BOLETÍN
DE MALARIOLOGÍA
Y SALUD AMBIENTAL
Vol. XLIX, Nº 1, Enero-Julio, 2009

Leishmania chagasi y *Trypanosoma cruzi*: Conducta trófica en cultivos axénicos puros y mixtos

Carmen Durán[1], María F. Quiroga[2], Zoraida Díaz-Bello[3], Sylvia Silva[4], Antonio Roschman-González[5], Miriam Strauss[6] & Felix Tejero[2]*

El mecanismo adaptativo entre *Leishmania* y *Trypanosoma* ante la competencia por los recursos nutricionales en ambientes compartidos ha sido pobremente investigado. En particular, el estudio de la conducta trófica entre *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* podría contribuir al entendimiento de situaciones de gran relevancia médica en humanos, como son las infecciones mixtas por ambos tripanosomatídeos. En este trabajo se establecieron cultivos axénicos puros de *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi*, así como cultivos axénicos mixtos (*L. chagasi* + *T. cruzi*) en médio BHI. Se registraron los cambios de dinámica poblacional (organismos por mililitro), la evolución de la estructura de las poblaciones, las variaciones de las concentraciones de colesterol, glucosa y proteínas totales, así como los cambios de pH en el medio de cultivo. El manejo cuantitativo de los conjuntos numéricos generados experimentalmente se abordó con técnicas univariadas (Análisis de la Varianza) y multivariadas (Análisis Discriminante Múltiple). Los resultados demuestran diferencias estadísticas significativas entre las medias de los parámetros considerados y prueban que el comportamiento *"in vitro"* investigado en el cultivo mixto *L. chagasi – T. cruzi* difiere taxativamente del estudiado en los cultivos puros de *L. chagasi* y *T. cruzi.*

Palabras clave: *Leishmania chagasi, Trypanosoma cruzi*, cultivo *"in vitro"*.

INTRODUCCIÓN

La actividad trófica es fundamental en los procesos de transmisión del agente patógeno y del desarrollo del parásito. *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* además de ser los agentes etiológicos de patologías humanas importantes en el Neotropico (WHO, 1990; Morel, 1999) son capaces de establecer infecciones mixtas en humanos y animales (Travi *et al.*, 1994; Corredor-Arjona *et al.*, 1999; Bastrenta *et al.*, 2003). El éxito de tales infecciones mixtas esta vinculado, en parte, a la conducta trófica de los agentes patógenos y a su sobrevivencia en el medio ambiente compartido.

Ambos tripanosomatídeos tienen ciclos de vida complicados caracterizados por ajustes metabólicos radicales. Tanto los amastigotes de *L. chagasi* como los tripomastigotes de *T. cruzi*, en cuestión de segundos, pasan del ambiente homeotermo del hospedador mamífero al medio poiquilotermo del insecto vector. Invadir, colonizar y establecerse en el vector o en el mamífero implica desempeñar roles peculiares (incluyendo metabolismo y comportamiento) y ocupar espacios específicos en el nuevo hábitat. Así, el éxito adaptativo del parásito, depende en gran medida, de su habilidad en el uso de los substratos tróficos disponibles.

[1] Cátedra de Parasitología. Escuela de Medicina "Luis Razetti", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
[2] Laboratorio de Biología Funcional de los Kinetoplastida. Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
[3] Sección de Inmunología. Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas.
[4] Sección de Inmunoparasitología. Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
[5] Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Mitsuo Ogura". Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
[6] Sección de Biología Celular. Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

*Autor de correspondencia: felixtejero@gmail.com

Comprender los mecanismos de utilización de los sustratos nutricionales requiere conocer el metabolismo básico de los organismos. Si bien el metabolismo de los tripanosomatídeos es un tópico bien documentado (McConville *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2003; Bringaud *et al.*, 2006; Urbina, 2006; Opperdoes & Coombs, 2007), el manejo de sustratos tróficos potenciales o explícitos, es un tema no referido en la literatura.

En este trabajo se presenta por primera vez una evaluación cuantitativa del comportamiento trófico de *L. chagasi* y *T. cruzi* mantenidos en cultivos axénicos puros y mixtos (*L. chagasi* + *T. cruzi*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos axénicos puros de *L. chagasi* (cepa MHOM/BR/74/PP75) y *T. cruzi* (cepa Y), así como cultivos axénicos mixtos (*L. chagasi* + *T. cruzi*) se establecieron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapa de rosca no apretadas provistos de medio bifásico BHI (Brain Heart Infusion). El sistema de cultivo consta de fase sólida (2 gr de BHI + 1,5 gr de agar + 0,1 mg/mL de gentamicina + 50 mL de agua bidestilada + 10% de sangre de conejo desfibrinada) y de fase líquida (50 mL de solución salina isotónica en agua bidestilada: 0,85% de NaCl + 1% de glucosa + 0,1 mg/mL de gentamicina). En la fase líquida se sembraron $0{,}2\times10^6$ flagelados/mL. Un día después, e interdiariamente durante 35 días, se extrajeron 0,1 mL de la fase líquida; previo a la extracción los matraces de cultivo se agitaron con movimientos circulares suaves. De éste volumen (0,1 mL), 5µL se emplearon en el cálculo del número de flagelados/ml mediante cámara de Neubauer, 5µL adicionales se utilizaron para hacer frotis que, una vez teñidos con colorante Giemsa (10% en agua corriente), se utilizaron en el estudio de la dinámica morfotípica, otros 5µL se usaron en la determinación del pH y 85 µL se centrifugaron (350mg/25 min, 4°C). El sobrenadante se fraccionó en alícuotas de 3µL y 2 de 5µL cada una con las que se determinaron las concentraciones de colesterol, glucosa y proteínas totales, respectivamente. Las muestras de colesterol, glucosa y proteínas totales se procesaron (Reinhold, 1953; Trinder, 1979; Allain *et al.*, 1974) y analizaron en un lector de microplacas a 520 nm, 505 nm y 540 nm, respectivamente. Matraces Erlenmeyer idénticos libres de parásitos se utilizaron como control. Los cultivos se mantuvieron a 26ºC sin agitación y sin mezclas particulares de gases. Los experimentos se hicieron por triplicado y se repitieron 3 veces.

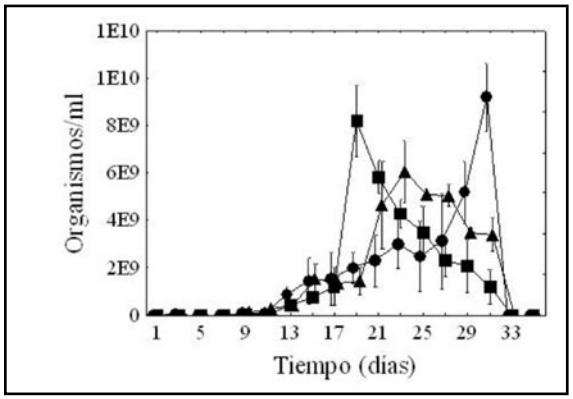
Las magnitudes numéricas generadas se evaluaron cuantitativamente con análisis de la varianza de 2-vías (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1995) y análisis discriminante múltiple (ADM) (Pielou, 1977; Pielou, 1984).

El ANOVA de 2-vías es una prueba de comparación de medias que contrasta las fuentes de variación y el ADM es una técnica reduccional multivariada que permite determinar discriminación entre grupos naturales. En este caso el ADM reduce el espacio 8-dimensional original (variables registradas: organismos/mL, amastigotes/mL, promastigotes/mL, epimastigotes/mL, [glucosa], [colesterol], [proteínas totales] y pH) a un espacio 2-dimensional proyectado en un plano cartesiano cuyos ejes de abscisas y ordenadas son las funciones discriminantes (Función Discriminante 1 y Función Discriminante 2).

RESULTADOS

La representación gráfica de los cambios del número de organismos/mL en el cultivo puro de *L. chagasi* y *T. cruzi*, así como en el cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*) muestra curvas con picos máximos y mínimos de organismos/mL distintos que, adicionalmente, se alcanzan en tiempos desiguales con cinéticas de cambio diferentes en cada proceso (cultivo puro de *L. chagasi*, cultivo puro de *T. cruzi* y cultivo mixto de *L. chagasi* + *T. cruzi*) (Fig. 1).

Fig. 1. Densidad de las poblaciones puras de *Leishmania chagasi* (●), *Trypanosoma cruzi* (■) y mixtas (*Leishmania chagasi* + *Trypanosoma cruzi*) (▲) en medio BHI. El intervalo muestra el error estándar.



En todos los casos se calculó el error estándar por cuanto se analizaron los resultados obtenidos de la distribución muestral.

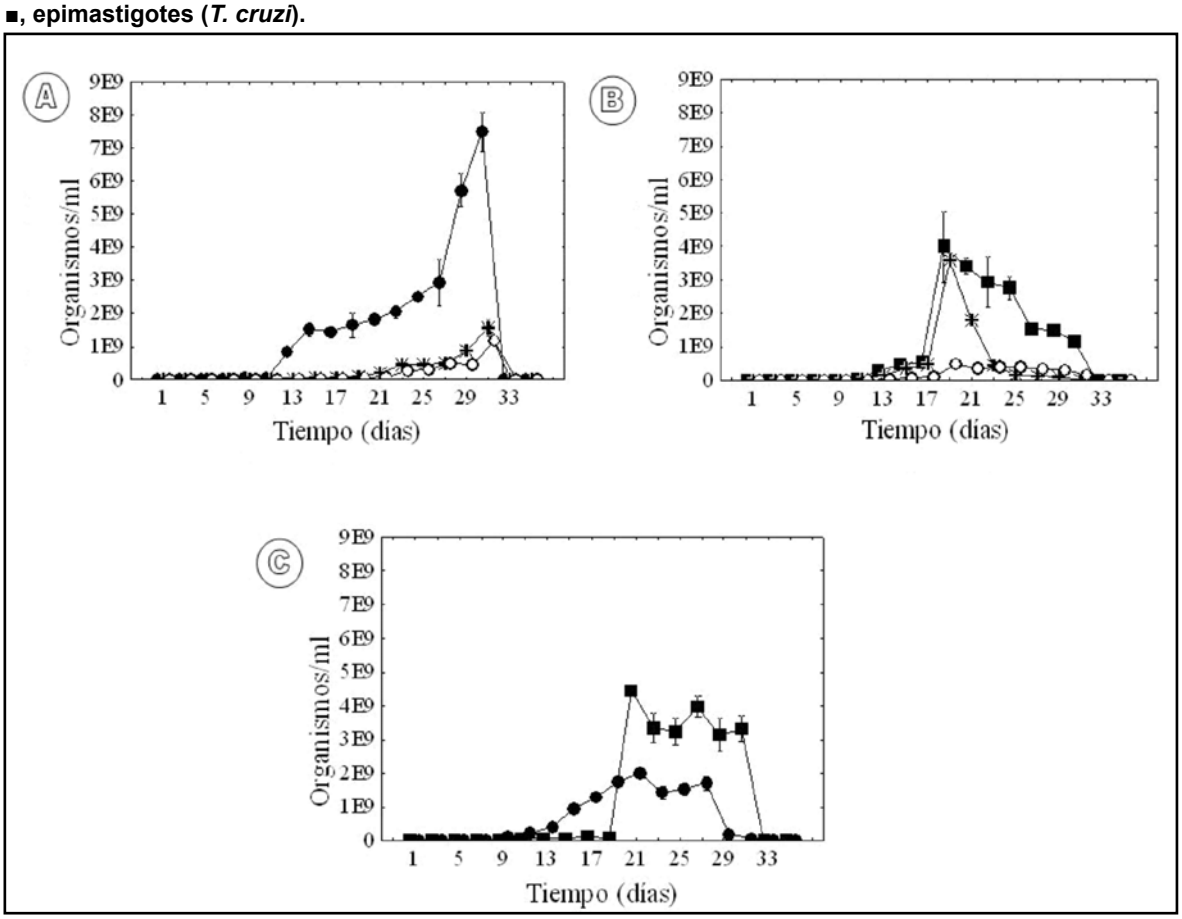
Los frotis coloreados a partir de la fase líquida de los grupos experimentales permitieron establecer las características morfotípicas (estadios) particulares de las poblaciones en cada uno de ellos: cultivo puro de *L. chagasi*, cultivo puro de *T. cruzi* y cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*) (Fig. 2).

En el cultivo puro de *L. chagasi* se identificaron los estadios de promastigote, esferomastigote y amastigote (las formas aberrantes no fueron consideradas). El promastigote resultó la forma predominante (Fig. 2A), presentando pico de crecimiento máximo en las fases finales del cultivo. Los esferomastigotes y los amastigotes también expresaron picos poblacionales máximos en las postrimerías del cultivo. En todos los casos el número de esferomastigotes predominó sobre el de amastigotes.

El cultivo puro de *T. cruzi* permitió establecer la presencia de epimastigotes, esferomastigotes y amastigotes (las formas aberrantes no fueron consideradas). La Fig. 2B muestra que el estadio más abundante fue el epimastigote con pico de crecimiento máximo en las fases intermedias del cultivo, seguido por esferomastigotes y amastigotes. Es notorio el paralelismo entre las cinéticas y las concentraciones máximas de epimastigotes y esferomastigotes durante los primeros 17 días de cultivo (Fig. 2B).

Los únicos estadios rastreados en el cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*) fueron epimastigotes y promastigotes, ya que la metodología empleada en

Fig. 2. Dinámica de crecimiento-extinción de estadios de *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* en medio BHI. A). Cultivo puro de *Leishmania chagasi*: ●, promastigotes; X, esferomastigotes; ○, amastigotes. B.) Cultivo puro de *Trypanosoma cruzi*: ■, epimastigotes; X, esferomastigotes; ○, amastigotes. C). Cultivo mixto (*Leishmania chagasi* + *Trypanosoma cruzi*): ●, promastigotes (*L. chagasi*); ■, epimastigotes (*T. cruzi*).

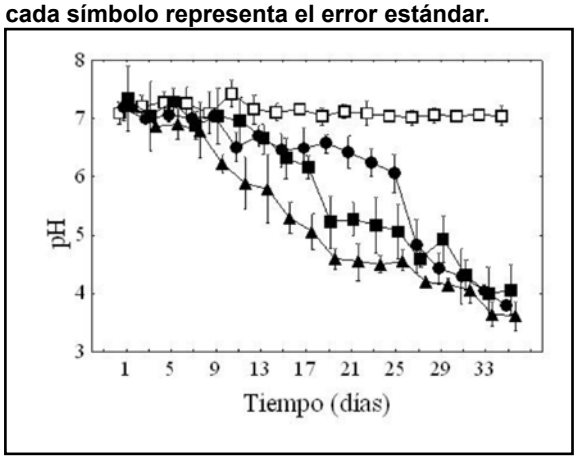


este trabajo no permite diferenciar amastigotes ni esferomastigotes de *L. chagasi* y *T. cruzi* (las formas aberrantes tampoco fueron consideradas). La Fig. 2C evidencia la preponderancia numérica de los epimastigotes sobre los promastigotes en el cultivo mixto, poniendo de manifiesto además, cinéticas de crecimiento y extinción que si bien son similares, resultan diferentes a sus correspondientes en los cultivos puros.

Los valores de pH registrados durante el tiempo de experimentación fueron diferentes, observándose su descenso sostenido. Por su parte, el pH del control fluctúa alrededor de 7,2. Los cambios entre el control (BHI sin parásitos), el cultivo puro de *L. chagasi*, el cultivo puro de *T. cruzi* y el cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*), parecieran diferir claramente (Fig. 3).

La dinámica de cambio en las concentraciones de colesterol, glucosa y proteínas totales en la fase líquida del cultivo puro de *L. chagasi* y *T. cruzi*, así como del cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*) en medio BHI se caracteriza por tendencias de comportamiento disímiles: las concentraciones de colesterol y glucosa disminuyen mientras que la de proteínas totales aumenta. Más aun, las particularidades de cambio en las concentraciones de colesterol, glucosa y proteínas totales, parecieran diferir entre los grupos experimentales (cultivo puro de *L. chagasi*, cultivo puro de *T. cruzi* y cultivos mixtos de *L. chagasi* + *T. cruzi*) y los controles respectivos (Fig. 3).

Fig. 3. Valores de pH en el cultivo de *Leishmania chagasi* (●), *Trypanosoma cruzi* (▲), *Leishmania chagasi* + *Trypanosoma cruzi* (■) y el cultivo control (□) en medio BHI. El intervalo alrededor de cada símbolo representa el error estándar.

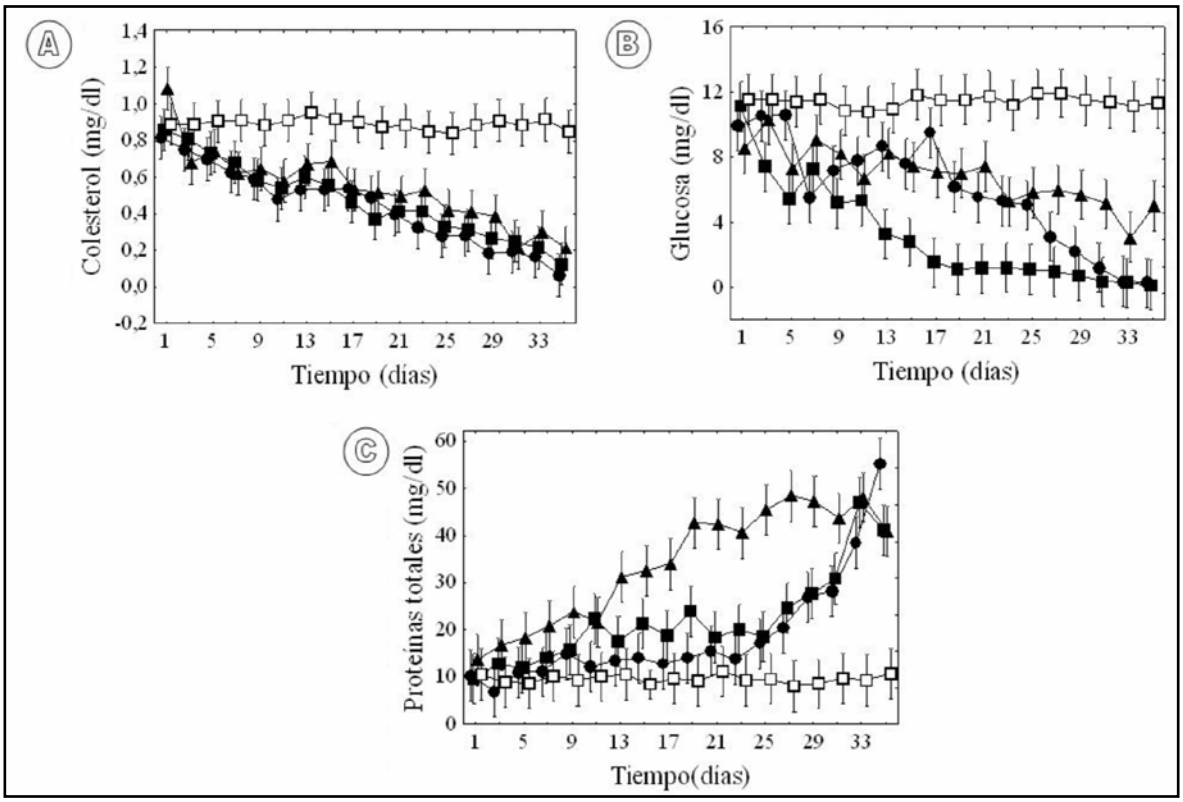


En efecto, los registros de concentración de glucosa (Fig. 4A) y colesterol (Fig. 4B) muestran disminución continua en el tiempo; en contraste con los controles. Por el contrario, los valores obtenidos al determinar la concentración de proteínas totales revelan conductas de incremento sostenido a lo largo del cultivo, comportamiento disímil al observado en el control (Fig. 4C). Según los intervalos de error estándar los cambios en la concentración de glucosa (Fig. 4A) y proteínas totales (Fig. 4C) observados en el cultivo mixto, sugieren diferencias con los registrados en el cultivo puro correspondiente.

Ciertamente que el estudio gráfico sugiere diferencias por cuanto la representación esquemática de los errores estándar en determinados casos y/o condiciones no se sobreponen (Fig. 1, 2, 3 y 4). Corroborar cuantitativamente la significancia de tales disimilitudes requiere que las magnitudes numéricas obtenidas a lo largo de los experimentos se investiguen con pruebas más objetivas; el ANOVA de 2-vías cumple con tales expectativas (Tabla I). El análisis se abordó ensamblando dos conjuntos de datos. El primero asociado a la dinámica de las poblaciones, como son la densidad de la población (fuente de variación: individuos, tiempo e interacción individuos-tiempo) (Fig.1) y los cambios observados en el número de los estadios presentes en el cultivo puro de *L. chagasi* (fuente de variación: estadios, tiempo e interacción estadios-tiempo) de *T. cruzi* (fuente de variación: estadios, tiempo e interacción estadios-tiempo) y el cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*)(fuente de variación: estadios, tiempo e interacción estadios-tiempo)(Fig. 2). El segundo set relacionado con los cambios de pH (fuente de variación: diferencias interespecíficas, tiempo e interacción diferencias interespecíficas-tiempo)(Fig. 3) y el manejo en las concentraciones de colesterol (fuente de variación: diferencias interespecíficas, tiempo e interacción diferencias interespecíficas-tiempo), de glucosa (fuente de variación: diferencias interespecíficas, tiempo e interacción diferencias interespecíficas-tiempo), y de proteínas totales (fuente de variación: diferencias interespecíficas, tiempo e interacción diferencias interespecíficas-tiempo) (Fig. 4).

El ANOVA comprueba ($\alpha \leq 0,05$) la significancia de todas las diferencias representadas gráficamente. Es más, el ANOVA demuestra además que el único caso en el que se observa similitud es la interacción diferencia interespecífica-tiempo en lo

Fig. 4. Cambios en la concentración de glucosa, colesterol y proteínas totales en la fase líquida del medio BHI. A). Concentración de glucosa: *Leishmania chagasi* (●), *Trypanosoma cruzi* (■), *Leishmania chagasi* + *Trypanosoma cruzi* (▲), control (□). B). Concentración de colesterol: *Leishmania chagasi* (●), *Trypanosoma cruzi* (■), *Leishmania chagasi* + *Trypanosoma cruzi* (▲), control (□) C). Concentración de proteínas totales: *Leishmania chagasi* (●), *Trypanosoma cruzi* (■), *Leishmania chagasi* + *Trypanosoma cruzi* (▲), control (□).



referente al consumo de glucosa. En otras palabras, al menos uno de los puntos de las curvas de extinción de glucosa es igual entre el cultivo puro de *L. chagasi*, el cultivo puro de *T. cruzi* y/o el cultivo mixto *L. chagasi* + *T. cruzi* (Tabla I).

El ANOVA resumido en la Tabla I demuestra la existencia de diferencias significativas entre las variables analizadas (densidad poblacional, estadios presentes, pH y [colesterol], [glucosa], [proteínas totales]) en los cultivos puros de *L. chagasi* y *T. cruzi*, así como en el cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*) con una probabilidad asociada menor o igual a 0,05. Las diferencias indican que las medias de crecimiento, estructura de las poblaciones (número y tipo de estadio), cambios en la concentración de colesterol, glucosa y proteínas totales, así como los valores de pH en la fase líquida del medio BHI, son diferentes. No obstante, no aporta información relevante al respecto de la acción simultánea de todas las variables en los grupos experimentales (cultivo puro de *L. chagasi*, cultivo puro de *T. cruzi* y cultivo mixto). Más aun, la información suministrada por el ANOVA es insuficiente, ya que no permite inferir con certidumbre significativa si los comportamientos (entendidos como integración de funciones) de *L. chagasi* y *T. cruzi* en la fase líquida del medio BHI de cultivos puros son iguales o diferentes y, aun menos, si difieren o no del cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*).

Por ello, se emplea una potente prueba multivariada que responde estas interrogantes: el ADM. Se trata de un test que genera un modelo matemático que reduce el hiperespacio original de ocho dimensiones (variables registradas) a un espacio de dos dimensiones plasmable en un plano de ejes cartesianos.

Los valores de Lambda de Wilks (λw) denotan la significancia estadística del poder discriminante

Tabla I. Tabla resumen del Análisis de la Varianza de dos vías sobre los datos generados experimentalmente.

		Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	*P*
Dinámica Poblacional	Densidad Poblacional (Fig. 1)	1. Cambio de Variación	$8x10^{17}$	2	$4x10^{17}$	4,33	0,0155
		2. Tiempo de cultivo (días)	$6x10^{20}$	17	$3x10^{19}$	376,35	0,0000
		Interacción 1 x 2	$3x10^{20}$	34	$8x10^{18}$	87,10	0,0000
	Cultivo de *Leishmania chagas* (Fig. 2A)	1. Cambio de Variación	$1x10^{20}$	17	$8x10^{18}$	97,87	0,0000
		2. Tiempo de cultivo (días)	$7x10^{20}$	2	$3x10^{19}$	423,35	0,0000
		Interacción 1 x 2	$1x10^{20}$	34	$3x10^{18}$	39,71	0,0000
	Cultivo de *Tripanosoma cruzi* (Fig. 2B)	1. Cambio de Variación	$9x10^{19}$	17	$5x10^{18}$	47,12	0,0000
		2. Tiempo de cultivo (días)	$2x10^{19}$	2	$1x10^{19}$	102,98	0,0000
		Interacción 1 x 2	$5x10^{19}$	34	$1x10^{18}$	12,97	0,0000
	Cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruci* Fig. 2C)	1. Cambio de Variación	$1x10^{20}$	17	$8x10^{18}$	93,23	0,0000
		2. Tiempo de cultivo (días)	$9x10^{18}$	1	$9x10^{18}$	32,94	0,0000
		Interacción 1 x 2	$5x10^{19}$	17	$3x10^{18}$	39,32	0,0000
Manejo del Sustrato	[Glucosa] (Fig. 3A)	1. Diferencia entre especies	0,27	2	0,14	11,62	0,0000
		2. Tiempo de cultivo (días)	6,62	17	0,39	32,94	0,0000
		Interacción 1 x 2	0,29	34	0,01	0,72	0,8625
	[Colesterol] (Fig. 3B)	1. Diferencia entre especies	403,44	2	201,72	100,75	0,0000
		2. Tiempo de cultivo (días)	961,56	17	56,56	28,25	0,0000
		Interacción 1 x 2	279,11	34	8,21	4,10	0,0000
	[Proteínas Totales] (Fig. 3C)	1. Diferencia entre especies	676,17	2	338,8	14,24	0,0000
		2. Tiempo de cultivo (días)	12065,64	17	709,74	29,89	0,0000
		Interacción 1 x 2	1812,52	34	53,31	2,25	0,0009
	pH (Fig. 4)	1. Diferencia entre especies	103,39	3	34,46	138,06	0,0000
		2. Tiempo de cultivo (días)	153,37	17	9,02	36,14	0,0000
		Interacción 1 x 2	58,45	51	1,15	4,59	0,0000

F: de Fisher; *P*: probabilidad asociada al evento con $\alpha \leq 0,05$.

del modelo; 0,00 conlleva poder discriminatorio y 1,00 ningún poder discriminante. La magnitud numérica de λw en la Función 0 ($\lambda w = 0,09$) implica gran capacidad discriminante de esa función. Por el contrario, la Función 1 tiene muy poco poder discriminante, características revalidadas por la bajísima significancia ($0,00 < 0,05$) de la Función 0 y la muy elevada significancia de la Función 1 ($0,91 > 0,05$). Las características generales del ADM (auto valores, correlación canónica y chi-cuadrado) permiten aseverar que el modelo generado por el ADM es consistente y, en consecuencia, la inferencia derivada es significativa con probabilidad asociada menor o igual a 0,05.

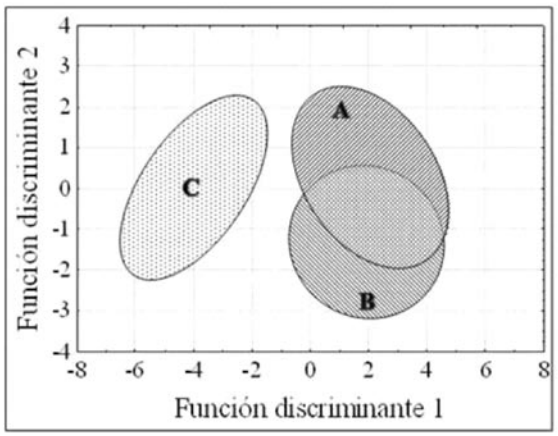
La representación gráfica del modelo produce tres nubes de puntos que corresponden al cultivo puro de *L. chagasi*, al cultivo puro de *T. cruzi* y al cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*). Las nubes de *L. chagasi* y *T. cruzi* están parcialmente superpuestas, mientras que la del cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*) se muestra sin conexión alguna con las otras dos (Fig. 5).

Tabla II. Tabla resumen del Análisis Discriminante Múltiple generada por los datos experimentales.

Función	Auto Valor	Correlación canónica	Lambda de Wilks	Chi-Cuadrado	gl	*P*
0	9,35	0,95	0,09	159,02	24	0,00
1	0,10	0,29	0,91	5,96	11	0,88

P: Significancia con $\alpha \leq 0,05$; gl, grados de libertad.

Fig. 5. Representación bidimensional del Análisis Discriminante Múltiple. Los conjuntos señalados con las letras A, B y C corresponden a las proyecciones de las variables originales en el plano reducido. Las nubes A y B, parcialmente superpuestas, simbolizan los cultivos puros de *Leishmania chagasi* (A) y *Trypanosoma cruzi* (B). La nube C pertenece a la proyección de las variables investigadas en el cultivo mixto (*Leishmania chagasi + Trypanosoma cruzi*).



Si bien los resultados gráficos del ADM (Fig. 5) muestran discriminación parcial entre el cultivo puro de *L. chagasi* (A) y el cultivo puro de *T. cruzi* (B) (nótese la zona de superposición), evidencian taxativamente segregación del cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*)(C).

DISCUSIÓN

El significado del cambio en la dinámica (crecimiento-decrecimiento) de las poblaciones y las variaciones morfológicas de los tripanosomatídeos heteroxenos está vinculado, al menos, a las variaciones del medio ambiente (Vickerman, 1976; 1985; 1988; 1994; Kollien & Schaub, 2000; Navarro *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2007). Los resultados presentados en este trabajo apoyan este enunciado, ya que los procesos observados en las curvas incremento-declinación de las densidades de las poblaciones, de la transformación morfológica y de las modificaciones en los valores del pH se corresponden con el cambio de concentración de proteínas totales en los tres cultivos (*L. chagasi* puro, *T. cruzi* puro y mixto: *L. chagasi* + *T. cruzi*). En este sentido, las fluctuaciones registradas en el número de organismos de una población serían función de la disponibilidad y manejo apropiado de los recursos del ambiente. Los resultados también sugieren relación entre el incremento del número de amastigotes y el descenso del pH. La acidificación de los cultivos podría constituir un aspecto inductor de la transmutación morfológica, por cuanto el pH extracelular es un factor promotor del cambio a formas infectivas que impulsa la metaciclogénesis *in vitro* de *L. mexicana* (Bates & Tetley, 1993).

En términos generales pareciera que durante la fase de crecimiento los parásitos incorporan colesterol del medio, lo cual se corresponde con la reducción de su concentración. En este punto del cultivo los organismos serían generalistas, por ello, la conducta trófica sería facultativa: el colesterol se incorporaría siempre y cuando estuviera presente en concentraciones adecuadas; por el contrario, si su concentración es baja, su uso sería sustituido por glucosa, o cualquier otro sustrato. La extinción de glucosa en el medio BHI va paralela a los incrementos de la densidad poblacional y, subsecuentemente, a la incorporación de colesterol. Si bien, investigaciones previas han establecido que el colesterol no constituye fuente energética importante, se ha propuesto que la biosíntesis de triglicéridos endógenos está asociada a las reservas energéticas intraglicosomales (Hart & Coombs, 1982; Levick *et al.*, 1998). Dichos acopios serían utilizables en las postrimerías del cultivo, evento acorde con el déficit de glucosa propio de esas fases del cultivo.

Se ha demostrado que la utilización de glucosa está restringida a medios con bajas presiones parciales de oxígeno (Furuya *et al.*, 2002). La parte del ciclo de vida de *L. chagasi* que transcurre en el intestino del invertebrado es anóxica y, adicionalmente, sostiene la multiplicación de los promastigotes (Attias, 1991; Marquardt *et al.*, 2000).

Por su parte, ni la incorporación ni la desincorporación de los compuestos investigados en los cultivos de *T. cruzi* evidenciaron relación intrínseca con los eventos de cambio morfológico. No obstante, la caída de los valores de pH del medio se correlaciona con el pico poblacional de epimastigotes, la disminución del número de esferomastigotes/mL y la presencia de amastigotes en los cultivos. Otros investigadores han relacionado el descenso de pH y la morfología de *T. brucei*, proponiendo que los cambios de pH promueven la transformación pleomórfica de este parásito (Rolin *et al.*, 1998).

Por otra parte, los ácidos grasos no constituyen fuentes exógenas esenciales para *T. cruzi*, ya que mantienen altos niveles de reservas endógenas a lo largo del tiempo (Rogerson & Gutteridge, 1980). Los resultados de este trabajo en los cultivos puros de *L. chagasi* son similares, hecho que reafirmaría la condición facultativa.

El modelo de ADM permite inferir escenarios ecológicos respecto a la superposición de nichos por cuanto *L. chagasi* y *T. cruzi* comparten espacios dimensionales en cultivos puros. Lo anterior se sustenta en la simpatría interespecífica en condiciones naturales (Bastrenta *et al.*, 2003). La superposición de nichos acontece cuando dos unidades organísmicas explotan los mismos recursos u otras variables ambientales, superponiéndose completamente cuando ambas entidades utilizan nichos idénticos: si los nichos divergen no hay superposición (Pianka, 2000).

En el caso de recursos ilimitados en sistemas vivos y ambiente saturado, se han demostrado alteraciones interespecíficas en cultivos mixtos de *L. chagasi* y *T. brucei* (Ter-Kuile & Opperdoes, 1992). Si bien ambos parásitos emplean glucosa como sustrato trófico, la superposición *in vitro* no conduce a la exclusión, aun sabiendo; en el caso de *T. brucei*, que los desechos tóxicos actúan negativamente sobre *L. chagasi* (Coppens *et al.*, 1992).

No obstante, en esta investigación no se observó uso diferencial de recursos tróficos en los cultivos puros, hecho que no sería un obstáculo para la coexistencia en cultivos mixtos (*L. chagasi* + *T. cruzi*). Por su parte, el comportamiento en los co-cultivos presenta características distintivas y particulares que permitirían definir la coexistencia *in vitro* de ambos organismos como una entidad morfo-funcional diferenciable de sus contrapartes puras (cultivo puro de *L. chagasi* y cultivo puro de *T. cruzi*) en términos matemáticos.

Nuestros resultados de conducta trófica en ambientes compartidos versus individuales, se correspondieron con la acumulación y expresión diferencial de la proteína de choque térmico Hsp70 (resultados no publicados) entre *L. chagasi* y *T. cruzi*. Se sugiere que los recursos nutricionales y la competencia por éstos, podría modular la respuesta adaptativa de los tripanosamatideos.

Finalmente, el comportamiento *in vitro* investigado en el cultivo mixto (*L. chagasi* + *T. cruzi*) difiere del estudiado en los cultivos puros de *L. chagasi* y *T. cruzi*, evidenciándose interacciones intra (estadios de desarrollo) e interespecíficas (*L. chagasi* - *T. cruzi*) en términos tróficos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Proyecto LOCTI-UCV 2007 Nº P0934020 (Laboratorios ELMOR, S.A.) por el apoyo económico recibido.

Leishmania chagasi and *Trypanosoma cruzi*: Trophic behavior in pure and mixed axenic cultures

SUMMARY

The adaptive mechanisms between *Leishmania* and *Trypanosoma* facing the competence for the nutritional resources in shared environments have been poorly investigated. Particularly, the study of the trophic behavior between *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi* could contribute to the understanding of relevant medical situations, as mixed human infections. In this work pure axenic cultures of *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi*, as well as mixed cultures (*L. chagasi* + *T. cruzi*) were established in BHI medium. Changes of population dynamics (organisms/mL), the evolution of the population's structure, the variations of the concentration of cholesterol, glucose and total proteins, as well as the changes of the medium's pH were registered. The generated numerical sets were tackled with univariate (Analysis of Variance) and multivariate (Multiple Discriminant Analysis) techniques. The results demonstrate significant statistical differences between the media of the considered parameters and prove that the *"in vitro"* behavior investigated in the *L. chagasi – T. cruzi* mixed culture precisely differs from the *L. chagasi* and *T. cruzi* pure cultures.

Key words: *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, *in vitro* culture.

REFERENCIAS

Allain C., Poon L. S., Chan C. S. G., Richmond W. & Fu P. C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20:** 470-475.

Attias A. (1991). Parasitología Clínica. Mediterraneo. Santiago de Chile.

Bastrenta B., Mita N., Buitrago R., Vargas F., Flores M., Machane M., Yacsik N., Torrez M., Le Pont F. & Breniere F. (2003). Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **98:** 255-264.

Bates P. & Tetley A. (1993). *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acid pH. *Exp. Parasitol.* **76:** 412-423.

Bringaud F., Riviere L. & Coustou V. (2006). Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol. Biochem. Parasit.* **149:** 1-9.

Coppens I., Ter-Kuile B. & Opperdoes F. (1992). Impairment of growth of *Leishmania donovani* by *Trypanosoma brucei* during co-culture. *Parasitology.* **105:** 393-398.

Corredor-Arjona A., Alvarez-Moreno C. A., Agudelo C. A., Bueno M., Lopez M. C., Caceres E., Reyes P., Duque B. S., Gualdon L. E. & Santacruz M. M. (1999). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infection and risk factors in a Colombian indigenous population. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **41:** 229-234.

Furuya T., Kessler P., Jardim A., Schnaufer A., Crudder C. & Parsons M. (2002). Glucose is toxic to glycosome-deficient trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **99:** 14177-14182.

Gu Z., Wang J., Li M., Zhang J. & Gong X. (2007). Redescription of *Trypanosoma siniperca* Chang 1964 from freshwater fish of China based on morphological and molecular data. *Parasitol. Res.* **100:** 395-400.

Hart D. T. & Coombs G. H. (1982). *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp. Parasitol.* **54:** 397-409.

Kollien A. H. & Schaub G. A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatomine. *Parasitol. Today.* **16:** 381-389.

Levick M. P., Tetaud E., Fairlamb A. H. & Blackwell J. M. (1998). Identification and characterisation of a functional peroxidoxin from *Leishmania* major. *Mol. Biochem. Parasitol.* **30:** 125-137.

Marquardt W. C., Demeree R. S. & Grieve R. B. (2000). *Parasitology and Vector Biology.* Harcourt – Academic Press. San Diego, USA.

McConville M. J., Mullin K. A., Ilgoutz S. C. & Teasdale R. D. (2002). Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **66:** 122-154.

Morel C. (1999). Chagas disease, from discovery to control – and beyond: history, myths and lessons to take home. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94:** 3-16.

Navarro M. C., De Lima A. R., Askue J. & Contreras V. T. (2003). Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98:** 83-91.

Opperdoes F. R. & Coombs G. H. (2007). Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol.* **23:** 149-158.

Pianka E. R. (2000). *Evolutionary Ecology.* Benjamin-Cummings, Addison-Wesley-Longman. San Francisco, USA.

Pielou E. C. (1977). *Mathematical ecology.* John Wiley & Sons. New York, USA.

Pielou E. C. (1984). *The interpretation of ecological data. A primer on classification and ordination*. John Wiley & Sons. New York, USA.

Reinhold J. G. (1953). Manual determination of serum total protein albumin and globulin fractions by Buiret method. pp. 88-89. En: *Standard Methods of Clinical Chemistry*. vol. 1. Ed. Reiner, M. Academic Press. New York, USA.

Roberts C. W., McLeod R., Rice D. W., Ginger M., Chance M. L. & Goad L. J. (2003). Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasit.* **126:** 129-142.

Rogerson G. & Gutteridge W. (1980). Catabolic metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* **10:** 131-135.

Rolin S., Hanocq-Quertier J., Paturiaux-Hanocq F., Nolan D. & Pays E. (1998). Mild acid stress as a differentiation trigger in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **93:** 251-262.

Sokal R. R. & Rohlf F. J. (1995). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research.* W. H. Freeman. New York. USA.

Ter-Kuile B. & Opperdoes F. (1992). Comparative physiology of two protozoan parasites, *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma brucei*, grown in chemostats. *J. Bacteriol.* **174:** 2929-2934.

Travi B. L., Jaramillo C., Montoya J., Segura I., Zea A., Goncalves A. & Velez I. D. (1994). *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50:** 557-565.

Trinder P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* **6:** 24-27.

Urbina J. A. (2006). Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100:** S9-S16.

Vickerman K. (1976). The diversity of kinetoplastid flagellates. pp. 1-34. En: *Biology of the Kinetoplastida.* Vol. 1. Eds. Lumsden, W.H.R. & Evans, D. A. Academic Press. London, UK.

Vickerman K. (1985). Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Brit. Med. Bull.* **41:** 105-114.

Vickerman, K. (1994). The evolutionary expansion of the trypanosomatids flagellates. *Int. J. Parasitol.* **24:** 1317-1331.

Vickerman K., Tetley L., Hendry K. A. & Turner C. M. (1988). Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. *Biol. Cell.* **64:** 109-119.

World Health Organization. (1990). Control of the Leishmaniasis. World Health Organization Expert Committee. Technical Report. Geneva, Switzerland.

Recibido el 03/02/2009
Aceptado el 28/04/2009