

Instituto "López-Neyra" de Parasitología
Sección de Fisiología y Bioquímica del Parasitismo
Granada. España

BIOQUIMICA DEL *ASCARIS LUMBRICOIDES*. X. INFLUENCIA DE LA ADICION AL MEDIO DE ANTIBIOTICOS Y SULFAMIDAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA "IN VITRO"

por

SANCHEZ MORENO, M.; HERMOSO, R.; MONTEOLIVA, M.

SUMMARY

Analysis in homogenate of *Ascaris lumbricoides*, culture "in vitro" during three days, at a constant temperature of 30°C and the periodic change of the medium every 4 hours, have been done; it has been proved that, the values of the determinate components are more similar to the *Ascaris* normal habitat, when it is added to the medium of Tyrode: 1,0 gr. of glucose and 0,3 gr. of hemoglobina of pigper litre. Succesively, the possible incidence upon the *Ascaris* culture of several antibiotics and sulfonamides, added to the medium, has been studied.

The best medium for the culture of *Ascaris* is: solution of Tyrode modified with bicarbonate 1.000 ml., glucose 1 gr., hemoglobin of pig 0,3 gr., and Penicillin-G 0,25 gr., is concluded.

INTRODUCCION

En artículos anteriores (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) los análisis para determinar la normalidad fisiológica y bioquímica del *Ascaris* en sobrevivencia durante 3 días, se realizaron, previa disección del parásito por tejido, suponiendo que podrían encontrarse diferencias más o menos significativas según el tejido considerado. En los resultados que se obtuvieron se señalaban que las diferencias encontradas según ensayos y según tejidos, eran a veces contradictorias y que sólo manifestaban significación estadística cuando los valores parciales se referían a *Ascaris* total. Esto, nos indujo a realizar los análisis finales en

(Recibido el 3-XI-1977).

REV. IBER. PARASITOL. Vol. 38 (1-2), 1978.

homogenados totales, con lo cual se simplificaban las técnicas analíticas y se reducían las posibles causas de error como consecuencia de las múltiples manipulaciones a que se sometía la muestra.

A continuación se estudian las posibles incidencias que sobre la normalidad del *Ascaris* en sobrevivencia puede tener la adición de ciertos antibióticos, sulfamidas y antifúngicos, en los medios utilizados.

MATERIAL Y METODOS

Los *Ascaris* recogidos del Matadero Municipal son transportados y preparados como se indica en el trabajo (2).

El dispositivo empleado para el cultivo es según (7). Después del cultivo se procede a trocear los *Ascaris* y a realizar la diálisis del homogenado. Esta se lleva a cabo tal como se indica en (5). El fraccionado cromatográfico del dializado se realiza en columna de Amberlita CG-400 (lavada con ClH, sosa y agua, finalmente, hasta reacción neutra) y de 1 × 20 cm. Inicialmente se equilibra la columna con ácido bórico 0,02N y después se pasan los 10. ml. de dializado previamente neutralizado con ClN. La columna se eluye con 50 ml. de borato sódico 0,002M. Después se pasan 30 ml. de sosa 0,2N y finalmente 20 ml. de agua destilada. La determinación de azúcares de las dos fracciones que se recogen, se hace por el método de la antrona (10).

La lectura directa del dializado y expresado en Adenosina nos da unos valores que pueden referirse al conjunto de los derivados adenílicos.

En la fracción no dializable se realizan las medidas espectrofotométricas en un Beckman D-G-B- a 280 mn (proteínas) y a 412 (Hemoglobina) tal como indican (9). También en la fracción no dializable se determina el contenido de Glucógeno.

Se ha usado como medio base una solución de Tyrode modificada con bicarbonato y adicionada de diversos nutrientes: Glucosa a 0,3 y 1 gr. y hemoglobina de cerdo a 0,3 gr. por litro de Tyrode, respectivamente. Posteriormente se ha adicionado al medio inhibidores del crecimiento microbiano, en las concentraciones que se indican en la tabla A.

T A B L A A

MEDIO	NUTRIENTES		INHIBIDORES	DOSIS mgr/litro
	Glucosa (gr/litro)	Hb (gr./litro)		
1	—	—	Gantrisona	200
2	1,0	0,3	"	200
3	—	—	Sulfoguanidina	200
4	1,0	0,3	"	200
5	—	—	Penicilina	250
6	1,0	0,3	"	250
7	—	—	Nistatina	30
8	1,0	0,3	"	30
9	—	—	Estreptomicina	250
10	1,0	0,3	"	250
11	—	—	Kanamicina	250
12	1,0	0,3	"	250
13	--	—	Tetraciclina	250
14	1 0	0,3	"	250

RESULTADOS

TABLA I
Contenido de componentes en homogenados totales de Ascaris hembras, después de 72 horas de sobrevivencia, a 30°C. Renovación del medio cada 4 horas

	M ₁		M ₂		M ₃		M ₄		M ₅	
	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A
Glucosa (mg/gr.)	2,99	+ 53	1,99	—	2,16	—	2,10	—	2,87	+ 44
Trehalosa (mg/gr.)	3,12	+ 77	1,76	—	1,10	— 37	1,90	—	2,38	+ 35
"Adenilicos" nM/gr.	2,28	+ 31	1,69	—	1,54	—	1,89	+ 12	1,94	+ 14
Glucógeno sol. (mg/gr.)	16,69	+ 36	12,24	—	17,64	+ 44	15,86	+ 28	17,12	+ 39
Gluc. combinado (mg/gr.)	35,15	+ 31	26,85	—	28,75	—	34,72	+ 29	28,40	+ 22
Proteínas (mg/gr.)	40,19	+ 16	30,56	—	33,98	+ 11	40,19	+ 31	35,17	+ 15
Hemoglobina nM/gr.	47,48	+ 12	44,28	—	45,62	—	56,98	+ 36	58,66	+ 42

TABLA II
Contenido de componentes en homogenados totales en Ascaris hembras, después de 72 horas de sobrevivencia, a 30°C. Renovación del medio cada 4 horas, en Tyrode adicionado de los diversos inhibidores del crecimiento microbiano ensayado

	Glucosa		Trehalosa		"Adenilicos"		Gluc. Sol.		Gluc. Comb.		Hemoglobina		Proteínas	
	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A
Gantrisona	2,36	+ 19	1,79	—	1,75	—	17,08	+ 39	32,89	+ 22	38,01	— 14	25,48	— 17
Nistatina	1,46	— 27	1,40	— 20	1,69	—	9,55	— 22	17,32	— 35	27,98	— 37	30,10	—
Sulfoguanidina	0,33	— 83	2,35	+ 33	1,94	+ 15	12,51	—	25,83	—	37,11	— 16	32,87	—
Penicilina	2,14	—	2,15	+ 22	2,08	+ 24	12,52	—	37,22	+ 40	58,32	+ 32	33,20	—
Estreptomicina	2,02	—	1,29	— 21	1,75	—	23,45	+ 92	24,51	—	40,10	+ 19	28,39	—
Kanamicina	2,36	— 19	0,49	— 73	1,74	—	9,98	— 18	22,93	— 15	42,62	—	31,58	—
Tetraciclina	1,39	— 30	0,51	— 71	1,70	—	11,77	—	16,37	— 40	37,25	— 16	24,20	— 21

TABLA III
Contenido de componentes en homogenados totales en Ascaris hembras, después de 72 horas de sobrevivencia, a 30°C. Renovación del medio cada 4 horas, en Tyrode adicionado de 1,0 gr. de glucosa y 0,3 gr. de hemoglobina y los diversos inhibidores del crecimiento microbiano ensayados

	Glucosa		Trehosa		"Adenilicos"		Gluc. Sol.		Gluc. Comb.		Hemoglobina		Proteinas	
	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A	$\bar{x}$	$\pm$ %A
Gantrisona	2,50	+ 26	2,03	+ 15	2,20	+ 30	17,44	+ 42	33,52	+ 25	47,33	—	32,13	—
Nistatina	3,40	+ 71	1,57	— 11	1,82	—	17,70	+ 45	23,83	— 11	48,00	+ 18	31,01	—
Sulfoguanidina	3,16	+ 59	2,32	+ 32	2,21	+ 31	16,37	+ 33	36,29	+ 35	44,85	—	31,23	—
Penicilina	2,25	+ 14	2,24	+ 27	2,12	+ 25	19,51	+ 59	32,42	+ 21	53,64	+ 21	36,61	+ 20
Estreptomicina	2,25	+ 14	1,83	—	2,05	+ 22	18,24	+ 49	34,55	+ 29	52,11	+ 18	37,20	+ 22
Kanamicina	1,91	—	0,38	— 79	1,98	+ 40	12,19	—	21,96	— 18	76,69	+ 73	50,64	+ 66
Tetraciclina	2,91	+ 46	1,99	+ 13	2,31	+ 39	15,34	+ 25	30,24	+ 13	42,99	—	29,18	—

TABLA IV
HOMOGENADOS TOTALES
(RESUMEN)

Medios: Tyroide adicionado	Gluc.	Treh.	Gg.Sol	Gg.Cm	Prot.	Hb	Aden.
	+ %A	% A	% A	% A	% A	% A	% A
Iniciales	+53	+47	+36	+31	+12	+16	+31
Glucosa (6,3)	—	—37	+44	—	—	+11	—
Gl (0,3) + Hb (3,0)	—	—	+28	+29	+36	+31	+12
Gl (1,0) + Hb (0,3)	+44	+35	+39	+22	+42	+15	+15
Gantrisona	+19	—	+39	+22	—14	—17	—
Gant. + Gl + Hb	+26	+15	+42	+25	—	—	+30
Nistatina	+27	—20	—22	—35	—37	—	—
Nist. + Gl + Hb	+71	—	+45	—11	+18	—	—
Sulfoguanidina	—83	+33	—	—	—16	—	+15
Sulf. + Gl + Sb	+59	+31	+33	+35	—	—	+31
Penicilina	—	+22	—	+40	+32	—	+24
Pen. + Gl + Hb	+14	+27	+59	+21	+21	+20	—25
Estreptomicina	—	—27	+92	—	— 9	—	—
Estrep. + Gl + Hb	+13	—	+49	+29	+18	+22	+22
Kanamicina	—19	—73	—18	—15	—	—	—
Kan. + Gl + Hb	—	—79	—	+18	+73	+66	+40
Tetraciclina	—30	—71	—	—40	—16	—21	—
Tetra. + Gl + Hb	+46	+13	+25	+13	—	—	+38

DISCUSION

En la tabla IV se expresan los resultados obtenidos en la búsqueda de un medio que pudiese, al menos durante 3 días, mantener el parásito en condiciones similares a las del intestino del cerdo. Se ha tomado como valor 100 el contenido de los diferentes componentes analizados al final de la sobrevivencia del parásito en medio Tyrode sin adición de inhibidores del crecimiento microbiano o nutrientes al medio de sobrevivencia. Los valores de la tabla expresan el contenido en más o menos tanto por ciento del anterior y encontrado en el análisis final de las experiencias utilizando diferentes medios. Un tanto por ciento en menos significa que durante la sobrevivencia en las condiciones indicadas el componente analizado desciende más que en sobrevivencia en ayunas, un porcentaje en más, indica que este componente no ha descendido como en ayunas y si el

porcentaje es superior al dado como valor para “iniciales” indica la síntesis durante la sobrevivencia ha superado el valor medio de este componente en el *Ascaris* en su habitat normal.

Componentes Azucarados.—Al comparar (tabla I) los valores iniciales frente a los de ayunas, encontramos que las pérdidas de estos componentes durante la sobrevivencia en ayunas son notables, alcanzándose valores hasta del 77 y 53 por ciento para trehalosa y glucosa, respectivamente. Para el glucógeno (soluble y combinado) las pérdidas oscilan alrededor del 30 por ciento. Si al medio se le adiciona 300 mgr. de glucosa se observa una disminución frente a ayunas para la trehalosa de 37 por ciento, mientras que el glucógeno soluble experimenta un aumento del 44 por ciento, permaneciendo sin variación significativa la glucosa y el glucógeno combinado. Si al medio además de la glucosa se le adiciona 30 mgr. de hemoglobina de cerdo se observa un aumento en los valores del glucógeno tanto soluble como combinado del 28 y 29 por ciento, respectivamente. Aunque la glucosa y la trehalosa no experimentan variaciones.

Si aumentamos la concentración de glucosa hasta 1 gr. y se le adiciona los 300 mgr. de hemoglobina de cerdo, se observa un aumento altamente significativo en todos los azúcares del orden del 35, 44, 50 y 23 por ciento para trehalosa, glucosa, glucógeno (soluble y combinado), respectivamente.

Componentes protéicos, hemoglobina y derivados adenílicos.—Se denominan derivados “adenílicos” y corresponde a la fracción del homogenado que es dializable y que absorbe a una longitud de onda de 260 nm.

En la misma tabla n.º I se expresan las variaciones que sufren estas constantes bioquímicas; éstas experimentan unas variaciones muy similares a las sufridas por los componentes azucarados. Al comparar los valores iniciales frente a ayunas se observa una pérdida del orden de un 16, 12 y 31 por ciento para las proteínas, hemoglobina y derivados “adenílicos”. Si al medio se le adiciona nutrientes se observan unos incrementos muy considerables frente a los valores en ayunas y, por ejemplo, si la adición de nutrientes es de 1 gr. de glucosa y 300 mgr. de hemoglobina por litro de Tyrode los valores que se obtienen son del orden de un 15, 41 y 15 por ciento para proteínas hemoglobina y derivados “adenílicos” respectivamente.

A continuación se realizaron experiencias en las cuales se han usado medios sin nutrientes y medios con nutrientes (glucosa 1 gr. y hemoglobina de cerdo 0,3 gr.) y a éstos se les adicionó los distintos inhibidores del crecimiento microbiano y en las concentraciones reseñadas en la Tabla A.

Componentes azucarados.—La glucosa desciende en todos los casos en ausencia de nutrientes, incluso cuando al medio se le adiciona glucosa a baja concentración (tabla IV). En presencia de inhibidores este descenso es superior al valor en ayunas, destacando la Sulfoguanidina con un —83 por ciento. En contraste, la otra sulfoguanidina ensayada, la Gantrisona, frena el descenso de la glucosa en ayunas, dando un tanto por ciento positivo. La adición de nutrientes al medio (glucosa como elemento hidrocarbonado y hemoglobina de cerdo como nutriente proteico y aportador de grupo hemo) neutraliza los efectos anteriores incluso superando el valor inicial. En el caso de la Nistatina, Sulfoguanidina y Tetraciclina que de un —27, —83 y —30 por ciento pasan a 71, 59 y 46 por ciento positivo, respectivamente. En el caso de la Penicilina y Estreptomycin ocurre que de unos valores similares a los de ayunas, cuando el medio es enriquecido con nutrientes, experimentan un aumento de un 14 y 13 por ciento, respectivamente.

La trehalosa disacárido no reductor característico de los invertebrados tanto artrópodos como no artrópodos, ha sido relacionado su contenido en la hemolinfa de los insectos voladores con la intensa actividad muscular que han de desarrollar durante el vuelo. Su existencia en el líquido celomático y tejido de los nematodos, cuya actividad muscular es pequeña, puede estar relacionada con la formación de ATP como fuente energética inmediata, dado que los fosfógenos (fosgoarginina y fosfocreatina) son prácticamente inexistentes en los nematodos. Su descenso durante el cultivo en ayunas no se recupera en ningún caso, e incluso la presencia sola de glucosa o de algún inhibidor del crecimiento microbiano incrementa aún más las pérdidas en sobrevivencia (tabla IV). Casos extremos son la kanamicina y la tetraciclina que hacen bajar la trehalosa a cifras de —73 y —71 por ciento. Sin embargo la sulfoguanidina mantiene el nivel en un 33 por ciento. La presencia de hemoglobina en el medio mejora estos valores finales sin que en ningún

caso llegue a alcanzarse el nivel inicial. El nivel más alto se obtiene precisamente en ausencia de sulfamidas y antibióticos.

En el caso de la fracción de glucógeno soluble, su concentración es poco influenciada por los medios, manteniendo sus valores en las proximidades de los iniciales. Son excepción la nistatina sola y la kanamicina sola, que descienden su contenido final por debajo del de ayunas. Podría admitirse que hay un mecanismo operativo de regulación de esta fracción hidrocarbonada que es alterado por estos antibióticos. Por esta razón el efecto de los nutrientes es menos evidente, salvo en el caso de los antibióticos indicados como la kanamicina que neutraliza el efecto nocivo de la misma y totalmente en el caso de la nistatina.

El glucógeno combinado es el que en tanto por ciento constituye la mayor parte de los componentes hidrocarbonados del *Ascaris*. Sus variaciones por consiguiente son las que reflejan más aproximadamente las modificaciones de los glúcidos totales. Su descenso en medio Tyrode solo o adicionado de antibióticos, sulfamidas o antifúngicos es compensado por la adición de glucosa y hemoglobina al medio. Si se conjuga el efecto de los inhibidores del crecimiento microbiano sobre las reservas hidrocarbonadas ambos tipos de glucógeno (tabla IV) el efecto más desfavorable lo produce la nistatina, seguida de la kanamicina y tetraciclina y el efecto más favorable lo produce la estreptomycin, gantrisona y penicilina.

Componentes nitrogenados.—El nivel de proteínas se mantiene en medios sépticos cuando se adicionan nutrientes y descienden a nivel de ayunas o por debajo cuando se agrega al medio antibióticos, sulfamidas o antifúngicos. El caso más extremo es el de la gantrisona y tetraciclina que ponen el nivel final en un —17 y —21 por ciento. La adición de glucosa y hemoglobina al medio recuperan las proteínas del *Ascaris* en el caso de la penicilina, kanamicina y estreptomycin, pero no tienen efecto en los restantes.

La concentración de hemoglobina, depende prácticamente del aporte exógeno del grupo hemo. La presencia en el medio de hemoglobina debe de mantener los valores iniciales o incrementarlos. Esto es lo que ocurre en todos los casos analizados incluso cuando el antiséptico solo hace descender el valor final por debajo del nivel en ayunas.

Los “derivados adenilicos” en presencia de sulfamidas, antibióticos o antifúngicos en el medio sin nutrientes no afecta más al nivel final que afecta el ayuno y la presencia de hemoglobina en el medio recupera el valor inicial.

En términos generales puede deducirse que salvo en el caso de los “derivados adenilicos” en que los antibióticos no modifican los resultados de las condiciones de ayunas en medio séptico, en los restantes casos influyen negativamente sobre la sobrevivencia del *Ascaris*. Influencia que en parte y no en todos los casos es neutralizada por la adición de nutrientes al medio. La recuperación más homogénea de todos los componentes analizados se realiza en medio séptico en presencia de glucosa al 1 por mil y de hemoglobina al 0,3 por mil. El antibiótico menos perjudicial es la penicilina.

RESUMEN

Se han realizado análisis finales en homogenados de *Ascaris*, mantenidos en sobrevivencia durante tres días, a temperatura constante de 30°C y renovación automática del medio cada 4 horas; comprobándose que los valores de los controles bioquímicos analizados son más similares a los del *Ascaris* en su habitat normal, cuando al medio de Tyrode se le adiciona glucosa 1 gr. y hemoglobina 0,3 gr. por litro. A continuación se ha estudiado la posible incidencia sobre la sobrevivencia del *Ascaris*, de una serie de antibióticos, sulfamidas y antifúngicos, adicionados al medio. Concluyendo que el medio que consideramos como más idóneo para mantener en sobrevivencia el *Ascaris* durante tres días es condiciones óptimas es: solución de Tyrode modificado con bicarbonato, 1.000 ml.; glucosa, 1 gr.; hemoglobina de cerdo. 0,3 gr.; penicilina, 0,25 gr.

REFERENCIAS

1. DAWSON, R. M. C.; ELLI, D. C.; ELLIOT, W. H. and JONES, D. M. (1969). —Date for biochemical Research, Clarendon Press. Oxford. England.
2. HERMOSO, R. y MONTEOLIVA, M. (1973).—Bioquímica del *Ascaris lumbricoides* del cerdo. II. Trehalosa y glucosa en líquido perivisceral.—Revista Ibérica de Parasitología, 33, 427.
3. HERMOSO, R. y MONTEOLIVA, M. (1974).—Bioquímica del *Ascaris lumbricoides*. V. Variaciones durante la supervivencia en ayunas de los componentes azucarados en diversos tenidos.—Rev. Ibérica de Parasitología, 34, 295.
4. HERMOSO, R.; MONTEOLIVA, M. y SANCHEZ, M. (1975a).—Bioquímica del *Ascaris lumbricoides*. VII. Efectos de la adición de diversos nutrientes al medio de sobrevivencia sobre los componentes azucarados del *Ascaris*.—Rev. Ibérica de Parasitología, 35, 329.

5. HERMOSO, R.; SANCHEZ, M. y MONTEOLIVA, M. (1975b).—Bioquímica del *Ascaris lumbricoides*. VIII. Efecto de varios nutrientes sobre los componentes nitrogenados en diversos tenidos.—Rev. Ibérica de Parasitología, 35, 339.
6. MONTEOLIVA, M. 1973).—Bioquímica del *Ascaris lumbricoides*. I. Componentes del líquido perivisceral.—Rev. Ibérica de Parasitología, 33, 407.
7. MONTEOLIVA, M. y HERMOSO, R. (1970).—Estudio de sobrevivencia de helmintos parásitos. I. Cultivo "in vitro" del *Ascaris lumbricoides*, var. summn.—Rev. Ibérica de Parasitología, 30, 283.
8. MONTEOLIVA, M. y HERMOSO, R. (1974).—Bioquímica del *Ascaris lumbricoides*. VI. Variaciones de algunos constituyentes protectores del *Ascaris* hembras cultivadas en ayunas.—Rev. Ibérica de Parasitología, 34, 229.
9. MONTEOLIVA, M.; BENITO, M. y HERMOSO, R. (1973).—Bioquímica del *Ascaris lumbricoides*. III. Estudio estadístico del contenido en proteínas y hemoglobina del líquido perivisceral.—Rev. Ibérica de Parasitología, 34, 517.
10. TREVEYLAN, W. E. y HARRISON, J. S. (1956).—Yeast Metabolism. VII. Yeast carbohydrates fractions, separation from nucleic acid, analysis, and behavior during anaerobic fermentation. *Biochem. J.*, 63, 23.