

## Efecto del potencial rédox sobre los parámetros del cultivo de *Trypanosoma cruzi* desarrollado en medio líquido agitado

R.A. MARTÍNEZ, S.A. GUERRERO, H.F. MIGLIETTA\*

Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales (CIEN), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, U.N.L., Paraje El Pozo, 3000 Santa Fe, Argentina

\*Correspondencia. E-mail: hilario@fcb.unl.edu.ar

### RESUMEN

El potencial rédox (Eh) es una propiedad fisicoquímica que presentan los solutos capaces de intercambiar electrones con un electrodo inerte. El potencial rédox influye en el crecimiento bacteriano en forma independiente del oxígeno disuelto. Es escasa la información disponible en relación a cultivos *in vitro* de protozoarios, en particular de *Trypanosoma cruzi*. Para determinar el efecto del Eh sobre los parámetros de cultivos, se empleó la cepa Tulahuén 0, desarrollada en medio CIEN líquido en agitación y se ensayaron valores de Eh entre 310 mV (testigo) y 110 mV en 11 réplicas diferentes y duplicadas. Se determinaron pH, velocidad específica de desarrollo ( $\mu$ ), Eh, rH, velocidad de consumo de glucosa y rendimiento. Los resultados muestran que  $\mu$  varía en forma directa con el Eh. Se establece una alta correlación ( $r = 0,93$ ;  $P < 0,01$ ) entre rH [ $rH = (Eh_{(V)} + 0,06 \text{ pH})/0,03$ ] y  $\mu$ , manteniendo constante la concentración de oxígeno disuelto. Los otros parámetros del medio no mostraron variaciones significativas. Se concluye que variaciones en el Eh del medio de cultivo afectan en forma significativa la  $\mu$  del *T. cruzi* y que es una variable a tener en cuenta cuando se ensayan sustancias con probable efectos tripanocidas.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, potencial rédox, cultivos de protozoarios

### SUMMARY

**Effect of redox potential on culture parameters of *Trypanosoma cruzi* developed in liquid stirred media.** The redox potential (Eh) is a physico-chemical property presented by solutes able to interchange electrons with an inert electrode. The redox potential influences bacterial growth in an independent way from dissolved oxygen. The available information about protozoaries *in vitro* grown is scarce, being *Trypanosoma cruzi* main example. *T. cruzi* Tulahuén 0 strain, developed in CIEN liquid stirred media, was used to determine the Eh effect on growth parameters. Eh values between 310 mV (reference) and 110 mV were measured in 11 different samples and by duplicate. pH, m, Eh, rH, consume glucose rate and efficiency were determined. Results show that specific rate of development ( $\mu$ ) varies in a direct way with Eh. A high correlation ( $r = 0.93$ ;  $P < 0.01$ ) between rH ( $rH = Eh_{(V)} + 0.06 \text{ pH}$ ) and  $\mu$  was established, even when dissolved oxygen concentration remained constant. Other parameters in the growing medium showed no significant variations. It is concluded that changes on Eh in the medium significantly affect of *T. cruzi*'s growth being a variable to take into account when potential tripanocide substances are analyzed.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, redox potential, protozoaries growths

El potencial rédox es una propiedad fisicoquímica que presentan las soluciones acuosas donde se encuentran presentes solutos capaces de intercambiar electrones con un electrodo inerte. El potencial rédox es conocido por influir en el desarrollo bacteriano (3). Este parámetro ha sido estudiado en forma intensiva en los últimos años para conocer la naturaleza de dos fenómenos intrigantes: 1) magnitudes positivas del Eh, como consecuencia del oxígeno disuelto en el medio, inhiben el desarrollo de la mayoría de las bacterias anaerobias, 2) valores positivos similares del Eh, logrados por la adición de otras sustancias químicas al medio, pueden no afectar el desarrollo microbiano (3). También, diferentes efectos de la concentración de oxígeno y potencial rédox en el crecimiento y supervivencia de *Escherichia coli*, sugieren

que ésta es afectada por el potencial rédox en forma independiente, tanto de la naturaleza del oxidante empleado, como de la concentración del oxígeno disuelto en el medio (9, 10). Para explicar los efectos del Eh se supone que alguna molécula rédox interactúa en la cadena de transferencia de electrones, alterando el transporte y la fuerza protón motriz (2). En otros microorganismos, al mantener el cultivo en ciertos valores del potencial rédox, se logra bloquear la transferencia de  $O_2$  desde la fase gas a la líquida (4). Los cambios inducidos en el potencial rédox, en cultivos puros de *S. typhimurium*, hacen que las células sean más o menos sensibles al stress térmico (12) y en cultivos mezclados con otros microorganismos Gram-negativos, dichos cambios se encuentran asociados a la inhibición del crecimiento de *S.*

*typhimurium* por los otros competidores gram-negativos (13). En cultivos *in vitro* de protozoarios, es escasa la información disponible en relación a la influencia del potencial rédox del medio de cultivo sobre el desarrollo. El objetivo de este trabajo es detectar si variaciones en el valor del potencial rédox al inicio de cultivos *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* influyen en los parámetros del cultivo, en condiciones de valores constantes del oxígeno disuelto en el medio.

El medio de cultivo utilizado fue medio CIEN líquido, de composición semidefinida (15). Se empleó la cepa Tulahuén 0 de *T. cruzi*, mantenida en medio CIEN líquido, por subcultivos sucesivos. La solución de ácido ascórbico se preparó en agua bidestilada, a la concentración de 750 mmoles/l y se esterilizó por filtración a través de membrana con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Se repartió en tubos y se mantuvo congelada a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso. La solución de glucosa se preparó en agua bidestilada a la concentración de 1,6 mmol/ml y se esterilizó por filtración a través de membrana con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Las medidas del potencial rédox se realizaron con un potenciómetro de estado sólido con electrodos de Pt y de calomel. Los electrodos se vincularon mediante puente salino con solución saturada de KCl agarizada al 2% p/V. El resultado se expresó en mV. El rH, mediante la expresión:  $\text{rH} = (E_{\text{n(v)}} + 0,06 \text{ pH}) / 0,03$  (11). El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer, sobre muestras diluidas en solución de NaCl isotónica tamponada y formolada al 1% V/V. El oxígeno disuelto se determinó mediante un método electrométrico, con electrodo de Pt recubierto con membrana de teflón, empleando una solución de KCl saturada y luego diluida al  $\frac{1}{2}$  y un electrodo de referencia de calomel. El electrodo fue calibrado en una operación previa. Para la determinación de glucosa se utilizó un *kit* de diagnóstico de glucosa por el método enzimático (Glicemia enzimática. Wiener Lab. Rosario, Argentina) sobre una muestra de medio de cultivo previamente centrifugado. Para las medidas de pH se empleó un pHmetro, con electrodos de vidrio y de Ag/AgCl. El medio de cultivo se preparó en un solo *batch*, se repartieron 50 ml en cada frasco Erlenmeyer de 250 ml de capacidad y se esterilizó a 0,5 atm, 15 min. Luego se adicionaron 5% V/V de suero fetal bovino y la cantidad de glucosa necesaria para una concentración final de 33 mmol/l. El ácido ascórbico se adicionó de 1,5 a 15  $\mu\text{mol/ml}$  en una serie de 10 frascos Erlenmeyers. A uno no se le adicionó el ácido ascórbico, obrando como testigo. Los frascos Erlenmeyers se inocularon con epimastigotes de *T. cruzi*, provenientes de un mismo pool, con una densidad final del orden de  $10^7$  cél/ml. Se incubaron en agitador rotativo a 100 rpm, durante 72 hs. a  $28\text{ }^\circ\text{C}$ . Se tomaron 5 ml de muestra cada 24 hs., a partir del tiempo cero hasta las 72 hs. Una parte alícuota de la muestra se destinó a recuento celular. La otra parte se centrifugó a 2000 rpm durante 30 min. El

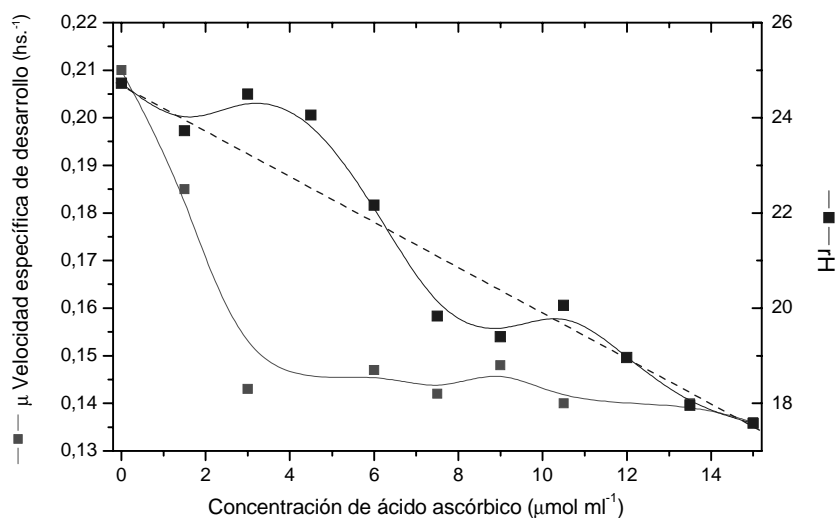
sobrenadante se destinó a las otras determinaciones. El ensayo se realizó por duplicado.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos. El valor del rH desciende en relación con la cantidad de ácido ascórbico agregado, con una pendiente de  $-0,476 \text{ rH ml } (\mu\text{ mol ácido ascórbico})^{-1}$  en el rango ensayado. La velocidad específica de desarrollo ( $\mu$ ) del *T. cruzi*, determinada entre tiempo cero y 72 hs. de cultivo, disminuye a medida que el potencial rédox inicial se aleja de los valores del cultivo testigo. Existe una correlación alta entre los valores del rH y los de la velocidad específica de desarrollo. El coeficiente de correlación es  $r = 0,93$ , ( $P < 0,01$ ). El rendimiento de células producidas por  $\mu\text{mol}$  de glucosa consumida ( $y$ ) decrece con la adición de ácido ascórbico con una pendiente de  $-0,00515 \times 10^7 \text{ cél prod ml } (\mu\text{ mol gluc. cons. } \mu\text{ mol ác ascórb})^{-1}$  y el coeficiente de correlación con el rH es  $r = 0,385$  ( $P > 0,05$ ), pequeño para acreditar una correlación válida. La velocidad de consumo de glucosa ( $\mu$ ) por las células de *T. cruzi* no cambia al variar los valores del rH. El valor medio de la velocidad de consumo de glucosa,  $\bar{v} = 0,664 \mu\text{ mol glucosa cons. } (10^7 \text{ cél } 24 \text{ hs.})^{-1}$ , es similar al que se obtiene para el testigo. Se podría estimar que los cambios en el rH del medio no alteran el metabolismo de la glucosa en el *T. cruzi*. Es oportuno aclarar que los cambios en los parámetros del cultivo considerados no se encuentran asociados a la concentración de oxígeno disuelto en el medio, cuyo valor para el ensayo se mantuvo en  $C_{\text{O}_2} = 247,6 \pm 23 \text{ nmol O}_2/\text{ ml}$ . La velocidad específica de desarrollo disminuye de  $0,210 \text{ hs.}^{-1}$  a  $0,145 \text{ hs.}^{-1}$  con los 2 primeros agregados de ácido ascórbico (rH 23,5 y rH 24,3), siguiendo una recta con pendiente  $-2,1 \times 10^{-2} \text{ hs.}^{-1} \text{ ml } (\mu\text{ mol ác. asc.})^{-1}$ . Se puede observar que para los agregados subsiguientes de ácido ascórbico, los cambios de  $\mu$  son menos marcados y siguen una recta con pendiente  $-8,3 \times 10^{-4} \text{ hs.}^{-1} \text{ ml } (\mu\text{ mol ác. asc.})^{-1}$  (Fig. 1). La variación en los valores del rH del medio, en el rango estudiado, no es deletérea para el *T. cruzi*, pero todo indica que tiene efectos sobre la fisiología celular al afectar la velocidad específica de desarrollo. Se concluye que los cambios en el potencial rédox, al inicio del cultivo, afectan en particular a la velocidad específica de desarrollo del *T. cruzi* en las condiciones del experimento, no así a los otros parámetros del cultivo. El *T. cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Las drogas tripanocidas en uso tienen efectos secundarios nocivos, agregado a la resistencia del parásito a las mismas (17, 18). En la actualidad, distintos productos vegetales están siendo analizados, *in vitro* e *in vivo*, por su potencial efecto inhibitorio de la multiplicación celular de *T. cruzi* y de otros patógenos humanos (1, 7). Estimamos que los cambios en el comportamiento del *T. cruzi*, al variar el potencial rédox del medio de cultivo, pueden ser de utilidad al evaluar los efectos sobre los parámetros del cultivo, *in vitro*, cuando se ensayan extractos crudos de vegetales u otras

**Tabla 1.** Resultados obtenidos de la velocidad específica de desarrollo, pH, velocidad específica de consumo de glucosa, rendimiento, potencial rédox, y rH, al adicionar ácido ascórbico, al inicio, en una serie de 1,5 a 15  $\mu\text{mol/ml}$ , al medio de cultivo de *T. cruzi*, cepa Tulahuén O.

Los valores de la tabla corresponden al promedio de 2 ensayos realizados en forma simultánea.

Ácido ascórbico $\mu\text{mol/ml}$	pH 0 hs.	$\mu$ Célula prod. /cél. 24 hs	$E_h$		rH 0 hs.	$v$ mmol gluc.cons./ $10^7$ cél 24 hs.	$y$ $10^7$ Cél prod/ $\mu\text{mol}$ glucosa cons.
			0 hs. mV	24 hs. mV			
0,0	7,20	0,210	310	250	24,73	0,66	0,318
1,5	7,25	0,185	280	235	23,73	0,64	0,286
3,0	7,25	0,143	300	240	24,50	1,04	0,137
4,5	7,20	0,172	290	230	24,06	0,50	0,334
6,0	7,25	0,147	230	170	22,16	0,59	0,249
7,5	7,25	0,142	160	80	19,83	0,62	0,197
9,0	7,20	0,148	150	75	19,40	0,59	0,251
10,5	7,20	0,140	170	100	20,06	0,60	0,233
12,0	7,15	0,158	140	70	18,96	0,69	0,229
13,5	7,15	0,140	110	55	17,96	0,68	0,206
15,0	7,10	0,136	101	50	17,58	0,69	0,197



**Figura 1.** Variación de la velocidad específica de desarrollo y el rH al inicio del cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en función de la cantidad de ácido ascórbico agregado al medio de cultivo.

sustancias, en la búsqueda de productos tripanocidas. Por otra parte, en los tripanosomátidos, en forma similar a otros organismos de metabolismo aerobio, los fenómenos de oxirreducción intracelular se relacionan con una variada gama de procesos, como la detoxificación de hidroperóxidos (5, 16), la síntesis de ADN (6, 14), la activación de enzimas y de los factores de transcripción

(8), etc. En consecuencia, sería de importancia evaluar las modificaciones que podrían producirse en estos metabolismos al modificarse el potencial rédox extracelular.

**Agradecimientos:** El trabajo fue subsidiado por el Programa CAI + D' 2002 de la UNL. Código: 12/B3151208.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Araya JE, Solange da Silva IN, Mortara RA, Manque P, Cordero E, Sagua H, *et al* (2003) Diterpenoids from *Azorella compacta* (Unbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst. Oswaldo Cruz 93: 413-418.
2. Bespalov VA, Zhulin IB, Taylor BL (1996) Behavioral responses of *Escherichia coli* to changes in redox potential. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10084-10089.
3. Breznak JA, Costilow RH (1994) Physico-chemical factors in growth. En: Gerhardt P, Nurray RG, Wood WA, Krieg NR (Eds.), Methods for general and molecular bacteriology, ASM Press, Washington, DC, p. 137-155.
4. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH (2000) The response to oxidative stress of *Fusobacterium nucleatum* grown in continuous culture. FEMS Microbiol. Lett. 187: 31-34.
5. Docampo R (1990) Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem. Biol. Interact. 73: 1-27.
6. Dormeyer M, Reckenfelderbaumer N, Ludemann H, Krauth-Siegel RI (2001) Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. J. Biol. Chem. 276: 10602-10606.
7. Echevarria A, Torres Idavoy D (2001) Efecto de un extracto de *Petiveria* L sobre el crecimiento de *Giardia lamblia*, *in vitro*. Rev. Cubana Med. Milit. 30: 161-165.
8. Gelhaye E, Rouhier N, Gerar J, Jolivet Y, Gualberto J, Navrot N, *et al* (2004) A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 14545-14550.
9. George SM, Richardson LC, Pol UE, Peck MW (1998) Effects of oxygen concentration and redox potential on recovery of sub lethally heat damage cells of *Escherichia coli* 0157H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocitogenes*. J Appl. Microbiol. 84: 903-909.
10. George SM, Peck MW (1998) Redox potential affects the measured heat resistance of *Escherichia coli* 0157H7 independently of oxygen concentration. Lett. Appl. Microbiol. 27: 313-317.
11. Glasstone S (1953) Tratado de Química Física. Aguilar SA, Madrid, p. 851-854.
12. Komitopoulou E, Baiton NJ, Adams MR (2004) Oxidation-reduction potential regulates RpoS levels in *Salmonella typhimurium*. J. Appl. Microbiol. 96: 271-278.
13. Komitopoulou E, Baiton NJ, Adams MR (2004) Premature *S. typhimurium* growth inhibition in competition with other gram-negative organisms is redox potential regulated via RpoS induction. J. Appl. Microbiol. 97: 964-972.
14. Ledemann H, Dormeyer M, Sticherling C, Stallmann D, Follmann H, Krauth-Siegel RL (1998) *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. FEBS Lett. 431: 381-385
15. Miglietta HF, Martinez RA, Barrios MA, Marzocchi VA (1984) Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*. Comparación de cultivos en medio bifásico y sumergido. Medicina. 40 (S1): 254.
16. Muller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL (2003) Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. Trends Parasitol. 19: 320-328
17. Rodrigues Coura J, de Castro S. (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97: 3-24.
18. Stoppani A (1999) Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Medicina 59 (Supl. 2): 147-165.