

EL CONSUMO DE OXIGENO DE CEPAS DE UTA Y ESPUNDIA (*Leishmania*) CON MONOSACARIDOS.

Margarita Aurazo R., Inés Gárate C. y César Náquira V.

Departamento de Microbiología y Parasitología.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

SUMARIO

Se ha realizado un estudio comparativo de la respiración y la acción de los monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa y manosa) sobre el consumo de oxígeno entre dos cepas de *Leishmania* provenientes de casos clínicos de leishmaniasis cutánea pura (uta) y de leishmaniasis cutáneo-mucosa (espundia) del Perú.

SUMMARY

This is a comparative study of respiration and monosaccharid action (Glucose, Fructose, Galactose and Mannose) about oxygen consumption between two strains of *Leishmania* isolated from patients with cutaneous (uta) and muco-cutaneous leishmaniasis (espundia) from Peru.

INTRODUCCION

La leishmaniasis tegumentaria se presenta en el Perú bajo dos formas clínicas diferentes: la leishmaniasis cutánea pura, que en nuestra sierra es conocida desde tiempos remotos como "uta" y la leishmaniasis cutáneo-mucosa llamada "espundia", predominante en la selva peruana.

Se ha discutido si las leishmaniasis son producidas por una sola especie de *Leishmania* con manifestaciones diferentes según el hospedero o si son varias especies, sub-especies o razas de *Leishmania* con características patógenas diferentes que expliquen las diversas modalidades clínicas, SIROL y cols. (1974). LUMSDEN (1974) propuso que para la clasificación de estos microorganismos se tuvieran en cuenta sus caracteres intrínsecos (morfología, estructura química, efectos inmunológicos) y extrínsecos (respuesta de otros componentes a la invasión de los organismos). En las investigaciones actuales hay una inclinación por estudiar las características bioquímicas y fisiológicas de estos organismos para su mejor sistematización.

En el presente trabajo se hace un estudio comparativo de los aspectos básicos de la bioquímica de los microorganismos causantes de la "uta" y "espundia". Este estudio comprende: a) La respiración y b) La acción de los monosacáridos sobre el consumo de oxígeno.

MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se han utilizado dos cepas de *Leishmania*, una de ellas (L-678) aislada de un caso humano de leishmaniasis andina cutánea pura, forma denominada "uta"; y la otra cepa (L-394) aislada de un paciente de leishmaniasis selvática cutánea que correspondía a la fase cutánea de la forma llamada "espundia", ya que el paciente fue tratado oportunamente, sin haberse presentado lesiones mucosas.

Las cepas fueron mantenidas en medio Tobie con sangre desfibrinada e inactivada de conejo en la proporción de 15% para los medios destinados a la cepa de "uta" y 10% en los medios para la cepa de "espundia". La obtención de los parásitos para los experimentos se realizó cuando las cepas se encontraban en la etapa semilogarítmica de crecimiento, para ello se debieron determinar las curvas de crecimiento de ambas cepas mediante el método por conteo directo de las formas promastigote durante los primeros siete días después de la siembra.

Los experimentos para el cociente respiratorio, respiración endógena y efecto de los monosacáridos sobre el consumo de oxígeno fueron realizados en el aparato Warburg (marca B. Braun). La estimación del intercambio de gases fue calculada mediante métodos manométricos, UMBREIT y cols. (1964).

Hicimos uso de los siguientes monosacáridos: D-Glucosa, D-Fructosa, D-Galactosa y D-Manosa. Cada monosacárido fue empleado en solución 0.1 Molar utilizándose en cada experimento 10 micro M. del monosacárido.

Los experimentos fueron realizados a 30°C. Las lecturas fueron hechas cada 10 minutos durante una hora.

Se utilizaron tres frascos-manómetros para cada experimento. Uno de los frascos fue utilizado como termobarómetro y los otros dos se utilizaron con 1.0 ml. de suspensión de parásitos de cada cepa. Los reactivos empleados fueron los siguientes: Buffer fosfato 0.1 M., pH 7.3, Solución Ringer, Hidróxido de potasio al 20%.

Cada cifra dada a conocer en los resultados es promedio de cuatro experimentos.

RESULTADOS

1.—Determinación de las curvas de crecimiento.

Se observó en el primer día un decrecimiento en la cantidad de microorganismos; en el segundo día se inició un crecimiento progresivo hasta el quinto día en la cepa de "uta" y hasta el sexto día en la cepa de "espundia", días en los cuales las cepas llegaron a la fase exponencial de su desarrollo; a partir de estos días se observó un decrecimiento progresivo en la cantidad de microorganismos.

TABLA 1.

TABLA 1
DETERMINACION DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO
POR CONTAJE DIRECTO

DIA	CEPA DE "UTA" PARASITOS/ml.	CEPA DE "ESPUNDIA" PARASITOS/ml.
0	42'000,000	43'000,000
1	14'000,000	11'000,000
2	35'000,000	24'000,000
3	40'000,000	30'000,000
4	60'000,000	40'000,000
5	65'000,000	60'000,000
6	60'000,000	70'000,000
7	24'000,000	31'000,000

2.—Determinación del Cociente Respiratorio.

La cepa de "uta" presentó un cociente respiratorio promedio de 0.96 ± 0.03 . En la cepa de "espundia" se pudo apreciar un cociente respiratorio promedio de 0.96 ± 0.02 .

3.—Respiración endógena.

El oxígeno consumido por la cepa de "uta" fue: 207.15 micro litros $O_2/10^6$

microorganismos y para la cepa de "espundia" se obtuvo un promedio de 192.28 micro litros $O_2/10^6$ parásitos. La probabilidad de desviación es: mayor que 0.5.

4.—Efecto de los carbohidratos sobre el consumo de oxígeno.

En la TABLA 2 se dan a conocer los valores promedio de las cifras resultantes de los experimentos realizados con cada uno de los monosacáridos.

TABLA 2

EFFECTO DE LOS MONOSACARIDOS SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO

MONOSAC.	CEPA	RESPIRACION ENDOGENA	RESPIRACION CON GLUCOSA	% DE INCREM.	DESVIAC. STAND.
GLUCOSA	Uta . . .	199.40 \pm 35.45	340.37 \pm 49.30	70.69	2.42
	Espundia .	388.43 \pm 41.65	646.69 \pm 41.65	66.48	3.71
FRUCTOSA	Uta . . .	192.75 \pm 42.21	365.50 \pm 76.78	89.62	1.97
	Espundia .	126.97 \pm 20.00	224.50 \pm 30.10	76.00	2.70
GALACTOSA	Uta . . .	258.94 \pm 55.20	282.48 \pm 53.08	9.09	0.30
	Espundia .	145.83 \pm 16.47	187.62 \pm 52.20	28.99	0.77
MANOSA	Uta . . .	177.51 \pm 42.66	236.24 \pm 51.32	33.08	0.88
	Espundia .	107.90 \pm 25.78	149.38 \pm 16.95	38.50	1.34

DISCUSION

El mantenimiento de la cepa de "uta" en el laboratorio en los medios de cultivo NNN, Agar Sangre y Tobie es difícil, lo cual no ocurre con la cepa de "espundia". Para obtener una cantidad apreciable de parásitos fue necesario aumentar el contenido de sangre en los medios de cultivo destinados para la cepa

de "uta" (15%) en lugar del 10% en los medios para la cepa de "espundia". Deduciendo que las variaciones observadas en las cepas corresponden a requerimientos nutricionales diferentes.

Se observó que el rango de variabilidad de pH del medio podía ser más amplio en el caso de la cepa de "espundia" que en el de "uta", lo cual puede

estar en relación con la permeabilidad celular que como ha demostrado ZELDON (1960) favorecería, según el pH la absorción de elementos nutricionales.

En las curvas de crecimiento, el máximo punto de crecimiento exponencial corresponde al quinto día en la cepa de "uta" y al sexto día en la cepa de "espundia", lo cual es más corto que lo señalado para otros miembros de la familia Trypanosomatidae; así para *T. cruzi* se señala 10 días según APT y NAQUIRA (1966). La cortedad en el desarrollo exponencial de las cepas de *Leishmania* nos indica la extraordinaria actividad metabólica dentro de los seis días siguientes a la siembra. La aparente mayor cortedad (1 día) en el punto máximo exponencial de la cepa de "uta", en relación a la cepa de "espundia" puede deberse a la mayor actividad metabólica de la primera dado que recibió un mayor aporte nutricional.

El cociente respiratorio reflejaría con una relativa propiedad los cambios metabólicos, sobre todo cuando se están utilizando sustratos ya sea ricos en hidratos de carbono, grasas o proteínas. En el caso de las cepas de "uta" y "espundia" se aprecia que el cociente respiratorio es alto y similar, lo cual pareciera demostrarnos que la actividad metabólica sería similar para ambas cepas, necesitándose un estudio de los metabolismos de los principales nutrientes para confirmar esta aseveración. La alta cifra alcanzada podría indicarnos que la actividad metabólica es preferencialmente proporcionada por el metabolismo de carbohidratos, tal vez en relación con la energía necesaria para su movimiento.

La absorción de los monosacáridos se hace generalmente por gradiente de concentración o por un transporte activo, pareciendo ser éste el más importante, ya que permitiría una mejor regulación de la actividad metabólica de las células así se ha demostrado la presencia de hexoquinazas que catabolizan la fosforilización y absorción de monosacáridos, dichas hexoquinazas podrían ser específicas para cada monosacárido, lo cual indicaría que la absorción no se realizaría a igual velocidad. Se sabe que la glucosa y fructosa son utilizadas en proporciones similares, siendo menor esta utilización para

la galactosa y manosa, por algunos de la familia Trypanosomatidae, VON BRAND (1966).

Uno de los métodos usados para determinar si un carbohidrato puede ser utilizado por los parásitos es la investigación del consumo de oxígeno, VON BRAND (1966). En el presente trabajo se utilizó dicho método, habiéndose realizado el estudio de cuatro monosacáridos: siendo el resultado, el haber observado un incremento similar del consumo de oxígeno por la presencia de glucosa y fructosa y de una menor estimulación por la presencia de galactosa y manosa, lo cual está en líneas generales de acuerdo con lo observado en otros parásitos.

En nuestros resultados, tanto la cepa de "uta" como la de "espundia", son estimuladas por la glucosa en porcentaje similar, estando dicho porcentaje de incremento en similitud con lo encontrado por MANCILLA y cols. (1969) para *L. brasiliensis*.

El estímulo de la fructosa es similar en ambas cepas y este porcentaje de incremento es semejante al proporcionado por la glucosa, lo cual está en relación a lo señalado por VON BRAND (1966).

La galactosa y la manosa estimulan poco el consumo de oxígeno, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas. El bajo porcentaje de incremento de consumo de oxígeno podría estar en relación a una menor absorción y utilización de la misma, cuya causa, entre otras, puede ser la puesta en juego de mecanismos enzimáticos que limitarían su absorción y utilización más oportuna.

De la comparación de los resultados obtenidos para cada una de las cepas, tanto la cepa de "uta" y la cepa de "espundia", no presentan diferencias estadísticamente representativas, lo cual nos induce a afirmar que en relación a la utilización de los carbohidratos, ambas cepas tienen comportamiento similar y que sería interesante estudiar el metabolismo intermediario que pudiera explicar mejor el diferente comportamiento de las cepas, en caso de ser especies diferentes, o datos que expliquen la calidad de lesiones tan distintas en los casos de "uta" y "espundia".

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- APT, W. y NAQUIRA, C. - 1966. Efecto de la Thalidomide sobre el desarrollo en cultivo de *Trypanosoma cruzi*. Bol. Chile. Parasit. **21**: 105-108.
- LUMSDEN, W. - 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. Tr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **68**:74-75.
- MANCILLA, R.; NAQUIRA, C. y LANAS, C. - 1969. Metabolism of glucose-C14 en *Leishmania brasiliensis*. Comp. Biochem. Physiol. **28**:227-232.
- SIROL, J.; DELPRAT, C. y FERRUS, P. - 1974. Les maladies leishmaniennes. Med. Trop. **34**:73-77.
- UMBREIT, W.; BURRIS, R. y STAUFFER, J. - 1964. Manometric techniques. 4ª ed. 305 p. Minneapolis, Burgess.
- VON BRAND, T. - 1966. Biochemistry of parasites. 429 p. New York Academic Press.
- ZELEDON, R. - 1960. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some aminocompounds on the respiration. J. Parasit. **46**:541-551.
-