

NUTRIÇÃO E METABOLISMO DE FORMAS DE CULTURA DE *LEISHMANIA*

Y. P. FIGUEIREDO (1), C. A. da COSTA (2), W. MAYRINK (2), F. G. ARAUJO (2), M. DIAS (3),
M. N. MELO (2), P. MAGALHÃES (5), P. WILLIAMS (4), S. M. BATISTA (2) e M. V. COELHO (2)

RESUMO

Os Autores desenvolveram um meio de cultura líquido, complexo, no qual obtiveram massas de promastigotas em amostras de *Leishmania donovani*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*. Observaram ser a temperatura de 23°C e a faixa de pH 7,0-7,2, ideais para o desenvolvimento dessas espécies, no meio proposto. Dos estudos de metabolismo, relacionados com as trocas de temperatura, verificaram que as espécies testadas apresentaram um comportamento intermediário entre *Crithidia fasciculata* e *Trypanosoma cruzi*. Interpretando a equação de Arrhenius, sugerem diferenças fisiológicas entre as amostras testadas e observaram ainda que malonato, barbital e iodoacetato inibem a respiração de *Leishmania* à 28 e 37°C.

INTRODUÇÃO

Inúmeras diferenças no comportamento fisiológico de amostras de *Leishmania* são relatadas na literatura. JANOVY & POORMAN⁴ mostram diferenças no coeficiente respiratório, em relação à temperatura, entre *Leishmania donovani*, *L. mexicana* e *L. tarentolae*. RUDZINSKA & col.⁹ revelam que a transformação amastigota/promastigota envolve proliferação mitocondrial bastante intensa. Diferenças fisiológicas envolvendo amostras de *L. braziliensis* da Costa Rica são relatadas por ZELEDON & DEMONGE¹⁴. Outros, CASTRO & PINTO²; TRAGER & KRASSNER¹¹, postulam que os diferentes comportamentos clínicos de espécies do gênero *Leishmania* estejam condicionados a uma adaptação a variação de temperatura das diversas partes do corpo do mamífero.

O objetivo de nosso trabalho, é executar um estudo de fisiologia comparada em amostras de *Leishmania* isoladas em diferentes áreas endêmicas do Brasil. Para esse estudo, faz-se necessário a obtenção de grandes quantidades de promastigotas o que não é possível em determinadas amostras, empregando o meio de NNN NICOLLE⁸, fato relatado por LAINSON & SHAW⁶ e também observado por nós.

Nesta primeira parte, procuramos desenvolver um meio de cultura que fornecesse condições adequadas ao crescimento e manutenção de todas as amostras de *Leishmania* mantidas em nosso laboratório. Estudamos também o comportamento do metabolismo

Trabalho realizado nos Departamentos de Zoologia e Parasitologia e Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Grupo de Estudos de Leishmanioses com auxílio do Conselho de Pesquisas da UFMG

- (1) Do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
- (2) Do Departamento de Zoologia e Parasitologia — Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
- (3) Da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto
- (4) Professor Visitante — Conselho Britânico
- (5) Médico Sanitarista da SUCAM

endógeno em várias condições de temperatura e frente à inibidores metabólicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *Leishmania*

L. donovani

Amostra n.º 46 isolada por um de nós (W.M.) de um paciente com calazar proveniente do Município de Caratinga — MG.

L. braziliensis

Amostra n.º 6 isolada pelo Prof. Alencar de um paciente, no Estado de Ceará.

Amostra n.º 100, isolada pelo Dr. Paulo Magalhães de paciente proveniente também da região de Caratinga — MG.

Amostra HB, isolada de baço de Hamster inoculado com a amostra 100 e no qual ocorreu visceralização.

As amostras de n.º 101, 102, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, isoladas por um de nós de pacientes da região de Caratinga, MG, foram utilizadas apenas para testar o crescimento no meio proposto.

Utilizamos também, uma amostra de *L. braziliensis guyannensis* (amostra 1176) e uma de *L. mexicana amazonensis* (amostra PH8) ambas isoladas pelo Dr. Ralph Lainson, a primeira de um paciente no Amapá e a segunda de *Lutzomyia flaviscutellata*, capturado em Belém, Estado do Pará.

Meios de Cultura

Todas as amostras são mantidas rotineiramente no laboratório por passagens quinzenais em meio de NNN empregando o meio LIT, CAMARGO¹ como fase líquida.

O meio proposto, designado como meio T, apresenta a seguinte composição:

Fase A

Adicionar 5 g de Infuso de Fígado (OXOID) a 300 ml de água destilada a 100°C. Manter em ebulição por 5 minutos. Filtrar em algodão por 3 vezes. Ao filtrado, adicionar:

NaCl	7,5 g
KCl	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	8,0 g
Glicose	2,0 g
Triptose (OXOID)	5,0 g
Água destilada — q.s.p.	880 ml

Fase B

Misturar volumes iguais de sangue total de coelho e água destilada. Congelar e degelar à 37°C. Centrifugar a 1600 x g 20 minutos e usar o sobrenadante.

Fase C

Misturar 6 partes de A e 4 partes de B. O pH é acertado para 7,0-7,2 com HCl 0,1 N. Esterilidade é obtida por filtração em placas de Seitz.

Efeito do pH e temperatura no crescimento

Um volume de 5 ml do meio T foi distribuído em tubos "Screwcaps" e as condições de pH e temperatura foram variadas isoladamente. O número de flagelados foi determinado através de contagem eletrônica em Microcell Counter. ToA Modelo 1002 — Sensibilidade R2 F2 e Discriminador 350.

Obtenção de massa de promastigotas

50 ml de meio T foram inoculados com 10 ml de uma cultura de *Leishmania* em crescimento exponencial e incubados a 23°C durante 48 horas. A seguir a cultura foi centrifugada a 1600 x g por 10 minutos a 4°C e descartado o sobrenadante. O sedimento foi lavado duas vezes em tampão fosfato pH 7,2-0,2 M, e finalmente ressuspenso e diluído no mesmo tampão até a obtenção de 280 UK (fotocolorímetro Klett-Sumerson filtro verde), após o que as células foram examinadas ao microscópio para verificar motilidade e ausência de contaminação.

Respiração

Estudos respirométricos foram feitos utilizando-se um monitor biológico de oxigênio, YSI-modelo 43 (Yellow Spring Instrument Co. Inc.), acoplado a um circulador Haake, modelo FJ., e um registrador Bausch Lomb. Todos os sistemas foram montados para um volume final de 3,0 ml. Para o estudo da influência da temperatura sobre o metabolismo endógeno, 1,0 ml de suspensão de células eram somadas a 2,0 ml de tampão fosfato pH 7,2. No estudo relativo à ação de inibidores metabólicos 0,2 ml de tampão fosfato foram substituídos pela mesma quantidade do inibidor.

Em todos os estudos foram observados 3.0 minutos para equilíbrio térmico além de 4 minutos de pré-tratamento quando se tratava de inibidores metabólicos.

RESULTADOS

Inicialmente procuramos desenvolver um meio de cultura que promovesse bem o crescimento de todas as amostras de *Leishmania* mantidas em nosso laboratório. O meio descrito permitiu crescimento abundante possibilitando repiques seriados de todas as amostras citadas. Observamos pelas Figs. 1 e 2 que não houve diferenças óbvias no desenvolvimento do flagelado quando o pH do meio variou entre 6,8 a 7,6. Para as amostras n.º 46 e 6, maior número de promastigotas foi obtido em pH 7,0 e 7,2 respectivamente. Quanto a temperatura (Figs. 3 e 4) observamos melhor desenvolvimento nas amostras 6 e 46 à 23°C, atingindo um máximo em 72 hs. Entretanto, a 28°C o desenvolvimento máximo foi obtido em menor período de tempo (\pm 48 hs). A 35 e 37°C não houve desenvolvimento do flagelado levando inclusive a morte celular entre 48 e 72 hs. Os efeitos da temperatura sobre o consumo de oxigênio são sumarizados na Tabela I e Fig. 5.

A Tabela I mostra que a velocidade de consumo de oxigênio aumenta entre 17 e 37°C e decresce rapidamente entre 37 e 47°C para as amostras HB, 1176 e 100. De maneira análoga se comportam as amostras 46 e 6

tendo o mesmo aumentado entre 17 e 33°C, decrescendo entre 33 e 45°C. O exame microscópico, no entanto, não revelava qualquer alteração na motilidade do parasita nas condições experimentais.

O gráfico da equação de Arrhenius (Fig. 5) mostra em todos os casos que as linhas se interceptam a 33°C sendo o significado deste dado também discutido adiante.

A Tabela II mostra os resultados dos experimentos de inibição do consumo de oxigênio por inibidores respiratórios.

Aproximadamente os mesmos valores percentuais de inibição a 28 e 37°C são encontrados para as amostras 6, 46 e 1176 frente a todos os inibidores testados. As amostras 100 e HB no entanto revelam maiores percentuais de inibição com Barbitol a 37°C.

DISCUSSÃO

O meio de cultura descrito não nos permite qualquer conclusão a respeito das possíveis exigências nutritivas do parasito pelo fato de ser complexo. Entretanto mostrou ser um meio útil para se obter massa de promastigota, visto que houve bom crescimento em todas as amostras, inclusive naquela com desenvolvimento deficiente em NNN, citada por LAINSON⁶.

Pequenas diferenças de crescimento do flagelado foram observadas quando variamos o pH do meio entre 6,8 e 7,6. Entretanto, os melhores resultados na temperatura de 23°C, foram obtidos na faixa de pH 7,0-7,2, o que nos leva a admitir como sendo a adequada. Nas condições testadas pH superior a 7,6 parece não ser adequada.

Com relação à temperatura o comportamento foi bastante homogêneo entre as amostras de *L. donovani* e *L. braziliensis* (Figs. 3 e 4). Incubação a 35 e 37°C, mesmo por períodos curtos como 24 horas, promovem alterações irreversíveis que se devem possivelmente à desnaturação de alguma macromolécula ou sistema enzimático essencial conforme foi admitido por THOMAS¹⁰ para *Tetrahymena*

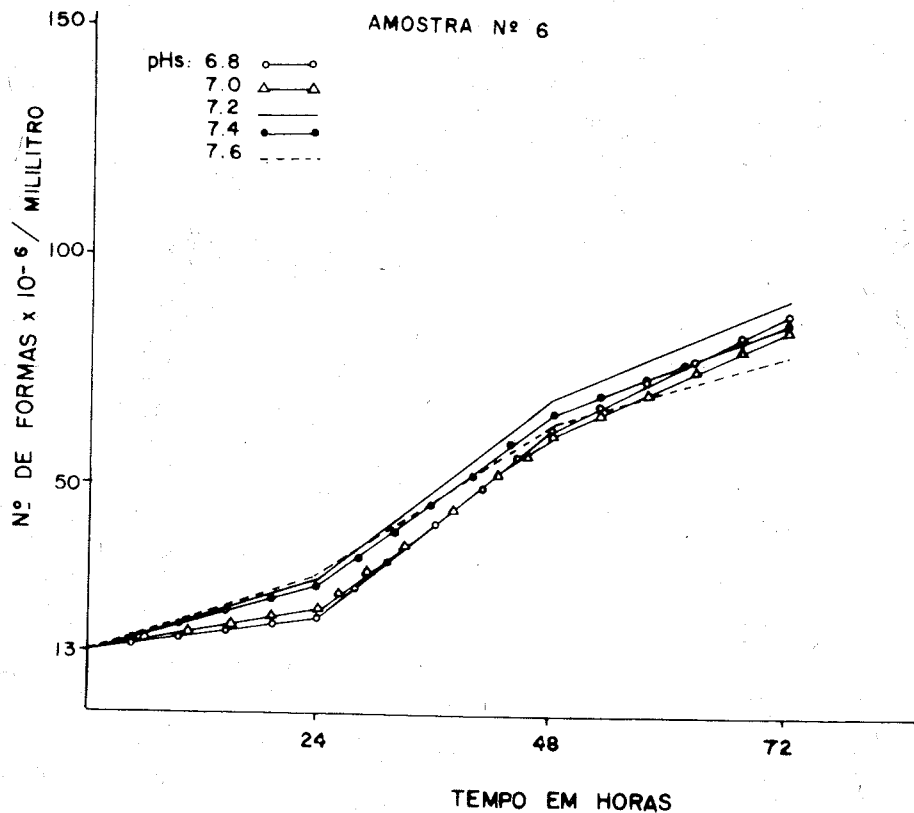


Fig. 1 — Influência do pH no desenvolvimento de uma amostra de *Leishmania braziliensis* no meio T.

TABELA I

Consumo de oxigênio em *Leishmania* em relação à temperatura. Culturas de 48 horas em meio T

Temperatura °C	Consumo de oxigênio em μO_2 nas amostras				
	HB	1176	100	46	6
17	13,0	14,0	13,6	23,4	13,2
21	27,0	22,6	30,3	35,6	17,4
24	34,0	26,5	36,7	40,9	24,9
28	55,5	39,0	59,3	57,3	30,3
33	81,5	57,0	90,0	78,9	39,65
37	86,0	67,0	113,6	73,0	34,3
39	80,0	56,5	88,3	44,6	26,0
42	63,5	30,0	34	28,3	13,6
45	30	19,0	36	0	0
47	0	0	0	0	0

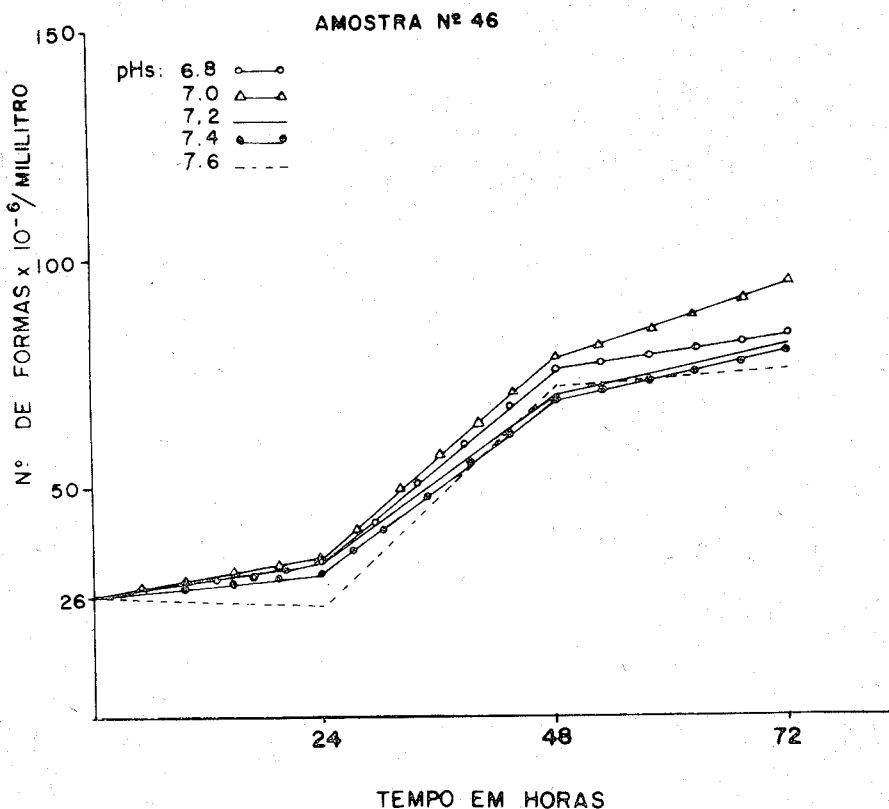


TABELA II

Sensibilidade de formas de cultura de *Leishmania* à inibidores metabólicos. Resultados expressos em percentual de inibição do consumo de oxigênio sobre o endógeno

Inibidor	Iodoacetato (*)		Malonato (**)		Barbital (**)	
	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C
Amostra						
6	59,8	50,0	62,8	56,1	48,8	56,1
46	57,9	63,2	52,7	54,3	63,2	46,0
1176	46,7	44,2	64,6	52,2	29,6	38,5
100	37,6	60,8	49,8	65,4	22,4	55,5
HB	40,4	53,9	64,8	54,1	17,6	41,7

Concentrações:

(*) $1,3 \times 10^{-3}M$

(**) $6,6 \times 10^{-2}M$

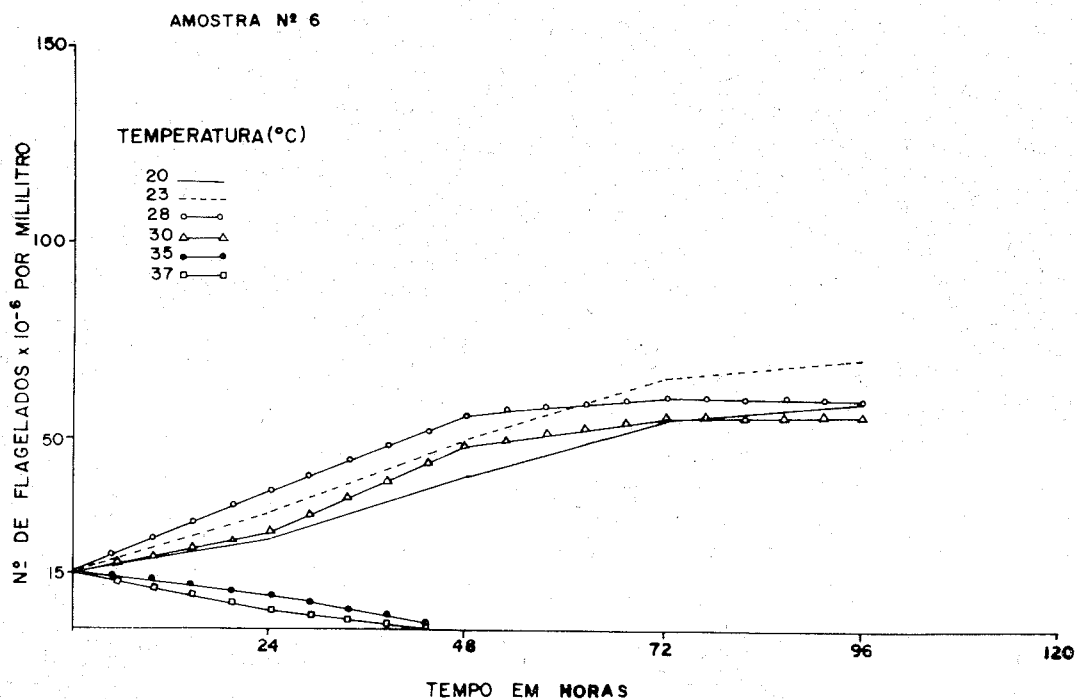


Fig. 3 — Influência da temperatura no desenvolvimento de uma amostra de *Leishmania braziliensis* no meio T.

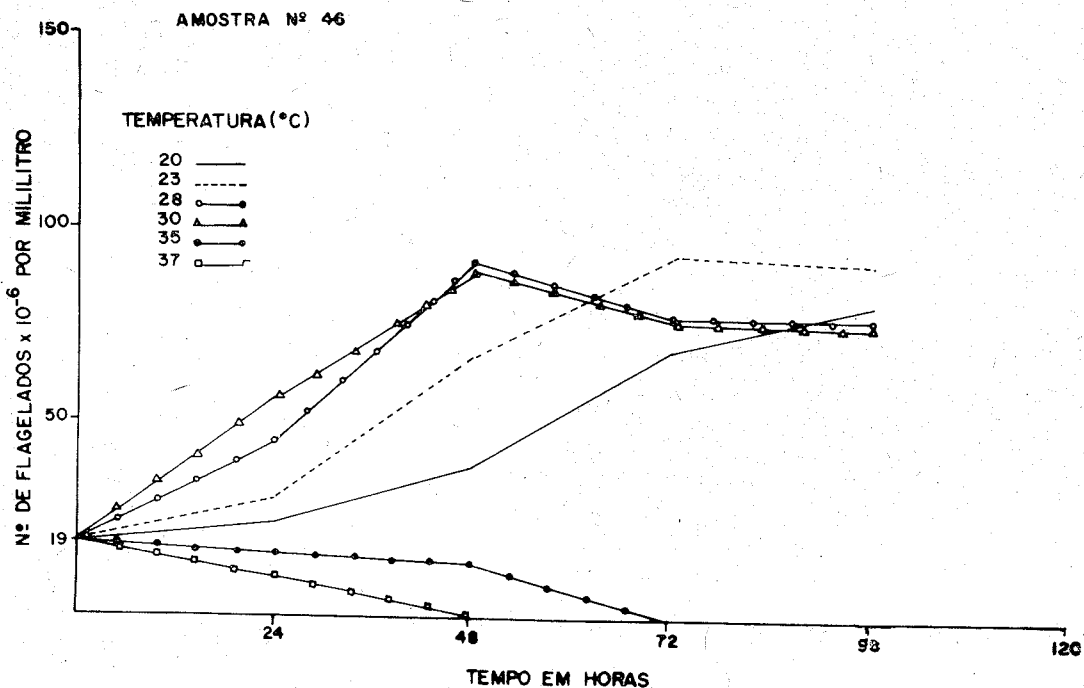


Fig. 4 — Influência da temperatura no desenvolvimento de uma amostra de *Leishmania donovani* no meio T.

pyriformes e por KRASSNER⁵ para *Leishmania tarentolae*. Subculturas não são obtidas mesmo a 28°C. Presumivelmente a temperatura limite para o crescimento no sistema testado seria abaixo de 28°C. A temperatura de 23°C foi admitida como ideal para obtenção de massa de células e manutenção de amostras de *Leishmania*.

Com relação à trocas de temperatura os resultados, por nós obtidos com amostras de *Leishmania* (aumento contínuo do consumo de O₂ até 37°C, mostram um comportamento intermediário quando comparado com os obtidos por LWOFF⁷ em *Crithidia fasciculata*

(34°C) e VON BRAND¹² em *Trypanosoma cruzi* (40,4°C). Idêntica interpretação damos aos dados respirométricos fornecidos pela equação de Arrhenius (Fig. 5).

Admitimos que a manutenção das amostras 6 e 46 em condições de laboratório por períodos mais longos tenha interferido no estudo da influência da temperatura sobre a respiração (Fig. 5), no ponto de morte térmica (Tabela I), como também no aumento considerável de O₂ até 33°C ao invés de 37°C, como aconteceu nos outros casos.

Para as amostras HB, 100, 46 e 6 o gráfico da equação de Arrhenius (Fig. 5) mos-

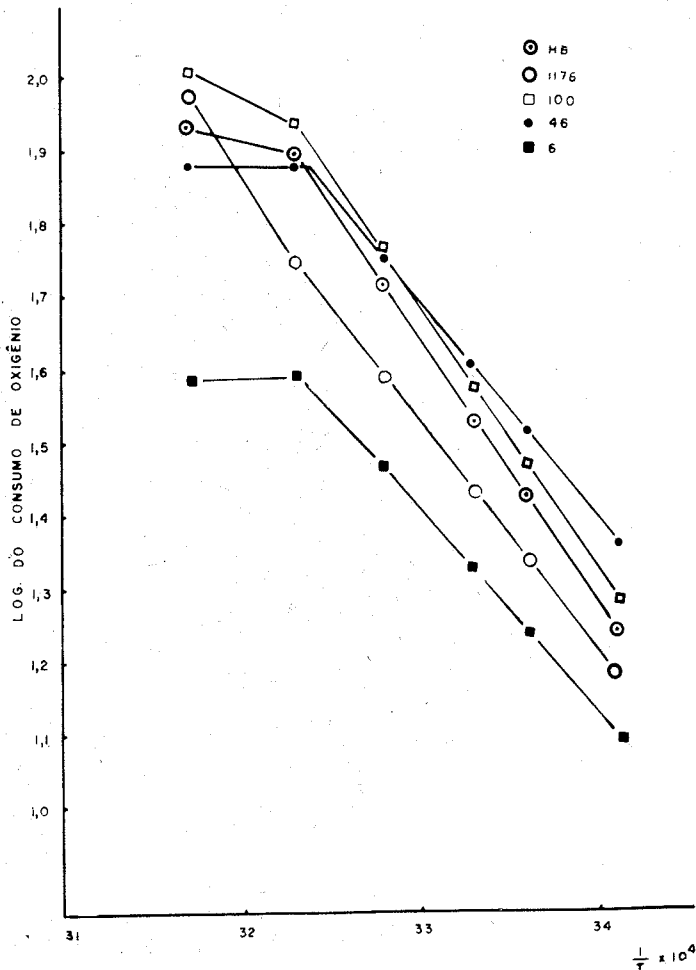


Fig. 5 — Representação gráfica da equação de Arrhenius para as amostras de *Leishmania* (HB, 1176, 100, 46 e 6), relacionadas em Material e Métodos.

tra duas linhas retas interceptantes como no *T. cruzi* e *Eustrongylides ignotus* (VON BRAND¹³). A amostra 1176, no entanto, mostra um gráfico muito mais aproximado do obtido em *C. fasciculata* por LWOFF⁷. Tais dados poderiam significar diferenças fisiológicas entre as amostras de *L. braziliensis* o que justificaria a utilização de novos padrões taxonômicos. O significado da interceptação a 33°C é uma boa meta para especulação conforme sugerido por VON BRAND¹³.

A inibição provocada por malonato (Tabela II) sugere a participação da desidrogenase succínica. A enzima estaria ligada a uma flavoproteína como sugerido pela inibição provocada por Barbiturato. Esta inibição mais acentuada a 37°C nas amostras HB e 100 (Tabela II) pode estar ligada a maior participação da flavoproteína nesta temperatura. A ausência de inibição por iodoacetato em diluições maiores que M/200 sugere a não participação de enzimas contendo grupos sulfidrílicos mesmo em percentuais mínimos. A sensibilidade semelhante a inibidores nas temperaturas de 28 e 37°C poderia indicar um sistema funcional idêntico a ambas as temperaturas como sugerido para *T. cruzi* por FIGUEIREDO³.

SUMMARY

Nutrition and metabolism of Leishmania culture forms

A new liquid culture medium which promotes a high yield of promastigotes of *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis*, and *Leishmania mexicana* was developed. In this medium a pH between 7.0 and 7.2 and a temperature of incubation of 23°C were found to give the highest yields of promastigotes of the species tested. From the metabolic studies related to the behaviour of the cultures in response to changes of temperature it was noted that *Leishmania* shows a behaviour which is intermediate between *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi*. Physiological differences among the three species of *Leishmania* tested seem to occur. This was noted when the Arrhe-

nus equations obtained with each specie were compared.

The effect of several inhibitors of the respiratory process in microorganisms was tested and malonate, barbital, and iodoacetate were shown to actively inhibit the respiratory process of *Leishmania* at temperatures of 28°C and 37°C.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao Dr. Egler Chiari, por nos ter facilitado o uso do contador de células, pertencente ao CNPq TC-46 Doença de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMARGO, E.P. — Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I — Origen of metacyclic Trypanosomes in liquid medium. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6: 43-100, 1964.
2. CASTRO, M.P. & PINTO, S.C. — Influence of the temperature on growth of *Leishmania enriettii* in tissue culture. *J. Protozool.* 7 (Suppl.):7-8, 1960.
3. FIGUEIREDO, Y.P. — *Metabolismo oxidativo de formas epimastigotas de T. cruzi*. [Tese de Mestrado]. Univ. Federal do Rio de Janeiro, Inst. de Microbiologia, 1973.
4. JANOVY, J. & POORMAN, A.E. — Temperature and metabolism in *Leishmania*. I — Respiration in *L. donovani*, *L. mexicana* and *L. tarentolae*. *Exptl. Parasitol.* 25:276-282, 1969.
5. KRASSNER, S.M. — Effect of Temperature on Growth and Nutritional Requirements of *Leishmania tarentolae* in a Defined Medium. *J. Protozool.* 12:73-78, 1965.
6. LAINSON, R. & SHAW, J.J. — Leishmaniasis of the new world. Taxonomic Problems. *Brit. Med. Bull.* 28:44-48, 1971.
7. LWOFF, A. — Die Bedeutung des Blutfarbstoffes für die parasitischen Flagellaten. *Zentr. Bakt. Parasit. Abst.* 1: Orig., 130, 498, 1934, in Von Brand T. 1946.
8. NICOLLE, C. — Sur une piroplasmose nouvelle d'un ranguer. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 13:213-215, 1907.

9. RUDZINSKA, M.A.; D'ALESSANDRA, P. & TRAGER, W. — The fine structure of *Leishmania donovani* and the role of the kinetoplast in the Leishmania Leptomonad transformation. *J. Protozool.* 85:215-223, 1964.
10. THOMAS, H. — Effect of temperature on the reproductive rate of *Tetrahymena pyriformis*. *Exptl. Cell. Res.* 28:269-279, 1962.
11. TRAGER, W. & KRASSNER, S.M. — Growth of parasitic Protozoa in tissue cultures. *Research Protozool.* 2:357-382, 1967.
12. VON BRAND, T.; JOHNSON, E.M. & RESS, C.W. — Observations on the respiration of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Gen. Physiol.* 30:163-175, 1946.
13. VON BRAND, T. — *Biochemistry of Parasites*. New York, Academic Press, 429 páginas, pág. 350-351, 1966.
14. ZELEDON, R. & DEMONGE, G. — Physiological studies on the culture form of four strains of *Leishmania brasiliensis*. I — nitrogen content, substrate utilization, and effect of metabolic inhibitors on respiration and its relation of infectivity. *J. Parasitol.* 53:937-945, 1967.

Recebido para publicação em 12/6/1975.