

# Estandarización de la técnica para la obtención de trypomastigotes en células 3T3 a partir de una cepa local de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Standardization of the technique for obtaining trypomastigotes in 3T3 cells from a local strain of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes

N. Marisol Córdova Rojas<sup>1,a</sup>, Mary Cruz Torrico<sup>2,a</sup>, Faustino Torrico<sup>3,b</sup>, Eduardo L. Suárez Barrientos<sup>3,b</sup>

## Resumen

**Objetivos:** evaluar el empleo de cultivos celulares para la obtención de tripomastigotes en células 3T3, a partir de una cepa local de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. **Métodos:** se realizó cultivo in vitro de células 3T3 en medio DMEM-SBF al 10% más penicilina estreptomycin, a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> al séptimo día, fueron infectados con epimastigotes de *T. cruzi* cepa TcV, aislados de pacientes con Chagas agudo y cultivados preliminarmente en medios bifásicos como NNN y LIT. **Resultados:** a los 14 días de infección se observó al parásito en las formas: de amastigotes (forma intracelular), posteriormente la tripomastigote (forma extracelular) que fueron liberados al medio una vez lisadas las células infectadas. Posteriores sub cultivos de células 3T3 con tripomastigotes obtenidos a partir de los epimastigotes mejoran la obtención de *T. cruzi*. **Conclusiones:** es posible la obtención de trypomastigotes a partir de una cepa local de epimastigotes recreando el ciclo biológico del parásito in vitro.

**Palabras claves:** cultivos celulares, epimastigotes, trypomastigotes, células 3T3, cepa de *T. cruzi* - TcV.

## Abstract

**Objectives:** to evaluate the use of cell cultures for the production of trypomastigotes in 3T3 cells, from a local strain of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Methods:** we previously performed growing 3T3 cells in DMEM-10% FBS more penicillin-streptomycin in vitro at 37 °C, 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub> on the seventh day, they were infected with *T. cruzi* epimastigotes TcV strain, isolated from patients with acute Chagas and preliminarily grown in biphasic media as NNN and LIT. **Results:** after 14 days of infection was observed the parasite forms: extracellular) that were released into the infected cells once lysed. Subsequent sub 3T3 cell cultures trypomastigotes obtained from epimastigotes obtaining improved *T. cruzi*-TcV. **Conclusions:** it is possible to obtain trypomastigotes from a local strain epimastigotes recreating the life cycle of the parasite in vitro.

**Keywords:** cell culture, epimastigotes, trypomastigotes, 3T3 cell, strain of *T. cruzi* - TcV.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una antroponosis debida al protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad es característica del continente americano y más particularmente de Latinoamérica<sup>1,2</sup>.

En Bolivia afecta más de la mitad de la extensión de su superficie territorial, siendo la cepa TcV uno de los principales causantes de la enfermedad de Chagas, con predominio en el territorio nacional.<sup>3-9</sup>

El *Trypanosoma cruzi* infecta una gran variedad de células nucleadas in vitro e in vivo, aunque presente tropismo por ciertos tipos celulares como células musculares y células macrófagos<sup>10,11</sup>. El parásito atraviesa por una serie de estados de desarrollo denominados: trypomastigotes, amastigotes, y epimastigotes.<sup>8,10,12-16</sup>

Los primeros cultivos realizados por investigadores, em-

plearon medios bifásicos como el NNN (Medio de Novy, MacNeal y Nicolle), se verificó que formas tripomastigotes aparecían en la fase estacionaria del cultivo sin embargo estos eran escasos para estudios posteriores. Estos tripomastigotes fueron denominados como tripomastigotes metacíclicos, ya que son parte de la transformación de formas epimastigotes en medios que mimetizan el ambiente encontrado en el interior del tracto digestivo del insecto vector<sup>11,12</sup>. El proceso de transformación se denominó metaciclogénesis.

Varios son los medios utilizados de forma rutinaria para el crecimiento de formas epimastigotes de *T. cruzi* sin embargo Camargo fue el primero en analizar sistemáticamente el proceso de transformación de epimastigotes en tripomastigotes usando el medio LIT (Medio de cultivo Liver Infusion Tryp-tose)<sup>3,11,12,14</sup>.

Poco se ha descrito sobre la obtención de trypomastigotes a partir de epimastigotes in vitro en nuestro medio. Sin embargo el hecho de que la forma epimastigote del *T. cruzi* pueda ser cultivado en medios axénicos nos abre la posibilidad con este trabajo, que formas trypomastigotes de la cepa local TcV, pueda ser obtenida a partir de epimastigotes de *T. cruzi* en forma no axénica sino a través de cultivos celulares in vitro, a partir de estas cepas se podrá realizar otros estudios que nos permitirá comprender mejor aspectos relacionados a la enfermedad de Chagas.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas (IBISMED), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba Bolivia.

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigación Médicas (LABIMED), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba Bolivia.

<sup>3</sup>Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba Bolivia

<sup>a</sup>Bioquímico; <sup>b</sup>Médico.

\*Correspondencia a: N. Marisol Córdova R.

Correo electrónico: nmarcordova@yahoo.com

Recibido el 6 febrero de 2015. Aceptado el 18 de marzo de 2015

## Material y métodos

### Obtención de Epimastigotes de *T. cruzi*

La cepa TcV de *T. cruzi* fue aislada y tipificada a partir de la muestra de sangre de un recién nacido, de la localidad de Punata que fue diagnosticado por micrométodo con Chagas congénito.

La muestra de sangre en la cual se encontraban los parásitos fue cultivada previamente en el medio de cultivo LIT (infusión de hígado y triptona) (Difco), a 27°C, durante siete días, suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) inactivado.

#### • Cultivo de Células 3T3

En el presente estudio, se emplearon células 3T3 (células fibroblásticas de ratón). Dichas células a una concentración de 2 000 000 de células/ml fueron cultivadas por 96 hrs. en frascos de cultivo de 70 ml a 37°C y 5% de CO<sup>2</sup> con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (BioWhittaker) suplementados con SBF inactivado (SIGMA) al 10% más penicilina (100 UI/ml) /estreptomicina (100 µgr/ml) (SIGMA). Una vez obtenida la monocapa de células, en los frascos de cultivo con un 80-90 % de confluencia se realizó el cambio de medio por DMEM-SBF inactivado al 2% para detener la proliferación celular.

#### • Infección de las células 3T3

Epimastigotes aislados del medio de cultivo LIT, resuspendidos en 10 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (BioWhittaker) al 2% fueron centrifugados por 15 minutos a 4 000 rpm, transcurrido este tiempo, se desechó el sobrenadante y se ajustó la concentración de los mismos, a 15 millones de epimastigotes por ml, los cuales fueron adicionados a la monocapa de células 3T3 con observación diaria a través del microscopio invertido.

A los días 7 y 11 posinfección, se realizó el cambio de medio, para eliminar epimastigotes que no se habían transformado en trypomastigotes metacíclicos, asimismo se adicionó al nuevo medio de cultivo 500 µl plasma de pacientes negativos para la enfermedad de Chagas, dejándose al mismo, interactuar con el medio por 48 hrs., para que pueda activarse el sistema de complemento y de esta manera lisar a los epimastigotes existentes.

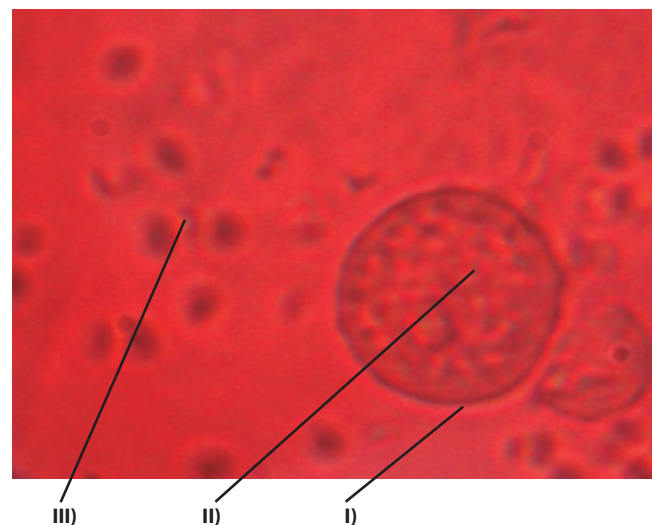
#### • Observación de células 3T3 Infeccionadas

Transcurridos 14 días de infección los medios de cultivo fueron examinados a través del microscopio invertido, para observar presencia o ausencia de células 3T3 infectadas, y divisar en el interior de las mismas la existencia de amastigotes.

#### • Obtención y recolección de Trypomastigotes extracelulares

Al día 14-15 pos infección, trypomastigotes extracelulares que se encuentran en el medio de cultivo, fueron recuperados en tubos falcón de 50 ml con pipetas dispensables de 10 ml estériles y centrifugados a 1 200 rpm por cinco minutos para retirar los restos celulares existentes, el sobrenadante donde se encuentran los trypomastigotes fue retirado y transferido a un otro tubo falcón, al cual se adiciono DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (BioWhittaker) al 2%

**Figura 1.** I) Célula 3T3 infectada con la cepa TcV de *trypanosoma cruzi* II) Amastigotes intracelulares III) Trypomastigotes.



cantidad suficiente para (c.s.p.) 50 ml, este fue nuevamente centrifugado a 4 000 rpm. por 20 minutos, transcurrido el tiempo de centrifugación se retiró el sobrenadante, y el pellet de trypomastigotes fue resuspendido en 5 ml de medio para realizar el recuento de parásitos en la cámara de Neubauer. Los parásitos obtenidos se emplearon para realizar subcultivos de trypomastigotes.

Al frasco de cultivo inicial, donde se encuentran células infectadas, se adicionó el medio DMEM al 2%, se llevó a incubar nuevamente, proceso que se repite a diario hasta obtener una gran cantidad de trypomastigotes que conllevan a la decoloración celular por sobreinfección de estas.

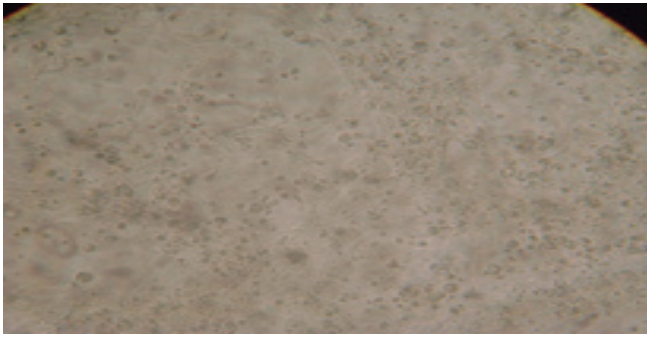
## Resultados

Mediante la infección de células 3T3, por trypomastigotes metacíclicos, previa transformación de formas epimastigotas a formas infectantes, se pudo obtener trypomastigotes semejantes a formas existentes en la sangre estableciendo de esta forma el ciclo completo de la cepa TcV in vitro.

### Obtención de trypomastigotes extracelulares en cultivo celular

I. Al colocar epimastigotes, cepa TcV a la monocapa de células 3T3 (medio de cultivo celular) tardaron 11 días en la transformación de epimastigotes a trypomastigotes metacíclicos empleando el medio enriquecido de DMEM SBF al 2%. Transcurrido este tiempo se pudo observar células infectadas en cuyo interior se encontraban poblaciones de amastigotes, donde en algunas de estas células se observaba mayor movimiento lo cual nos hace suponer que se realizaba la diferenciación de amastigotes a trypomastigotes (Figura 1).

II. A partir del día 14 se observa que la cantidad de parásitos va en aumento o crecimiento exponencial por día, así como también el número de células 3T3 infectadas, observándose por lo tanto un aumento progresivo de células infectadas en proporción a la cantidad de parásitos existentes y la



**Figura 2. a)** Abundante cantidad de Células 3T3 infectadas con la cepa TcV de *Trypanosoma cruzi*

monocapa celular se torna frágil y comienza a decolorarse por la sobreinfección celular (Figura 2).

#### Trypomastigotes a partir de *T. cruzi* cepa TcV

El tiempo que tardaron en infectarse las células 3T3 en los subcultivos celulares, con trypomastigotes obtenidos a partir del cultivo principal (cultivo madre) fue de siete días, obteniéndose mayor número de parásitos a medida que transcurrían los días, evidenciándose esto al realizar el recuento de trypomastigotes cada 24 horas y por observarse un mayor número de células 3T3 infectadas (Figura 3).

#### Discusión

Para la obtención de trypomastigotes en células 3T3 a partir de una cepa local de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* realizamos cultivos celulares, los cuales fueron infectados con epimastigotes de la cepa local TcV para obtener trypomastigotes para posteriores fines investigativos.

Los primeros cultivos realizados por investigadores, emplearon medios bifásicos como el NNN donde se verificó que formas tripomastigotes aparecían en la fase estacionaria del cultivo y que su porcentual aumentaba con el envejecimiento del cultivo<sup>11,12,14,17</sup>, sin embargo el porcentaje de transformación de la forma epimastigote a tripomastigote empleando estos medios bifásicos no está totalmente definido dificultándose los estudios cuantitativos del crecimiento celular<sup>1,11,12,14,18</sup>. El desarrollo de medios monofásicos (medio LIT), abrieron la posibilidad de realizar estudios cuan-

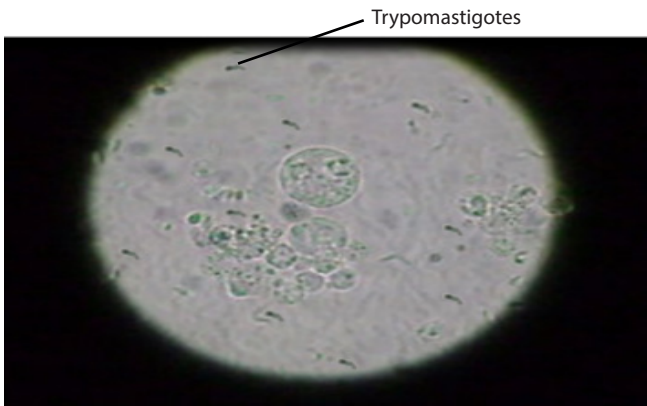


**Figura 2. b)** Monocapa de células 3T3 a punto de decolorarse con presencia de trypomastigotes libres en el medio

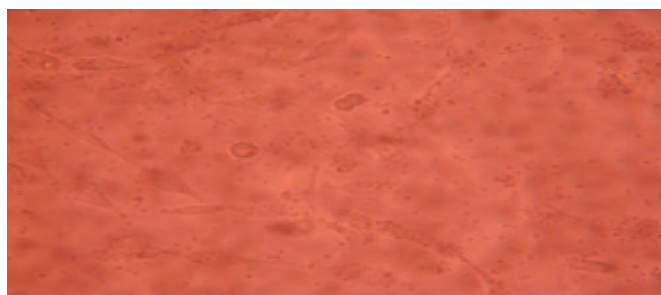
titativos<sup>3,11,14</sup> sin embargo el porcentaje de transformación y crecimiento de parásitos eran relativamente pequeños lo que pondría en duda el empleo de estos medios de cultivo para la obtención de trypomastigotes en forma masiva, estas limitaciones hacen que investigadores como Velazco-Gamboa y Col. realicen estudios en cultivos celulares, empleando células Vero para obtener trypomastigotes de la cepa Munanta previa obtención de trypomastigotes metacíclicos en el medio LIT<sup>5,11</sup>. En nuestros laboratorios se realizaron estudios similares, con cultivos celulares empleando células 3T3 para obtener trypomastigotes, a partir de la cepa TcV de epimastigotes en forma masiva. Nuestros resultados muestran que se logró la adaptación de los epimastigotes al cultivo celular in vitro, logrando obtener la capacidad de transformación a trypomastigotes metacíclicos directamente en el medio de cultivo.

Por otra parte la adición de plasma de pacientes sin la enfermedad de Chagas al medio de cultivo produce: lisis de las formas epimastigotas por activación del sistema de complemento mientras que los trypomastigotes son resistentes<sup>2,10,12,14,18-20</sup>, este mecanismo permitió en nuestro trabajo, la selección de formas resistentes de trypomastigotes metacíclicos a la lisis, al agregar plasma humano libre de Chagas a los frascos de cultivo, permitiendo de esta manera la infección de células 3T3 evidenciándose esto al observar células infectadas con presencia de amastigotes.

Proeopio & Mortara indican que los procesos de invasión e interacción parásito célula hospedera, varían dependiendo de factores intrínsecos de la cepa de parásito así como también la línea celular involucrada en la infección<sup>1,10,12,17,21,22</sup>. En base a lo indicado podemos mencionar que los epimastigotes de la cepa TcV al adaptarse al medio de cultivo celular enriquecido, permitió reproducir in vitro el ciclo biológico del parásito donde se pudo evidenciar los diferentes estadios morfológicos del parásito. Si bien algunos autores tardaron siete días para que el parásito complete su ciclo intracelular para desarrollar la transformación de amastigotes a trypomastigotes y ser liberados al medio<sup>10,12,19</sup> nuestros resultados indican que el proceso de transformación morfológica hasta la aparición de amastigotes posinfección tardó un período de catorce días, esto se puede deber a que las formas epimastigotas fueron adicionadas directamente al cultivo celular (monocapa de células 3T3), transcurrido este tiempo se pudo observar células infectadas, cuya proporción fue en aumento



**Figura 2. c)** Abundante cantidad de trypomastigotes extracelulares.



**Figura 3. a)** Célula 3T3 infectada con la cepa TcV de *trypanosoma cruzi*



**Figura 3. b)** Trypomastigotes en medio de cultivo DMEM al 2%.

al paso de los días, por lo tanto el nivel de la infección celular estará determinada por el número de parásitos existentes, es así que si la proporción de parásitos va en aumento, como también el número de células infectadas, la monocapa celular se torna frágil y comienza a decolorarse, esta situación lo mencionan también otros autores<sup>11</sup>.

Por otro lado coincidimos con Velazco-Gamboa y Col., en que el tiempo requerido de transformación a formas trypomastigotas pos infección es de siete días, cuando realizamos los subcultivos de la monocapa de células 3T3 con los trypomastigotes obtenidos. Este patrón en días requerido para la transformación y obtención del parásito, es similar a experiencias previas, en estudios realizados en nuestros laboratorios para la obtención de trypomastigotes a partir de la cepa tulahuén (datos no registrados) coincidiendo el mismo con

otros autores<sup>10,12,18,20</sup>.

La obtención de trypomastigotes de *T. cruzi* a partir de la cepa TcV de epimastigotes, nos permitió evidenciar que es posible reproducir el ciclo biológico del parásito en la línea celular 3T3 donde se pudo advertir el proceso de infección y transformación intracelular del parásito, estos aspectos nos permitirán realizar otros estudios para determinar el grado de infectividad celular de las distintas cepas de *T. cruzi* que van circulando en nuestro país.

**Conflictos de interés:** los autores declaramos que no existe conflicto de intereses.

**Agradecimientos:** Al Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBISMED y al Laboratorio de Investigaciones Médicas, LABIMED) de la Facultad de Medicina, UMSS.

## Referencias bibliográficas

1. Velazco Gamboa C, Puentes C.F., Moreno García A., Patarroyo M., Puerta B. C., Adaptación de la cepa Munanta de *Trypanosoma cruzi* al cultivo in vitro en células vero: Revista de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana 1997; Vol 4(1): 83-94.
2. Ulisses de Carvalho T. Cultivo Celular
3. López E.N., D'Jesus R. Infectividad en ratón de las formas de *Trypanosoma cruzi* deiferenciadas por primocultivo en medio LIT. Med-Ula, Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de los Andes. Vol. 5 N°1-4 1996.
4. Zaidenberg A., Tournier H.A., Schinella G.R., Buschiazzi H.O., *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo: Revista latinoamericana de microbiología (2000) 42:21-26.
5. Rodriguez A.M., Aragort De R.R., De Jesus R., Calcagno M., Maizo De S.Z., Segnini S., Diaz S. Tripomastigotes de sangre y de cultivo celular de *Trypanosoma Cruzi* Y. Diferencia en la infectividad para ratones Balb/c: Parasitología al día. Vol 24 N° 1-2 (2000)
6. Figueiredo R., Steindel M., Soares M.J. The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during in vitro cultivation. Parasitol Res.:80:517-522 (1994)
7. Barnabé C., Breniere S.F. Eco distribución de los clones de *Trypanosoma cruzi*
8. Nogueira N., Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*: Mechanism of entry and intracellular fate in Mammalian cells: From the Rockefeller University, New York 10021
9. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2009; 104, 1051-1054.
10. Murray PK., Boltz RC., Schmatz DM. Separation of individual stages of *Trypanosoma cruzi* grown in cell culture by continuous free-flow electrophoresis. J Protozool. 1982; 29(1):109-13.
11. Schmatz DM., Murray PK *Trypanosoma cruzi*: selective isolation of pure trypomastigotes from cultured muscle cells. J Parasitol. 1981 ; 67 (4): 517-21.
12. Tanowitz HB., Kirchoff LV., Somon D., Morris SA.; Weiss LM., Wittner M., La enfermedad de Chagas. Clin Microbiol Rev 1992;5(4):400-19.
13. WHO. Special programme for research and training in tropical diseases (TDR), Report of Scientific Group in Chagas Disease TDR/SWG/09. World Health Organization: Buenos Aires; 2007.CI
14. Wanderley de Sousa. Medio Axénico, disponible en:file:///C:/Documents and Settings/Janneth/Configuración local/Arch.
15. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annual Reviews in Microbiology. 1973; 27(1): 347-82
16. Proeopio, D. & Mortara, R.A.. The invasión of mammalian cell by two infective stage of *Trypanosoma cruzi* have distinct mechanism that also depend on the host cell cytoskeleton. En: Resúmenes del VI Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Biología Celular. Oaxtepec-México. 1995.
17. Zaidenberg A., Tournier H.A., Schinella G.R., Buschiazzi H.O., *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo: Revista latinoamericana de microbiología (2000) 42:21-26.
18. Camargo E. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic *trypanosoma* in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 6:93.1964.
19. Zaidenberg A, Tournier H, Schinella G, Buschiazzi H. *Trypanosoma cruzi*: influence of human plasma on the morphogenesis of blood trypomastigotes in a cell-free culture media Revista Latinoamericana de Microbiología [1995, 37(1):71-77].
20. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012; 12(2):240-53.
21. Del Puerto F, Sanchez Z, Nara E, Meza G, Paredes B, Ferreira E et al. *Trypanosoma cruzi* lineages detected in congenitally infected infants and Triatoma infestans from the same disease-endemic region under entomologic surveillance in Paraguay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2010; 82, 386-390.
22. Lafaille J. J., Linss J., Cardoso M.A.B., Krieger M.A., Aymerch S., Goldenberg S. Cloning of *Trypanosoma cruzi* stage specific genes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Suppl. Vol. 82, 11-1987, 252