



Trypanosoma cruzi: características del crecimiento y susceptibilidad a violeta de genciana “in vitro” de dos poblaciones nativas de Zaña, Lambayeque, Perú

Trypanosoma cruzi. in vitro ground features and susceptibility to gentian violet of two native populations from Zaña, Lambayeque, Peru

Cristian Aurazo¹, Judith Roldán² y César A. Jara²

¹Egresado de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo

RESUMEN

En el norte peruano se ha registrado la presencia de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, en el vector, *Panstrongylus chinai*, y en animales sinantrópicos; sin embargo, las poblaciones nativas aún no han sido caracterizadas. En la presente investigación se determinaron las características del crecimiento y la susceptibilidad a violeta de genciana in vitro de dos poblaciones de *T. cruzi* obtenidas de *P. chinai* naturalmente infectados en Zaña, Lambayeque-Perú, denominadas arbitrariamente Tz-1 y Tz-2. De cada población se preparó una suspensión conteniendo 5×10^5 epimastigotes/mL, de la cual se inoculó 0.05 mL en tubos con el medio de cultivo bifásico BHI. Un similar inóculo se añadió a otros tubos conteniendo el mismo medio de cultivo a los que adicionó violeta de genciana a las concentraciones de 0.01ug/mL, 0.1ug/mL, 1.0ug/mL, 10.0ug/ mL y 100.0ug/mL. Se encontró un crecimiento máximo de 995000 epimastigotes/mL y 912000 epimastigotes/mL para la población Tz-1 y Tz-2, respectivamente, al 16^{to} de cultivo, así como, susceptibilidad de ambas poblaciones a las concentraciones de 10.0ug/mL y 100.0ug/mL de violeta de genciana.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, *Panstrongylus chinai*, susceptibilidad, violeta de genciana

ABSTRACT

In northern Peru has recorded the presence of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, in vector, *Panstrongylus chinai*, and synanthropic animals; however, native populations have not yet been characterized. In the present study the growth characteristics and susceptibility to gentian violet in vitro of two populations of *T. cruzi* obtained from naturally infected *P. chinai* Zaña, Lambayeque, Peru, called arbitrarily determined Tz Tz-1 and-2. Of each stock suspension containing 5×10^5 epimastigotes / mL, of which 0.05 mL was inoculated into tubes containing the BHI culture medium prepared biphasic. A similar inoculum was added to another tube containing the same culture medium to which added gentian violet 0.01ug/mL concentrations, 0.1ug/mL, 1.0ug/mL, 10.0ug / mL and 100.0ug/mL. 995000 maximum growth of epimastigotes / mL and 912000 epimastigotes / mL for Tz Tz-1 and-2 population, respectively, to the 16th of culture, as well as susceptibility to both populations 10.0ug/mL concentrations was found and 100.0 ug / mL of crystal violet.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Panstrongylus chinai*, susceptibility, gentian violet

INTRODUCCIÓN

Producida por el protozooario hemofalgelado *Trypanosoma cruzi* y reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las trece enfermedades tropicales más descuidadas, la enfermedad de Chagas ha sido un azote para la población humana del continente americano, principalmente en zonas rurales en donde habita el insecto vector, y sigue siendo debido a que por efectos de la globalización y al aumento de viajes de inmigrantes desde centro y Sudamérica al resto del mundo, la infección se ha difundido en USA, Canadá y Europa ^{1,2,3,4,5}. En el Perú existen aproximadamente 192 mil infectados y el 12% de la población de halla en riesgo de contraer la enfermedad, principalmente en los departamentos del sur (Arequipa, Moquegua y Tacna) en donde el vector es *Triatoma infestans* y secundariamente en algunos departamentos del norte (Cajamarca, Amazonas y Piura) en donde el vector es *Rhodnius ecuadoriensis* ^{2,6,7}.

T. cruzi pertenece a una especie heterogénea consistente en un pool de cepas, stocks o aislamientos que circulan entre mamíferos y los insectos vectores, esta heterogeneidad ha sido ampliamente estudiada mediante métodos biológicos, bioquímicos y moleculares y puede explicar la variabilidad de las manifestaciones clínicas y las variaciones geográficas en relación a la morbilidad, reconociéndose en la actualidad seis categorías de poblaciones denominadas: TcI a TcVI^{8,9}. Los métodos biológicos involucran aspectos como la morfología, infectividad, tropismo tisular, virulencia, composición antigénica, velocidad de metacicloénesis, crecimiento de epimastigotes en medios de cultivo y la susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos^{8,10,11}.

El crecimiento de los epimastigotas en medios de cultivo varía en relación al tiempo, medio de cultivo y número de parásitos, por ejemplo, algunas cepas de Bolivia y de Brasil presentaron picos de crecimiento de epimastigotes en medio de cultivo 3N entre los 9 y 11 días ^{10,11}, de Colombia de 30 días en medio AGAR-LIT-BHI ⁸ y poblaciones aisladas de *Panstrongylus chinai* de Chaman (La Libertad) a los 13 a 18 días en medio 3N ¹² y en sólo cinco días cuando se utilizó BHI mezclada con un extracto de maca ¹³.

Debido a los pocos antitripanosomas disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: nifurtimox y benzimidazol, comparados con antiparasitarios para otras enfermedades^{14,15}, se ha investigado la efectividad de algunos aceites esenciales extraídos de plantas ^{16,17,18} así como sustancias químicas como el thienyl-2-nitropropeno ¹⁹, compuestos dicationicos aromáticos ²⁰ y violeta de genciana²¹.

Teniendo en cuenta la gran heterogeneidad que presenta el parásito en relación a sus características biológicas, las mismas que pueden variar entre distintas poblaciones de *T. cruzi* de diferentes áreas geográficas o dentro de una misma zona geográfica, que la presencia del parásito ha sido registrada en el valle de Zaña (Lambayeque, Perú) ²² pero que no ha sido objeto de estudios posteriores, el presente trabajo estuvo orientado a determinar las características de crecimiento y susceptibilidad a diferentes concentraciones de violeta de genciana en medio de cultivo BHI, de dos poblaciones de *T. cruzi* obtenidas de *Panstrongylus chinai* de Zaña-Lambayeque, Perú.

MATERIAL Y MÉTODOS

Poblaciones de *Trypanosoma cruzi*

Se usaron dos poblaciones nativas de *T. cruzi* denominadas arbitrariamente Tz-1 y Tz-2, obtenidas de distintos especímenes de *Panstrongylus chinai*, naturalmente infectados, capturados en el valle de Zaña, departamento de Lambayeque, Perú (6.71°LS, 79.57°LO). Los triatominos fueron alimentados con sangre de paloma y colocados en placas petri estériles donde defecaron y las heces fueron examinadas al microscopio invertido en busca de formas flageladas, según procedimientos utilizados previamente ^{12,13}.

Cultivo in vitro de epimastigotes de *T. cruzi* y preparación del inoculo

Los epimastigotas se obtuvieron a partir de sangre de ratones infectados previamente con cada población de *T. cruzi* (Tz-1 y Tz-2) extraída de forma estéril e inoculada, 0.1mL, en tubos con medio bifásico BHI, conteniendo una fase sólida de agar BHI suplementada con sangre de conejo y una fase líquida constituida por caldo BHI, y conservados a 28±1°C¹³.

A partir del segundo día de inoculados, se extrajo en condiciones de esterilidad con ayuda de una jeringa tuberculina 0.1mL de muestra de la fase líquida del medio para realizar un recuento en cámara de Neubauer a fin de determinar la fase logarítmica de crecimiento y a partir de ésta preparar un inoculo conteniendo 5×10^5 epimastigotes/mL^{8,12,13}, para cada población de *T. cruzi*.

Determinación de las características del crecimiento de epimastigotes

Una vez obtenido el inóculo estandarizado por cada población, se inoculó 0.05 mL de este en tubos con medio bifásico BHI (10 por cada población). A partir del segundo día hasta el día 24 postinoculación se evaluó el crecimiento extrayendo 0.1mL de la fase líquida cada 48 horas, para hacer recuento en cámara de Neubauer, manteniéndolos a temperaturas de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ^{12,13}.

Evaluación de la Susceptibilidad de las poblaciones de *T. cruzi* a violeta de genciana

Para esta evaluación se emplearon concentraciones de 0.01ug/mL, 0.1ug/mL, 1.0ug/mL, 10.0ug/mL, 100.0ug/mL de esta. Para ello las distintas concentraciones se obtuvieron añadiendo la violeta de genciana en caldo BHI estéril, preparándose inicialmente la concentración de 100.0ug/mL, y a partir de estas diluciones sucesivas para la obtención de las restantes concentraciones. Se añadió 4mL de caldo BHI conteniendo cada determinada concentración en tubos con medio agar BHI suplementado con sangre de conejo (5 tubos/concentración/población, respectivamente).

Una vez obtenido también un inóculo estandarizado de 5×10^5 epimastigotes/mL, se agregó 0.05 mL de este, en cada de los tubos con medio BHI conteniendo las distintas concentraciones de violeta de genciana. Además se tuvieron 5 tubos con medio BHI bifásico conteniendo únicamente 0.05mL del inoculo por cada población de *T. cruzi*, los cuales fueron usados como controles. Al día 16 de inoculación y habiendo alcanzado la fase de máximo crecimiento en los tubos controles; se extrajo en condiciones de esterilidad 0.1mL de todos los tubos inoculados (tanto experimentales como controles), para mediante recuento en cámara de Neubauer, determinar los siguientes valores⁹:

$$\text{Índice de crecimiento (I.C.)} = \frac{\text{Número final de parásitos}}{\text{Número inicial de parásitos}}$$

Porcentaje de crecimiento (P.C.), sólo cuando I.C. del grupo experimental es > 1 .

$$P : C. = \frac{I.C. \text{ de grupo experimental}}{I.C. \text{ de grupo control}} \times 100$$

Porcentaje de reducción del crecimiento (P.R.), sólo cuando I.C. del grupo experimental es menor a 1.

$$P.R. = 100 - \left(\frac{I.C. \text{ del grupo experimental}}{I.C. \text{ del grupo control}} \right) \times 100$$

RESULTADOS

Se encontró que la fase logarítmica de crecimiento se inició al 4^{to} día de inoculación en ambas poblaciones, alcanzando un nivel máximo de 995000 epimastigotes/mL y 912000 epimastigotes/mL, para las poblaciones Tz-1 y Tz-2, respectivamente, a los 16 días post inoculación en medio BHI (Fig. 1). Respecto de la susceptibilidad a la violeta de genciana, se encontró que ambas poblaciones presentaron susceptibilidad a las concentraciones de 10.0ug/mL y 100.0ug/mL, en el 99.9 y 100.0%, respectivamente (Tabla 1).

DISCUSIÓN

Como se sabe, *T. cruzi* metaboliza la glucosa y otros azúcares mediante la vía glicolítica en condiciones aeróbicas con excreción de ácidos orgánicos y que para ello requiere de minerales, proteínas y vitaminas presentes en el medio para su crecimiento, sobreviviendo en forma de epimastigotes a temperatura de $24-28^\circ\text{C}$, a $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$ ^{13,17,22}. Muchos de estos elementos se encuentran en el medio de cultivo utilizado lo

que permitió obtener un adecuado crecimiento de las formas epimastigotes de ambas poblaciones, Tz-1 y Tz-2, con una concentración máxima de 995000 epimast/mL y 912000 epimast/mL, respectivamente, valores mayores a los alcanzados por Saldaña et al ¹³ quienes utilizaron el mismo medio y obtuvieron, en promedio, 155000 epimast/mL. Sin embargo con el uso de otros medios de cultivo, como el medio LIT, se han encontrado que cepas de distintos países pueden alcanzar valores de crecimiento mayores: entre 2'000,000 y 28'000,000 epimast/mL ^{8,10,15}.

Tabla 1. Susceptibilidad de epimastigotes derivadas de poblaciones Tz-1 y Tz-2 de *Trypanosoma cruzi* aisladas de *Panstrongylus chinai* de Zaña, Lambayeque, Perú, a violeta de genciana.

Violeta de genciana (ug/MI)	Población Tz-1		Población Tz-2	
	% C	% R	% C	% R
0.01	97.92	0	96.50	0
0.10	83.99	0	80.24	0
1.00	36.59	0	38.58	0
10.00	0	99.99	0	99.99
100.00	0	100.00	0	100.00

(%R)= porcentajes de reducción y (%C)= porcentajes de crecimiento, respecto a los controles.

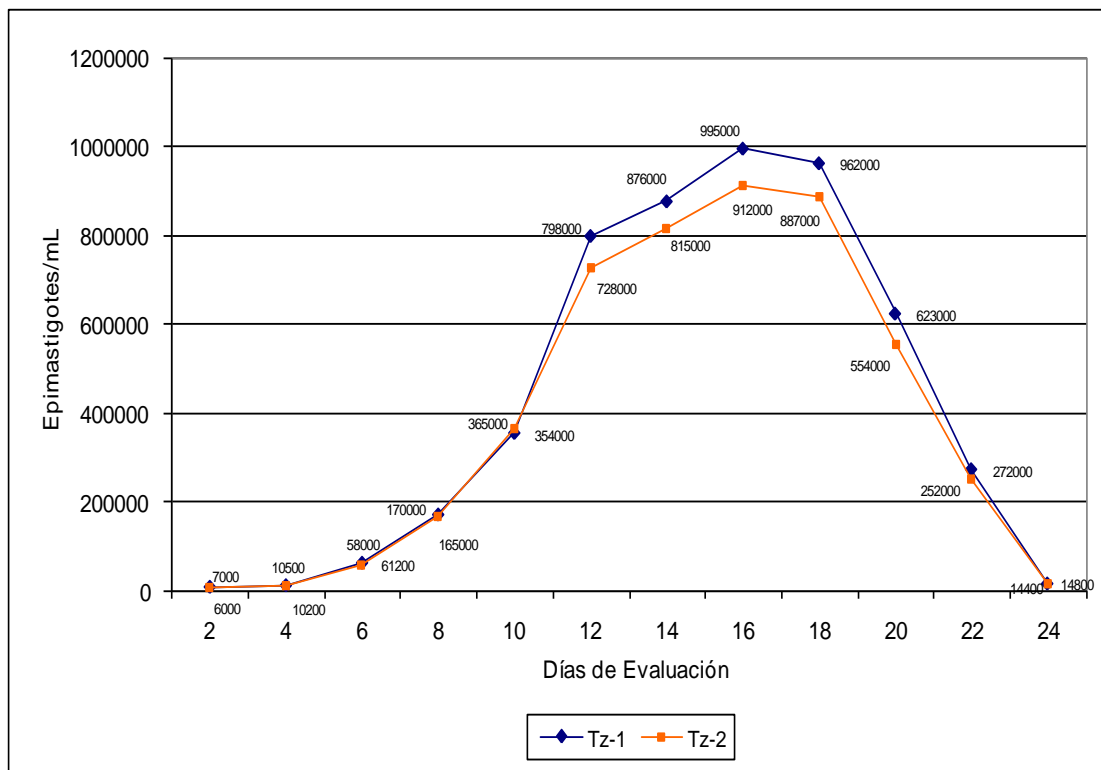


Fig. 1. Crecimiento de epimastigotes de las poblaciones Tz-1 y Tz-2 de *Trypanosoma cruzi*, procedentes de Zaña-Lambayeque-Perú, en medio de cultivo BHI.

Todo ello permite afirmar que el tipo de medio empleado es la primera razón que permite explicar los resultados obtenidos y la sangre empleada para suplementar el medio, la segunda, ya que se ha encontrado que algunas cepas del parásito para su óptimo crecimiento necesitan hemoglobina humana o de otra procedencia específica ^{15,25}. Adicionalmente, como producto del metabolismo intermediario, el parásito

produce gran cantidad de algunos ácidos orgánicos (acetato, succinato, L-alanina, ácido láctico, etanol, glicerol) que estarían acidificando el pH del medio, aspecto que variaría en cada población debido a que cada una de ellas produciría distintas sustancias y en cantidades distintas ^{13,25}

El metabolismo de los kinetoplastidos se caracteriza por un excepcional grado de flexibilidad, hecho que les confiere a responder adecuadamente a los cambios nutricionales drásticos; para ello, los peroxisomas crecen y se multiplican por fisión nuclear y después de ello estos organelos maduros pierden su capacidad de incorporar proteínas adicionales, de manera que para lograr ello el organismo prepara nuevos glicosomas adaptados a una nueva situación: organelos con un diferente set de enzimas cuya expresión es inducida por las alteraciones de las condiciones de crecimiento. Similarmente la degradación de estos organelos es inducible y selectiva, así los glicosomas viejos son eliminados removidos por astofagia^{17,18}. Implicando que estas poblaciones de *T. cruzi* (Tz-1 y Tz-2) tendrían un comportamiento similar de reemplazo de los glicosomas viejos y una buena adaptabilidad a los cambios en su medio, pero al comparar con otras poblaciones de distintos países^{9,15}, estarían presentando una variedad genética en la velocidad de reemplazo de glicosomas nuevos adaptados a las nuevas condiciones del medio ^{18,23,25,26}.

Tan involucrados en el metabolismo como los glicosomas, se hallan los reservosomas, organelos de reserva energética presente en el parásito y que almacena macromoléculas ingeridas, las cuales pueden ser usadas en el proceso de transformación ^{23,25}, lo que implicaría que el tamaño de las reservosomas en la población Tz-2 sea relativamente menor a la población Tz-1, haciendo que el nivel de crecimiento sea un poco menor; asimismo, observándose aún presencia de formas sanguíneas en su morfología normal así como en proceso de conversión a epimastigotes, durante más días, en la población Tz-2.

Finalmente, el otro organelo implicado también en el metabolismo es el acidocalcisoma, el cual es un organelo acumulador de energía conteniendo una gran cantidad de Ppi inorgánico en vista de la presencia de una H⁺- ATPasa en la membrana del acido calsisoma, jugando un papel en la regulación del pH citoplasmático y como centro de la osmoregulación del parásito ^{23,25,26}.

La resistencia de *T. cruzi* a drogas quimioterapéuticas como nifurtimox, benznidazol además del violeta de genciana varía de 0% a 100% y esto puede ser relacionado a la preferencia miotrópica de cepas y predominancia de formas sanguíneas gruesas, dentro de las cuales las cepas sensibles son miotrópicas como reticulotrópicas mostrando predominancia de formas delgadas, además, algunos aspectos como la variación en la absorción y metabolismo de la droga, el estado morfológico del parásito pueden ser implicados ^{4,14,15}.

El crecimiento encontrado en las tres primeras concentraciones de violeta de genciana en porcentajes distintos y reducción en las dos de mayor concentración es similar a lo hallado en la cepa GM aislada en Brazil que presentó un máximo crecimiento también a los 16 días de inoculación y presencia de crecimiento en las mismas concentraciones del colorante (0.01, 01 y 1.0 ug/mL), así como a las cepas RAL y MC obtenidas en Bolivia que, a pesar de tener su pico máximo de crecimiento en días anteriores (entre 9 y 11 días de inoculación), muestran igualmente tendencia a mantener su crecimiento en porcentajes variables, a las mismas concentraciones del colorante ¹⁰. Esto estaría relacionado con el tipo de parásito presente en el huésped vertebrado experimental: el modelo ratón, el cual cuando se infecta con las poblaciones obtenidas en el ambiente natural muestra predominio de las formas gruesas de tripomastigota sanguíneo ^{14,15}.

A manera de conclusión, en base a los hallazgos, se podría indicar que las poblaciones investigadas en el presente trabajo alcanzan un óptimo crecimiento máximo al 16° día postinoculación, con una fase logarítmica estable y bastante prolongada en medio bifásico BHI, que muestran susceptibilidad alta a las concentraciones de 10.0 ug/mL y 100.0 ug/mL de violeta de genciana. Por lo tanto, se podría recomendar

el uso de este medio en trabajos in vitro con poblaciones nativas del parásito aisladas de diferentes zonas del país y el uso de las concentraciones encontradas efectivas de violeta de genciana únicamente en bancos de sangre de hospitales o como controles en la evaluación in vitro de la susceptibilidad de poblaciones nativas de *T. cruzi* aun no investigadas a agentes quimioterapéuticos conocidos o en fase de prueba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moncayo A, Silveira S. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Instituto Oswaldo Cruz 2009; 104(Suppl. 1):17-30
2. Rassi Jr A, Marin-Neto JA. Chagas Disease. Lancet 2010; 375: 1388-1402
3. Carod-Artal FJ, Gascon J. Chagas Disease and stroke. Lancet Neuro J 2010; 9: 533-542
4. Lescure FX, Le Loup G, Freiløj H, Develoux M, Paris L, Brutus L, et al. Chagas Disease: changes in knowledge and management. Lancet Infect Dis 2010; 10: 556-570
5. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO Press, Geneva. 2010
6. Bayer AM, Hunter GC, Gilman RH, Cornejo del Carpio JG, Naquira C, Bern C, Leoy MC: Chagas Disease, migration and community settlement patterns in Arequipa, Peru. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3(12): e567
7. Ancca J, Vega S, Pinto J, Náquira C. Caracterización genética de *Trypanosoma cruzi* aislado de triatomíneos de áreas endémicas de la enfermedad de Chagas en el Perú. Rev Ibero-latinoam parasitol 2009; 1:8-14
8. Botero LA, Mejia AM, Triana O. Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. Biomédica 2007; 27(Supl. 1): 64-74
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(7): 1051-1054
10. Martínez D R, Escario J, Nagal R and Gómez B A. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(1): 53-59.
11. Bertoli M, Hitomi A M, De Ornelas T M, Marques D S and Lucia G M. Infectivity for mice of *Trypanosoma cruzi* I and II strains isolated from different hosts. Parasitol Res 2006; 99: 7-13.
12. Díaz-Limay E, Escalante H, Jara CA. Niveles de parasitemia y alteraciones hitopatológicas en *Mus musculus* BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del valle Chaman, La Libertad, Perú. Parasitol Latinoam 2004; 59: 153-158
13. Saldaña C, Cordova O, Vargas F. Utilización de *Lepidium peruvianum*, maca, como medio de cultivo para el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2006; 23(2): 137-140
14. Rodríguez-Morales AJ. Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2005; 22(2): 123-133
15. Zulantay AI, Apt W. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Rev Med Chile 2011; 139: 247-257
16. Cardoso J, Soares MJ. In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105(8): 1026-1032
17. Escobar P. Leal SM, Herrera LV, Martinez JR, Stashenko E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. Essential oils and their major components. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105(2): 184-190
18. Rojas J, Solis H, Palacios O. Evaluation in vitro de las actividades anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. An Fac med 2010; 71(3): 161-165
19. Herrera C, Vallejos GA, Loaiza R, Zeledon R, Urbina A, Sepulveda-Boza S. In vitro activity of thyenil-2 nitropropene compounds against *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(7): 980-985

20. Da Silva CF, Da Silva PB, Batista MM, Dalioy A, Tidwell RR, Soeiro MNC. The biological in vitro effect and selectivity of aromatic dicationic compounds on *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105(3): 239-245
21. Martínez D R, Escario J, Nagal R and Gómez B A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(1): 53-59.
22. Jara C, Escalante H, Díaz E y Roldán J. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en el valle de Zaña, Lambayeque-Perú. SCIENDO 2002; 5: 9-21.
23. Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes F R and Michels P A M. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in kinetoplastida. Kinetoplastid Biol & Dis 2003; 2:1-30.
24. Lauria P L, Santana J M, Tavares F S and Texeira A R L. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients: I behavioral characterization in vitro. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30(3):187-192.
25. Maya JD, Cassals BK, Hurriaga-Vasquez P, Ferreira J, et al. Mode of action on natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp Biochem & Physiol, Part A, 2007; 146: 601-620
26. Junior COR, Alves RO, Rezende CAM, da Costa CF, et al. Trypanocidal activity of lipophilic diamines and amino alcohols. Biomedic & Pharmacoterp 2010; 64: 624-626