

## Cambios metabólicos durante la epimastigogénesis *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*

Marvin Querales<sup>1,2</sup>, Jesús Torres<sup>1</sup>, Diana Graterol<sup>1,3</sup>, Rosa Arteaga<sup>1</sup>, María Navarro<sup>1</sup>, Víctor Contreras<sup>1</sup>, Willmer Pineda<sup>1</sup>, Ana Rita De Lima<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Protozoología. Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP). Universidad de Carabobo. Valencia Venezuela

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica. Escuela Ciencias Biomédicas y Tecnológicas. Universidad de Carabobo. Valencia Venezuela

<sup>3</sup> Departamento de Morfosisopatología. Escuela de Bioanálisis. Facultad Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia Venezuela.

**Correspondencia:** Ana Rita De Lima.

**E mail:** delima.anarita@gmail.com

**Recibido:** Abril 2013 **Aprobado:** Septiembre 2013

### RESUMEN

La epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* es la transformación del tripomastigota sanguícola en epimastigota que ocurre en la porción anterior del tracto intestinal del insecto vector. Se ha reportado la activación de cisteín proteasas durante la epimastigogénesis *in vitro* en condiciones axénicas, sugiriendo la utilización de aminoácidos como fuente de carbono para la obtención de energía. El objetivo del presente trabajo fue estudiar a través de indicadores los cambios metabólicos producidos durante la diferenciación tripomastigota-epimastigota. Se partió de un 100% de tripomastigotas sobrenadantes de células Vero, incubados en medio LITB a 27°C en condiciones de alta (epimastigogénesis horizontal) y baja (epimastigogénesis vertical) tensión de oxígeno. Se realizó conteo de parásitos (Cámara de Neubauer) y recuento diferencial (Giemsa) a diferentes tiempos de incubación (0, 1, 2, 4, 6, 8, 11 y 12 días). A cada tiempo se determinó en los sobrenadantes del medio de cultivo las concentraciones de glucosa y amoníaco, así como los valores de pH. Los resultados mostraron que: 1) Independientemente de la tensión de oxígeno se evidenció formas en diferenciación y amastigotas durante el proceso, siendo la aparición de epimastigotas más tardía en alta tensión de oxígeno; 2) El incremento

poblacional fue significativamente mayor en condiciones de alta tensión de oxígeno, registrándose alta mortalidad de amastigotas durante los primeros días de incubación en la epimastigogénesis vertical; 3) El consumo de glucosa fue concomitante con la aparición de epimastigotas en ambas condiciones, siendo mayor en alta tensión de oxígeno; 4) No se registró liberación de amoníaco en ninguno de los casos estudiados; 5) Los valores de pH fueron similares hasta el sexto día en ambas condiciones, evidenciándose una acidificación gradual del medio de cultivo en alta tensión de oxígeno. Todo parece sugerir que durante la epimastigogénesis de *T. cruzi*, los parásitos involucrados en los procesos de diferenciación no muestran activación de las diferentes rutas metabólicas.

**Palabras claves:** *Trypanosoma cruzi*, metabolismo, epimastigogénesis.

### ABSTRACT

#### Metabolic changes during *in vitro* *Trypanosoma cruzi* epimastigogenesis

The epimastigogenesis of *Trypanosoma cruzi* is the transformation from bloodstream trypomastigote to epimastigote that occurs in the anterior portion of the intestinal tract of the insect vector. It has been reported cysteine proteases activation during axenic epimastigogenesis *in vitro*, suggesting the use of amino acids as a carbon source for the production of energy. The aim of this work was to study through indicators metabolic changes produced during the trypomastigote-epimastigote differentiation. We started with a 100% trypomastigotes derived from Vero cell supernatants, incubated in LITB medium at 27°C under high (horizontal epimastigogenesis) and low (vertical epimastigogenesis) oxygen tension. We estimated parasites number (Neubauer chamber) and differential morphology (Giemsa) at different incubation times (0, 1, 2, 4, 6, 8, 11 and 12 days). Each time was determined in the supernatants of the culture medium glucose and ammonia concentrations as well as the pH values. The results showed that: 1) Regardless of the oxygen tension it was evidenced differentiation forms and amastigote during the process, with the later occurrence of epimastigotes in high oxygen tension; 2) Population growth was significantly greater in high oxygen tension, registering high mortality of amastigotes during the firsts incubation days in the vertical epimastigogenesis; 3) Glucose consumption was concomitant with the appearance of epimastigotes in

both conditions, being higher in high oxygen tension; 4) There was no ammonia release in any of the cases studied; 5) The pH values were similar to the sixth day in both conditions, showing gradual acidification of the culture medium at high oxygen tension. Everything seems to suggest that during the epimastigogenesis of *T. cruzi* parasites involved in differentiation processes show no activation of different metabolic pathways.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, metabolism, epimastigogenesis.

## INTRODUCCIÓN

Un evento de fundamental importancia durante el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* es la transformación de tripomastigotas sanguícolas en epimastigotas (epimastigogénesis), que ocurre en la porción anterior del tracto intestinal del insecto vector, asegurando la propagación del parásito en la naturaleza. La mayoría de los estudios que abordan este fenómeno han sido realizados *in vivo* en el insecto vector, en los cuales se ha determinado múltiples factores en el establecimiento de la infección como la especie de parásito involucrada (1), así como otros dependientes del vector como el factor lítico del estómago (2,3), lectinas (4,5) fragmentos de hemoglobina (6) inanición del insecto y liberación de hormonas por parte del sistema endocrino del insecto (7). En relación a los eventos morfológicos que ocurre durante la epimastigogénesis, se plantea que el insecto ingiere una población pleomórfica constituida de formas finas o gruesas de tripomastigotas, donde las primeras se transforman en amastigotas y que es a partir de éstos últimos que ocurre la diferenciación hacia epimastigotas (8). Por otro lado, se propone que la mayoría de la población de tripomastigotas sanguícolas ingeridos por el insecto sufre una serie de cambios morfológicos antes de llegar a epimastigotas, mientras que el resto se transforma directamente en esa forma (9).

Estudios de epimastigogénesis realizados *in vivo* en nuestro laboratorio utilizando ninfas de *Rhodnius prolixus* indican cambios en la cinética de diferenciación en función del aislado de *T. cruzi* empleado (1). No obstante, un hecho común en todas las cepas utilizadas es la aparición de formas redondeadas compatibles con amastigotas. Ensayos de epimastigogénesis *in vitro* en diferentes medios de cultivo axénico indican que durante este proceso ocurre la aparición de formas redondeadas sin flagelo libre con kinetoplasto en barra (10, 11), las cuales posteriormente fueron identificadas como amastigotas (12).

Múltiples estudios revelan que los eventos de diferenciación de *Trypanosoma cruzi* están asociados a condiciones de estrés representadas por las condiciones microambientales (13). Esto genera cambios en la utilización de fuentes de energía en función del estadio del parásito y su disponibilidad en el medio. Mientras que los epimastigotas poseen un metabolismo eminentemente glicolítico (14-16), se admite que los tripomastigotas poseen un metabolismo fundamentalmente proteico (17,18). En el caso de los amastigotas, se describe un metabolismo glicolítico y en ellos no se ha detectado la presencia tanto de enzimas involucradas en el ciclo de Krebs como en la degradación oxidativa de aminoácidos (19). Ensayos realizados *in vitro* muestran que la depleción de glucosa en el tracto intestinal posterior del insecto vector conduce a una activación del metabolismo proteico del epimastigota durante la transformación hacia tripomastigota metacíclico, con liberación de cantidades importantes de amoníaco (20). Durante la epimastigogénesis *in vitro* se ha demostrado la activación diferencial de proteasas durante este proceso (10), sugiriendo cambios en la utilización de nutrientes asociados al proceso de diferenciación morfológica. En el presente trabajo, se estudió a través de indicadores, los

cambios metabólicos producidos durante la epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio LITB.

## MATERIALES Y METODOS

**Parásitos y Estadios.** Se utilizó el clon EPm6 de procedencia humana y clonado por dilución limitante y plaqueo en ratones albinos. Estos parásitos han sido mantenidos mediante pases trimestrales alternos entre triatomino (*Rhodnius prolixus*) y ratón (Balb/c) (21).

Los estadios utilizados fueron: tripomastigotas sobrenadantes de cultivos celulares (equivalentes a tripomastigotas tipo hemático) así como epimastigotas procedentes de cultivos axénicos, en medio líquido LITB (Liver Infusión Triptose) (22).

**Obtención de Tripomastigotas tipo hemático provenientes de cultivos celulares.** Para la obtención de los tripomastigotas sobrenadantes de células se partió de tripomastigotas metacíclicos purificados inducidos *in vitro* (23), con los cuales se infectaron monocapas de células Vero en una relación de infección de 10 parásitos/célula en frascos de cultivo (Falcon). Luego de un contacto durante 8 horas a 37°C, los recipientes fueron lavados con Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino. Se mantuvo las células infectadas durante 3 días a 37°C y posteriormente se realizó cambio del medio de cultivo, para un tiempo de incubación adicional de 2 días bajo las mismas condiciones. Al quinto día de infección, se retiró el sobrenadante de los medios de cultivo y se procedió a la concentración de los tripomastigotas a 1500 xg durante 15 minutos a 4°C (Centrífuga IEC, B22M), los cuales fueron resuspendidos en medio LITB (22).

**Epimastigogénesis en medio LITB.** Se partió de tripomastigotas sobrenadantes de células Vero, los cuales fueron inoculados en medio LITB. Con la finalidad de determinar el efecto

de la tensión de oxígeno sobre la cinética de diferenciación, se realizó la epimastigogénesis en dos tipos de envases, con el propósito de obtener diferentes alturas del medio de cultivo. Se ensayaron dos condiciones extremas, empleando una altura del medio de 3 mm para alta tensión de oxígeno (epimastigogénesis horizontal) y una altura de 87 mm para baja tensión de oxígeno (epimastigogénesis vertical). En ambos casos se partió de un inóculo de  $3,35 \times 10^6$  tripomastigotas/mL, los cuales fueron incubados a 27°C en frascos Falcon de 25 cm<sup>3</sup> con 3 mL de medio LITB (epimastigogénesis horizontal) y tubos cónicos estériles de 15 mL con un volumen final de 10 mL de medio de cultivo (epimastigogénesis vertical), procediéndose a la obtención de alícuotas del cultivo a las 24 horas, 2, 4, 6, 8, 11 y 12 días.

Los ensayos se realizaron por triplicado. Como condiciones controles se emplearon tripomastigotas sobrenadantes de células Vero (0 horas de incubación en medio LITB) y epimastigotas de 6 días de cultivo crecidos en fioles de 125 mL conteniendo 20 mL de medio LITB (22). Con las alícuotas obtenidas a diferentes días de la cinética de transformación se realizó contaje diferencial de parásitos en cámara de Neubauer.

Las alícuotas se sedimentaron, recolectando los sobrenadantes para la determinación de las concentraciones de glucosa y amoníaco, así como determinación de los valores de pH. Los sedimentos fueron utilizados para posterior recuento diferencial de láminas coloreadas con Giemsa.

Para evidenciar el aumento en el número de parásitos se estimó el incremento poblacional (Nt/No) el cual es un índice que se calcula dividiendo el número de parásitos/mL el día del contaje (Nt) entre el número de parásitos/mL al inicio del ensayo a tiempo 0 (No).

### **Análisis de las transformaciones morfológicas mediante microscopía óptica.**

Se realizaron láminas coloreadas de los parásitos obtenidos a diferentes días del proceso de transformación (0, 1, 2, 4, 6, 8, 11 y 12), así como de tripomastigotas sobrenadantes de células con 0 horas de incubación y epimastigotas procedentes de final de fase exponencial (6 días) en medio LITB utilizados como controles. Para ello, los sedimentos de las diferentes alícuotas fueron lavados en buffer salino fosfato (PBS) 0,15 M, pH 7.2 y fijados con formaldehído al 2% en solución salina. La fijación de los parásitos en la lámina se realizó con metanol al 100%. Las láminas fueron teñidas con Giemsa, visualizadas con un aumento de 1000X en un microscopio óptico (Nikon, Eclipse 400) y fotografiados con una cámara digital (Nikon, Coolpix 4500). Se contaron al menos 300 parásitos por cada lámina y tiempo de incubación.

### **Determinación de las concentraciones de glucosa, amoníaco y valores de pH.**

A los sobrenadantes de las alícuotas obtenidas a los diferentes días de la cinética de transformación se les determinó la concentración de glucosa mediante método enzimático (glucosa oxidasa) y la concentración de amoníaco mediante la reacción de Berthelot (24). En ambos casos se calculó la concentración de las diferentes muestras calculadas en base a curvas de calibración empleando patrones con diferentes concentraciones de glucosa y amoníaco, respectivamente. Los valores de pH se estimaron mediante medición del sobrenadante empleando un pHmetro (Digimed, DM-23).

### **Curva de crecimiento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* en condiciones de alta y baja tensión de oxígeno.**

Para determinar el efecto de la tensión de oxígeno sobre el incremento poblacional, consumo de glucosa y liberación de amoníaco de epimastigotas en

medio LITB, se decidió realizar una curva de crecimiento de epimastigotas simulando las mismas condiciones de tensión de oxígeno empleadas durante la cinética de diferenciación de tripomastigotas hacia epimastigotas. Para ello, se partió de un inóculo de  $2 \times 10^6$  parásitos/mL en medio LITB a 27°C, iniciándose los cultivos de cada condición por triplicado. Se realizó conteo diferencial de parásitos en cámara de Neubauer los días 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22 y 26.

Con el propósito de evidenciar los cambios metabólicos durante ambas curvas de crecimiento (alto y bajo tenor de oxígeno) se determinó la concentración de glucosa y amoníaco en los sobrenadantes del medio de cultivo a cada tiempo de incubación, utilizando la misma metodología anteriormente descrita.

**Análisis de los datos.** En vista de que todos los ensayos se realizaron por triplicado en cada tiempo de incubación, se representaron los datos en función del promedio  $\pm$  la desviación estándar de los resultados obtenidos. Con el propósito de establecer si existían diferencias estadísticamente significativas, se empleó la prueba de t de Student, con un intervalo de confianza del 95%, estimándose como significativo un valor de  $P \leq 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Análisis de los cambios morfológicos durante la epimastigogénesis *invitro* de *Trypanosoma cruzi* en medio LITB:**

Habiéndose establecido previamente que la tensión de oxígeno afecta las principales rutas metabólicas en la células eucariotas, se procedió a evaluar la transformación de tripomastigotas sobrenadantes de células hacia epimastigotas (epimastigogénesis) de *Trypanosoma cruzi* en medio LITB en dos condiciones: a) con alta tensión de oxígeno (epimastigogénesis horizontal) y b) en

presencia de baja tensión de oxígeno (epimastigogénesis vertical).

La Tabla 1 muestra una comparación de los resultados obtenidos durante la epimastigogénesis horizontal y vertical en medio LITB a 27°C. Se partió de un inóculo inicial de  $3,35 \times 10^6$  parásitos/mL constituidos por un 100% de tripomastigotas sobrenadantes de células Vero (día 0), caracterizados por poseer forma alargada, kinetoplasto redondo y muy próximo a la extremidad posterior (Figura 1, panel A). A las 24 horas de incubación se observó una disminución en el número total de parásitos. El recuento diferencial efectuado a partir de láminas coloreadas con Giemsa evidenció que el porcentaje de tripomastigotas disminuyó drásticamente a un 5 y 7% en condiciones de alta y baja condición de oxígeno, respectivamente. Esta caída es a expensas de un aumento de formas en diferenciación, los cuales se caracterizaron por presentar un acortamiento del flagelo, cuerpo redondeado y kinetoplasto redondo (Figura 1, panel B, señalado con punta de flecha). Se puede observar que a partir del segundo día de incubación, existe diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ) en el incremento poblacional (Nt/No), siendo claramente mayor en la epimastigogénesis horizontal y llegando a alcanzar hasta cuatro veces más la población de parásitos totales que en la epimastigogénesis vertical. En el recuento diferencial de morfologías del parásito, no se registraron cambios entre ambas cinéticas hasta el día 4 de incubación, con un predominio de formas en diferenciación los días 1 y 2, con un porcentaje muy bajo de epimastigotas. En el cuarto día desaparecen las formas en diferenciación y hay un porcentaje significativo de formas ovoides con ausencia de flagelo libre y kinetoplasto en barra compatibles con el estadio amastigota (Figura 1, panel C), así como un incremento significativo en la

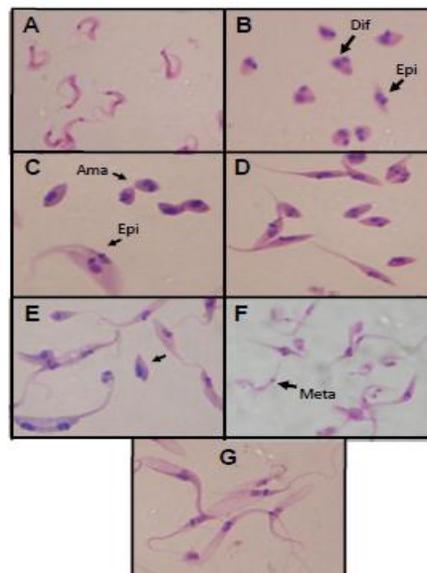
población de epimastigotas. A partir del sexto día se pueden apreciar diferencias más notorias, observándose que los amastigotas se diferencian más rápidamente hacia epimastigotas en condiciones de baja tensión de oxígeno (91% vs 13%), así como una caída significativa en el porcentaje de amastigotas. A partir del octavo día se registró un aumento significativo del índice poblacional en condiciones de alta tensión de oxígeno, coincidiendo con un incremento importante en el porcentaje de epimastigotas (42%), que se caracterizaron por presentar forma alargada, kinetoplasto en barra y de ubicación anterior próximo al núcleo (Figura 1, panel D, señalado con punta de flecha). No obstante, a pesar de registrarse un 61% de epimastigotas en condiciones de baja tensión de oxígeno, sólo se registró un ligero incremento poblacional y la aparición de un 29% de formas en diferenciación (Figura 1, panel E). Cabe destacar que a partir del día 8 de incubación se evidenció un 7% de formas inmóviles en la epimastigogénesis vertical, llegando a alcanzar un 19% para el día 12 (resultados no mostrados). Llama la atención la aparición de una nueva población de formas en diferenciación a partir del día 11 en ambas cinéticas, así como presencia de tripomastigotas metacíclicos en condiciones de alta tensión de oxígeno. Estos últimos comparten características morfológicas con los tripomastigotas sobrenadantes de células Vero, con la diferencia de presentar una estructura más fina y delgada (Figura 1, panel F, señalado con punta de flecha).

Es de hacer notar que los epimastigotas obtenidos durante ambas cinéticas de transformación mostraron morfología comparable a sus homólogos crecidos durante seis días en medio LITB, utilizados como control en los diferentes ensayos (Figura 1, panel G).

**Tabla 1.** Distribución porcentual de formas estructurales de *Trypanosoma cruzi* durante la incubación a diferentes tiempos de tripomastigotas sobrenadantes de células en alta y baja tensión de oxígeno en medio LITB a 27 °C.

Día	Nt/No <sup>(1)</sup>		Recuento Diferencial (%) <sup>(2)</sup>									
	Alta	Baja	Tripomastigota		Diferenciación		Amastigota		Epimastigota		Metacíclico	
			Alta	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja
0	-	-	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0,87	0,78	5 ± 1,7	7 ± 2,6	92 ± 1,0	92 ± 3,1	0	0	3 ± 1,2	1 ± 1,2	0	0
2	1,19	0,41*	1 ± 1,0	2 ± 2,9	97 ± 1,0	96 ± 3,2	0	0	2 ± 1,7	2 ± 4,1	0	0
4	3,43	0,41*	0	0	0	0	88 ± 4,6	73 ± 11,1	12 ± 4,6	27 ± 11,1	0	0
6	7,46	0,64*	0	0	0	0	87 ± 2,9	9 ± 2,4	13 ± 2,9	91 ± 2,4*	0	0
8	12,39	3,54*	0	0	0	29 ± 3,5	58 ± 3,1	10 ± 6,7	42 ± 3,1	61 ± 6,1	0	0
11	26,92	8,66*	0	0	26 ± 4,7	21 ± 7,6	30 ± 1,6	14 ± 1,7	38 ± 4,4	65 ± 6,7	6 ± 1,2	0*
12	35,27	8,41*	0	0	25 ± 1,6	15 ± 5,9	14 ± 1,6	8 ± 3,5	39 ± 3,5	77 ± 8,7	20 ± 2,2	0*

<sup>(1)</sup> Incremento poblacional. Nt indica contaje de parásitos a tiempo t y No indica el número de parásitos al inicio del ensayo (día 0). <sup>(2)</sup> Se realizó mediante láminas coloreadas con Giemsa. Los valores representan la media ± la desviación estándar de ensayos realizados por triplicado. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto a alta tensión de oxígeno tomando en cuenta el mismo día de incubación.

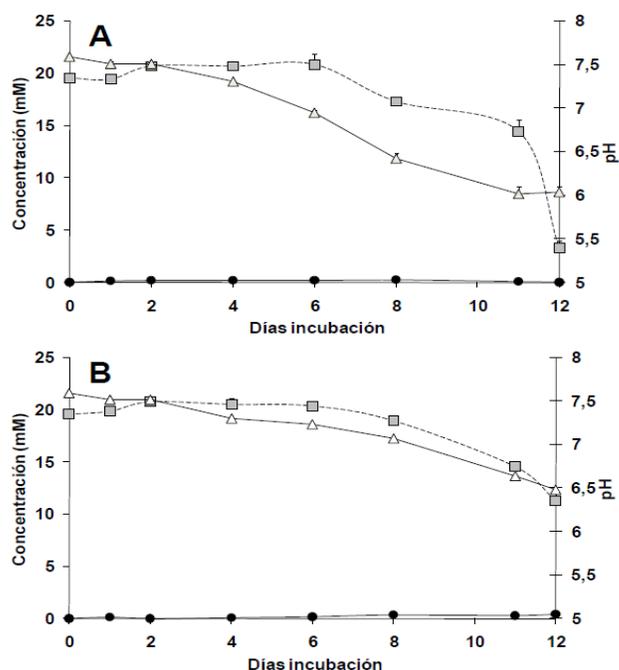


**Figura 1.** Cambios morfológicos durante la epimastigogénesis *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* en medio LITB. Tripomastigotas sobrenadantes de células fueron incubados durante 0 horas (panel A), 24 horas (panel B), 4 días (panel C), 8 días (paneles D y E) y 11 días (panel F). El panel G corresponde a epimastigotas controles crecidos durante 6 días en medio LITB. Dif=formas en diferenciación; Epi: Epimastigotas; Ama: Amastigotas; Meta: tripomastigotas metacíclicos (Aumento 1000X).

**Asociación de los parámetros estudiados (glucosa, amoníaco y pH) durante la epimastigogénesis *invitro* de *Trypanosoma cruzi*.** Con el fin de poder obtener una aproximación del estatus metabólico durante la epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi*, se procedió a hacer una asociación de los indicadores estudiados: glucosa, amoníaco y valores de pH en cada condición.

El análisis comparativo del consumo de glucosa y liberación de amoníaco durante la epimastigogénesis horizontal (Figura 2A) y vertical (Figura 2B) en medio LITB no mostraron cambios en sus concentraciones en ambas condiciones experimentales hasta el día 11, detectándose diferencias estadísticamente significativas al día 12, donde el consumo de glucosa fue más acentuado en la condición de alto tenor de oxígeno (comparar Figuras 2A y 2B) y en donde los niveles de amoníaco fueron prácticamente indetectables en ambos casos, llegando a alcanzar un valor máximo de 0,44 mM en el día 12 durante la epimastigogénesis vertical (Figura 2B).

La variación de pH durante los dos tipos de epimastigogénesis mostró que los valores fueron muy similares en ambas condiciones hasta el cuarto día de incubación, registrándose diferencias estadísticamente significativas a partir del día 6 en donde se observó una disminución más acentuada en la epimastigogénesis horizontal (Figura 2A).



**Figura 2.** Cambios en la concentración de glucosa (■), amoníaco (●) y valores de pH (△) durante la epimastigogénesis en condiciones de alta (Panel A) y baja tensión de oxígeno (Panel B) de *Trypanosoma cruzi* en medio LITB a 27°C. La escala de la derecha corresponde a los valores de pH. Los puntos representan el promedio más o menos la desviación estándar de los ensayos realizados por triplicado.

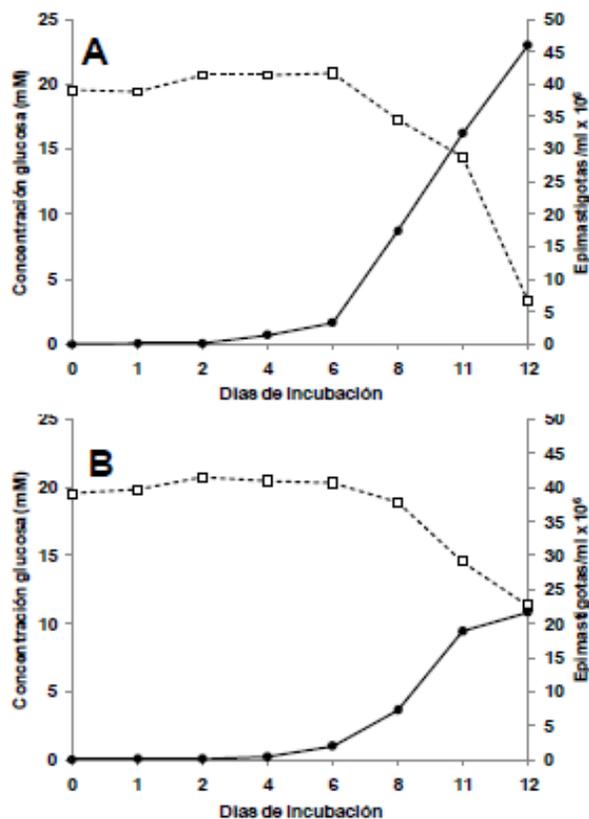
**Asociación entre el número absoluto de epimastigotas, consumo de glucosa y liberación de amoníaco durante la epimastigogénesis *invitro* de *Trypanosoma cruzi*.** Se ha establecido que el consumo de glucosa depende de varios factores, entre ellos la tensión de oxígeno y el número de parásitos totales. Esto nos hace pensar que aún empleando un mismo inóculo de partida y medio de cultivo, existen diferencias en el comportamiento metabólico de los parásitos en condiciones de alto y bajo tenor de oxígeno.

Al hacer la comparación entre el incremento poblacional ( $N_t/N_0$ ) de la epimastigogénesis horizontal y vertical (Tabla 1), se evidencia que el número total de parásitos es estadísticamente diferente, razón por la cual con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, se procedió a hacer gráficos que contemplaran el número absoluto de epimastigotas, así como las concentraciones de glucosa y amoníaco durante los diferentes tiempos de la cinética de transformación en ambas condiciones.

En la Figura 3A se muestran los parámetros correspondientes a la epimastigogénesis horizontal en donde se evidencia que en el día 8 de la cinética se alcanzó un pico máximo en el porcentaje de epimastigotas (Tabla 1). No obstante, a pesar de que este porcentaje fue similar hasta el día 12, existe un incremento progresivo en el conteo de epimastigotas que se explica en base al incremento poblacional.

Este aumento significativo de epimastigotas a partir del día 8 coincide con la disminución progresiva de las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo (Figura 2A), sin detectarse liberación significativa de amoníaco.

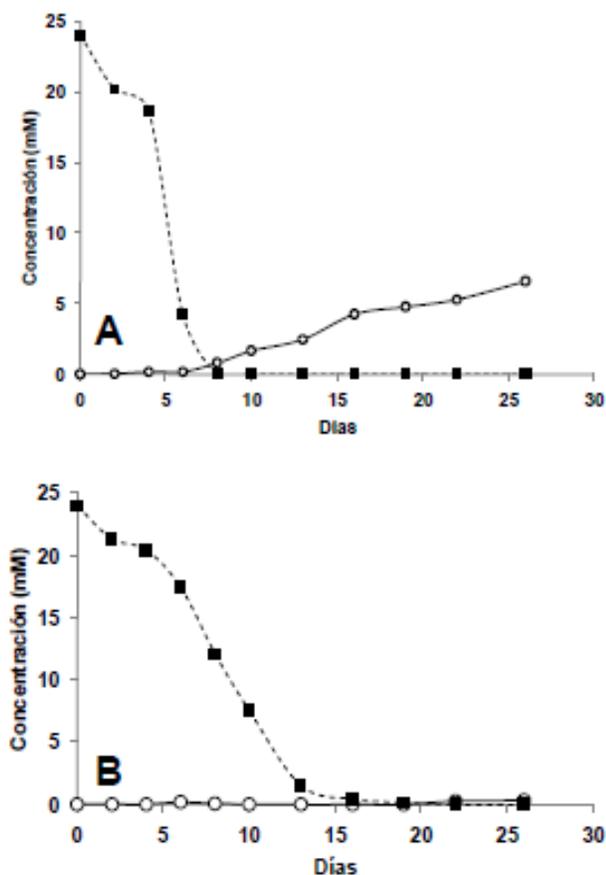
Cuando se graficaron estos mismos parámetros utilizando los resultados obtenidos durante la epimastigogénesis vertical (Figura 3B), se observó un mayor porcentaje de epimastigotas en el día 6 de la cinética (Tabla 1), pero no obstante, dado el poco incremento poblacional registrado, el número absoluto de este estadio es menor, alcanzándose prácticamente la mitad de la reportada para la epimastigogénesis horizontal en el día 12 de incubación. Nuevamente, este incremento progresivo en el número absoluto de epimastigotas coincidió con el agotamiento de la glucosa del medio de cultivo, pero a un ritmo mucho más lento.



**Figura 3.** Correlación entre el número absoluto de epimastigotas (●) y las concentraciones de glucosa (□) durante la epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio LITB en condiciones de alta (Panel A) y baja (Panel B) tensión de oxígeno. La escala de la derecha corresponde al número de epimastigotas/mL.

**Determinación del consumo de glucosa y liberación de amoníaco durante la curva de crecimiento de epimastigotas en medio LITB en condiciones de alta y baja tensión de oxígeno.** Habiéndose demostrado y publicado que durante la curva de crecimiento de epimastigotas se incrementa significativamente la producción de amoníaco una vez agotados los niveles de glucosa del medio LITB (20), se quiso evaluar su producción durante la curva de crecimiento de epimastigotas simulando las mismas condiciones de alta y baja tensión de oxígeno empleadas en este estudio.

En alta tensión de oxígeno se evidenció una fase exponencial que se extendió hasta el día 10, seguida de una fase estacionaria típica hasta el día 26, iniciándose la fase de mortalidad (resultados no mostrados). Cuando se analizó la concentración de glucosa durante la curva de crecimiento (Figura 4A), se evidenció que ésta se agotó completamente al octavo día, concomitantemente con un incremento significativo en la liberación de amoníaco al medio de cultivo, el cual se incrementó progresivamente hasta el día 26.



**Figura 4.** Cambios en la concentración de glucosa (■) y amoníaco (○) durante la curva de crecimiento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* en medio LITB a 27°C en presencia de alta (Panel A) y baja (Panel B) tensión de oxígeno. Los puntos representan el promedio de los ensayos realizados por triplicado.

El análisis de la curva de crecimiento en condiciones de baja tensión de oxígeno reveló la existencia de una fase exponencial en dos etapas: una hasta el día cuatro, y luego un nuevo incremento hasta el día 8. No obstante, no se evidenció una fase estacionaria típica y se registró una caída progresiva en el número de parásitos totales a partir del día 10 que culminó con un 100% de mortalidad al final de la curva (resultados no mostrados). El análisis de la concentración de glucosa en esta condición evidenció una disminución en la velocidad del consumo de la misma, agotándose completamente el día 19 (Figura 4B). Sin embargo, no se evidenció la liberación de amoníaco al medio de cultivo, aún cuando para dicho momento se contaba con una población de  $1,77 \times 10^6$  parásitos/mL.

## DISCUSIÓN

Previamente fue demostrado que durante la epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio LITB cursa con un incremento en la actividad de cisteín proteasas, las cuales se intensifican en forma progresiva a partir del cuarto día de incubación, alcanzando valores máximos al día 12 (10). Con el propósito de determinar si este incremento de la actividad proteolítica pudiera estar asociado al agotamiento de nutrientes del medio de cultivo, en el presente trabajo se estudiaron a través de indicadores los cambios metabólicos durante la epimastigogénesis del parásito en medio LITB. En vista que el oxígeno influye de manera significativa en las rutas metabólicas de las células eucariotas, se decidió realizar los ensayos en presencia de alta y baja tensión de oxígeno.

En ambos casos a las 24 horas de incubación se registró una disminución en el número de parásitos totales (Tabla 1). Esto pudiera obedecer a la lisis de los mismos, por cuanto no se registró la aparición de formas inmóviles durante el recuento diferencial en fresco. Esto

podiera obedecer a dos razones: a) cambio en la composición del medio de cultivo de medio MEM a LITB; y b) disminución de la temperatura de 37 a 28°C. Esta situación coincide con resultados nuestros durante la epimastigogénesis *in vivo* en la porción anterior del tracto intestinal de ninfas de *Rhodnius prolixus* (1).

El análisis del recuento diferencial a través de láminas coloreadas con Giemsa mostró un comportamiento similar entre la epimastigogénesis horizontal y vertical hasta el segundo día de la cinética (Tabla 1), caracterizado por una caída significativa en el porcentaje de tripomastigotas. De éstos, un 92% se convirtieron en formas en diferenciación caracterizadas por poseer forma redondeada con flagelo muy corto y kinetoplasto redondo, previamente identificados como formas regresivas (25), y en donde sólo un muy pequeño porcentaje se transformaron directamente en epimastigotas. Esto concuerda con resultados obtenidos durante la epimastigogénesis *in vivo* en el vector, donde se reporta que sólo un porcentaje muy pequeño de tripomastigotas evolucionan directamente hacia epimastigotas (9). Por otra parte, estudios realizados *in vivo* en nuestro laboratorio mostraron similar comportamiento con un porcentaje que varía según la cepa de *T. cruzi* empleada (1). A partir del cuarto día se evidenció que de estas formas en diferenciación, algunas se convirtieron directamente a epimastigotas, mientras que la mayoría se transformaron en parásitos con morfología redondeada sin flagelo libre, coincidiendo con resultados previos en nuestro laboratorio empleando otros tipos de medios de cultivo (10, 11). En ensayos de epimastigogénesis *in vitro* en medio ML15HA realizados por nuestro grupo de trabajo, se pudo comprobar que estas formas redondeadas sin flagelo libre presentan

resistencia a la lisis por el complemento y expresan antígenos específicos de amastigotas, sugiriendo que efectivamente corresponden a este estadio del parásito (12).

Todo parece indicar que el cambio de temperatura es un factor disparador para la transformación del tripomastigota sobrenadante de célula en las denominadas formas en diferenciación. No habiéndose registrado consumo de glucosa, liberación de amoníaco ni cambios de pH del medio en ambas condiciones de trabajo, todo parece indicar que las formas en diferenciación representan morfologías de adaptación al medio de cultivo. Aún cuando la Tabla 1 indica porcentajes similares de formas en diferenciación en ambas condiciones, la caída en el número de parásitos totales (Nt/No) en condiciones de baja tensión de oxígeno nos indica que estos parásitos parecen ser más sensibles a los bajos niveles de oxígeno presentes en la epimastigogénesis vertical. Estas formas de transición del parásito se transforman mayoritariamente en amastigotas, y sólo un porcentaje pequeño se transforma directamente hacia epimastigotas. Esto indica que estas formas en diferenciación regresivas representan una población pleomórfica, la cual en su mayoría requieren hacerse competentes hacia la diferenciación transformándose en amastigotas. El cálculo del número absoluto de amastigotas en ambas condiciones parece indicar que éstos son sensibles a los niveles de oxígeno, registrándose una caída significativa de su población en condiciones de baja tensión de oxígeno.

En efecto, se ha reportado que los amastigotas poseen un metabolismo dependiente de oxígeno (19). Esta condición de estrés pudiera inducir una nueva diferenciación del parásito, explicando el alto porcentaje de epimastigotas (91%) registrado al sexto día en condiciones de baja tensión de oxígeno.

Tanto en condiciones de alta como baja tensión de oxígeno se registra duplicación del número absoluto de amastigotas (resultados no mostrados), siendo este proceso más acelerado durante la epimastigogénesis horizontal, incrementándose posteriormente la población de epimastigotas. Estos resultados concuerdan con otros previamente descritos (26), quienes reportan que en ausencia de recambio de medio de cultivo los amastigotas son capaces de duplicarse solamente por dos generaciones, luego de lo cual inician su diferenciación hacia epimastigotas. Sin embargo, el presente estudio no indica consumo de glucosa en esta etapa en ambas condiciones, registrándose solamente una caída de los valores de pH a partir del día 6 durante la epimastigogénesis horizontal (Figura 2A). Estos resultados difieren de los reportados por Engel y colaboradores (27), quienes cultivaron amastigotas en medio axénico y determinaron que ya a las 24 horas de incubación con un 99% de amastigotas, se registra la caída de más de un 50% de la glucosa inicial en el medio de cultivo. Por lo tanto, es posible que la caída de pH sea consecuencia de productos liberados por este estadio. La ausencia de liberación de amoníaco al medio de cultivo indica ausencia de activación del metabolismo proteico. En efecto, se ha reportado que los amastigotas no poseen enzimas del metabolismo de proteínas (19, 27).

La figura 3 muestra que en ambas condiciones de tensión de oxígeno, se registra un incremento importante del número absoluto de epimastigotas a partir del octavo día, coincidiendo con el inicio del agotamiento de glucosa del medio de cultivo. Esto puede explicarse en base al metabolismo eminentemente glicolítico de los epimastigotas (15, 16, 28). No obstante, sólo se llegó a consumir casi en su totalidad en condiciones de alta tensión de oxígeno. Esto puede explicarse en base al mayor número absoluto de

epimastigotas en esta condición, así como al hecho de que la tensión de oxígeno afecte la velocidad del consumo de glucosa. Para corroborar esta hipótesis, se analizó el consumo de glucosa durante la curva de crecimiento de epimastigotas simulando ambas tensiones de oxígeno utilizadas durante la epimastigogénesis (Figura 4), obteniéndose resultados similares. En efecto, en *T. cruzi* se ha reportado que la vía catalizada por fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la malato deshidrogenasa (MDH) representan los únicos mecanismos para la reoxidación de NADH bajo condiciones anaeróbicas (14). Esto conlleva a la descarboxilación del fosfoenolpiruvato a oxaloacetato y su posterior reducción a malato, el cual es transportado a la matriz mitocondrial (15). Al no estar operativo el ciclo de Krebs, ocurre acumulación del malato, el cual debe ser convertido vía succinato y su liberación al medio de cultivo. Esto, aún cuando permite la sobrevivencia del parásito, permite un flujo más lento de los intermediarios de la vía glicolítica afectando la velocidad del consumo de glucosa.

Al final de ambas cinéticas se registra la aparición de una nueva población de formas en diferenciación. Es posible que estas últimas correspondan a formas progresivas previamente descritas (25), postulándose que posteriormente los epimastigotas, aún luego de sufrir varios períodos de replicación se diferencian hacia tripomastigotas. No obstante, sólo se evidenció la aparición de tripomastigotas metacíclicos en condiciones de alta tensión de oxígeno. Habiéndose demostrado previamente que la metaciclogénesis está asociada a la capacidad de utilización de aminoácidos como fuente de energía una vez agotado los niveles de glucosa del medio (20), el menor consumo de glucosa y la ausencia de liberación de amoníaco (figuras 2 y 3) podría explicar la ausencia de este proceso durante la epimastigogénesis vertical.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo permite proponer que la epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio LITB se puede producir tanto en condiciones de baja y alta tensión de oxígeno, observándose en ambos casos la aparición de formas en transición con características morfológicas compatibles con amastigotas. Independientemente de los niveles de tensión de oxígeno, todo parece indicar que durante este proceso, los parásitos involucrados en los procesos de diferenciación (formas en diferenciación y amastigotas) no muestran activación de las diferentes rutas metabólicas. Por otro lado, la aparición de epimastigotas posterior a la duplicación de amastigotas parece indicar que la capacidad de diferenciación está precedida de un proceso de multiplicación, ocurriendo efectivamente activación de las rutas metabólicas una vez alcanzado el estadio epimastigota. Todo esto sugiere que en *Trypanosoma cruzi* los procesos de multiplicación y diferenciación son excluyentes entre sí.

**Agradecimiento.** Al Sr. Johny Albanese por su apoyo en la infraestructura del laboratorio.

**Financiamiento.** Este trabajo se realizó con el financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo a través del proyecto de Grupo FCS-2010-001 y Proyectos de Inversión Menor CDCH-011-2011, CDCH-012-2013, CDCH-009-2013.

## REFERENCIAS

1. Navarro MC, Córdoba A, Fernández K, Arteaga R, Graterol D, Domínguez MI, De Lima AR, Pineda W, Contreras VT. Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi*: método para estudiar *in vivo* la transformación de tripomastigota en epimastigota. *Kasmera* 2012; 40:122-133.
2. Azambuja P, Guimaraes JA, Garcia ES. Haemolytic factor from cop of *Rhodnius prolixus*: evidence and partial characterization. *Cell Diff* 1983; 29:833-837.
3. Azambuja P, Mello CB, D'Escoffier LN, Garcia ES. *In vitro* cytotoxicity of *Rhodnius prolixus* haemolytic factor and mellitin towards different trypanosomatids. *Braz J Med Biol Res* 1989; 22:597-599.
4. Pereira MEA, Andrade AEB, Ribeiro JMC. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science* 1981; 211:597-600.
5. Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Differential *in vitro* and *in vivo* behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol* 1996; 82:112-121.
6. García ES, González MS, Azambuja P, Baralle FE, Fraidraich D, Torres HN, Flawia MM. Induction of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis in the hematophagous insect vector by hemoglobin and peptides carrying alpha\_D-globin sequence. *Exp Parasitol* 1995; 81:255-261.
7. Azambuja P, Feder D, Garcia ES. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact of the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp Parasitol* 2004; 107:89-96.
8. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; 31:472-481.
9. Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatominae*. *Parasitol Today* 2000; 16:381-387.
10. De Lima AR, Aparicio A, Berrocal A, Navarro MC, Contreras VT. Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: cambios peptídicos, glicopeptídicos y enzimáticos. *Salus* 2007; 11:39-47.
11. Barrios J, Contreras O, Graterol D, Navarro MC, Contreras VT, De Lima A.R. *Trypanosoma cruzi*: Epimastigogénesis en condiciones axénicas. Cambios morfológicos, peptídicos, glicopeptídicos y antigénicos. *Acta Cientif Venezol* 2008; 59:1-11.
12. Graterol D, Arteaga R, Navarro MC, Domínguez MI, De Lima AR, Contreras VT. El estadio amastigota precede la evolución del epimastigota durante la epimastigogénesis *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Venezol Microbiol* 2013; 33: X-X

13. Goldenberg S, Avila AR. Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. *Adv Parasitol* 2011; 75:285-305.
14. Urbina, JA. The phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: molecular, kinetic and regulatory properties. *Arch Biochem Biophys* 1987; 258:186-195.
15. Cannata JJB, Cazzulo JJ. Glycosomal and mitochondrial malate dehydrogenases in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1984; 11:37-49.
16. Maugeri DA, Cannata JJ, Cazzulo JJ. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Essays Biochem* 2011; 51:15-30.
17. Bringaud F, Riviere L, Coustou V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 149:1-9.
18. Bringaud F, Barrett MP, Zilberstein D. Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012; 17:349-74.
19. Sanchez-Moreno M, Fernandez-Becerra MC, Castilla-Calvente JJ, Osuna A. Metabolic studies by <sup>1</sup>H NMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained by 'in vitro' culture. *FEMS Microbiol Lett.* 1995; 133(1-2):119-125.
20. De Lima AR, Navarro MC, Arteaga R, Contreras VT. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in low glucose axenic media shifts its competence to differentiate at metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol* 2008; 119:336-342.
21. Contreras VT, Araque W, Delgado V. *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis *in vitro*. I. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89:253-259.
22. Goitia-Aular M, Boisso J. Cultivo de *Trypanosoma cruzi* (cepa Elpidio Padrón) en un medio semidefinido. Efecto de algunas variaciones en la composición y condiciones del mismo. *Acta Cientif Venezol* 1982; 38:488-496.
23. Contreras V, Salles J, Thomas N, Morel C, Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 16:315-327.
24. Gordon SA, Fleck A, Bell J. Optimal conditions for the estimation ammonium by Berthelot reaction. *Annals Clin Biochem* 1978; 15:270-275.
25. Zaidenberg A, Tournier H, Schinella G, Buschiazzo H. *Trypanosoma cruzi*: obtención de amastigotas extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. *Rev Lat-Amer Microbiol* 2000; 42:21-26.
26. Engel JC, Dvorak JA. *Trypanosoma cruzi*: cell biological behavior of epimastigote and amastigote forms in axenic culture. *J Protozool* 1988; 35:513-518.
27. Engel JC, Franke de Cazzulo BM, Stoppani AO, Cannata JJ, Cazzulo JJ. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1987; 26:1-10.
28. Urbina, JA. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1994; 10:107-110.