

1 51
1

CARACTERISTICAS DE AISLAMIENTO Y POSIBLE
ROMPIMIENTO OCULTO DE LA SUBUNIDAD MAYOR
DE ARN RIBOSOMAL DE EPIMASTIGOTES DE
TRYPANOSOMA CRUZI

TESIS QUE PRESENTA

CLEMENTINA CASTRO HERNANDEZ

En Cumplimiento Parcial de los Requerimientos

Para la Obtencción del Título de

Licenciada en

Investigación Biomédica Básica

Colegio de Ciencias y Humanidades

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado

Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

(Sometida a Consideración el 27 de Marzo).

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

INTRODUCCION	Pág. 1
MATERIALES Y METODOS	Pág. 5
RESULTADOS	Pág. 11
DISCUSION	Pág. 27
BIBLIOGRAFIA	Pág. 34.

INTRODUCCION

Consideraciones Generales

Trypanosoma cruzi es un protozoario flagelado causante de la enfermedad de Chagas cuya morbo-letalidad es elevada en Centro y Sudamérica. Su importancia, como problema de Salud Pública, en México está apenas siendo examinada (1). El parásito presenta un ciclo de vida - complejo y su conducta en el hospedero es de características tales, que el conocimiento de su fisiología génica no solo es interesante sino necesario (2) (3). Algunos aspectos básicos en el conocimiento de esta fisiología, como son la regulación de la transcripción y la traducción de la información génica, se han visto en gran medida bloqueados por la imposibilidad, hasta ahora rutinaria de obtener moléculas enteras de ácido ribonucleico (ARN). Este problema no solo incide sobre moléculas de ARN del tipo mensajero (ARNm), sino también, sobre aquellas de ARN del tipo ribosomal (ARNr), que es más resistente a la degradación.

Consideraciones Particulares

A la fecha, en todos los eucariotes se han encontrado cuatro moléculas de ARNr: las 28S, 18S, 5.8S y 5S más una extra (4) en Drosophila: la 2S*. Excepto la 5S, el resto de las moléculas se transcriben en una sola unidad llamada precursor o transcrito primario, y se derivan de éste por rompimiento endonucleolítico y modificación enzimática. La molécula 5S, en la mayoría de los eucariotes, se origina en otros sitios del genoma. La denominación en Svedbergs se usa de una manera muy convencional, sobre todo la de 28S, para referirse a los diferentes tamaños moleculares, al origen de las células de tipo eucariote, sin representar, en la mayoría de los casos, el coeficiente de sedimentación particular, s. Para obviar este problema, en lo subsiguiente me referiré en general a las moléculas 18S y 28S como a las subunidades menor y mayor de ARNr y a las dos juntas como ARNr, simplemente.

Varios laboratorios han reportado ya el aislamiento de ARNr en forma, inexplicablemente, degradada a

* S= Coeficiente de sedimentación en Svedbergs.

partir de organismos tripanosomátidos (5, 6). Lo mismo se ha afirmado en el caso de otros protozoarios parásitos (7) y de vida libre (8), (9), (10), en un díptero (4) y en un lepidóptero (11). El perfil de gradientes de sacarosa usual presenta dos picos anchos y de altura similar. Con base en estos datos, se ha empezado a hablar de ARNr inestable en este tipo de organismos. Otro hallazgo curioso en estas preparaciones, es que la especie claramente inestable es la subunidad mayor con productos de degradación de tamaño similar al de la subunidad menor. Un tercer dato mayoritario es que la subunidad mayor se degrada en dos fragmentos desiguales, con excepción de Plasmodium (7), alrededor de 0.6 y 0.7 millones (m) de peso molecular que, sumados, dan el tamaño de 1.2 a 1.4 m de la molécula completa.

En el caso de los tripanosomátidos los pesos moleculares reportados de la subunidad menor de ARNr, son superiores al peso molecular de la subunidad menor de los eucariotes superiores. Esto podría interpretarse sencillamente como una alteración de los valores reales, debido a la existencia de fragmentos de la subunidad mayor.

Proposición

Los datos presentados a continuación intentan demostrar que la subunidad mayor puede obtenerse entera o fragmentada en dos, dependiendo de las condiciones desnaturalizantes de los métodos de extracción y separación de ARNr. Esto sugiere fuertemente, que el rompimiento ocurre específicamente en un sitio particular de la molécula y que las probabilidades de una degradación por manipulación experimental son extremadamente bajas. Adicionalmente, se demuestra que la elevada estimación del peso molecular de la subunidad menor es real, y no se debe a la contribución de los fragmentos provenientes de la degradación de la subunidad mayor.

Materiales y Métodos

Cultivos Celulares

Un aislado mexicano de *T. cruzi* proveniente de La Cruz, Jalisco (Dr. Jorge Tay, Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M.) fue crecido en medio líquido de infusión de hígado triptosa (12) suplementado con 10% de suero bovino fetal, en cultivo en agitación y a 28° C.

La cepa AT-9 de *Escherichia coli* (Dr. Fernando Pastarrachea, Departamento de Biología Molecular, I I B, U.N.A.M.) fue crecida en medio Luria (13) en cultivo en agitación a 37° C hasta alcanzar 120 unidades Klett.

Preparación de Polisomas y Ribosomas de *T. cruzi*

Las células fueron cosechadas cerca de la fase media de crecimiento logarítmico por centrifugación a 10,000 g por 10 min a 4° C y luego lavadas dos veces con $\text{KCl } 0.1 \text{ M}$ $\text{Mg Ac}_2 \text{ } 0.005 \text{ M}$ $\text{CaCl}_2 \text{ } 0.003 \text{ M}$ $\text{Tris/HCl } 0.03 \text{ M}$ (pH 7.0). En los experimentos iniciales (Resultados, Fig. 1),

esta solución fue añadida de bentonita 3 mg/ml, o de heparina 4 mg/ml, o de la combinación bentonita 5 mg/ml heparina 4 mg/ml. En todos los experimentos subsecuentes, la solución fue rutinariamente añadida solo de la combinación de dietil pirocarbonato 10 ug/ml heparina 4 mg/ml. Esta última combinación fue también usada en todas las soluciones subsiguientes, que por brevedad no se mencionara en la especificación de cada una de ellas, así como para enjuagar todo el material de vidriería. Tanto la vidriería como las soluciones, fueron previamente esterilizadas por autoclave. Las células, después de ser lavadas, fueron resuspendidas en la misma solución en proporción de 1.0 g por 10.0 ml y se lisaron por la adición de Nomidet P 40 al 0.3% final. El lisado fue centrifugado subsecuentemente a 10,000, 20,000 y 100,000 g por 10, 10 y 120 min respectivamente. El sobrenadante de 20,000 g fue usado como fuente de polisomas y el precipitado de 100,000 g fue resuspendido, en diferentes soluciones, con 2-5 pasos a través de pipetas de orificio pequeño para romper polisomas remanentes, fue usado como fuente de ribosomas y es llamado de aquí en adelante, fracción ribosomal.

Extracción de ARN de T. cruzi

El ARN fue extraído de dos fuentes: (a) de células enteras previamente lavadas (b) del sobrenadante de 20,000 g y (c) de la fracción ribosomal. (a) las células fueron resuspendidas en KAc 0.1 M cloruro de guanidina 8.0 M o alternativamente en Tris/HCl (pH 7.0) 0.05 M KCl 0.15 M MgCl₂ 0.005 M adicionado de un volumen de fenol y la metodología descrita por Cox (14) fue utilizada (b) En experimentos iniciales, el sobrenadante de 20,000 g fue utilizado con la adición de los inhibidores de ribonucleasa descritos en el párrafo anterior y la extracción de ARN se llevó a cabo con fenol como en (a). La fracción ribosomal fue resuspendida, alternativamente, en tres soluciones: (1) Tris/HCl (pH 7.0) 0.01 M EDTA* 0.01 M SDS** 2%, calentando a 90° C por 2 min; (2) Tris/HCl (pH 7.0) 0.01 M EDTA 0.01 M DMSO*** 10% durante 24 h a 4° C; y (3) Tris/HCl (pH 7.0) 0.01 M LiCl 2.0 M urea 4.0 M, durante 24 h a 4° C. Las resuspensiones fueron centrifugadas a 20,000 g por 20 min y los precipitados resuspendidos en Tris/HCl (pH 7.0) 0.01 M EDTA 0.001 M LiCl 0.05 M Sarkosyl 0.1%.

* Acido etilendiamino tetra acético.

** Dodecil sulfato de sodio.

*** Dimetil sulfóxido.

Electroforesis en Geles no Desnaturalizantes

El ARNr fue analizado en geles en placa de poliacrilamida 2.0% agarosa 0.5% de acuerdo a lo descrito por Peacock et al (15) (16). Las muestras de ARNr fueron precipitadas por la edicion de dos volúmenes de etanol y dejadas durante la noche a 20° C. El precipitado fue recuperado por centrifugación a baja velocidad, secado con N₂, redissuelto en un volumen mínimo de Trisma base 21.6 g; EDTA 1.86 g, ácido úrico 11 g, aforado a 2 LT con agua desionizada, pH 8.3 y azul de bromofenol fue añadido como marcador del frente. La electroforesis se llevó a cabo por 14 h, a 100 V y 4° C. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 5.0 ug/ml y fotografiados con una cámara Polaroid. ARNr de hígado de ratón o de E. coli, extraídos por los métodos habituales de fenol, fueron usados como estándares de peso molecular.

Electroforesis en Geles Desnaturalizantes

El ARNr fue también analizado en geles en placa de agarosa 0.75% o 1.5% siguiendo los procedimientos de Lehrach et al. (17) usando formaldehído como desnaturalizador. El

precipitado de ARNr fue resuspendido en Na_2HPO_4 0.018 M NaH_2PO_4 0.002 M formaldehído 2.2 M formamida 50% y calentando a 60°C por 5 min. La electroforesis se realizó por 14 h, a 10 mA y temperatura ambiente (aprox. 20°C)

Gradientes de Sacarosa

Las muestras polisomales fueron colocadas sobre gradientes isocinéticos de sacarosa preparados con 5.5ml de sacarosa al 30% en el recipiente de mezclado y sacarosa al 15% en el recipiente de reserva. Las soluciones de sacarosa fueron hechas en Tris/HCl (pH 7.0) 0.02 M KCl 0.05 M Mg Ac₂ 0.003 M. Los tubos fueron centrifugados en el rotor Beckman SW 40 a 100,000 g por 5 h a 4°C. Los gradientes fueron continuamente extraídos y leídos, a 254 nm, en una celdilla de flujo continuo de una unidad óptica ISCO.

Las muestras de ARNr fueron analizadas en gradientes isocinéticos preparados con 6.0 ml de sacarosa al 20% en el recipiente de mezclado y sacarosa al 5% en el de reserva. Las soluciones de sacarosa fueron hechas en Tris/HCl (pH 7.0) 0.01 M EDTA 0.001 M LiCl 0.05 M Sarkosyl 0.1%. Los tubos fueron centrifugados en el rotor Beckman SW 40 a 126,000 g por 13 h a 4°C.

RESULTADOS

Efecto de las Condiciones Desnaturalizantes Sobre la Integridad de la Subunidad Mayor del ARNr

El lisado de células, fue extraído con fenol y muestras del ARN provenientes de la fase acuosa fueron colocadas sobre gradientes de sacarosa con el objeto de separar las subunidades de ARNr y juzgar sobre su estado de integridad. Los perfiles obtenidos mostraron el resultado usual: un pico relativamente pequeño, y en algunas ocasiones prácticamente ausente, en la posición de la subunidad mayor; un pico ancho en la posición de la subunidad menor; y un pico grande en la posición correspondiente al ARN soluble. Las condiciones del ARNr no cambiaron significativamente con el uso de diferentes inhibidores de ribonucleasa o de combinaciones de éstos (Fig. 1).

Ultracentrifugación Analítica

Las corridas de velocidad de sedimentación fueron realizadas por centrifugación de banda con una centrifuga Spinco modelo E equipada con la óptica de absorción ultravioleta, con graficador automático y en una celdilla formadora de banda tipo Vinograd conteniendo Tris/HCl (pH 7.0) 0.01 M EDTA 0.001 M LiCl 0.05 M sacarosa 5%. Los coeficientes de sedimentación fueron medidos con ARNr a concentraciones de 1.6 a 16 ug/ml, en centrifugaciones a 34,000 rpm por 100 min a 20° C y finalmente corregidos a condiciones de agua a 20° C y a dilución infinita, tomando como valor de volumen para el específico 0.55 ml/g.

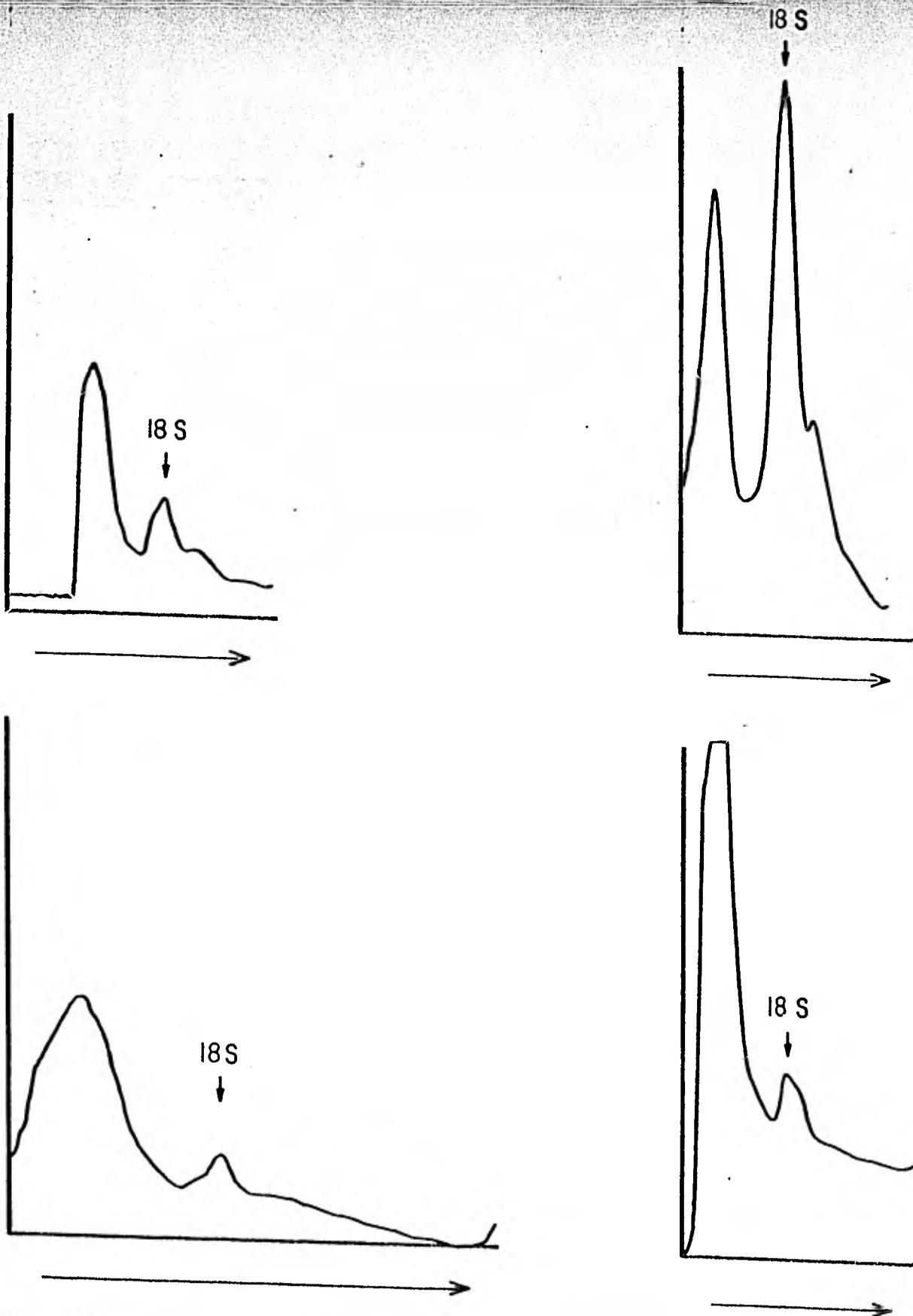


Fig. 1. Gradientes de sacarosa de ARN citoplásmico de *T. cruzi*. El lisado celular fue obtenido en presencia de bentonita (A), de heparina (B), de bentonita-heparina (C), y de dietil pirocarbonato-heparina (D). El sobrenadante de 20,000 g fue desproteínado con fenol en presencia de los inhibidores correspondientes y el ARN fue utilizado a partir del precipitado de etanol.

Resultados similares fueron obtenidos cuando se utilizó la fracción ribosomal y cuando, en presencia de la combinación de dietilpirocbonato y heparina, se extrajo con dodecil sulfato de sodio a 90°C . (Fig. 2); o cuando las células enteras, previamente lavadas, fueron directamente extraídas con fenol (Fig. 3) o con cloruro de guanidina (Fig. 4).

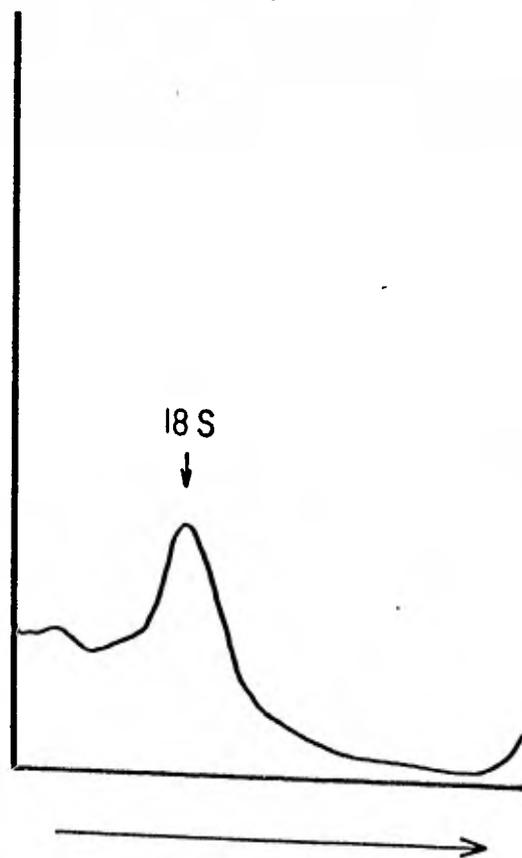


Fig. 2. Gradiente de sacarosa de ARN citoplásmico de *T. cruzi*. El lisado celular fue obtenido en presencia de dietil pirocarbonato-heparina y la fracción ribosomal fue desproteínizada con dodecilsulfato de sodio al 2% y calentado a 90°C por 2 min.

Fig. 3. Gradiente de sacarosa de ARN total de T. cruzi. Las células enteras y resuspendidas fueron directamente desproteinizadas con fenol (Materiales y Métodos).

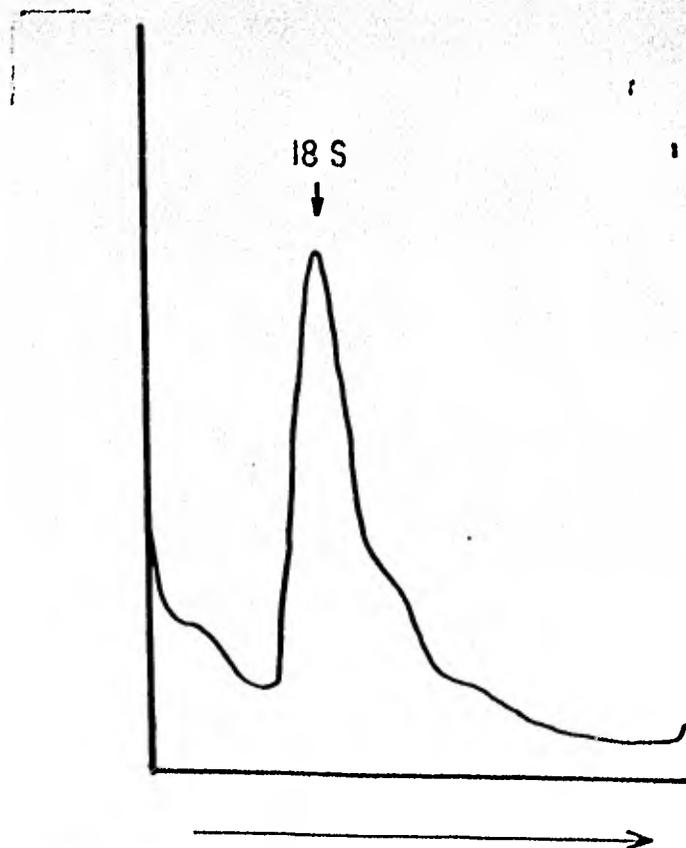
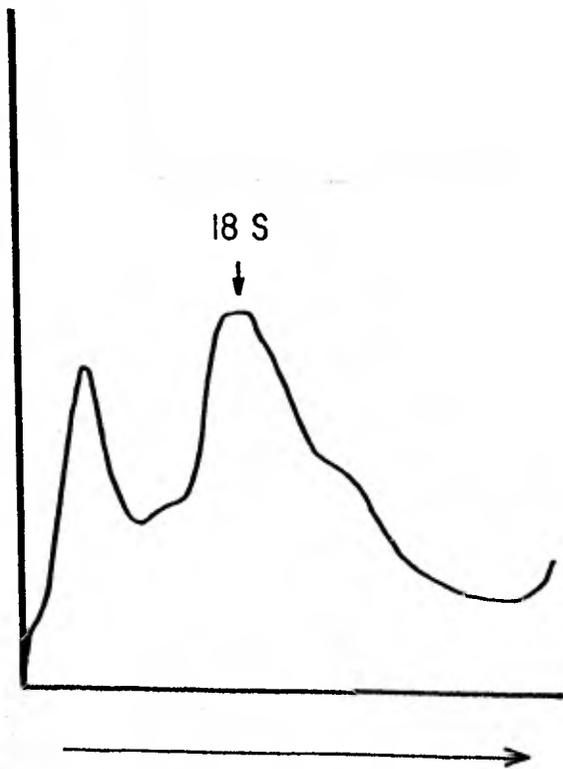


Fig. 4. Gradiente de sacarosa de ARN total de T. cruzi. Las células enteras fueron directamente resuspendidas en la solución de cloruro de guanidina y el ARN fue obtenido como en Materiales y Métodos.

Los datos anteriores pueden ser interpretados como el resultado de la actividad residual de ribonucleasas parcialmente inactivadas, a pesar de que la mezcla inhibidora haya demostrado ser muy eficiente en otros sistemas (18). Para lograr una certeza mayor de la existencia de esta actividad residual e infiriendo que, si ésta existe y se expresa en ARNr también debería hacerlo muy ventajosamente sobre ARNm que comunmente es más sensible que el ARNr, se intentó demostrar la existencia de polisomas en el lisado. Consecuentemente, se colocó una muestra del sobrenadante de 20,000g, sobre el gradiente isocinético y se centrifugó. La Figura 5 muestra que material polisomal está en realidad presente en estas preparaciones.

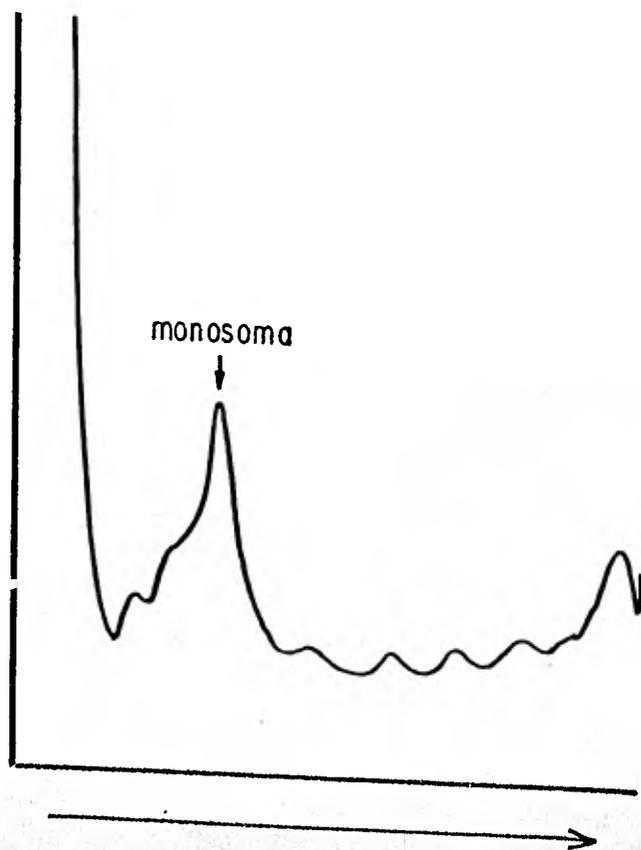


Fig. 5. Gradiente de sacarosa del sobrenadante de 20,000 g del lisado de T. cruzi.

Este material es además sensible a ribonucleasa exógena, como se demuestra por la desaparición concomitante de polisomas al añadirse esta enzima a la preparación, antes de su centrifugación (Fig. 6).

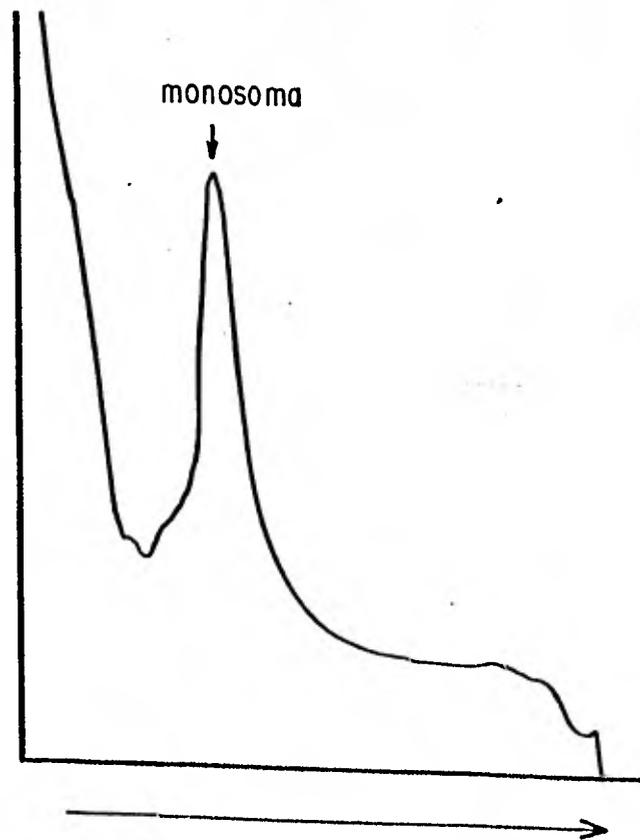


Fig. 6. Gradiente de sacarosa del sobrenadante 20,000 g del lisado de T. cruzi. El material fue previamente incubado con ribonucleasa 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 30 min a 4° C.

Con esta información se decidió entonces di sociar el complejo ARNr protefna en condiciones menos drásticas, ya que los agentes anteriores son agentes desnaturalizantes fuertes. El uso de dimetil sulfóxido al 10% produjo una mejor preparación de ARNr al aumentar concentración de la subunidad mayor. (Fig. 7)



Fig. 7. Gradiente de sacarosa de ARN citoplásmico de T. cruzi. El lisado celular fue obtenido en presencia de dietil-pirocarbonato, heparina y la fracción ribosomal extraída con dimetil sulfóxido al 10%.

La combinación de urea y litio produjo preparaciones de ARNr con índices de absorvencia 260/280 y 260/230 no menores de 2.0 y 2.5, respectivamente. Al ser examinadas en gradientes de sacarosa mostraron, por primera vez, dos picos delgados y en la proporción esperada para moléculas enteras (Fig. 8)

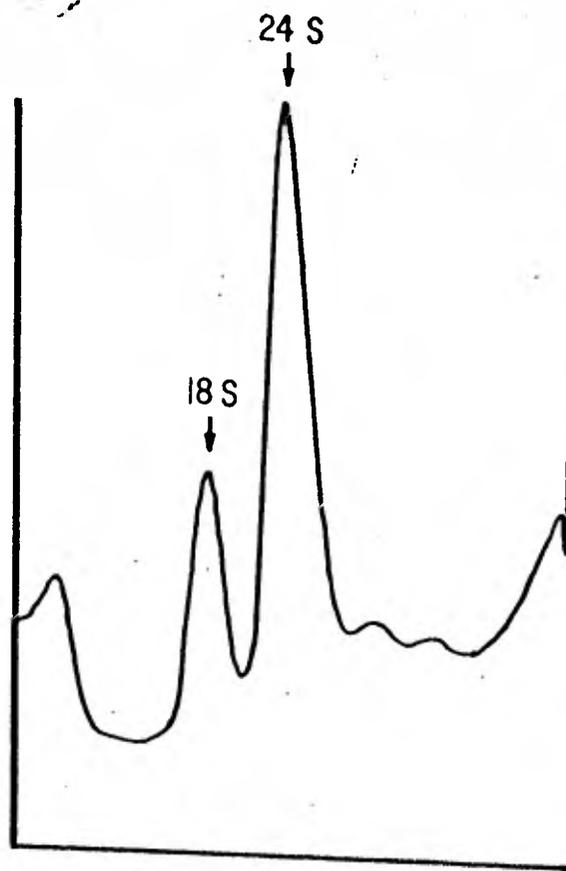


Fig. 8. Gradiente de sacarosa de ARN citoplásmico de *T. cruzi*. El lisado celular fue obtenido como en la Fig. 7 y la fracción ribosomal desproteínizada con la solución de urea-litio.

Habiendo identificado este tipo de moléculas, se procedió a confirmar la hipótesis de que la desnaturalización es el agente desenmascarante de un rompimiento oculto. La preparación de ARNr obtenida por el método de urca litio (todo en presencia constante de la mezcla inhibidora), fue incubada a 20°C y muestras obtenidas a diferentes tiempos de incubación fueron exhibidas en gradientes de sacarosa. La Figura 9 muestra esta secuencia en tres tiempos de incubación y se puede observar la conversión paulatina del perfil de moléculas enteras en los perfiles de moléculas fragmentadas, notándose la disminución de la subunidad mayor con el correspondiente aumento en los dos picos más ligeros de la región de la subunidad menor. Cuando esta conversión se lleva al límite, la región de la subunidad menor contiene un solo pico ancho, como en el caso de la Figura 1.

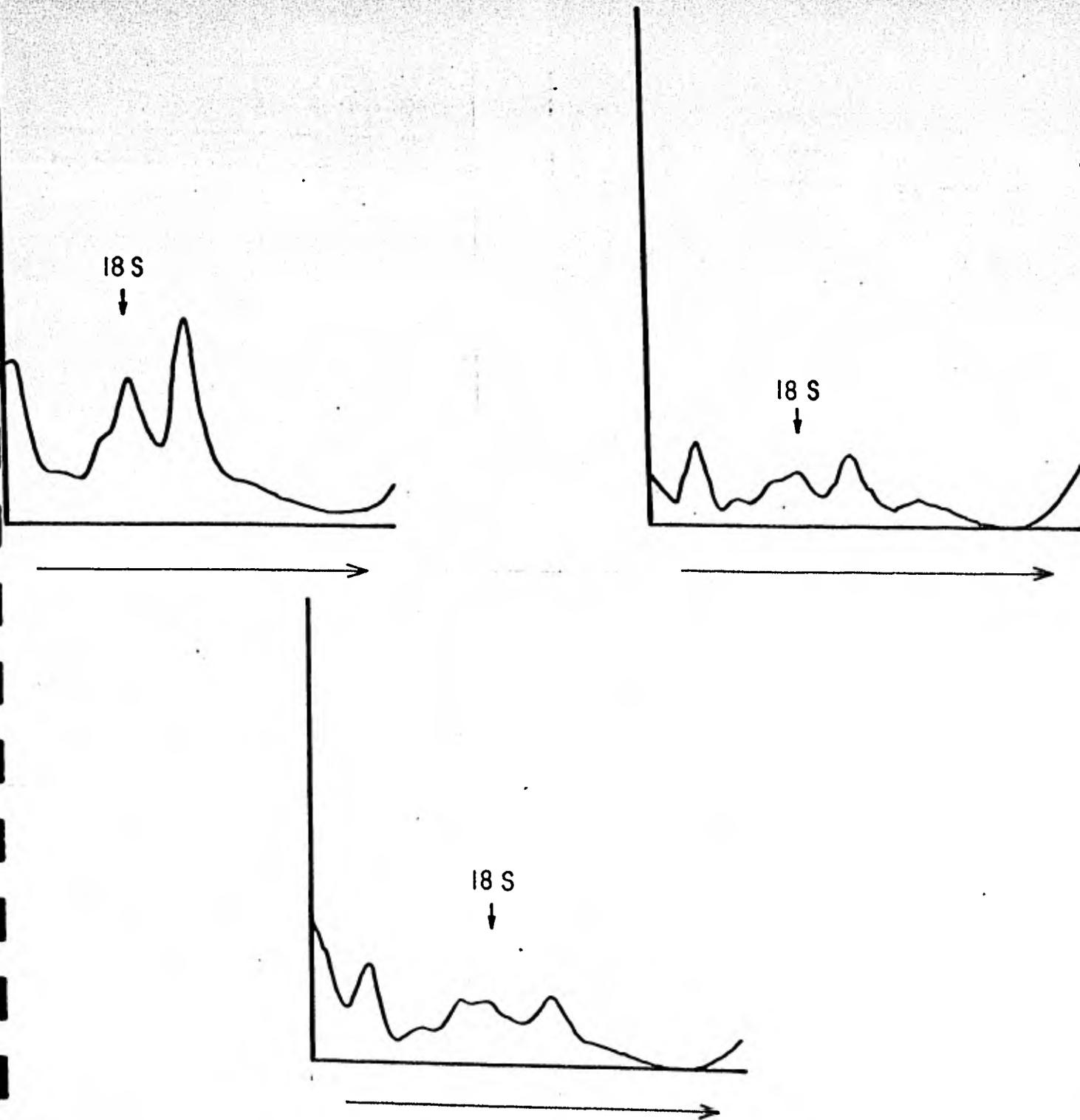
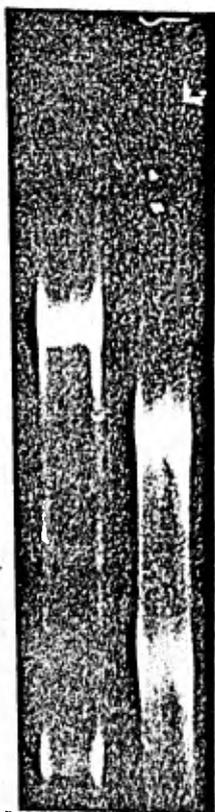


Fig. 9. Gradiente de sacarosa de ARN citoplásmico de T. cruzi. El ARNr fue obtenido como en la Fig. 8 e incubado por 10 h (A), 18 h (B) y 24 h (C) a 20° C, en presencia de dietil pirocarbonato-heparina.

Con el objeto de abundar en el efecto de la desnaturalización, de mejor resolver los tres picos en la posición de la subunidad menor, de identificar la procedencia de estos picos, y de obtener una estimación de los tamaños de las especies moleculares y sus fragmentos, se procedió a la separación de las especies por electroforesis en placas de gel. La preparación de ARNr obtenida por el método de urea-litio fue primeramente corrida en geles no desnaturalizantes. La figura 10 corresponde a la fotografía de un gel en placa no desnaturalizante, en la que la preparación de T. cruzi (carril b) muestra solo dos bandas correspondientes a las subunidades mayor y menor, sin la presencia de productos de fragmentación.



a b

Fig. 10. Gel en placa de poliacrilamida 2% agarosa 0.5% sin agentes desnaturalizantes. Carril a: ARNr de hígado de rata. Carril b: ARNr de T. cruzi obtenido por desproteíni- zación con urea litio.

Estas mismas preparaciones que, bajo los criterios arriba citados en condiciones no desnaturizantes, tanto para gradientes de sacarosa como para electroforesis en gel, contenían moléculas no fragmentadas de ARNr, fueron sometidas a desnaturización y subsecuentemente a electroforesis en condiciones desnaturizantes. Las muestras de ARNr de T. cruzi mostraron ahora cuatro o tres bandas en lugar de dos. La primera banda, de tamaño molecular mayor, muy tenue y en la mayoría de las ocasiones ausente, migró en la posición de la subunidad mayor, las otras tres bandas, o las únicas en la mayoría de los geles, migraron en la posición de la subunidad menor (Fig. 11). Esta distribución de bandas es justamente la misma a la obtenida en gradientes de sacarosa no desnaturizantes pero con muestras calentadas (Fig. 9).

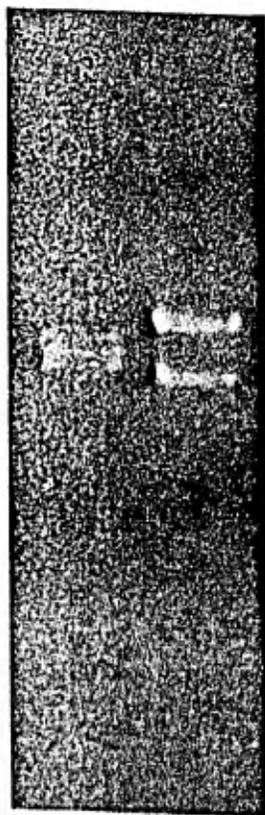


Fig. 11. Gel en placa de agarosa 0.75% formaldehído 2.2 M. Carril a: ARNr de T. cruzi obtenido como en la Figura 10 y previamente desnaturizado (Material y Metodos). Carril b ARNr de E. coli previamente desnaturizado.

a. b

La muestra de ARNr conteniendo las dos subunidades mostró un triplete de bandas de tamaño molecular similar, migrando en la región de la subunidad menor (Fig. 12, carril a). La fracción del gradiente de sacarosa correspondiente a la subunidad mayor demostró las dos bandas más ligeras del triplete (Fig. 12, carril b), o tres bandas, una correspondiente a la subunidad mayor completa y las otras dos, las más ligeras del triplete, correspondientes a los fragmentos de la mayor, cuando el tratamiento desnaturizante previo a la electroforesis fue menos drástico (Fig. 12, carril c). Por último, la fracción del gradiente de sacarosa conteniendo la subunidad menor solo mostró una banda que migró como la banda más pesada del triplete (Fig. 12, carril d). Por consiguiente, la subunidad mayor da origen a los dos fragmentos más ligeros del triplete y la menor a la especie más pesada de este triplete.

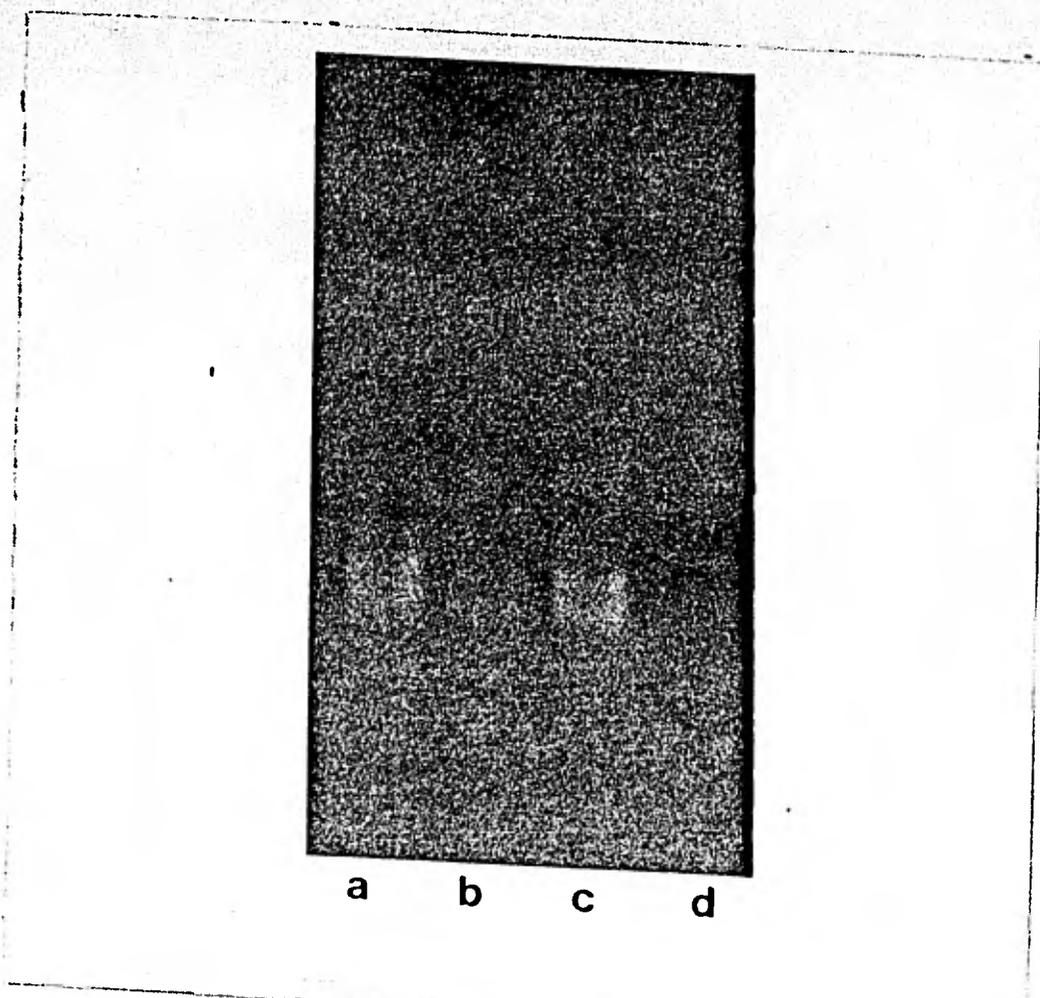


Fig. 12. Gel en placa de agarosa 0.75% formaldehido 2.2 M con diferentes fracciones de ARNr desnaturalizado de *T. cruzi* obtenido por desproteínezación con urea-litio. Carril a: ARNr no fraccionado en gradiente de sacarosa. Carril b: ARNr obtenido de la fracción del gradiente de sacarosa correspondiente a la subunidad mayor y calentado a 60° C por 5 min en la mezcla desnaturalizante (Materiales y Métodos). Carril c: igual al Carril b, pero calentado por solamente 1 min. Carril d: ARNr obtenido de la fracción del gradiente de sacarosa correspondiente a la subunidad menor.

Tamaños Moleculares

El tamaño de las cuatro moléculas de ARNr de T. cruzi (las subunidades mayor y menor y los fragmentos de la mayor) fueron estimados en el sistema de electroforesis en gel en placa, en condiciones no desnaturizantes y desnaturizantes. El cálculo fue obtenido a partir de la gráfica del logaritmo de los valores de peso molecular, contra los valores de las distancias migradas por las bandas, usando ARNr de hígado de rata en los geles no desnaturizantes o de E. coli en los desnaturizantes. La Tabla 1 resume los datos obtenidos de varios experimentos. Los valores obtenidos para las subunidades mayor y menor, a partir de geles no desnaturizantes y desnaturizantes, coinciden razonablemente bien. La suma de los valores de los dos fragmentos es aproximadamente 300 bases menor que el valor de la subunidad mayor.

Tabla I. Tamaños moleculares de las subunidades mayor y menor y de los dos fragmentos derivados de la mayor, de ARNr de T. cruzi

Tipo de Gel	Especie Molecular	Tamaño Molecular *	
		Daltones	Bases
No Desnaturalizante (N=2)	Subunidad Mayor	1,370,631	3,996
	Subunidad Menor	855,590	2,494
Desnaturalizante (N=5)	Subunidad Mayor	1,371,021 ± 11,868	3,997 ± 34
	Fragmento α	569,881 ± 3,488	1,661 ± 10
	Fragmento β	695,660 ± 4,357	2,028 ± 12
	Subunidad Menor	844,928 ± 4,450	2,463 ± 13

* Se muestra la media ± el error estandar, siendo N el número de diferentes geles medidos. Los valores para las subunidades mayor y menor de ARNr estándares fueron 1.75 y 0.70 m para hígado de rata (10), y 1.07 y 0.55 m para E. coli (22), respectivamente.

Velocidades de Sedimentación

Para este tipo de determinaciones, se usaron muestras de ARNr de T. cruzi, obtenidas mediante el método de extracción con urea-litio. El coeficiente de sedimentación s fue calculado por dos métodos: uno relativo a estándares conocidos, y el otro absoluto.

Las muestras de ARNr de T. cruzi y de hígado de rata fueron cosedimentadas (Fig. 13) en gradientes isocinéticos de sacarosa, en solución no desnaturante. Las dos subunidades menores ocuparon una posición coincidente, por lo que se adoptó un valor de 18S para la menor de T. cruzi: la posición intermedia de la subunidad mayor de T. cruzi dio un valor de 24S.

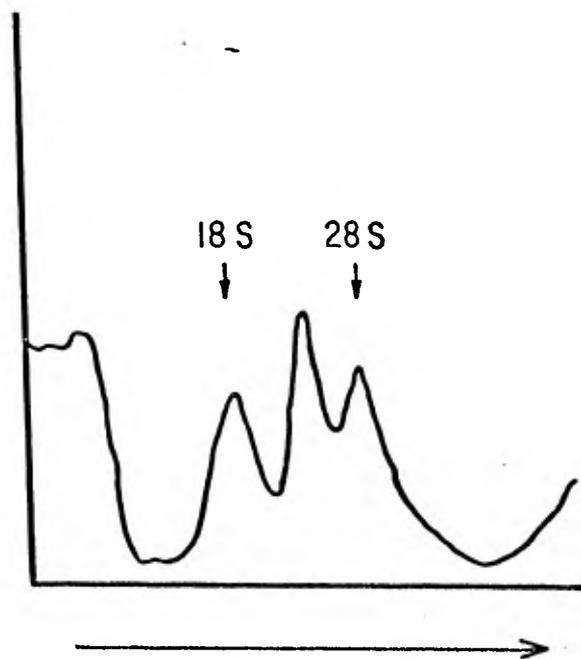


Fig. 13. Gradiente de sacarosa con una mezcla de ARNr de hígado de rata y de T. cruzi obtenido por desproteinización con urea-litio. Las flechas indican las posiciones del ARNr de hígado de rata.

Muestras de varias concentraciones de ARNr de T. cruzi fueron colocadas en la celdilla analítica formadora de bandas conteniendo una solución no desnaturalizante, con sacarosa como agente estabilizante de las bandas. Los valores de $s_{20,w}$ fueron calculados a partir del registro ultravioleta (Fig. 14) para cada concentración de ARNr. A partir de los seis valores obtenidos en las diferentes concentraciones, se calcularon finalmente los valores de $s_{20,w}^0$ (Fig. 15 A y B) que resultaron ser 17.2 y 23.2S para las subunidades mayor y menor, respectivamente.

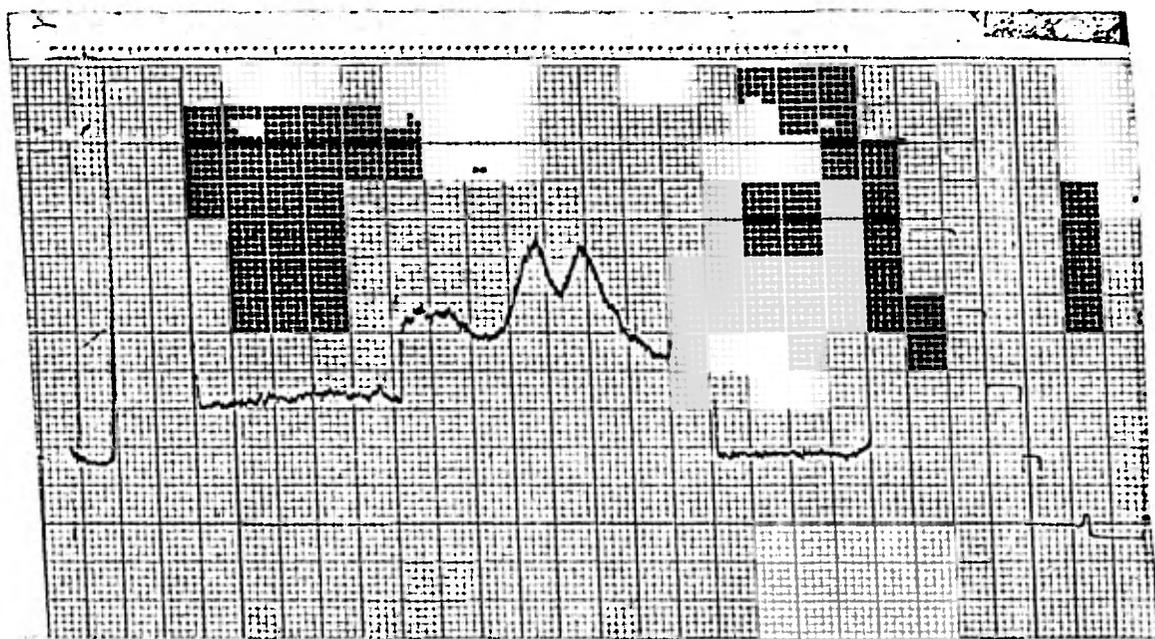


Fig. 14. Registro continuo de la absorción a 265 nm del contenido de la celdilla analítica, cargada con ARNr de T. cruzi, obtenido a los 48 min. de centrifugación. El primer pico corresponde a la subunidad menor y el segundo a la mayor.

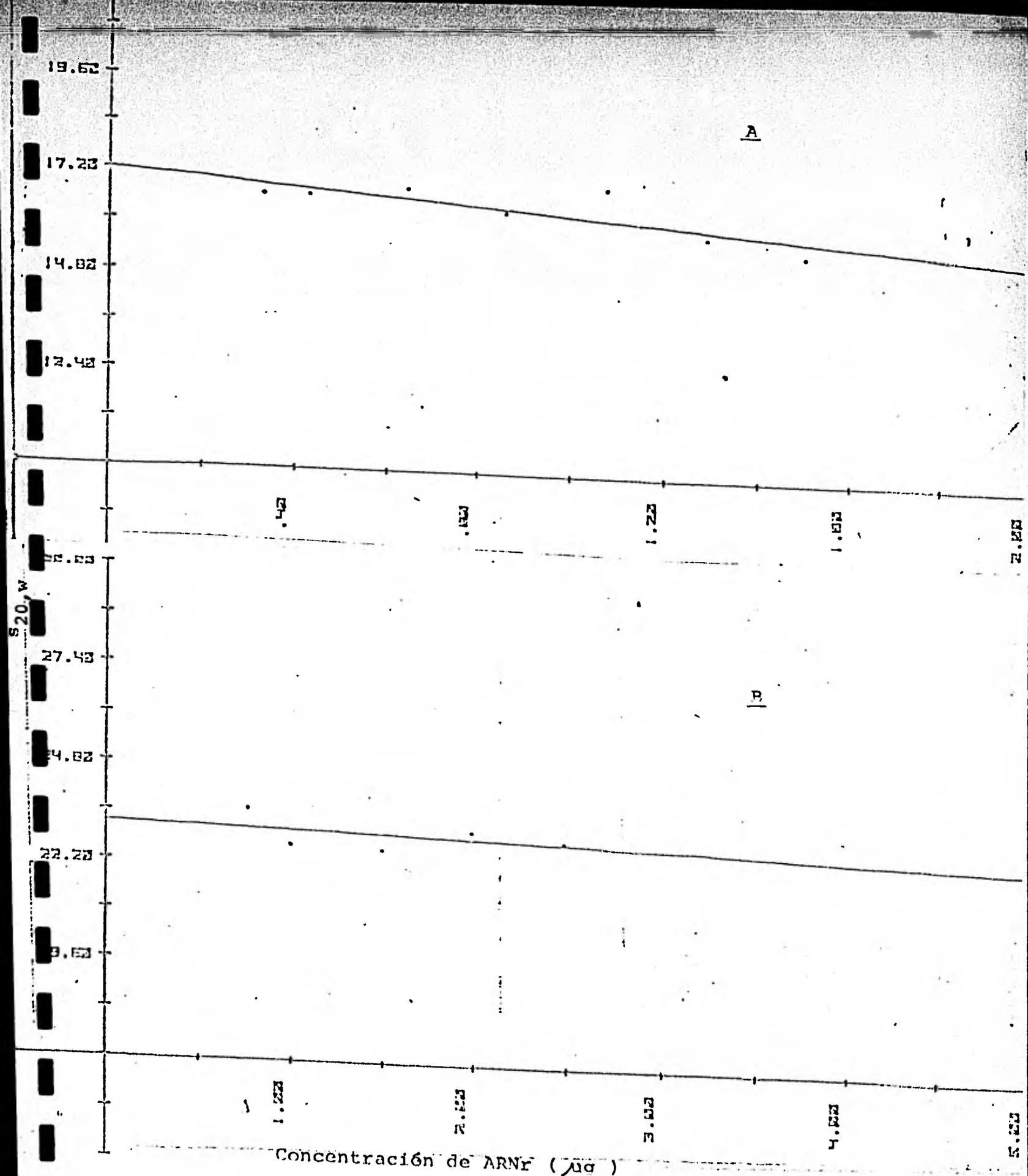


Fig. 15 Grafica de valores de $s_{20,w}$ contra concentración de ARr de T. cruzi. (A) subunidad menor, (B) subunidad mayor

DISCUSION

La aparición de dos fragmentos derivados de la subunidad de ARNr 24S de T. cruzi puede ser explicada, principalmente, por dos mecanismos. (i) por rompimiento enzimático de la molécula entera, durante las manipulaciones in vitro, e (ii) por la disociación de dos fragmentos preexistentes in vivo. Los datos reportados previamente por diferentes laboratorios y los reportados aquí, parecen apoyar el segundo mecanismo:

1. El ARNr fue aislado, desde la cosecha celular, siempre en presencia de una mezcla inhibitoria de la actividad de ribonucleasa altamente eficiente: además de que se tomaron las precauciones correspondientes al tratamiento del agua para soluciones, a la esterilización y manejo del material de vidrio, al uso de guantes y de que se evitó la contaminación, por ribonucleasa comercial, en el uso de los utensilios.
2. Se demostró la existencia de polisomas sensibles a ribonucleasa exógena en el mismo lisado que se usó para la extracción de ARNr. Aunque se ha reportado la existencia de ARNm roto proveniente de polisomas, se desconoce si esta ruptura se efectuó durante la

extracción. Además, el ARN total extraído con guanidina, que mostró fragmentos de ARNr, fue ensayado en su capacidad de estimular síntesis de proteínas en un sistema libre de células proveniente de reticulocito y dependiente de ARNm exogeno. La fluorografía de la electroforesis de las proteínas sintetizadas, marcadas radioactivamente con metionina S^{35} , mostró bandas intensas en la zona de peso molecular alto, hasta 0.22 m, implicando la existencia de ARNm de tamaño grande (experimentos no publicados y realizados en colaboración con el Dr. Lino Díaz, Departamento de Biología del Desarrollo, IIBM, UNAM).

3. El uso de agentes fuertemente desnaturalizantes, sobre células enteras o sobre fracciones subcelulares, siempre produjo preparaciones de ARNr conteniendo los fragmentos alfa y beta de la especie 24S: en la mayoría de los casos, con la desaparición casi completa de la 24S.
4. Por el contrario, la utilización de técnicas de desproteínización ribosomal en condiciones moderadas, consistentemente produjo: (i) perfiles de gradientes de sacarosa con dos picos delgados y en proporciones adecuadas a la masa de las especies

- 18 y 24S, e (ii) la aparición de solo dos bandas en la electroforesis de los geles no desnaturantes. Este mismo material, cuando fue desnaturado por calor o por agentes químicos, dio lugar a la aparición de los fragmentos alfa y beta.
5. Todos estos cambios ocurrieron solamente con la especie 24S, pero no con la 18S ni con ninguna especie extraída del hígado de rata o de E. coli

Si el rompimiento del ARNr 24S ocurre in vivo, esto debe realizarlo una ribonucleasa específica y debe ocurrir durante el procesamiento del ARNr precursor para producir el 24S puesto que en T. cruzi se ha reportado la existencia de un precursor putativo de 31S y extraído con fenol (19).

A pesar de todo lo anterior, el rompimiento in vitro no puede ser totalmente desechado. Si éste es el caso, la situación exigiría la existencia de una región única de ARNr críticamente expuesta a la acción de ribonucleasas inespecíficas en la conformación nativa del ribosoma. La deficiencia de aproximadamente 300 bases en la suma de los fragmentos alfa y beta, en comparación al número contenido en el ARNr 24S, podría apoyar el rompimiento in vitro si este dato se considerara debido a la existencia de cortes múltiples, produci

dos por ribonucleasas inespecíficas, Sin embargo, esta deficiencia también puede explicarse por la liberación, en condiciones desnaturalizantes, del ARNr 5.8S y del ARNr 5S, que contienen unas 200 y 120 bases respectivamente. Los geles de agarosa y agarosa-poliacrilamida usados en estos experimentos no fueron adecuados para la demostración de estas moléculas pequeñas, pero en otros tripanosomátidos se han encontrado dos bandas en la región correspondiente (5).

El dato de un peso molecular de 1.37 m para el ARNr 24S de T. cruzi esta de acuerdo con las relaciones reportadas entre pesos moleculares de ARNr, tipo "28S", de diversas especies y la posición de estas en la escala filogenética. Este ARNr aumenta en peso en los animales de evolución más reciente, de aproximadamente 1.4 m en erizos de mar hasta 1.75 m en mamíferos (20). La electroforesis en geles no desnaturalizantes usada en estos experimentos es similar a la usada por Loening (10) y tratando de comparar estos datos con los por él reportados, T. cruzi se colocaría en un lugar intermedio entre los hongos (21) y las plantas superiores (22) con valores de 1.27 - 1.31 m, y los erizos de mar y las moscas de la fruta con valores de 1.40 a 1.41 m.

Con respecto a la subunidad 18S de T. cruzi

con 0,85 m de peso molecular, la interpretación no es sencilla. En primer lugar, todos los valores conocidos en las distintas especies caen en dos categorías claras: alrededor de 0,56 m para procariotes y de 0,70 m para plantas superiores y animales. En segundo lugar, este último valor permanece constante en la evolución de los animales. Variaciones artificiales en este tipo de determinaciones pueden deberse a error experimental, a diferencias en las estructuras secundaria y terciaria, o a una población heterogénea. Los errores de las determinaciones presentadas aquí están alrededor, y nunca mayores, del 2%. Los valores encontrados en geles no desnaturalizantes y desnaturalizantes comparan razonablemente bien. Los valores derivados de geles de poliacrilamida y reportados tanto en otros tripanosomátidos (5) como Amoeba y Euglena (10), caen también en el rango de 0,84-0,89 m y en todos ellos la subunidad mayor de ARNr es reportada como inestable con productos de tamaño semejante al de la subunidad menor. En los geles utilizados en este trabajo se pudieron resolver, sin embargo, bandas con diferencias un poco menores a 0,1 m (fragmentos α y β) y la probabilidad de estar midiendo una banda, tan nítida como las otras, conteniendo especies moleculares de muy diferente tamaño, es entonces baja. Con base en lo anterior, los valores encontrados para

el ARNr 18S de 0.85 m deben representar diferencias verdaderas en peso molecular con respecto a los de las subunidades menores de ARNr de hígado de rata y de E. coli. Este tipo de protozoarios deberán colocarse entonces en una posición extra al esquema general de solo dos tipos de subunidades menores. Aunque la regla general, de pequeñas para procariotes y grandes para eucariotes, sigue vigente aun con la inclusión de estos protozoarios.

Finalmente, los valores encontrados de coeficientes de sedimentación relativos y absolutos comparan bastante bien entre si: 18 y 17.2S para la especie menor y 24 y 23.2S para la especie mayor. Los valores de tipo absoluto se encuentran muy cercanos a los reportados para E. coli (22); sin embargo, no son directamente comparables porque las condiciones de fuerza iónica durante la sedimentación son diferentes. La velocidad de sedimentación depende de parámetros tales como coeficiente de difusión, coeficiente de fricción, ionización de la macromolécula, contraiones, índice axial y viscosidad intrínseca, que a su vez, dependen fuertemente de la fuerza y composición iónica del solvente al interaccionar con polímeros cargados iónicamente y de conformación libre al azar (23). En los experimentos de centrifugación analítica realizados en el presente trabajo, se ha tenido que hacer un compromiso entre las probabilidades de desnaturalización de la subunidad 24S y la obtención del

polímero en su conformación libre al azar que es la más adecuada para que la velocidad de sedimentación represente diferencias verdaderas en tamaño molecular (24). Es en función de estos considerandos, que se decidió sedimentar el ARNr de T. cruzi en ausencia de cationes divalentes y en bajas concentraciones de cationes monovalentes, condiciones ambas que reducen el coeficiente de sedimentación (22). Además resulta mucho más interesante el estimar, en un futuro, los valores de viscosidad intrínseca de estas preparaciones para poder aplicar el tratamiento de Scheraga y Mandelkern (25) y llegar a otra estimación independiente y razonable del peso molecular de las subunidades del ARNr de T. cruzi.

BIBLIOGRAFIA

1. Enfermedad de Chagas en México, Centro de Investigaciones, Ecológicas del Sureste, No. 1 serie de documentos, San Cristóbal Las Casas, Chis., México, 1978.
2. American Trypanosomiasis Research, Scientific Publication No. 318, Pan American Health Organization, Brazil, marzo 1975.
3. Trypanosomiasis and Leishmaniasis, Ciba Foundation Symposium 20, Associated Scientific Publishers, P.O. Box 211, Amsterdam, 1974.
4. White, R.L., Hogness, D.S.: "R Loop mapping of the 18S and 28S sequence in the Long and Short repeating units of Drosophila melanogaster rDNA" Cell, 10, 177-182, 1977.
5. Morales, N.M. y Roberts, J.F.: "A comparative study of the ribonucleic acids of three species of Trypanosomatids," Comp Bioch. Physiol., 59, 1-4, 1978.
6. Leon, W., Fouts, D. y Manning, J.: "Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate Leishmania donovani, Nucleic Acid Research, 5, 491-504, 1978.
7. Miller, F.W. y Ilan, J.: "The ribosomes of Plasmodium berghei: isolation and ribosomal ribonucleic acid analysis", Parasitology, 77, 345-365, 1978.
8. Bostock, C.J., et al, ; "Lability of 26S ribosomal RNA in Tetrahymena pyriformis, Expt. Cell Res., 66, 260-262, 1971.
9. Rubin, N.J. y Eckhardt R.A.: "Characterization of a hidden break in the large molecular weight ribosomal RNA (rRNA) of Tetrahymena pyriformis, J. Cell Biol., 79, 18 Annual meeting of American society, Abstract RP 2312, 1978.

10. Loening, U.E., "Molecular Weights of Ribosomal RNA in relation to evolution", *J. Mol. Biol.*, 38, 355-365, 1968.
11. Ishikawa, H. y Newburgh, R. W. "Studies of the Thermal conversion of 28S RNA of Galleria mellonella (L.) to an 18S product", *J. Mol. Biol.*, 64, 135-144, 1972.
12. Camargo, E.P.: "Grow and diferenciacion of Trypanosoma cruzi", Origen of Metacyclic Trypanosomes in liquid medium. *Revta Inst. Met. Trop. S. Paulo*, 6, 220-224, 1964.
13. Adelberg, E.A. y Burns, S.: "Genetic variation in the sex factor of Escherichia coli", *J. Bacteriol.*, 79, 321-330, 1960.
14. Cox, R.A., Methods in Enzymology. Gossman L. y Mol dave K. editors, Academic Press, New York, 12B, 120-129, 1967.
15. Peacock, A.C. y Dingman, W.: "Resolution of Multiple Ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis", *Biochemistry*, 6, 1818-1827, 1967.
16. Dahlberg, A.E., Dingman y Peacock A.C.: "Electrophoretic Characterization of Bacterial Polyribosomes in agarose-acrylamide composite gels", *J. Mol. Biol.*, 41, 139-147, 1969.
17. Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. y Boedtker H.: "RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical re examination", *Biochemistry*, 16; 4723-4751, 1977.
18. Jost, P.P., Grandula, P., Sakol, P. y Takeshi, O. : "An improved method for insolation of active vite-llogenin messenger RNA from chicken liver", *Bioch. Biophys. Acta*, 517, 338-348, 1978.

19. Tanowitz, H., Wittner, M., Sveda y Soeiro R.: "Studies on Ribosomal RNA of Trypanosoma cruzi", J. Parasitology, 61, 1065-1069, 1975.
20. Porter, D. y Smiley, R.; "Ribosomal RNA molecular weights of Trichomyceto and Zygomycetes", Experimental Mycology, 3, 188-193, 1979.
21. McIntosh, L. y Cattolico, R.A.: "Preservation of algal and higher plant ribosomal RNA integrity during extraction and electrophoretic quantitation", Analyt. Biochem., 91, 600-612, 1978.
22. Stanley, W.M. y Bock, R.M.: "Isolation and physical properties of the ribosomal ribonucleic acid of Escherichia coli", Biochemistry, 4, 1302-1311, 1965.
23. Schachman, H.K.: "Ultracentrifugation in Biochemistry" Academic Press, New York and London, 1959.
24. Strauss, J.H., Kelly, R.B. y Sinsheimer, R.L. "Denaturation of RNA with Dimethylsulfoxide," Biopolymers, 6, 793-807, 1968.
25. Scheraga, H.A. y Mandelkern L.: "Consideration of the Hydrodynamic Properties of Proteins," J. Am. Chem. Soc., 75, 179-184, 1953.