

## UTILIZACIÓN DE *Lepidium peruvianum* MACA, COMO MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE *Trypanosoma cruzi*

Charles Saldaña C\*, Ofelia Córdova P\*, Franklin Vargas V\*

### RESUMEN

Por sus características nutritivas de alto valor, se ensayó la posible utilidad del *Lepidium peruvianum* maca, como un medio para cultivar *Trypanosoma cruzi*. Bajo condiciones experimentales se procedió a incubar epimastigotes de *T. cruzi* en cuatro medios de cultivo bifásicos diferentes, a base de *Lepidium peruvianum* maca, los cuales fueron comparados con el medio de cultivo BHI como control. La incorporación de maca como medio de cultivo permitió el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*; se determinó que el medio que contenía maca enriquecida con sangre entre los componentes sólidos y la infusión de maca en la fase líquida, presentó un mayor crecimiento ( $3,41 \times 10^5$  parásitos/mL) con respecto a los otros medios de cultivo al quinto día ( $p < 0,05$ ).

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*; Medio de cultivo; *Lepidium peruvianum* (fuente: DeCS BIREME).

### ABSTRACT

Because of its high nutritional value, the possible usefulness of *Lepidium peruvianum* (maca) was assayed, as a possible culture medium for *Trypanosoma cruzi*. Under experimental conditions, *T. cruzi* epimastigote were incubated in four biphasic different culture media including *Lepidium peruvianum* (maca), and they were compared against BHI culture medium as a control. The inclusion of maca in the culture media allowed *Trypanosoma cruzi* growth; it was determined that the medium containing blood-enriched maca amongst its solid components and a maca infusion in the liquid phase had better growth ( $3,41 \times 10^5$  parasites/mL) compared to the other culture media after five days ( $p < 0,05$ ).

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*; cultivate way; *Lepidium peruvianum* (source: DeCS BIREME).

### INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una zoonosis que se encuentra ampliamente distribuida en el continente americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta Chile, Argentina y en algunos países de las Antillas<sup>1</sup>. Se estima que existen a nivel mundial de 18 a 20 millones de personas infectadas y 40 millones de personas expuestas; las infecciones son asintomáticas y las sintomáticas pueden ser agudas o crónicas<sup>2</sup>, por sus graves consecuencias sobre la salud y repercusiones socio-económicas constituye un problema de salud pública que está muy relacionado con el desarrollo económico y social<sup>1-3</sup>.

En el Perú, existe 9% de endemia de esta enfermedad, con 600 000 infectados y siete millones de personas en riesgo de adquirirla (34% de la población total), la macrorregión sur del país (Arequipa, Moquegua, Tacna,

Ica, Ayacucho y Apurímac) donde existen alrededor de un millón de personas expuestas a la enfermedad, esta considerada como la principal zona chagásica; sin embargo, también se han reportado casos en la vertiente noreste (La Libertad, Tumbes, Piura) y centro oriental de los Andes (Cajamarca, Amazonas, San Martín y Ucayali)<sup>4</sup>.

El *T. cruzi* presenta varios estadios durante su crecimiento y desarrollo: el epimastigote, que es móvil y se desarrolla en el intestino del insecto vector, *Triatoma infestans*, y en los medios de cultivo en el laboratorio; el trypomastigote, que se puede encontrar al final del intestino del triatomino y en la sangre del hospedero vertebrado, es muy móvil; y el amastigote que es el tipo intracelular, inmóvil, se presenta en forma de nidos en el hospedero vertebrado<sup>5</sup>.

\* Instituto de Investigación en Microbiología y Parasitología Tropical. Universidad Nacional de Trujillo. La Libertad, Perú.

El *Trypanosoma cruzi* metaboliza la glucosa y otros azúcares, realizando una fermentación aeróbica con excreción de ácidos orgánicos; además tiene un tropismo hacia el componente graso, indicando que este microhábitat le proporciona al parásito compuestos necesarios en sus estrategias para desarrollar su ciclo intracelular<sup>6</sup>.

El *Lepidium peruvianum* (maca) es una de las especies con mayor valor alimenticio, por su alto contenido, comparables con los recomendados por la FAO - OMS, de aminoácidos esenciales como la lisina, tirosina y fenilalanina. Asimismo, presenta una fracción grasa rica en ácido linoléico, ácido graso muy utilizado por el organismo para la biosíntesis de ácidos grasos esenciales<sup>7</sup>.

La maca conocida inicialmente como *Lepidium meyenii* Walpers, desde el punto de vista taxonómico es una planta fanerógama, clase dicotiledónea, orden Papaverales, única representante de la familia Brassicaceae, que crece silvestre y domesticada en las altiplanicies de la meseta de Bombón, entre los departamentos de Pasco y Junín, en los Andes Centrales de Perú, entre los 3000 y 4500 msnm. Se desarrolla en temperaturas que oscilan entre los 3 y 7 °C durante el día y hasta -10 °C durante la noche<sup>8-10</sup>

Se ha demostrado el valor nutricional y energético de la maca en modelos animales<sup>11</sup> y en humanos<sup>12</sup>, esto debido a que los niveles de minerales, proteínas y vitaminas de la maca son altos comparados con otras especies<sup>7,10</sup>. Muchos de estos mismos elementos se encuentran en medios de cultivo usados en laboratorio para el cultivo de *T. cruzi*, por ejemplo el medio BHI, que contiene infusión de cerebro de ternera, infusión de corazón de res, peptona de gelatina, cloruro de sodio, fosfato disódico dodecahidratado, glucosa, agua y cloruro de potasio, a pH 7,0 +/- 0,2<sup>13</sup>.

En consideración a la importancia del cultivo de *T. cruzi* para su identificación en el laboratorio y otros estudios biológicos y moleculares, creemos conveniente introducir *Lepidium peruvianum* maca, en el cultivo de tripanosomátidos, aprovechando su riqueza de nutrientes, y que mediante estudios comparativos con otros medios de cultivo se determine su beneficio.

## EL ESTUDIO

### MATERIAL BIOLÓGICO

Las raíces de maca fueron adquiridas en el mercado de la ciudad de Trujillo, procedentes de Ayacucho e identificadas como *Lepidium peruvianum* ecotipo blanca, en

el Herbarium Truxillensis de la Universidad Nacional de Trujillo.

El estudio se realizó en el Instituto de Microbiología y Parasitología Tropical (INIMYPAT) de la Universidad Nacional de Trujillo. Se usó la cepa de referencia de *Trypanosoma cruzi* maracay aislada de *Panstrongylus chinai*, caracterizada en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad de Granada, España, y proporcionada por el Laboratorio de Protozoología de la Universidad Nacional de Trujillo.

### PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO A BASE DE MACA

Las raíces de *Lepidium peruvianum* fueron previamente lavadas con agua destilada y secadas a 60 °C por una semana, luego se disolvió 50 gramos de maca en un litro de agua destilada, se hirvió por 15 minutos, y luego se dejó enfriar. Finalmente se decantó y la fase líquida se guardó para preparar los medios de cultivo, a los cuales se les denominó medio maca.

Se controló el pH del medio maca a 7,2 semejante al pH del medio BHI; se observó que era estable a temperatura ambiente (20 a 25 °C) y a temperatura de conservación de 4 °C.

### CULTIVOS DE FORMAS EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi*

Los cultivos de epimastigotes se realizaron en medios bifásicos conteniendo una fase sólida constituida de 5 mL de agar base de maca solo o con sangre y una fase líquida constituida de 2mL de caldo de maca o solución salina fisiológica (SSF), como medio de cultivo control se utilizó el medio BHI (Tabla 1).

Posteriormente, se procedió a sembrar  $1 \times 10^5$  parásitos/mL en los tubos conteniendo los diferentes medios de cultivo y se incubaron a 28 °C (temperatura óptima de crecimiento de formas epimastigotes) durante siete días. Todos los medios de cultivo se ensayaron por triplicado.

**Tabla 1.** Medios de cultivo bifásicos usados para el desarrollo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Nombre	Medio de Cultivo	
	Fase sólida	Fase líquida
Control	BHI + sangre	SSF
M1	Maca + sangre	SSF
M2	Maca	SSF
M3	Maca + sangre	Maca
M4	Maca	Maca

Para la determinación de la curva de crecimiento, se siguió el método del recuento total en cámara citométrica, se extrajo una gota del medio de cultivo de los diferentes tratamientos a 0, 24, 48, 72, 96 y 168 horas y se colocó en la cámara de Neubauer para su recuento citométrico bajo observación al microscopio<sup>14</sup>, los valores encontrados se graficaron en función del tiempo, a fin de determinar la curva de crecimiento.

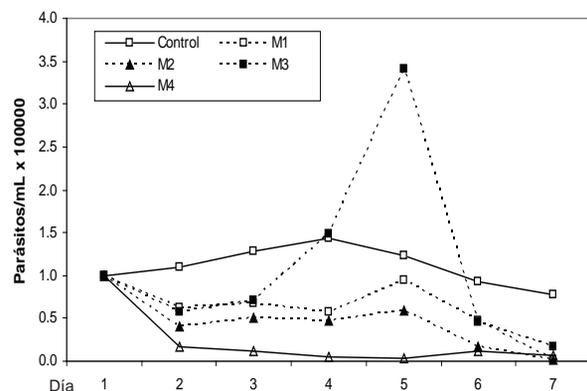
#### ANÁLISIS DE DATOS

Se creó una base de datos en Excell® y se usó el paquete estadístico Statistic v.5.0. Se evaluaron las diferencias de las medias para cada punto de la curva de crecimiento de epimastigotes entre los medios de cultivos ensayados usando el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, se consideró significativo cuando se obtuvo  $p < 0,05$ .

#### HALLAZGOS

De los medios de cultivo ensayados, sólo el M3 (agar maca con sangre como fase sólida, e infusión de maca como fase líquida) demostró desarrollo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Figura 1), teniendo un promedio de  $1,115 \times 10^5$  parásitos/mL, mostrando incluso mayor crecimiento que el medio BHI ( $p < 0,05$ ) al quinto día.

Así mismo es posible observar que en relación a las cuatro fases de la curva de crecimiento de un microorganismo (fase de reposo, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de declive o muerte) la logarítmica o exponencial se da alrededor del 4<sup>to</sup> al 6<sup>to</sup> día (96 a 144 horas) del tiempo de incubación (Figura 1).



**Figura 1.** Curva de crecimiento del *Trypanosoma cruzi* según diferentes medios de cultivo. Se observa un óptimo crecimiento con el medio de cultivo que se encuentra constituido de agar maca con sangre como fase sólida, e infusión de maca como fase líquida (M3). \*:  $p < 0,05$ .

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con el medio de cultivo M3 (agar maca con sangre como fase sólida, e infusión de maca como fase líquida) evidencian que la incorporación de *Lepidium peruvianum* maca, puede ser útil como un medio de cultivo para *Trypanosoma cruzi* lo cual genera nuevas expectativas para el uso de este recurso autóctono, así como por su evidente menor costo y fácil preparación en relación con el medio BHI.

La curva de crecimiento dividida en tres fases hallada con el M3 es similar a la encontrada en otros estudios con diferentes medios de cultivo para *Trypanosoma cruzi*<sup>14</sup>, así mismo el crecimiento máximo que se da en el quinto día ha sido corroborada con medios de cultivo como medio Grace's, RPMI-1640, SDM-79, MTL y TC-199<sup>15</sup>; esto probablemente por el aporte nutricional que brinda la maca para el desarrollo de este parásito<sup>16</sup>.

Sin embargo, es necesario realizar próximos estudios con el M3, incorporando el uso de diferentes ecotipos de maca (blanca, roja, negra, amarilla) para determinar cual es el ecotipo más recomendable, y analizar los componentes de los medios preparados; así como comparar los resultados con medios más idóneos para el cultivo del *T. cruzi* y buscar perfeccionar la técnica u otros aditamentos al medio que podrían mejorar su rendimiento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ.** The impact of Chagas disease control in Latin America. A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(5): 603-12.
2. **World Health Organization Expert Committee.** Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser 2002; 905: 1-109.
3. **Rodriguez-Morales A.** Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2005; 22(2): 123-33.
4. **Perú, Ministerio de Salud.** Doctrina, normas y procedimientos para el control de la tripanosomiasis o Enfermedad de Chagas en el Perú. Lima: MINSa; 1998.
5. **Vega S, Náquira C.** Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas). 2<sup>da</sup> ed. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2006. Serie de Normas Técnicas N° 26.
6. **Villasuso AL, Aveldaño M, Vicario A, Machado-Domencech EE, García de Lema M.** Culture age and carbamoylcholine increase the incorporation of endogenously synthesized linoleic acid in lipids of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biochim Biophys Acta 2005; 1735(3): 185-91.

7. **Quirós CF, Aliaga R.** Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). En: Herman M, Heller J (eds). Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca, yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: International Plant Genetic Resources Institute; 1997. p. 173-97.
8. **León J.** The Maca (*Lepidium meyenii*), a little know food plant of Peru. Econ Bot 1964; 18:122-27.
9. **Tovar O.** Plantas medicinales del Valle de Mantaro. Lima: CONCYTEC; 2001.
10. **Obregón V.** Maca, planta medicinal y nutritiva del Perú. Lima: Instituto de Fitoterapia Americano; 1998.
11. **Canales M, Aguilar J, Prada A, Marcelo A, Huamán C, Carvajal L.** Evaluación nutricional de *Lepidium meyenii* (MACA) en ratones albinos y su descendencia. Arch Latinoam Nutr 2000; 50(2): 126-33.
12. **Roncero G, Ramos W, Garmendia F, Arroyo J, Gutiérrez J.** Eficacia de la maca fresca (*Lepidium meyenii* Walp) en el incremento del rendimiento físico de deportistas en altura. An Fac Med 2005; 66(4): 269-73.
13. **México, Secretaría de Salud.** Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos [documento en internet]. México: Secretaría de Salud; 1994. [Fecha de acceso: 22 de septiembre de 1995]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/089ssa14.html>.
14. **Zainderberg A, Tournier HA, Schinella GR, Buschiazzo HO.** *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. Rev Latinoam Microbiol 2000; 42(1): 21-26.
15. **Miralles DM, Marín C, Magán R, Fernández-Ramos C, Entrala E, Cordova O, et al.** In vitro culture and biochemical characterization of six trypanosome isolates from Peru and Brazil. Exp Parasitol 2002; 102(1): 23-29.
16. **Dini A, Migliuolo G, Rastrelli L, Saturnino P, Schettino O.** Chemical composition of *Lepidium meyenii*. Food Chem 1994; 49(4): 347-49.

---

**Correspondencia:** Charles Saldaña Chafloque. Instituto de Investigación en Microbiología y Parasitología Tropical. Universidad Nacional de Trujillo.  
Dirección: Urb. Manuel Arévalo II-Etapa Mz. B-30 Lote: 26. La Esperanza – Trujillo. La Libertad. Perú.  
Teléfono: 00- 51- 44-274877  
Correo electrónico: scorpium211@yahoo.es