parasitol Today* 1987; 7: 228-92.
- 19.- LAURIA-PIRES L, TEIXEIRA A R L. Virulence and pathogenicity associated with diversity of *T. cruzi* stocks and clones derived from Chagas's disease patients. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 304-10.
- 20.- LAURIA-PIRES L, SANTANA J M, TAVARES E S, TEIXEIRA A R L. 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.
- 21.- CALDERÓN-ARGUEDAS O, TROYO A, VALERIO I, CHINCHILLA M. Heterogeneidad clonal en epimastigotos de una cepa centroamericana de *T. cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitol Latinoam* 2002; 57: 40-5.
- 22.- PENIN P, GAMALLO C, DE DIEGO JA. Biological comparison between three clones of *T. cruzi* and the strain of origin (Bolivia) with reference to clonal evolution studies. *Mem Inst Osw Cruz* 1996; 91: 285-91.

Agradecimientos: Agradecemos a la Dra. Adriana Troyo-Rodríguez del Departamento de Epidemiología y Salud Pública, Universidad de Miami, FL, USA, por sus críticas y sugerencias a este manuscrito y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por su apoyo financiero al proyecto VI 803-A4-017.