

## ARTICULO

**Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* Dm28c en medio ML15-HA: Análisis proteico, glicoproteico y antigénico**

Diana Graterol, Dioglenny Ramírez, Andrea Ramos, Rosa Yanet Arteaga, Oriana Mundaray, Wilmer Pineda, María Consuelo Navarro, María Isabel Domínguez, Ana Rita De Lima, Víctor Tulio Contreras.

Laboratorio de Protozoología. Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Venezuela.

**Correspondencia:** Diana L. Graterol R.

**E-mail:** dianagraterol@hotmail.com

## RESUMEN

El medio ML15-HA permite simular *in vitro* los eventos morfogenéticos del ciclo vital de *T. cruzi*. Se ha evidenciado que los cambios morfológicos de la epimastigogénesis del clon Dm28c de *T. cruzi* en ML15-HA, ocurren más rápidamente que para otros aislados. Nuestro propósito fue investigar si los cambios macromoleculares ocurren concomitantemente con la rápida transformación morfológica. Tripomastigotas derivados de células infectadas se incubaron por diferentes tiempos en medio ML15-HA a 27°C. Los cambios morfológicos se determinaron por microscopía de contraste de fases y coloración con Giemsa. Los perfiles peptídico y glicopeptídico se analizaron mediante SDS-PAGE y coloraciones específicas. Los cambios antigénicos se estudiaron mediante Western blot usando sueros anti-Tripomastigotas y anti-Epimastigotas. Los resultados muestran: (1) caída del porcentaje de tripomastigotas e incremento de amastigotas en las primeras 24 horas, con incremento gradual de epimastigotas a partir de 48 horas; (2) tres perfiles peptídicos y glicopeptídicos diferentes: tripomastigotas, epimastigotas a partir del día 4, y un perfil intermedio los días 2 y 3, demostrando la estrecha correlación entre los eventos morfológicos y los cambios proteicos y glicoproteicos; (3) los perfiles antigénicos revelaron

estrecha relación entre los cambios morfológicos y la expresión de antígenos estadio-específicos. Los resultados obtenidos evidencian de manera concluyente que los cambios moleculares son más acelerados para el clon Dm28c en medio ML15-HA que en otros medios. Estos hallazgos abren la interrogante, si la velocidad de la epimastigogénesis está determinada por la constitución genética del aislado o por la riqueza nutricional del medio de diferenciación.

**Palabras Clave:** *Trypanosoma cruzi*, Epimastigogénesis, Medio ML15-HA.

## ABSTRACT

***Trypanosoma cruzi* Dm28c Epimastigogenesis in ML15-HA medium: protein, glycoprotein and antigen analyses**

The ML15-HA medium allows simulate *in vitro* morphogenetic events in the life cycle of *T. cruzi*. It has been demonstrated that the morphological changes of epimastigogenesis in ML15-HA of the *T. cruzi* clone Dm28c, occur faster than for other isolates. Our purpose was to investigate whether macromolecular changes occur concomitantly with rapid morphological transformation. Trypomastigotes derived from infected cells were incubated for different times in ML15-HA medium at 27°C. Morphological changes were determined by phase contrast microscopy and staining with Giemsa. Peptide and glycopeptide profiles were analyzed by SDS-PAGE and specific staining. Antigenic changes were studied by Western blot using serum anti-trypomastigotes and anti-epimastigotes. The results show: (1) decline in the percentage of trypomastigotes and amastigotes increased in the first 24 hours, epimastigotes gradually increases from 48 hours, (2) three peptide and glycopeptide profiles different: trypomastigotes, epimastigotes from the day 4 and an intermediate profile on days 2 and 3, showing the close correlation between morphological events and protein and glycoprotein changes, (3) antigenic profiles showed close relationship between the morphological changes and the expression of stage-specific antigens. The results show conclusively that the molecular changes are more rapid for clone Dm28c in ML15-HA medium than in other media. These findings open the question, if the epimastigogenesis speed is determined by the genetic constitution of isolated or nutritional wealth differentiation medium.

**Key Words:** *Trypanosoma cruzi*, Epimastigogenesis, ML15-HA medium.

## INTRODUCCIÓN

El estudio de los cambios moleculares que ocurren durante la transformación morfológica de los estadios del ciclo vital del *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Tripanosomiasis Americana, es importante para implementar medidas racionales en el combate de la enfermedad de Chagas. *T. cruzi* durante su ciclo evolutivo muestra cuatro estadios morfológica y fisiológicamente distinguibles, resultado de los procesos de diferenciación que ocurren en el vector y el hospedador vertebrado. Así, los epimastigotas se transforman en metacíclicos por el proceso de metaciclogénesis (1,2), los metacíclicos en amastigotas por amastigogénesis primaria (3), los tripomastigotas sanguíneos en amastigotas por amastigogénesis secundaria (4) y los tripomastigotas sanguíneos en epimastigotas por la epimastigogénesis que ocurre en el tracto intestinal del insecto vector.

Los procesos de transformación morfológica y molecular de *T. cruzi* pueden ser estudiados *in vitro* e *in vivo*, en parásitos mantenidos bajo condiciones controladas en el laboratorio simulando los eventos que ocurren en la naturaleza (5-7), se ha demostrado que factores como temperatura, pH, tensión de oxígeno y estrés nutricional disparan esos procesos de diferenciación (5,8-9). Sin embargo, no se encontraron estudios comparando la cinética de transformación morfológica ni molecular entre aislados de diferentes fuentes epidemiológicas en un medio de cultivo común que permita simular *in vitro* todos los procesos de diferenciación. Llama la atención que en la bibliografía consultada no se hayan reportado estudios indicando que en una especie, un mismo proceso de diferenciación ocurra a velocidades diferentes.

Gigante y Contreras (10,11) trabajando con el clon Dm28c de *T. cruzi* procedente de un

rabipelado (reservorio de la enfermedad de Chagas), caracterizado parasitológicamente y perteneciente al linaje filogenético Tc1 (12,13), quien además es modelo de referencia para estudios de morfogénesis (14), estandarizaron su cultivo y condiciones de diferenciación en medio ML15-HA (10,11); un medio base que se emplea rutinariamente para cultivo de células embrionarias de insecto (15).

Ellos estandarizaron las condiciones para inducir tres de los cuatro procesos de morfogénesis del ciclo vital de *T. cruzi* y evidenciaron que la epimastigogénesis del clon Dm28c de *T. cruzi* también cursa con la aparición de una morfología de transición previo a su diferenciación en epimastigota, como había sido previamente reportado para otros aislados en otros medios de diferenciación (16,17). Gigante y Contreras (10,11) además evidenciaron que los eventos morfológicos ocurren muy rápidamente en medio ML15-HA.

De ahí el interés de estudiar los eventos a nivel molecular que ocurren en el clon Dm28c para examinar si los cambios proteicos, glicoproteicos y antigénicos ocurren concomitantemente con los cambios morfológicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Parásitos y estadios:** Se trabajó con el clon Dm28c de *T. cruzi* aislado por hemocultivo de un rabipelado (*Didelphis marsupialis*) en el año 1976 como descrito previamente (12) y mantenido en *Rhodnius prolixus* con pases trimestrales en ratón. En los experimentos se emplearon parásitos con no más de tres meses en cultivo, con repiques semanales en medio ML15-HA (18,19). Los estadios utilizados fueron: tripomastigotas sobrenadantes de cultivos celulares (equivalentes a tripomastigotas tipo hemático) y epimastigotas procedentes de

cultivo axénico, crecidos durante 6 días a 27°C en medio ML15-HA como control de la epimastigogénesis.

**Epimastigogénesis inducida en medio ML15-HA pH 7,0:** Para estudiar la cinética de transformación de tripomastigotas a epimastigotas se emplearon tripomastigotas sobrenadantes de células Vero infectadas incubados en medio ML15-HA pH 7,0 (Base de medio L-15 comercial suplementado 1:1 con solución de Triptosa-Fosfato Glucosado, 5% Suero Fetal Bovino (SFB), 20 mmol/L Hemina y antibióticos 100 U/mL de Penicilina y 100 µg/mL de Sulfato de Estreptomicina), siguiendo el protocolo descrito por Barrios et al y Gigante et al (17,10). Se colocaron  $1 \times 10^7$  tripomastigotas/mL incubados a 27°C en una batería de tubos cónicos estériles de 15 mL con 4 mL del medio ML15-HA (10,11). Para analizar la cinética de transformación se procedió a la obtención de masas de parásitos los días 0, 1/3, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 para obtención de proteínas y glicoproteínas. Como condición control se emplearon epimastigotas de 6 días de cultivo mantenidos en el mismo medio por varias semanas.

Se hizo recuento diferencial de alícuotas de cada día de la cinética, bajo microscopía de contraste de fases para estimar (a) incremento del inóculo ( $N_t/N_0$ ); (b) porcentaje de tripomastigotas; (c) porcentaje de formas en diferenciación; (d) porcentaje de amastigotas; (e) porcentaje de epimastigotas y (f) porcentaje de formas inmóviles. La morfología de los parásitos se estudió en láminas coloreadas con Giemsa-ácido (20), con un aumento final de 1000X en microscopio óptico (Nikon, Eclipse 400) contando al menos 300 formas para determinar porcentajes morfológicos. Las morfologías más representativas se fotografiaron con cámara digital (Nikon, Coolpix, 4500).

**Obtención de las fracciones proteicas totales:** Masas húmedas de peso conocido se lisaron por criólisis hipotónica en agua suplementada con una mezcla de inhibidores de proteasas (trans-epoxi-succinil-L-leucilamido-4-guanidino-butano [E-64] 0,1 mmol/L; N $\alpha$ -p-tosil-L-cloro-lisina metil cetona [TLCK] 0,5 mmol/L; N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona [TPCK] 0,5 mmol/L y fenantrolina 1 mmol/L) en relación de 300 mg parásitos/mL de solución de lisis. Se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación (-20°C / 37°C), alternando con agitación en vórtex (3 min a temperatura ambiente). Los lisados se sedimentaron a 14.000 xg 10 min a 4°C y los sobrenadantes se suplementaron a 150 mmol/L NaCl (21).

La concentración de proteínas se determinó mediante Coomassie Plus-200 (Pierce, Rockford) según protocolo del fabricante usando Seroalbúmina Bovina (BSA) en un rango de 50 a 250 µg de proteína/mL y se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Ultrospect 3000 (Pharmacia).

**Análisis proteico, glicoproteico y antigénico durante la epimastigogénesis:**

Tripomastigotas sobrenadantes de células Vero, epimastigotas de medios axénicos y formas en diferenciación se analizaron por electroforesis bajo condiciones reductoras en mini-geles de poliacrilamida al 10% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (22), colocando 8 y 10 µg de proteína por canal para visualizar proteínas y glicoproteínas, respectivamente, y 4 µg para antígenos. Se incluyó un canal con proteínas marcadoras de peso molecular conocido (Promega, V-8491).

Para el análisis de glicoproteínas se incluyó un canal adicional con marcadores de referencia para carbohidratos (dilución  $\frac{1}{4}$  de 0,5  $\mu\text{g}$  de Fetuína de suero fetal bovino [Sigma, F-2379]; 1,5  $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ 1-ácida-glicoproteína [Sigma, G-9014] y 1,5  $\mu\text{g}$  de Mucina de glándula submaxilar de buey [Sigma, M-3895]). La electroforesis se desarrolló a corriente constante de 12 mAmp y a temperatura ambiente. Las proteínas separadas en los geles se visualizaron mediante coloración combinada de Coomassie-Plata (23) y las glicoproteínas según la técnica combinada de Ácido Periódico-Alcian Blue-Glutaraldehído-Plata (APABGP) (24,25).

El análisis antigénico se hizo mediante electroinmunotransferencia (26) a membranas de nitrocelulosa (MNC, Pierce). Los antígenos se revelaron usando sueros hiperinmunes anti-tripomastigotas (Anti-T) y anti-epimastigotas (Anti-E) preparados en conejos (27) diluidos 1/2000. Se usaron como anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo producida en cabra (1/3000) conjugadas a peroxidasa (Sigma, A-0545).

Los inmunocomplejos formados se revelaron mediante quimioluminiscencia empleando como sustrato luminol (Super Signal, Pierce) según protocolo del fabricante. Los geles fueron secados entre hojas de papel celofán y para obtener los luminogramas, las MNC se cubrieron con lámina de vinilo transparente y se expusieron a películas de Rayos X (Medical Film Konica Minolta).

**Digitalización, registro fotográfico y análisis:** Los geles y luminogramas se digitalizaron en densitómetro (Scanner Bio-Rad Imaging Densitometer, Modelo GPS-690) y analizaron con el Software (Bio-Rad Molecular Analyst<sup>®</sup>/PC 1,2 Software package). Las figuras y fotografías se procesaron por Microsoft Power Point 2007.

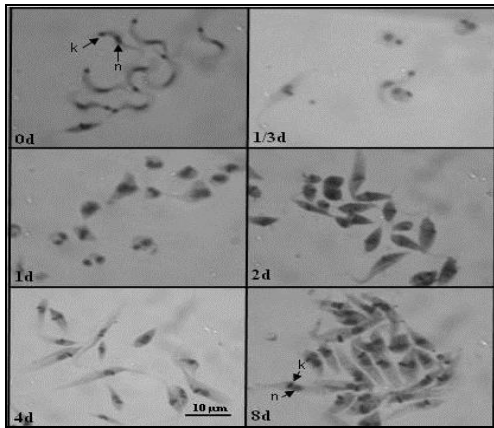
## RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los cambios morfológicos y poblacionales que ocurren durante la epimastigogénesis de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, expresados como porcentaje de formas (tripomastigota, en diferenciación, amastigota, epimastigota y formas inmóviles) e incremento del inóculo ( $N_t/N_0$ ). Se aprecia que los cambios más significativos ocurren en las primeras 24 horas con una caída abrupta del porcentaje de tripomastigotas (de 94,8 a 3,9%), un incremento concomitante de los amastigotas (de 0 a 89,4%) y sin incremento poblacional neto ( $N_t/N_0=1$ ).

En términos poblacionales, se observa que el inóculo se incrementa progresivamente desde 1,8 hasta 59,0 entre el día 2 y el día 10, lapso en el cual ocurre un incremento progresivo del porcentaje de epimastigotas, que se establecen como morfología predominante a partir del día 2 de la cinética hasta el día 8 (de 25,0% a 85,8%).

La Figura 1 muestra estos cambios por microscopía óptica, donde se aprecia la transformación de tripomastigotas en amastigotas al primer día de incubación y la transformación de amastigotas en epimastigotas a partir del segundo día (2d) con predominio de los epimastigotas a los 4 y 8 días (4d y 8d).

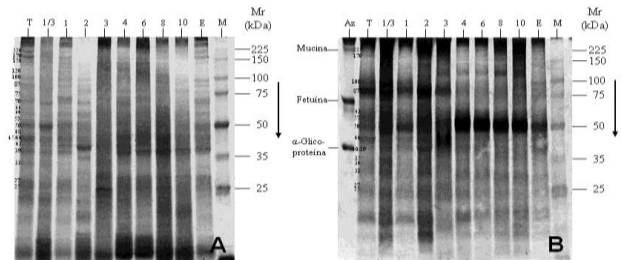
Entre las 8 horas (1/3d) y 24 horas (1d) se observan formas redondeadas en diferenciación entre los tripomastigotas alargados y los amastigotas redondos, hasta alcanzar la morfología típica del amastigota con kinetoplasto en barra. A partir del día 2 aparecen epimastigotas cortos (2d) que incrementan su tamaño y se mantienen como morfología predominante (epimastigotas típicos) hasta el 8vo día de incubación.



**Figura 1.** Cambios morfológicos durante la epimastigogénesis de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C. Los números corresponden a tiempo en días. n = núcleo; k = kinetoplasto. Coloración de Giemsa-ácida (1000X).

La Figura 2 muestra perfiles proteicos y glicoproteicos diferentes: uno para tripomastigotas (T, Panel A y B) y otro para epimastigotas (E, Panel A y B). Durante la diferenciación (canales 1/3 al 10) se aprecian cambios tanto en las proteínas (Panel A) como en las glicoproteínas (Panel B). El perfil epimastigota específico se observa a partir del día 4 de incubación de los tripomastigotas, compatible con el incremento progresivo de la morfología epimastigota (Tabla 1). En las proteínas, las mayores modificaciones están representadas por la distribución, cambios de intensidad y presencia de polipéptidos transitorios de alto peso molecular (por encima del marcador de 100kDa) antes del día 3 y cambios en los de mediano y bajo peso

molecular a partir del día 4 (por debajo del marcador de 75 kDa); lo que indica que a partir de ese día, el perfil proteico es semejante al estadio epimastigota y que en los primeros días, el perfil es semejante al estadio tripomastigota. En las glicoproteínas, durante la diferenciación (canales 1/3 al 10) se logra evidenciar cambios de espesor y de intensidad de algunos glicopéptidos, lo que sugiere la existencia de regiones de re-arreglos glicopeptídicos. Parecido a lo que se observa con las proteínas a partir del día 4 de incubación, los parásitos muestran un perfil glicopeptídico similar al de los epimastigotas controles compatible con el incremento progresivo de la morfología epimastigota.



**Figura 2.** Electroforesis (SDS-PAGE 10%) de los cambios polipeptídicos que ocurren en *T. cruzi* (Dm28c) durante la epimastigogénesis en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, teñidos con Coomassie-Plata (**Panel A**, 8 µg) y APABGP (**Panel B**, 10 µg). "T" corresponde a tripomastigotas y "E" a epimastigotas. Los números en la parte superior corresponden al tiempo de incubación en el medio ML15-HA pH 7,0. Az= 1,5 µg de mezcla de glicoconjugados. El canal "M" corresponde a los marcadores peptídicos de peso molecular y "Mr" a la movilidad relativa en kiloDaltons (kDa).

**TABLA 1.** Distribución porcentual de formas estructurales de *Trypanosoma cruzi* (Dm28c) durante la incubación a diferentes tiempos de tripomastigotas sobrenadantes de células en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C.

Tiempo (días)	Porcentaje de Formas					N <sub>t</sub> /N <sub>0</sub>
	T	D	A	E	Muertos	
0	94,8	0	0	5,1	0	1,0
1/3	14,8	0	74,3	10,8	0	-
1	3,9	2,6	89,4	3,9	0	1,0
2	0	28,6	45,4	25,0	0	1,8
3	0,8	7,1	33,9	58,0	0	2,9
4	1,6	11,9	15,0	71,4	0	6,5
6	0	6,8	8,4	84,7	0	15,1
8	0	6,8	3,9	85,8	3,3	45,1
10	0	1,7	1,7	82,6	13,9	59,0

T= Tripomastigotas; D= Formas en diferenciación; A= Amastigotas; E= Epimastigotas; Muertos= formas inmóviles. N<sub>t</sub>/N<sub>0</sub> = la relación entre el recuento de parásitos/mL a tiempo (t) sobre el recuento a tiempo 0.

Las Figuras 3 y 4 muestran los análisis por Inmunobloting de los perfiles antigénicos revelados por los sueros de conejo Anti-T y Anti-E durante la epimastigogénesis de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0. El suero Anti-T (Figura 3) revela 3 perfiles bien definidos: un primer perfil correspondiente a tiempo 1/3d y 1d similar al de tripomastigotas (canal T); un perfil entre el día 3 y 10 similar al perfil de epimastigotas (canal E); y un perfil de transición correspondiente al día 2 con bandas antigénicas compartidas de tripomastigotas y epimastigotas (canales T y E) y un antígeno de 80 kDa (punta de flecha blanca) ausente en los tripomastigotas y los epimastigotas.

En el canal T correspondiente a los tripomastigotas, el suero Anti-T reconoce una región de antígenos no resueltos por encima del marcador de 150 kDa (asterisco a la izquierda del canal T) y ocho bandas antigénicas de diferente intensidad y espesor por debajo del marcador de 150 kDa (134, 114, 100, 88, dupleta 75/72, dupleta 61/60, dupleta 51/49 y tripleta 47/45/43 kDa) distribuidos entre los marcadores 150 y 25 kDa y un antígeno intenso por debajo del marcador de 25 kDa, mientras que en el canal E correspondiente a los epimastigotas de la condición control, el suero Anti-T reveló ocho bandas antigénicas de diferente intensidad y espesor (125, 114, dupleta 100/95, 88, tripleta 75/69/66, 60, 53 y dupleta 50/47 kDa, punta de flecha a la izquierda del canal E) y un antígeno intenso por debajo del marcador de 25 kDa.

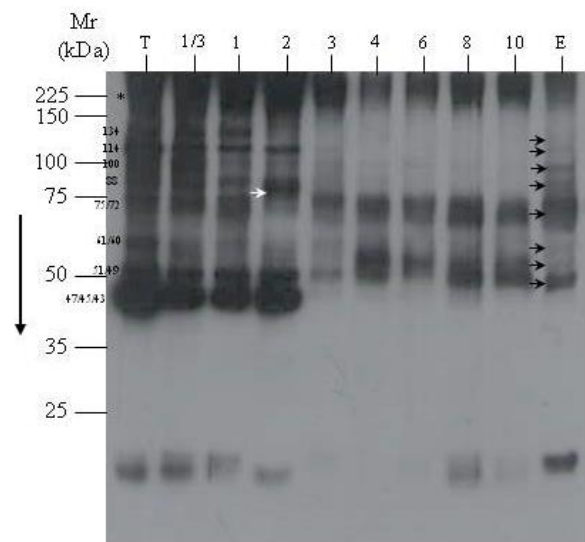
El suero Anti-E (Figura 4) revela también 3 perfiles bien definidos similar a lo observado con el suero Anti-T y un antígeno de 60 kDa (punta de flecha blanca a la izquierda del canal 2) ausente en los tripomastigotas y los epimastigotas.

El suero Anti-E reconoce en su antígeno homólogo, un perfil antigénico complejo

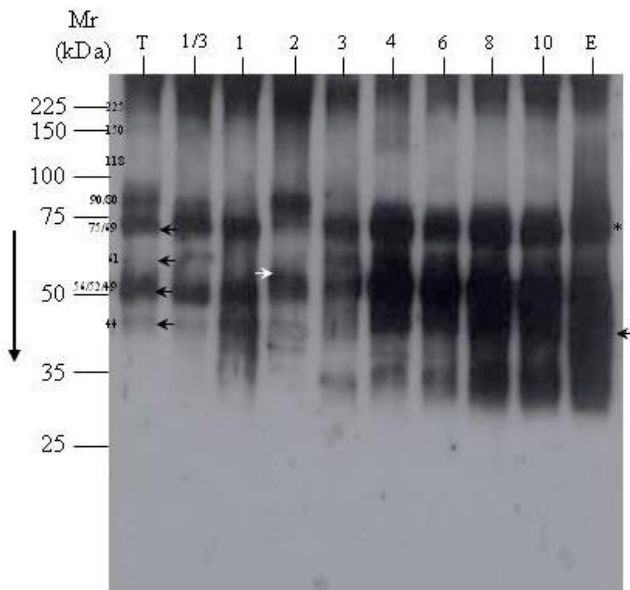
caracterizado por una banda ancha de antígenos no resueltos entre 56 y 30 kDa (punta de flecha a la derecha del canal E) y una banda (tripleta 82/72/67, asterisco a la derecha del canal E).

En el canal T, el suero Anti-E reconoce ocho bandas antigénicas de diferente intensidad (225, 150, 118, dupleta 90/80, dupleta 75/69, 61, tripleta 56/52/49 y 44 kDa) distribuidos entre los marcadores 225 y 25 kDa.

La comparación de estos perfiles muestra al menos cuatro bandas antigénicas comunes a ambos estadios (dupleta 75/69, 61, tripleta 56/52/49 y 44 kDa, punta de flecha a la derecha del canal T) los cuales mantienen su expresión durante toda la diferenciación (canales 1/3 al 10).



**Figura 3.** Inmunobloting (SDS-PAGE 10%) de los cambios antigénicos que ocurren en *T. cruzi* (Dm28c) durante la epimastigogénesis en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, revelados con suero de conejo Anti-T (1/2000) como descrito en Materiales y Métodos. T= tripomastigotas y E= epimastigotas. Los números 1/3, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 días corresponde al tiempo de incubación (días) en el medio de diferenciación. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kDa.



**Figura 4.** Inmunoblotting (SDS-PAGE 10%) de los cambios antigénicos que ocurren en *T. cruzi* (Dm28c) durante la epimastigogénesis en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, revelados con suero de conejo Anti-E (1/2000) como descrito en Materiales y Métodos. T= tripomastigotas y E= epimastigotas. Los números 1/3, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 días corresponde al tiempo de incubación (días) en el medio de diferenciación. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kDa.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se demuestra que los cambios macromoleculares durante la epimastigogénesis del clon Dm28c de *T. cruzi* en medio ML15-HA, ocurren simultáneamente con la transformación morfológica. Es de resaltar que se estudió la transformación del tripomastigota tipo sanguíneo con un parásito genéticamente homogéneo (clonado) en un medio de diferenciación (común) donde varios procesos de diferenciación fueron estandarizados.

A pesar que los estudios de morfogénesis de *T. cruzi* han sido realizados con aislados diferentes y/o medios de diferenciación diferentes, se ha propuesto que procesos de diferenciación de *T. cruzi* tales como metacicloogénesis, amastigogénesis y epimastigogénesis inducidos en condiciones

axénicas son afectados por factores inherentes al aislado y al microambiente en el cual ocurre la diferenciación (5).

Barrios et al (17) estudiando la epimastigogénesis del clon EPM<sub>6</sub> de *T. cruzi* (procedente de humano) incubado en un medio semi-definido (MEMTAU pH 6,7) (3) suplementado con hidrolizado de lactoalbúmina (1X), mostraron que los parásitos en diferenciación pasan por formas redondeadas sin flagelo (amastigotas) y formas de naveta antes de transformarse en epimastigotas. En los primeros 2 días cayó el porcentaje de tripomastigotas y a partir del día 6 se incrementó progresivamente hasta 6 veces la población y los epimastigotas se hicieron predominantes. De Lima et al (16) en un estudio similar trabajando con el clon EPM<sub>6</sub> de *T. cruzi* e incubando en un medio no definido químicamente (medio LIT B pH 7,2) mostraron que los cambios morfológicos de los tripomastigotas se inician en las primeras 12 horas de incubación, con incremento progresivo de formas redondas a las 48 horas que alcanzan un pico máximo al 4to día de incubación. Los epimastigotas se incrementaron significativamente a partir del 6to día, alcanzando al día 12 de incubación cerca de un 98% de epimastigotas. Gigante et al (10) trabajando con el clon Dm28c aislado de reservorio en condiciones equivalentes e incubando en un medio semi-definido (ML15-HA pH 7,0), mostraron que los cambios más significativos ocurren en las primeras 24 horas con una caída abrupta del porcentaje de tripomastigotas (de 94,8 a 3,9%) y un incremento concomitante de los amastigotas (de 0 a 89,4%), mientras que los epimastigotas se establecieron como morfología predominante a partir del día 2 hasta el día 10, con un incremento de 59 veces el inóculo. Los resultados anteriores evidencian que indistintamente de la procedencia del aislado

(humano o reservorio), los eventos de diferenciación que ocurren durante la epimastigogénesis son equivalentes y confirman la presencia del estadio amastigota precediendo al estadio epimastigota (6,28).

A nivel de proteínas y glicoproteínas, estudios previos del evento de transformación empleando otros aislados en medios diferentes muestran que los tripomastigotas expresan proteínas y glicoproteínas del epimastigota como demostrado por De Lima et al (16) trabajando con el clon EPM<sub>6</sub> de *T. cruzi* y medio LIT B y por Barrios et al (17) trabajando con el mismo clon y medio MEMTAU. Nuestros resultados para el clon Dm28c y medio ML15-HA pH 7,0 con 5% SFB que representa una condición de riqueza nutricional, muestran tres perfiles proteicos y glicoproteicos diferentes: uno para tripomastigotas entre las 0 y 24 horas de incubación; otro para epimastigotas a partir del día 4, comparable con el perfil control de epimastigotas, y un tercer perfil diferente para los días 2 y 3. Los mayores cambios fueron evidentes a partir de las 8 horas de incubación. Se aprecia la aparición de polipéptidos transitorios entre los días 1 y 2, lo que sugiere que en estas regiones está ocurriendo un re-arreglo polipeptídico que pudiera ser aportado por las formas amastigotas presentes en el cultivo durante este período.

El perfil epimastigota específico se observa a partir del día 4 de incubación, compatible con el incremento progresivo de la morfología epimastigota (Tabla 1), mucho más rápido que para otros aislados.

Los cambios glicopeptídicos observados muestran que el perfil de los tripomastigotas es significativamente diferente del perfil de epimastigotas y que durante la cinética de diferenciación, entre los días 2 y 4 se evidencian cambios en el espesor y la intensidad de algunos glicopéptidos que

sugieren la existencia de regiones de re-arreglos glicopeptídicos.

El análisis de los cambios antigénicos que ocurren durante la epimastigogénesis de Dm28c en ML15-HA, muestra una correlación entre los perfiles antigénicos de los estadios de partida (tripomastigotas) y de culminación (epimastigotas), y un perfil de transición con antígenos característicos: uno de 80 kDa, revelado por el suero Anti-T en parásitos del día 2 y otro de 60 kDa, revelado por el suero Anti-E también en parásitos del día 2. Llama la atención que no hay correspondencia entre el día de mayor porcentaje de amastigotas (día 1, Tabla 1) con la presencia de antígenos "específicos" (día 2), lo que podría sugerir que los cambios morfológicos preceden los cambios antigénicos. Un hecho irrefutable es que el perfil antigénico característico de los epimastigotas puede ser revelado por ambos antisueros (Anti-T y Anti-E) tan precozmente como el día 3 de la incubación, indicando que la mayor velocidad en los cambios morfológicos parece estar asociado a los cambios moleculares. Vale destacar que estudios previos de diferenciación de *T. cruzi* proponen que la expresión génica antecede la transformación morfológica (1) en contraste con la sugerencia hecha para explicar el alto porcentaje de amastigotas (día 1) sin antígenos específicos. Hecho que destaca la importancia de esta investigación al trabajar en un medio de diferenciación común para varios procesos de transformación morfológica. El análisis antigénico comparativo de la epimastigogénesis muestra que ensayos realizados en diferentes tiempos con aislados y condiciones diferentes, confirman los eventos fundamentales que ocurren durante la diferenciación. El estadio de partida (tripomastigota) y culminación (epimastigota) de la diferenciación muestran un perfil estadio-específico. Durante la diferenciación, aparece un perfil antigénico



diferente compatible con la existencia del estadio amastigota precediendo al estadio epimastigota y este evento parece que puede ser adelantado o retardado en función de la riqueza nutricional del medio de diferenciación, aspecto que merece ser investigado. La definición del perfil molecular característico de los epimastigotas (proteico, glicoproteico y antigénico) ocurre cuando hay predominancia de ese estadio concomitantemente con el incremento poblacional. En términos de la utilidad para fines diagnósticos, es evidente la existencia de antígenos comunes indistintamente del aislado y del medio de diferenciación, lo que permite sugerir un análisis de estos eventos usando sueros de pacientes chagásicos donde las coincidencias tienen un mayor significado diagnóstico que el uso de anti sueros estadio-específicos producidos en conejos.

Finalmente, se abre una serie de interrogantes que deben ser consideradas, tales como si la velocidad de la epimastigogénesis está determinada por la constitución genética del aislado o por la riqueza nutricional del medio de diferenciación; ó si las cinéticas de otros eventos de diferenciación (Metacicloogénesis) son diferentes para aislados de diferente constitución genética.

**AGRADECIMIENTOS.** Al Sr. Jhonny Albanese por la asistencia infraestructural. Organismos

**FINANCIAMIENTO.** FONACIT S1-2001000683; CDCH-UC FCS: Proyectos 2003-005; 2006-006; 00212-07; 2010-001; Investigaciones Menores 021-2013; 011-2011; 180-2011; 0394-2010, 0461-2010; Equipamiento Institucional 2005-012.

## REFERENCIAS

1. Contreras VT, Morel CM & Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mol Biochem Parasitol. 1985a; 14(1):83-96.
2. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM & Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol Biochem Parasitol. 1985b; 16(3):315-327.
3. Contreras VT, Navarro MC, De Lima AR, Arteaga R, Duran F, Askue J, et al. Production of Amastigotes from Metacyclic Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(8):1213-1220.
4. Tomlinson S, Vandekerckhove F, Frevert U & Nussenzweig V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. Parasitology. 1995; 110:547-554.
5. Contreras VT, De Lima AR, Navarro MC. Morfogénesis de *Trypanosoma cruzi*: Factores relevantes para la diferenciación *in vitro*. Rev Acta Biol Venez. 2006; 26(2):49-60.
6. Contreras V, Córdova A, Fernández K, Fernández A, De Lima AR, Domínguez MI, et al. Abordaje metodológico para estudiar la Epimastigogénesis *in vivo* de *Trypanosoma cruzi* en triatomíneos. Acta Cient Venez. 2009; 60(1):Resúmenes del Congreso. Memorias del LIX Convención anual de AsoVAC. 2009; Nov 15-20; Mérida, Venezuela. <http://www.asovacmerida.org.ve/pdf/resumen.pdf>.
7. Contreras V, Arteaga R, Graterol D, Córdova A, Fernández K, Barrios L, et al. Epimastigogénesis *in vitro* and *in vivo* of *Trypanosoma cruzi*: Comparison of strains isolated from Triatomine, Opossum and Man. XXIII Reunión Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia / XXXIV Reunión Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. 2007; Nov 5-7; Caxambú – Minas Gerais, Brasil.
8. De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid Biol Dis. 2002; 1(1):3.
9. Goldenberg S & Rodrigues Ávila A. Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. In: Advanced in Parasitology. Chagas Disease. Part A. Ed: Louis M. Weiss Herbert B. Tanowitz Louis V. Kirchhoff. First Ed. Academic Press. Elsevier. 2011; 13(25):285-305.
10. Gigante G, González G, Linares E. Epimastigogénesis, Metacicloogénesis, Amastigogénesis del clon Dm28c de *T. cruzi* en medio ML15-HA [Tesis de Grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis]. Universidad de Carabobo, Venezuela; 2009.

11. Contreras V, Gigante G, González G, Linares E, Arteaga R, Graterol D, et al. Epimastigogénesis, Metacicloogénesis y Amastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* clon Dm28c en medio ML15-HA. Acta Cient Venez. 2010; 61(1):50-51. Memorias del LX Convención anual de AsoVAC. 2010; Nov 14-19; Ciudad Bolívar, Venezuela. <http://www.asovacguayana.org.ve/>.
12. Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles MN, et al. Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988; 83(1):123-133.
13. Barnabé C, Brenière SF. Eco-distribucion de los clones de *Trypanosoma cruzi*. In: Alfred Cassab J.R., Noireau François, Guillen G. Chagas: La enfermedad en Bolivia: conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998-2002). La Paz (BOL); La Paz: Ministerio de Salud y Previsión Social; IRD, 1999; 209-215.
14. Krieger MA, Ávila AR, Yamada-Ogatta SF, Plazanet-Menut C, Goldenberg S. Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(1):165-168.
15. Lanar DE. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* cultivated with a *Triatoma infestans* embryo cell line. J Protozool. 1979; 26(3):457-462.
16. De Lima AR, Aparicio A, Berrocal A, Navarro MC, Graterol D, Contreras V. Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: cambios peptídicos, glicopeptídicos y enzimáticos. Salus. 2007; 11(2):39-47.
17. Barrios JG, Contreras O, Graterol D, Navarro MC, Contreras VT, De Lima AR. *Trypanosoma cruzi*: Epimastigogénesis en condiciones axénicas. Cambios morfológicos, peptídicos, glicopeptídicos y antigénicos. Acta Cient Venez. 2008; 59(1):29-38.
18. Villalta F, Kierszenbaum F. Growth of isolated amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in cell-free medium. J Protozool. 1982; 29(4):570-576.
19. Leibovitz A. The growth and maintenance of tissue/cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. Am J Hyg. 1963; 78:173-180.
20. Carvalho ALM. Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). Rev Pat Trop. 1973; 2:223-274.
21. De Lima AR, Fariás MN, Tortolero E, Navarro MC y Contreras VT. Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Acta Cient Venez. 2001; 52(4):235-247.
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259):680-685.
23. De Moreno MR, Smith JF y Smith RV. Silver staining of proteins in polyacrilamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. Anal Biochem. 1985; 151(2):466-470.
24. Moller HJ, Poulsen JH. Staining Glycoproteins/Proteoglycans on SDS PAGE. In: The Protein Protocols Handbook. 2<sup>nd</sup> Edition. Edited by: J.M. Walker. Humana Press Inc, Totowa, NJ 1996; 99:627-631.
25. De Lima AR, Arteaga R, Zorrilla G, Garboza R, Flores G, Araque W, et al. Glicoproteínas estadio específicas de *Trypanosoma cruzi*. Acta Cient Venez. 1996; 47(1):211.
26. Towbin H, Staehelin T y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76(9):4350-4354.
27. Zorrilla G. *Trypanosoma cruzi*: Identificación peptídica y comparación inmunológica durante la morfogénesis. [Tesis de Maestría]. Universidad Simón Bolívar, Caracas Venezuela; 1999.
28. De Lima AR, Navarro MC, Domínguez MI, Graterol D, Arteaga R, Fernández A, et al. Antígenos Amastigota específicos son expresados durante la Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi*. Acta Cient Venez. 2009; 60(1):Resúmenes del Congreso. Memorias del LIX Convención anual de AsoVAC. 2009; Nov 15-20; Mérida, Venezuela. <http://www.asovacmerida.org.ve/pdf/resumen.pdf>.