

## Cinética de crecimiento *in vitro* de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en células miocárdicas de roedores con diferente susceptibilidad

Rafael-Oswaldo Angel B.<sup>1</sup>, Misael Chinchilla C.<sup>2\*</sup>, Olga Marta Guerrero B.<sup>2</sup> & Alfredo Castro C.<sup>2</sup>

1 Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador. Fax: (503) 225-8822; rangel@elsalvador.com

2 Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, CIET, Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, 2060, San José, Costa Rica. Teléfono 506-207-42-77. Fax: 506-225-23-74. \*Correspondencia.

Recibido 22-VII-2004. Corregido 18-XI-2005. Aceptado 11-V-2006.

**Abstract:** *In vitro* growth kinetics of two *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) clones in myocardial cells from rodents of different susceptibility. Two *Trypanosoma cruzi* isolates, TCR-4 from Costa Rica and UES-1 from El Salvador, were studied *in vitro* to compare their infectivity or resistance and intracellular replication in myocardial cells in three strains of mice and rats: NGP white mice, C<sub>3</sub>H mice and Sprague Dowley rats. Myocardial cells were cultured on coverslips at 37 °C in a humid 10% CO<sub>2</sub> atmosphere and then infected at a ratio of one tripomastigote per cell. Samples were studied after 24, 72, 96 and 120 h of infection to determine parasite infection capacity and intracellular multiplication. Both parasites had the highest infection capacity in C<sub>3</sub>H mice, followed by NGP mice cells with a very low infection rate. Lastly, almost no *Trypanosoma cruzi* multiplication was observed in Sprague Dowley rats, suggesting a strong natural resistance in this animal to both strains of the parasite. The UES-1 isolate presented higher multiplication and greater invasion than the TCR-4 strain, showing greater virulence of UES-1 in heart cells, at least *in vitro*. Rev. Biol. Trop. 55 (1): 121-126. Epub 2007 March. 31.

**Key words:** Trypanosomatidae, *Trypanosoma cruzi*, heart cells, cell culture.

Durante su complejo ciclo de vida, *Trypanosoma cruzi* alterna entre hospederos invertebrados y vertebrados en los cuales establece la infección (Zingales y Colli 1985). Las formas encontradas en los vertebrados son parásitos intracelulares obligados que invaden y se replican en una gran variedad de células fagocíticas y no fagocíticas (Sadigursky 1999, Scharfstein y Morrot 1999). Aunque *T. cruzi* puede parasitar cualquier tipo de célula, su desarrollo en las células musculares cardíacas es importante, ya que su presencia en este tipo de células tiene un papel preponderante en las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas (Andrade 1999b). También se ha

determinado que existe una participación muy activa de las células cardíacas en su respuesta a la infección con *T. cruzi*, ya que al cultivarlas, en presencia de varias citoquinas, se observan diferencias importantes en la multiplicación del parásito en ellas (Postani *et al.* 1999). También es importante mencionar que las células de diferentes animales o aún de diferentes órganos en el mismo animal, presentan variaciones en el crecimiento de *T. cruzi*, lo cual ha sido demostrado en ciertas especies de roedores (Araujo *et al.* 1976, Chinchilla *et al.* 1995). Sobre la base de estos estudios y empleando un modelo *in vitro* descrito por Reyes y Chinchilla (1987), este estudio compara la multiplicación de dos

cepas de *T. cruzi* en células miocárdicas de varias especies de roedores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Parásitos:** Se utilizaron dos cepas, un aislamiento de *T. cruzi* de El Salvador (UES-1) obtenido de un niño en fase aguda en el departamento de Santa Ana, El Salvador en 1999 y otro aislamiento hecho en Costa Rica en 1987 (TCR-4) de un ejemplar de *Triatoma dimidiata*; ambas cepas son mantenidas por pases sucesivos cada 25 días en ratones C<sub>3</sub>H.

**Animales:** Se utilizaron ratones C<sub>3</sub>H de 20-25 g de peso para la obtención de tripomastigotos. Además ratones blancos NGP, ratones C<sub>3</sub>H y ratas Sprague Dowley de 2-4 días de nacidos para los correspondientes cultivos de células.

**Cultivo de células miocárdicas y modelo de infección:** Se realizó una disección de los animales recién nacidos bajo condiciones asépticas y los corazones se colocaron en una solución de Hanks (HBSS) a 4°C, lavándose una vez en dicha solución y para posteriormente cortarlos en pequeñas porciones y luego colocarlos cuidadosamente en frascos de Erlenmeyer para su tripsinización por 10 min a 37 °C. Este procedimiento se repitió dos veces más y se recolectó al final del proceso el sobrenadante en Minimal Essential Medium (SIGMA ®) más 10 % de suero fetal bovino con 10-100 UI de penicilina, 0.01 mg de estreptomycin y 0.025 µg de anfotericina B por ml (MEM-SFB). La suspensión celular se centrifugó a 800 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml de MEM-SFB, colocándose posteriormente en botellas de cultivo estériles, las cuales se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> por 24 h. Luego se agregaron 8 ml de MEM-SFB, se volvió a incubar por otras 24 h y después de este tiempo, se descartó el medio líquido, se agregaron 10 ml de medio y se incubó por 24 a 48 h hasta que se formara una monocapa. Para pasar las células a cubreobjetos, las botellas de cultivo se trataron con tripsina 0.25 % a 37 °C

con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> hasta que la monocapa se desprendiera. Posteriormente se colocó 0.1 ml de esta suspensión en cubreobjetos 22 x 22 mm y se incubaron 24 h a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> para su infección posterior (Reyes y Chinchilla 1987). Después de incubar por 24 h las células en cubreobjetos se infectaron con 0.1 ml de suspensión de tripomastigotos sanguíneos (derivados de ratones C<sub>3</sub>H infectados previamente con las respectivas cepas) en MEM-SFB, en una proporción de un parásito por célula miocárdica y se incubaron a 37 °C con 5-10 % de una atmósfera de CO<sub>2</sub>. Los cubreobjetos se retiraron (por duplicado) a las 24, 72 y 96 h lavándolos cuidadosamente con HBSS y fueron teñidos adecuadamente con Giemsa (1ml de colorante de Giemsa más 9 partes de buffer de fosfatos pH 7.2). Los controles consistieron en cultivos de células miocárdicas de animales sanos de cada especie de roedor. Cada cubreobjeto se examinó por microscopía de luz (lente 100 x) contándose en cada uno 500 células; de esta manera se estableció el número de células infectadas y el número de parásitos intracelulares totales lo que permitió calcular el número de parásitos por 100 células (población total), el número de parásitos por células infectadas y la tasa de multiplicación. Este valor se calculó dividiendo el número de parásitos intracelulares después de 120 h entre el número de parásitos después de 24 h. Las diferencias observadas entre los índices de reproducción del parásito en las células de los tres animales se evaluaron mediante la prueba de t de Student para comparación de promedios independientes utilizando niveles de confianza del 95 %.

## RESULTADOS

En los cuadros 1 y 2 se observa la multiplicación de los aislamientos de *T. cruzi* en células de corazón de los tres roedores, ratón C<sub>3</sub>H (RT C<sub>3</sub>H), ratón NGP (RT NGP) y rata blanca Sprague Dowley(R). En los tres animales la cantidad de parásitos por células cardíacas infectadas a las 24 h fue similar, pero el número

CUADRO 1  
*Curva de crecimiento de T. cruzi TCR-4 en células cardiacas*

TABLE 1  
*Growth curve of T. cruzi TCR-4 in heart cells*

Animal	Tiempo de infección	Células contadas			Parásitos	
		Totales	Infectadas	Intracelulares	/100 células	/100 células infectadas
R	24	501	2	2	0.4	100
	72	503	1	1	0.2	100
	96	500	4	4	0.8	100
	120	500	4	5	1.0	125
RT NGP	24	510	2	3	0.6	150
	72	500	4	6	1.2	150
	96	505	8	16	3.2	200
	120	503	10	28	5.6	280
RT C <sub>3</sub> H	24	504	15	15	3.0	100
	72	507	19	49	9.7	258
	96	515	25	75	14.6	300
	120	510	56	425	83.3	759

RT C<sub>3</sub>H: ratón C<sub>3</sub>H; RT NGP: ratón NGP; R: rata.  
 RT C<sub>3</sub>H: C<sub>3</sub>H mouse; RT NGP: NGP mouse; R: rat.  
 TCR-4-cepa de Costa Rica.  
 TCR-4-parasite clone from Costa Rica.

de parásitos intracelulares a las 72, 96 y 120 fue diferente y mucho más obvio en las células cardiacas de RT C<sub>3</sub>H a las 72 h después de la infección, especialmente las células infectadas con la cepa UES. En las células de corazón de R, el número de parásitos intracelulares permaneció casi constante durante el experimento, aunque como se observa en el cuadro 2 la multiplicación de esta cepa (UES) fue muy baja. Es necesario señalar que después de 120 h, la mayoría de las formas intracelulares fueron amastigotos; sin embargo, en pocos casos, se observaron tripomastigotos en el interior de las células, especialmente en lo referente a las células cardiacas de RT C<sub>3</sub>H, en las que se observaron tripomastigotos libres como resultado de la alta multiplicación del parásito y probable lisis de algunas células. En el cuadro 2 se observa que la cepa TCR-4 infectó menor cantidad de células en comparación con la cepa UES. Un comportamiento similar se observó

con respecto a la multiplicación intracelular de la cepa TCR-4.

La tasa de multiplicación de los parásitos por 100 células cardiacas infectadas indican una mayor multiplicación de la cepa *T. cruzi* (UES) en RT C<sub>3</sub>H que la cepa TCR4. Aunque en las células de corazón de R se evidenció multiplicación, ésta fue muy baja para ambas cepas (Cuadro 3). La tasa de multiplicación 24/120 h en células de corazón de RT C<sub>3</sub>H fue mayor para *T. cruzi* (UES) que el mostrado por la otra cepa (83.3) (Cuadro 3). Esta misma situación se repite también a las 72 y 96 h de infección, no obstante valores de multiplicación intermedios fueron observados en células de corazón de RT NGP. Puede verse también que hubo una mayor multiplicación en las células de corazón de RT NGP por parte de *T. cruzi* (UES) que la mostrada por *T. cruzi* (TCR-4); ambas cepas mostraron índices de multiplicación similares en células de corazón de R (Cuadros 1 y 2).

CUADRO 2  
*Curva de crecimiento de T. cruzi UES en células cardiacas*

TABLE 2  
*Growth curve of T. cruzi UES in heart cells*

Animal	Tiempo de infección	Células contadas		Parásitos		
		Totales	Infectadas	Intracelulares	/100 células	/100 células infectadas
R	24	505	2	2	0.4	100
	72	503	2	2	0.4	100
	96	500	4	4	0.8	100
	120	510	4	5	1.0	125.0
RT NGP	24	500	4	5	1.0	125
	72	500	14	18	3.6	129
	96	500	12	48	9.6	400
	120	500	32	126	25.2	394
RT C <sub>3</sub> H	24	500	16	22	4.4	138
	72	500	39	78	15.6	200
	96	500	51	215	43.0	422
	120	500	62	892	178.4	1439

RT C<sub>3</sub>H: ratón C<sub>3</sub>H; RT NGP: ratón NGP; R: rata.  
 RT C<sub>3</sub>H: C<sub>3</sub>H mouse; RT NGP: NGP mouse; R: rat.  
 UES. cepa de El Salvador.  
 UES. parasite clone from Costa Rica.

CUADRO 3  
*Multiplicación de cepas de T. cruzi en células cardiacas*

TABLE 3  
*Multiplication of T. cruzi parasite clones in heart cells*

<i>T. cruzi</i>	Animal	Parásitos/100 células (Infección con <i>T. cruzi</i> )		
		24 h	120 h	Tasa120/24 h
UES*	RT C <sub>3</sub> H	4.4	178.4	<b>40.5</b>
	R	0.4	1	<b>1.25</b>
TCR-4**	RT NGP	1	25.0	<b>9.33</b>
	R	0.4	1	<b>1</b>

RT C<sub>3</sub>H: ratón C<sub>3</sub>H; RT NGP: ratón NGP; R: rata.  
 RT C<sub>3</sub>H: C3H mouse; RT NGP: NGP mouse; R: rat.  
 \* cepa del El Salvador  
 \* parasite clone from El Salvador  
 \*\* cepa de Costa Rica  
 \*\* parasite clone from Costa Rica

## DISCUSIÓN

Se ha propuesto que la diversidad molecular existente en cepas de *T. cruzi* puede afectar el funcionamiento de los tejidos y órganos que infectan, como se evidencia por el hecho de que infecciones con cepas de parásitos pertenecientes a diferentes grupos fenotípicos, inducen distintos patrones histopatológicos en ratones infectados (Andrade 1999a, De Luca *et al.* 1993). Es así como estudios desarrollados con cepas de laboratorio sugieren que la expresión variable de la enfermedad de Chagas puede ser influenciada por la genética y la diversidad biológica de clones de *T. cruzi*, circulantes en reservorios selváticos y domésticos (Macedo y Pena 1998, Magalhaes *et al.* 1996). La posibilidad de variantes en la virulencia debida a la presencia de clones claramente definidos se ha comprobado, por lo menos en la cepa salvadoreña, ya que se han determinado clones con diferente grado de infectividad para macrófagos (Calderón-Arguedas *et al.* 2002). En Centroamérica no se han llevado a cabo estudios de este tipo, debido probablemente a que los cuadros clínicos descritos en algunos países no son tan dramáticos como los ocurridos en Sudamérica, aunado a la falta de recursos económicos en los institutos de investigación (Bloch 1982).

El patrón de crecimiento típico en células cardíacas de ratones C<sub>3</sub>H por parte de *T. cruzi* fue descrito en los trabajos realizados por Reyes y Chinchilla (1987). Estos investigadores utilizaron solamente una especie de animal, pues los objetivos eran otros, mientras que en este estudio se compara tal multiplicación en diferentes cepas de animales de laboratorio. La diferencia en multiplicación de *T. cruzi* en los tres tipos de animales (Cuadro 3), nos permite razonar lo siguiente: debido a que las células cardíacas no realizan mecanismos de defensa como los macrófagos (Bogdan y Rollinghof 1999, Dos-Reis 1997, Israelski *et al.* 1990), los resultados indican una resistencia natural a la infección de las células cardíacas de ratón en NGP y más marcada en rata blanca. La

diferencia, en cuanto a la susceptibilidad de diversos animales, de permitir la multiplicación de parásitos tales como el *Toxoplasma gondii*, había sido demostrado en células no fagocíticas pero no en células cardíacas (Chinchilla *et al.* 1995). Aunque conocido el patrón antes mencionado, no se conoce de trabajos en los que se comparan el crecimiento de *T. cruzi* en células de corazón de roedores. Con anterioridad se había informado de la resistencia natural de la rata blanca ante la multiplicación de algunos protozoarios (Chinchilla *et al.* 1981, 1995) lo cual se correlaciona con los resultados aquí obtenidos, ya que se observó que las células cardíacas de rata son también muy resistentes a la multiplicación de *T. cruzi*. Probablemente esta resistencia natural está genéticamente determinada y no depende de factores extrínsecos provenientes de la capacidad de infección del parásito. Está generalmente aceptado que las propiedades de la infección de *T. cruzi* son el resultado de la interrelación entre cepas de parásito y las especies de hospederos. Los resultados obtenidos en este estudio parecen ratificar este principio. Según los resultados *T. Cruzi* (UES) parece ser una cepa con una tasa alta de multiplicación en las células cardíacas de ratón C<sub>3</sub>H, además de poseer una mayor capacidad de invadir dicho tipo celular que *T. cruzi* (TCR-4). Estas diferencias entre la virulencia de estas cepas en cultivos *in vitro* de células de corazón y debido a la alta capacidad de infectar células cardíacas por parte de la cepa UES, parece conveniente realizar investigaciones de diferenciación de biotemas de cepas aisladas de pacientes salvadoreños con enfermedad de Chagas crónica y analizar mediante un modelo animal, la predilección por el tejido cardíaco.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado en parte por la Vicerrectoría de la Universidad de Costa Rica a través del proyecto No. 803-A2-042 y de acuerdo con el convenio Universidad de Costa Rica-DAAD.

## RESUMEN

Dos cepas de *Trypanosoma cruzi*, una originaria de Costa Rica (TCR-4) y otra de El Salvador (UES-1) fueron comparadas *in vitro* en cuanto a su infectividad y multiplicación en células miocárdicas de ratón blanco NGP, ratón C<sub>3</sub>H y rata Sprague Dowley con el fin de determinar la resistencia natural de las células de estos animales. Las células miocárdicas fueron cultivadas en cubreobjetos y posteriormente infectadas con tripomastigotos sanguíneos de la cepa respectiva en una relación de un parásito por célula miocárdica y posteriormente incubados a 37 °C con 10 % de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. Para determinar la capacidad infectante y multiplicación intracelular se analizaron muestras a las 24, 72, 96 y 120 h de infección, determinándose la curva de crecimiento y la tasa de multiplicación intracelular. Se encontró que las dos cepas fueron capaces de multiplicarse en las células miocárdicas de ratón C<sub>3</sub>H, muy poco en ratón NGP y prácticamente nada en rata, lo que sugiere una resistencia natural de las células de estos últimos dos animales. La cepa UES-1 tuvo una tasa de multiplicación e invasión mayor (p=0.001) sugiriendo por lo tanto una virulencia, al menos *in vitro* superior a la cepa TCR-4.

**Palabras clave:** Trypanosomatidae, *Trypanosoma cruzi*, células cardíacas, cultivo de células.

## REFERENCIAS

- Andrade, S.G. 1999a. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94 (Suppl 1.): 185-187.
- Andrade, Z.A. 1999b. Immunopathology of Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94 (Suppl 1.): 71-80.
- Araujo, F.G., D.M. Williams, F.C. Grumet & J.S. Remington. 1976. Strain dependent differences in murine susceptibility to *Toxoplasma*. Infect. Immun. 13: 1528-1530.
- Bloch, M. 1982. Conclusiones del estudio de la tripanosomiasis aguda y crónica. Rev. Inst. Invest. Med. 11: 180-183.
- Bogdan, C. & M. Rölinghoff. 1999. How do protozoan parasites survive inside macrophages. Parasitol. Today. 15: 22-28.
- Calderón-Arguedas, O., A. Troyo, I. Valerio & M. Chinchilla. 2002. Heterogeneidad clonal en epimastigotos de una cepa centroamericana de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Parasitol. Latinoam. 57: 40-45.
- Chinchilla, M., M. Alfaro & O.M. Guerrero. 1981. Adaptación natural de la rata blanca a *Toxoplasma gondii*. Rev. Biol. Trop. 29: 273-282.
- Chinchilla, M., L. Reyes & O.M. Guerrero. 1995. Resistance to intracellular parasites correlates with species differences in ability of macrophages to inhibit parasite replication. Immunol. Infect. Dis. 5: 83-87.
- De Luca D'oro, G.M., C.N. Gardenal, B. Berret & J.V. Crisci. 1993. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations for Argentina estimated from enzyme polymorphism. Parasitol 107: 405-410.
- DosReis, G.A. 1997. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitol. Today. 13: 335-342.
- Israelski, D.M., F.G. Araujo, J.S. Wachtel, L. Heinrichs & J.S. Remington. 1990. Differences in microbicidal activities of human macrophages against *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 58: 263-265.
- Macedo, A.M. & S.D.J. Pena. 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitol. Today. 14: 119-123.
- Magalhaes, J.B., S.G. Andrade & I. Sherlock. 1996. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after pasaje into autochthonous or foreign species of triatomine (Biological and biochemical patterns). Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 38: 23-28.
- Postani, M., M.R. Arnaiz & L.E. Fichera. 1999. Respuesta de las células cardíacas a la infección con *Trypanosoma cruzi*. Medicina. 59 (Suppl II.): 57-62.
- Reyes, L. & M. Chinchilla. 1987. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* in cultured murine myocardial cells mediated by a specifically induced lymphokine. Infect. Immun. 55: 1513-1516.
- Sadigursky, M. 1999. Evolution on the immunopathology of Chagas' disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94:277-278.
- Scharfstein, J. & A. Morrot. 1999. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas' disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94: 51-63.
- Zingales, B. & W. Colli. 1985. *Trypanosoma cruzi*: interaction with Host Cells. Cur. Top. Microbiol. Immunol. 117: 129-52.