

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



69

**DETERMINACION ELECTROFORETICA DE PATRONES
ISOENZIMATICOS DE AISLADOS MEXICANOS
DE TRYPANOSOMA CRUZI**

JAVIER ORTEGA CESEÑA

Q U I M I C O

1980

M-42529



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

PRESIDENTE: Dionisio Peláez Fernández
Jurado asignado VOCAL: Guadalupe Vélez Pratt
originalmente según SECRETARIO: Angelina Quintero Ruíz
el tema. 1er. SUPLENTE: Beatriz Medina Jiménez
2do. SUPLENTE: Oscar Velasco Castrejón

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Sustentante: Javier Ortega Ceseña

Javier Ortega C.

Asesor del tema: Angelina Quintero Ruíz

Angelina Quintero R.

Supervisor técnico: Julieta Rubio
Lightbourn

Julieta Rubio
Lightbourn



DEPTO. DE PASANTERÍA
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

2000-000000

A MIS PADRES

CONTENIDO

	página
I.- INTRODUCCION	1
a) Antecedentes	1
b) Caracterización de subespecies de <u>T. cruzi</u>	4
c) Propiedades de isoenzimas	6
d) Métodos de separación de isoenzimas	8
i) Electroforesis en gel de almidón	10
e) Caracterización de tripanosomas por electroforesis de isoenzimas	17
f) Objetivos	19
II.- MATERIALES Y METODOS	21
a) Cultivo de tripanosomas	21
b) Cosecha	23
c) Preparación de lisados	23
d) Electroforesis de ASAT, ALAT, ME, G6PD, PGM y GPI	24
i) Preparación de las placas para electroforesis	24
ii) Aplicación de las muestras	26
iii) Desarrollo de la electroforesis	27
e) Detección de la actividad enzimática (revelado de geles)	28
i) Revelado de ASAT y de ALAT	28
ii) Revelado de GPI, G6PD, PGM y ME	29
III.- RESULTADOS	33
IV.- DISCUSION	36
V.- BIBLIOGRAFIA	43

I.- INTRODUCCION

a) Antecedentes

En 1908, Carlos Chagas, médico brasileño, al estar estudiando la transmisión del paludismo en Minas Gerais, Brasil, encontró que una gran parte de las casas de barro del pueblo estaban infestadas de barbeiros ó chinches voladoras, grandes insectos que succionan sangre de diversos vertebrados. Además, observó que el intestino de estos insectos contenía organismos flagelados, los cuales fueron caracterizados posteriormente como tripanosomas. Se indujo a que los insectos infectados picaran a un mono y después se encontraron tripanosomas en éste, reproduciendo la enfermedad. Este es el único padecimiento, denominado tiempo después enfermedad de Chagas, en el cual el parásito que lo provoca y el insecto vector fueron descubiertos antes de que el padecimiento mismo fuese diferenciado. Posteriormente, en 1909, Chagas encontró el mismo tripanosoma en la sangre de un niño que presentaba fiebre, anemia y linfadenopatía, comprobando que se trataba de una entidad nosológica común en algunas partes de Brasil. Sin embargo, este importante descubrimiento de Chagas fue violentamente combatido y hasta rechazado por sus contemporáneos, principalmente por Kraus (1915) quien no pudo encontrar ningún -

caso humano de enfermedad de Chagas en el norte de Argentina, - aunque encontró una gran cantidad de insectos infectados en los domicilios de los habitantes.

En 1934 Mazza reportó varios casos agudos de la enfermedad de Chagas en el norte de Argentina, exactamente en donde - Kraus no fue capaz de encontrar ningún caso humano. Al igual que Chagas, Mazza fué criticado por descubrir nuevas enfermedades en vez de tratar las ya existentes, pero él y sus colegas persistieron en sus investigaciones y llegaron a registrar más de 1000 casos agudos antes de 1944; además señalaron la importancia de esta enfermedad como un problema de salud pública. Desde entonces se ha observado que este hemoflagelado parasita a muchos mamíferos inferiores y que es común en los insectos de la sub-familia de los triatomíneos, desde Argentina hasta los Estados Unidos. La infección humana es menos frecuente pero ocurre con distribución desigual desde México hasta el sur de Argentina, destacando Brasil como el país más severamente afectado.

En un principio, Chagas nombró al parásito Trypanosoma cruzi. Posteriormente, creyendo erróneamente que se reproducía - por esquizogonia en una etapa de su ciclo de vida, le dió el nombre de Schizotrypanum cruzi, nombre que aún se utiliza en muchas

partes del mundo.

La familia de los tripanosomátidos pertenece al orden - Cinetoplastida y está dividida en varios géneros que forman una interesante, pero aún no completamente entendida, secuencia evolutiva, que comprende desde parásitos protozoarios de invertebrados (monogénéticos) tales como Crithidia, Leptomonas, Blastocrithidia y Herpetomonas (2), hasta protozoarios que parasitan tanto a vertebrados como a invertebrados. Dentro de estos últimos, se encuentra el género Trypanosoma.

La forma de los tripanosomas puede ser fusiforme y puntiaguda en uno o ambos lados terminales o redonda, según el estado de diferenciación en que se encuentre. La primera tiene un flagelo que emerge de un gránulo basal localizado ya sea enfrente o detrás del núcleo y muy próximo a otro gránulo, el cual se ha denominado de varias maneras: bleroplasto, cinetonúcleo, cinetoplasto, etc. Esta estructura, contenida en la única mitocondria de este parásito, está formada de ácido desoxirribonucleico (ADN).

La división celular, aún poco entendida, ocurre por fisión longitudinal e involucra la división del cinetoplasto, del cuerpo basal y del núcleo. También pueden sufrir fisión múltiple

separándose después de varias divisiones nucleares en un número variable de descendientes ordenados en forma de roseta.

Las especies de tripanosoma que infectan mamíferos, representan por sí mismas una interesante materia de estudio desde el punto de vista evolutivo, en términos de su método de - - transmisión y su correlación con la localización del ciclo de - desarrollo en el insecto vector. Estas especies están comprendidas dentro de los subgéneros Estercoraria y Salivaria. Supuestamente las especies más primitivas son los estercorarios (p. ej. T. theileri, T. lewisi, T. conorhini y T. cruzi), que se desarrollan en el intestino posterior del insecto vector y son transmitidos al huésped vertebrado a través de las heces, y las especies más recientes son los salivarios (p. ej. T. vivax, T. congolense y T. brucei), que se desarrollan en el intestino y/o en - las glándulas salivales del insecto vector y son inoculados directamente al torrente sanguíneo del huésped mientras se alimentan.

b) Caracterización de subespecies de T. cruzi.

Desde el punto de vista morfológico, los tripanosomas - provenientes de diversos mamíferos y vectores son idénticos, y el cuadro clínico que presentan los humanos sobrevivientes a la fase

aguda está definida en términos generales como: alteraciones electrocardiográficas, cardiomiopatía crónica, cardiomegalía, megacolon y megaesófago. Esto ha ocasionado que T. cruzi haya sido tratado como una única entidad patogénica al hombre. Sin embargo, - existen una serie de evidencias tales como: las divergentes respuestas a drogas tripanocidas (3); los diferentes grados de infectividad tanto a huéspedes animales, como a humanos (4); diferencias geográficas de síndromes chagásicos (5), y discordancias terapéuticas notables (6), variables de región a región, que hacen sospechar la heterogeneidad del parásito causante.

Todos los factores antes mencionados aunados a que la taxonomía del género Trypanosoma ha estado basada principalmente en - la historia de su vida y de su morfología (7), y que las denominadas cepas (que deberían ser llamadas con más propiedad aislados), son normalmente denotadas sólo por el territorio de aislamiento - inicial y caracterizadas por el grado de infectividad y virulencia, han conducido a la búsqueda de métodos bioquímicos de identificación más objetivos. Entre éstos, cabe mencionar el trabajo de caracterización hecho por Newton (8), basado en las diferencias de densidad de flotación del ADN, tanto del núcleo, como del cinetoplasto, en gradientes de densidad; el de Mattei (9) que muestra diferencias en el patrón electroforético de los productos de diges-

ti3n con enzimas de restricci3n del ADN del cinetoplasto y el m3todo que hasta ahora ha sido m3s utilizado con fines taxon3micos, principalmente en protozoarios que consiste en determinar la conducta electrofor3tica de isoenzimas.

c) Propiedades de isoenzimas

En los 3ltimos a3os ha habido una evidencia creciente de la existencia de enzimas con formas moleculares m3ltiples, (10) y este hecho es ahora reconocido como un aspecto general de la -enzimolog3a y del metabolismo celular.

Antes de que este concepto fuese reconocido ya se hab3a notado la heterogeneidad molecular en preparaciones enzim3ticas, pero era atribuida usualmente a contaminantes o a enzimas parcialmente desnaturalizadas o degradadas. Durante la d3cada de -1950 surgieron indicios ocasionales de que esta heterogeneidad podr3a no ser artificial sino un reflejo de lo que ocurr3a en -realidad dentro de la c3lula (11), (12), (13). Ya que estos investigadores usaron m3todos que no permit3an resolver las m3ltiples formas de enzimas, sus comunicaciones no tuvieron impacto hasta que se desarroll3 un m3todo que determin3 la heterogeneidad enzim3tica. Acoplado la t3cnica de electroforesis en gel -

de almidón, de Smithies (14), con métodos histoquímicos de tinción para identificar enzimas separadas, Hunter y Markert (15) desarrollaron la técnica llamada de electroforesis horizontal en gel de almidón, que se caracteriza por su gran poder de resolución para la identificación de las diferentes formas moleculares de las enzimas.

Las isoenzimas son numerosas y características de muchas células, tejidos y órganos. En un tiempo se creía que un gene codificaba para una enzima y que era totalmente responsable de una reacción bioquímica. Esta simple ecuación molecular: - - un gene-una enzima-una reacción catalítica, fue una generalización útil en los inicios de la genética bioquímica, pero ahora se sabe que para catalizar la misma reacción, son necesarias múltiples variedades de una enzima, ya sea bajo diferentes condiciones metabólicas, o en diferentes sitios en la misma célula o en diferentes células o en la misma célula en diferentes estadios de diferenciación. Aparentemente, las isoenzimas han sido confeccionadas por presiones evolutivas (16), para ajustar los sofisticados requerimientos de la maquinaria metabólica celular.

En la actualidad, se acepta en general que las diferencias entre distintas especies de un género son el resultado de -

variaciones hereditarias desarrolladas durante el curso de la evolución en las estructuras de las proteínas de tales especies. Por ejemplo, aunque organismos de muy diversos tipos poseen citocromo C, éste difiere en estructura de un organismo a otro, en una medida relacionada con el tiempo transcurrido desde la divergencia de un ancestro común. Las diferencias dentro de la misma especie son las manifestaciones de modificaciones menos profundas que afectan únicamente a unas cuantas proteínas. Resulta claro pues, que si - las proteínas análogas provenientes de diferentes cepas de una especie pueden ser caracterizadas de alguna manera, que muestre diferencias estructurales, la identificación bioquímica de las diferentes cepas es factible.

d) Métodos de separación de isoenzimas

De los métodos que existen para separar isoenzimas, dos de los más usados son la electroforesis y la cromatografía de intercambio iónico. Ambos dependen básicamente de la naturaleza y magnitud de la carga resultante de la proteína en la solución amortiguadora que se use. Las técnicas electroforéticas han sido empleadas principalmente con propósitos analíticos y los métodos cromatoográficos, en escala preparativa.

Los procedimientos cromatográficos más comunes son la cro

matografía en columna de celulosas intercambiadoras de iones como la carboximetil-celulosa (CM-celulosa) y la dietilamino-etil-celulosa (DEAE-celulosa), así como la cromatografía de filtración en geles hidrofílicos por ejemplo del tipo Sephadex.

Los métodos electroforéticos han sido los más estudiados. En un principio, la electroforesis en papel fué ampliamente usada en bioquímica clínica para el estudio de anormalidades de proteínas de suero, siendo esta técnica una de las primeras en ser aplicadas en la separación de isoenzimas. Posteriormente fueron introducidos algunos métodos alternativos que empleaban diferentes medios de soporte como acetato de celulosa, gel de agar, gel de pdiacrilamida y gel de almidón.

La velocidad de migración de una proteína en un campo -eléctrico depende, como ya se explicó anteriormente, sobre todo de su carga eléctrica neta, ya que ésta puede ser variada dentro de amplios límites, cambiando el pH del medio, es posible que -una proteína dada se desplace hacia el electrodo correspondiente.

Aunque la carga eléctrica neta es el factor más importante para la separación de las proteínas durante la electroforesis, su efecto puede ser modificado considerablemente por otros facto

res tales como el tamaño y la forma de la molécula de la proteína y las propiedades fisicoquímicas de la solución amortiguadora. Todos los factores que afectan la separación electroforética de proteínas se aplican igualmente para las enzimas, pero se debe tener mucho cuidado para evitar su inactivación.

i) Electroforesis en gel de almidón.

Desde su introducción por Smithies (14), la electroforesis en gel de almidón ha sido usada más que cualquier otra técnica para la separación de isoenzimas.

El almidón, como se usa en electroforesis, es un gel más que un líquido viscoso, porque las cadenas de los carbohidratos se ramifican y entrelazan entre sí lo suficiente para formar un sólido semirrígido. La estructura resultante es un tamíz en donde la capacidad de las moléculas para pasar a través de éste depende del tamaño y de la forma de los poros del gel, del tamaño y de la forma de las moléculas, y de las interacciones que puedan ocurrir entre las moléculas y la matriz del gel, como son la adsorción y el intercambio de iones.

ii) Detección de isoenzimas in situ.

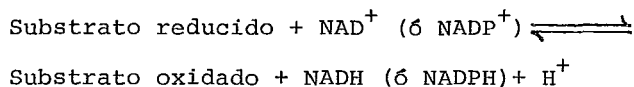
Se han descrito varios métodos para la detección de isoenzimas separadas por electroforesis sin recurrir a su elución, de tal manera que la detección y/o determinación de éstas se realiza "in situ" después de la electroforesis.

Los principales métodos existentes para detectar la actividad de las enzimas y de las isoenzimas son los espectrofotométricos, los cuales comprenden:

iiia) Los que miden la absorción de uno de los compuestos reaccionantes en la región ultravioleta (U.V.) del espectro, y

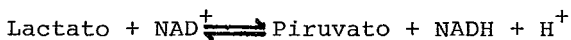
iiib) Los que se basan en la formación de un compuesto colorido que puede ser detectado en la región visible del espectro.

iiia) Un gran número de las técnicas de detección de enzimas conocidas como técnicas "UV", acoplan reacciones enzimáticas de deshidrogenasas que requieren como coenzimas cualquiera de los dos nucleótidos de piridina, el dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD) ó el dinucleótido de nicotinamida-(2'-fosfato) adenina (NADP), ya sea en sus formas oxidadas (NAD^+ y NADP^+) ó en sus formas reducidas (NADH y NADPH). La reacción general para estas deshidrogenasas es:

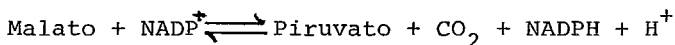


Algunos ejemplos específicos son:

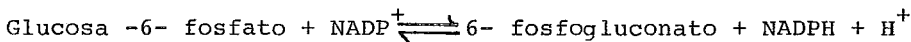
Lactato deshidrogenasa (LDH)



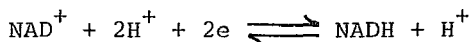
Enzima "Málica" (ME)



Glucosa -6- fosfato deshidrogenasa (G6PD)



En estas reacciones enzimáticas las coenzimas NAD - ó NADP están unidas débilmente a la deshidrogenasa y cuando se oxida un substrato, por ejemplo lactato a piruvato, ellas actúan como aceptores de electrones, de tal manera que un átomo de hidrógeno se transfiere como un ión hidruro a la porción nicotinamida de la forma oxidada de NAD⁺ (ó NADP⁺) para producir la forma reducida (NADH ó NADPH), el otro átomo de hidrógeno del substrato se libera como protón, como se ilustra en la siguiente - - reacción.



La mayoría de estas reacciones son reversibles aunque las enzimas muestran frecuentemente una mayor actividad solamente en una dirección, además hay que considerar que in vivo - existen muchos factores que pueden influir en la velocidad y dirección de una reacción. Debido a esta acción reversible es posible realizar el ensayo de deshidrogenasas en ambas direcciones y usar métodos alternativos de tinción de bandas en electroforesis de gel de almidón.

Muchas enzimas que no utilizan directamente NAD ó - NADP pueden ser ensayadas convenientemente acoplando sus reacciones con las deshidrogenasas ligadas a NAD ó NADP como se muestra en el siguiente ejemplo.

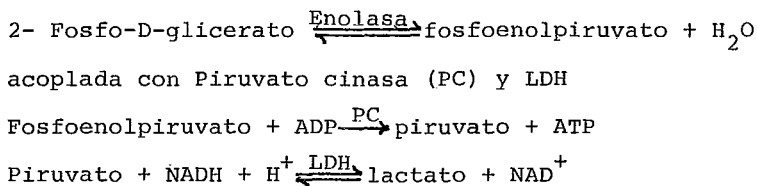
Alanina aminotransferasa (ALAT).

Alanina + 2-oxoglutarato $\xrightarrow{\text{ALAT}}$ Piruvato - glutamato

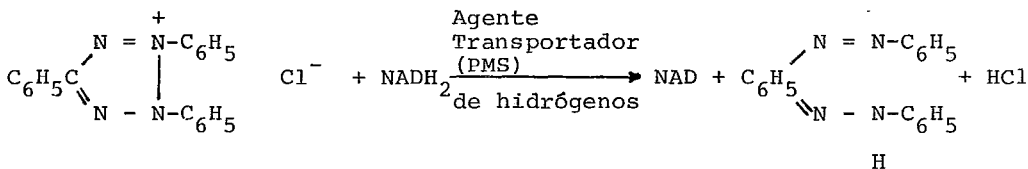
Acoplada con lactato deshidrogenasa (LDH);

Piruvato + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Lactato + NAD⁺

En algunos casos se requiere una segunda enzima acopladora que requiera la coenzima y así poder detectarla en U.V., tal es el caso de la enolasa:



iib) Las técnicas más utilizadas para la detección de las enzimas y las isoenzimas en electroforesis en gel, son - las de tinción con sales de tetrazolio debido a la facilidad que estas sales poseen para reducirse a compuestos poco solubles e - intensamente coloridos llamados formazanos.



Cloruro de 2,3,5 - trifeniltetrazolio

Trifenilformazano

Las sales de tetrazolio no reaccionan directamente - con la coenzima, sino que para que esto ocurra se requiere como in - termediario un agente transportador de electrones como el metilsul - fato de tetrazolio, que es el que más comunmente se usa, para cata - lizar la reacción. Se han sintetizado derivados más sensibles y de éstos, el bromuro de 2,5-difenil -3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-tetra - zolio (MTT) ha sido aplicado con éxito en la detección directa de

isoenzimas. Este compuesto tiene ventajas sobre otros del mismo tipo, ya que los formazanos correspondientes son más intensamente coloridos y presentan un menor grado de difusión en el gel.

Las reacciones que catalizan las isoenzimas que se estudiaron en este trabajo, así como el método de detección usado, se describen a continuación.

1.- E.C. 2.6.1.1* Glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT)

conocida también como: Aspartato aminotransferasa (ASAT).

L-Aspartato + 2-oxoglutarato $\xrightleftharpoons{\text{ASAT}}$ oxaloacetato + L-glutamato.

Acoplada con malato deshidrogenasa (MDH)

Oxaloacetato $\xrightleftharpoons{\text{MDH}}$ Malato



2.- E.C. 2.6.1.2 Glutamato piruvato transaminasa (GPT)

conocida también como: Alanina aminotransferasa (ALAT)

L-alanina + 2-oxoglutarato $\xrightleftharpoons{\text{ALAT}}$ piruvato + L-glutamato.

Acoplada con lactato deshidrogenasa (LDH)

piruvato $\xrightleftharpoons{\text{LDH}}$ lactato



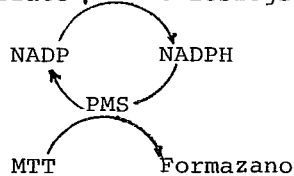
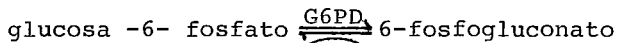
* Según nomenclatura aprobada por la IUPAC y la IUB.

3.- E.C. 5.3.1.9 Glucosa fosfato isomerasa (GPI)

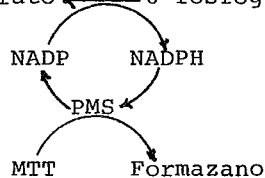
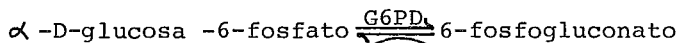
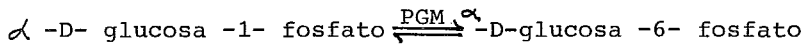
También conocida como: fosfohexosa isomerasa; fosfoglucosa isomerasa.



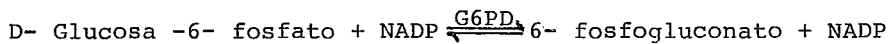
Acoplada con glucosa -6- fosfato deshidrogenasa (G6PD)

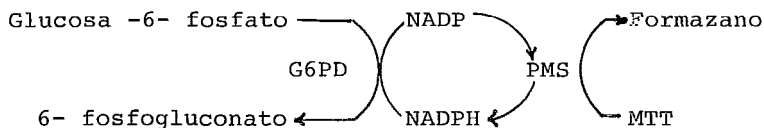


4.- E.C. 2.7.5.1. Fosfoglucomutasa (PGM)

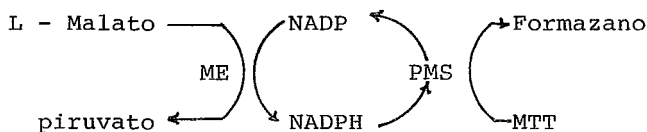
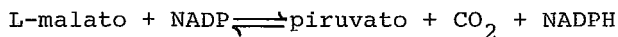


5.- E.C. 1.1.1.49 Glucosa -6- fosfato deshidrogenasa (G6PD)





6.- E.C. 1.1.1.40 L-Malato: NADP oxidorreductasa (oxaloacetato descarboxilante). Conocido también como enzima málica (ME)



e) Caracterización de tripanosomas por electroforesis de isoenzimas.

La determinación del patrón electroforético de isoenzimas, ha sido ampliamente usado como método taxonómico para varios grupos de protozoarios tales como Entamoeba (17), Paramecium (18) y Plasmodium (19). En Trypanosoma los primeros estudios fueron hechos, casi simultáneamente por Godfrey (20), con dos enzimas: aspartato-aminotransferasa (ASAT) y alanina-aminotransferasa (ALAT) y por Parr (21) con glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD), enzima málica (ME) y glucosa-fosfato-isomerasa (GPI). Ambos autores encontraron diferen

cias entre especies en lo que se refiere a número de isoenzimas, y solamente en dos casos observaron diferencias entre cepas que mostraron distintas velocidades de migración. Trabajos posteriores llevados a cabo en Leishmania (22), (23), T. brucei (24) y T. vivax (25) pusieron en evidencia la utilidad del uso de las propiedades electroforéticas de las isoenzimas para distinguir estas especies, no obstante que solamente estudiaron ALAT y ASAT.

En 1979 Miles (26) inició la caracterización de T. cruzi a través de este parámetro, eligiendo a Brasil como sede de la investigación. En este trabajo se estudiaron dos grupos de cepas correspondientes a aislados que, de acuerdo con su origen fueron llamados selváticos y domésticos. Se determinó su patrón de isoenzimas, llamado así porque utilizaron 6 enzimas; ASAT, ALAT, ME, G6PD, GPI y fosfoglucomutasa (PGM) para cada aislado, originando un perfil de movilidad electroforética más completo. En un trabajo posterior (27) se encontraron 3 tipos de patrones electroforéticos debido a las diferentes velocidades de migración de ASAT, PGM y GPI: el I correspondiente a aislados selváticos; el II correspondiente a aislados domésticos, y un patrón también de origen selvático, diferente a los anteriores, al que se denominó tipo - III.

f) Objetivos

Hasta la fecha, se han reportado 119 casos humanos de infección por T. cruzi (28) en 15 estados de la República Mexicana. Además se han encontrado 20 especies de transmisores infectados en forma natural, y varias especies pertenecientes a 3 géneros de roedores, los cuales son considerados como reservorios. Esto revela que la tripanosomiasis americana existe actualmente en nuestro país como enzootia y que existen las condiciones necesarias para su transmisión al hombre.

El objetivo de este estudio es el de caracterizar aislados mexicanos de T. cruzi provenientes de distintas regiones de México por medio del comportamiento electroforético de seis enzimas presentes en el parásito (ASAT, ALAT, ME, G6PD, PGM y GPI). Dicha caracterización puede tener una proyección relevante dentro de los estudios epidemiológicos preliminares que actualmente se realizan a través del Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste (CIES) y otras instituciones que intentan abordar desde un punto de vista integral todos los aspectos que conforman el problema, como son: seroepidemiología, clínica, transmisores, reservorios, etc. para lograr una mayor comprensión de la enfermedad de Chagas en México.

El otro punto de interés que ofrece este trabajo, se en cuenta en el aspecto taxonómico, esto es, la comparación con - cepas de T. cruzi procedentes de otro país, específicamente de Brasil.

II.- MATERIALES Y METODOS

a) Cultivo de los tripanosomas.

El crecimiento de todas las cepas de tripanosomas que se estudiaron, se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 ml con tapón de rosca conteniendo 5 ml de medio de cultivo LIT (29) y se incuban a 28°C (tabla 1).

La composición del medio LIT es la siguiente: Caldo de - Schaedler (liver infusion broth) 20g; triptosa, 5.0g; fosfato di - básico de sodio, 5.0g; cloruro de sodio, 4.0g; cloruro de pota - sio, 0.4g y dextrosa 2.0g por 1000 ml de agua. Se ajusta el pH - de la solución a 7.4 con ácido clorhídrico concentrado y se este - riliza en el autoclave a 20 lb/pul² durante 15 minutos. Los sub - cultivos se hacen cada 7 días con una concentración inicial de - 5-10 x 10⁶ células/ml. El número de tripanosomas se determinó en un contador de células (Coulter Counter modelo F) usando una so - lución de cloruro de sodio al 0.85% y formaldehído al 0.07%.

Tabla 1. Origen de los aislados mexicanos de T. cruzi

Aislado	Procedencia geográfica	Huésped
1	Zacoalco, Jalisco	<u>Triatoma barberi</u>
2	Briseño, Jalisco	Humano
3	La Cruz, Jalisco	<u>Triatoma barberi</u>
4	Guaymas, Sonora	<u>Triatoma</u> (a)
5	Cocula, Jalisco	<u>Triatoma phyllosoma</u> <u>barberi</u>
6	Tepechitlan, Zacatecas	<u>Triatoma phyllosoma</u> <u>pallidipenis</u>
7	León Brindis, Chiapas	Humano
8	Zacoalco, Jalisco	Humano
9	Miahuatlán, Oaxaca	<u>Triatoma barberi</u>
10	Yucatán (b)	Humano

a) Especie no clasificada

b) Localización geográfica no determinada

b) Cosecha.

Los tripanosomas se cosechan en la fase exponencial de crecimiento, esto es cuando alcanzan una concentración entre 40 y 50×10^6 cel./ml. se centrifuga un total aproximado de 150×10^6 células de cada aislado a 10,000 x g durante 10 min. El paquete celular se resuspende en 5 ml de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.06M, cloruro de sodio 0.043M y glucosa 0.55M y se centrifuga a 10,000 x g durante 10 min. El paquete celular se resuspende en DL-ditiotreitol 1mM, ácido epsilon amino caproico 1mM y EDTA 2mM, e inmediatamente se guarda en un ultracongelador a -70°C .

c) Preparación de los lisados.

El lisado se obtiene por descongelamiento gradual, colocando en hielo las suspensiones previamente guardadas a -70°C . Una vez descongelado (dos horas después aproximadamente) se centrifuga a 12,000 x g durante 15 minutos, se recupera el sobrenadante y se le agrega una solución de albúmina de suero bovino, de tal manera que la concentración final sea de 5%. Este material se aplica al gel.

d) Electroforesis de ASAT, ALAT, ME, G6PD, PGM y GPI.

i) Preparación de las placas para la electroforesis (30).

1. Se colocan 5.7g de almidón hidrolizado para electroforesis (Sigma Chem. Co. # 54501) en un matraz kitasato de 500 ml. y se agregan lentamente y agitando, de manera que no se formen grumos, 50 ml de la solución amortiguadora correspondiente (ver tabla 2).
2. La mezcla se calienta directamente en un mechero bunsen agitando fuertemente hasta que la viscosidad disminuya bruscamente.
3. Se coloca en la boca del matraz un tapón de hule horadado y se conecta a una bomba de vacío para evacuar el aire de la solución. Se tapa con un dedo el agujero del tapón y se agita la solución vigorosamente hasta que hierve formando burbujas grandes y queda totalmente transparente.
4. La solución de almidón se vierte rápidamente en una placa de vidrio como la que muestra en la Fig. 1. El almidón se distribuye uniformemente sobre la placa utilizando un apara

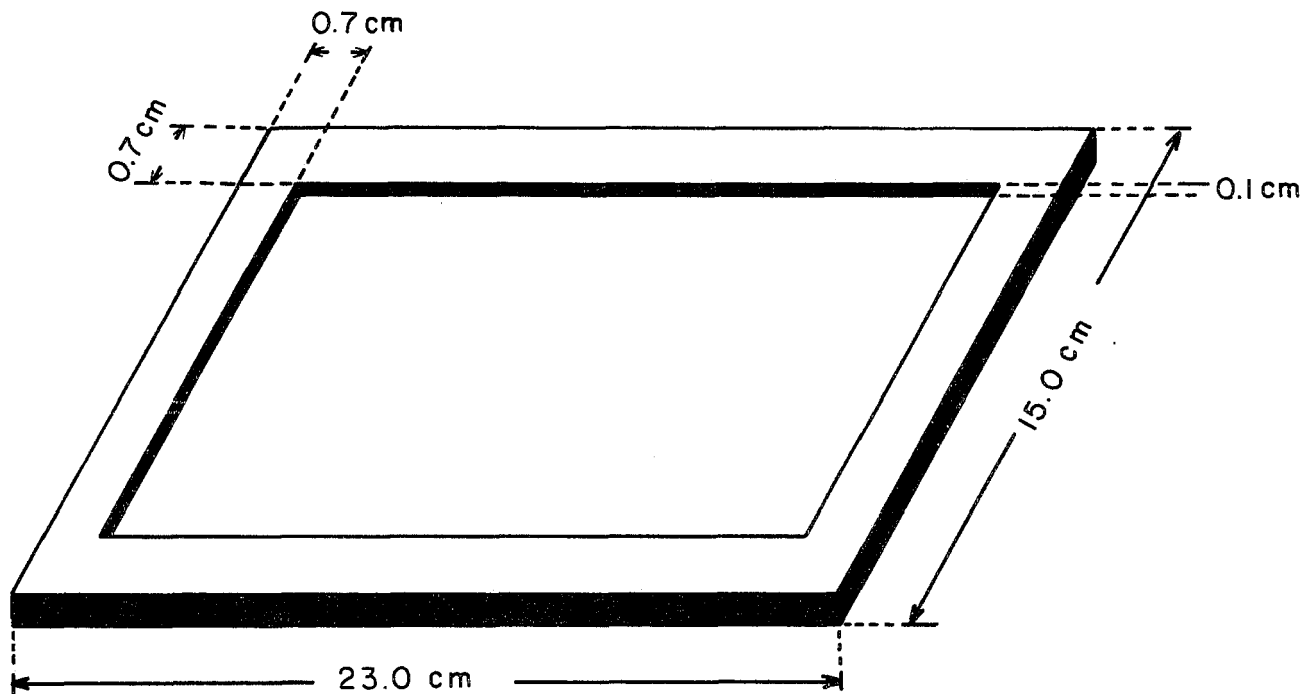


Figura 1. Detalles de la placa de vidrio usada para la electroforesis horizontal en gel de almidón.

to para hacer placas para cromatografía en capa fina.

5. El gel se cubre con una charola de plástico para evitar cualquier daño en la superficie. Después se guarda en frío hasta que el gel se forme completamente.

ii) Aplicación de las muestras.

En la parte central del gel se hacen incisiones de 0.8 cm aproximadamente, utilizando una espátula, y se marca el ánodo y el cátodo en los extremos del gel. Se empapan por capilaridad trozos de hilo de algodón de 0.6 a 0.7 cm con 5 microlitros de cada una de las muestras y se aplican con pinzas delgadas en las incisiones hechas previamente.

Una vez aplicadas las muestras, la placa se coloca horizontalmente en una cámara de electroforesis Gelman (No. de catálogo 51211). El gel de almidón se pone en contacto con la solución de la cámara por medio de tiras de papel Wathman $3\frac{M}{M}$ de 7.5 x 13.5 cm.

iii) Desarrollo de la electroforesis

Tabla 2. Condiciones para la separación de las isoenzimas por electroforesis.

Enzima	Sol. amortiguadora de la cámara.	Dilución para el gel de almidón.	Voltaje	Tiempo
ASAT	1	1:9	250v	7 hrs.
ALAT	2	1:9	100v	13 hrs.
G6PD	3	1:9	200v	9 hrs.
ME	4	3:37	150v	13 hrs.
GPI	5	3:37	150v	12 hrs.
PGM	3	1:9	150v	8 hrs.

Soluciones amortiguadoras.

Soluciones de la cámara de electroforesis:

1. Glicina 0.15M/NaOH: pH 9.5
 2. Tris^(a) 0.15M/ácido cítrico 0.0075M; pH 9.0
 3. Tris 0.1M/ácido maleico 0.1M/cloruro de magnesio 0.01M/EDTA 0.01M; pH 7.4
 4. Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.2M; pH 7.0
 5. Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.2M; pH 7.4
- (a) Tris hidroximetilaminometano.

e) Detección de la actividad enzimática (revelado de geles)

Se emplearon dos formas de revelado de geles, dependiendo de la enzima ensayada. ASAT y ALAT se detectaron in situ, a través de la fluorescencia producida por la oxidación de NADH a NAD.

i) Revelado de ASAT y ALAT.

Procedimiento

1. El sustrato y la coenzima se disuelven en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1M pH 7.4 (ver tabla 3).
2. A la solución anterior se le agrega la enzima acoplante (ver tabla 2) y se embebe en una hoja de papel filtro (13 x 22 cm.) Wathman # 1 distribuyéndola uniformemente.
3. La hoja de papel filtro empapada se coloca encima del gel evitando la formación de burbujas y se incuba durante 20 min a temperatura ambiente.
4. Se observa con una lámpara de luz ultravioleta de onda larga -

(366 nm) para visualizar la posición de las bandas.

5. Se fotografía utilizando una cámara Minolta con filtro amarillo, película blanco y negro ASA 32 y un tiempo de exposición de 60 segundos.

ii) Revelado de GPI, G6PD, PGM y ME

Estas enzimas se revelaron también in situ a través de la formación del formazano correspondiente.

1. Las soluciones usadas para revelar las enzimas se preparan como se muestra en la tabla 4.
2. A cada mezcla de soluciones se le agregan 15 ml de agarosa disuelta en agua (mantenida a + 50°C).
3. Se añaden 2 ml de MTT (2 mg/ml) y 2 ml de PMS (1 mg/ml).
4. Inmediatamente después, la mezcla se distribuye uniformemente en la placa del gel de almidón, a la cual se le había colocado un molde de las dimensiones del gel y de 3 mm de profundidad. De esta manera el gel de agarosa que contiene todos los

componentes para revelar la enzima se sobrepone al gel de almidón.

5. Se retira el molde y la placa se incuba a 37°C hasta que aparecen las bandas de color azul localizadas donde se encuentra la isoenzima.

6. El gel se fotografía colocando la placa sobre un megatoscopio con película al alto contraste ASA 18 y con un tiempo de exposición de 1/2 segundo.

TABLA 3. COMPOSICION DE LAS SOLUCIONES USADAS PARA DETECTAR
LAS ISOENZIMAS.

Enzima	Solución Amortiguadora p/revelar	Coenzima	Substrato	Mg Cl ₂	MTT	Metosulfato de Fenazina	Agarosa	Enzima Acoplante
ASAT	c	NADH 0.7mM	2-oxoglutarato 1mM Acido L. Aspártico 31.5Mn					Malato deshidro- genasa 15 u/ml
ALAT	c	NADH 0.7mM	2-oxoglutarato 1mM L-Alanina 0.225 M					Lactato deshidro- genasa ~ 15 u/ml
ME	A	NADP ⁺ 1mM	DL-Malato 3mM pH 7.0	0.01M	0.15mg/ml	0.075mg/ml	8mg/ml	
G6PD	A	NADP ⁺ 1mM	Glucosa-6- fosfato 1.3mM	0.01M	0.15mg/ml	0.075mg/ml	8mg/ml	
GPI	B	NADP ⁺ 1mM	Fructosa-6- fosfato 1.2mM	0.01M	0.15mg/ml	0.075mg/ml	8mg/ml	Glucosa-6- fosfato deshidro- genasa ~ 0.3 u/ml
PGM	A	NADP ⁺ 1mM	Glucosa-1- fosfato con glucosa 1.6 difosfato 3.5mM	0.01M	0.15mg/ml	0.075mg/ml	8mg/ml	Glucosa-6- fosfato deshidro- genasa ~ 0.3 u/ml

Soluciones amortiguadoras usadas para revelar

- A. Tris/HCl 0.1M pH 7.4
- B. Tris/HCl 0.1M pH 8.0
- C. Fosfato de sodio 0.1M pH 7.4

TABLA 4. DETECCION COLORIMETRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

ENZIMA	H ₂ O	Tris-HCl 0.6M pH 7.4	Tris-HCl 0.6M pH 8.0	C O E N Z I M A S		Mg Cl ₂ 0.1 M ²	Substratos	Enzimas Acoplantes
				NADP (10mg/ml)	ATP (5.5mg/ml)			
G6PD	5.0 ml	5.0 ml	-	1.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	G6P(A) 10mg/ml 1.0ml	-
ME	7.0 ml	5.0 ml	-	1.0 ml	-	2.0 ml	MALATO 0.1ml 1.0 ml	-
GPI	7.0 ml	-	5.0 ml	1.0 ml	-	2.0 ml	F6P(B) 10mg/ml 1.0ml	G6PD
PGM	6.0 ml	5.0 ml	-	1.0 ml	-	2.0 ml	G-1-P+G-1:6-P(C) 10mg/ml 2.0ml	G6PD

(A) Glucosa-6-Fosfato

(B) Fructosa-6-Fosfato

(C) Mezcla de Glucosa-Fosfato + Glucosa 1-6-Difosfato al 1%

III.- RESULTADOS

Las figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2E y 2F muestran las fotos de los zimogramas de cada una de las enzimas estudiadas: ASAT, ALAT, G6PD, ME y PGM en los diez aislados mexicanos de T. cruzi.

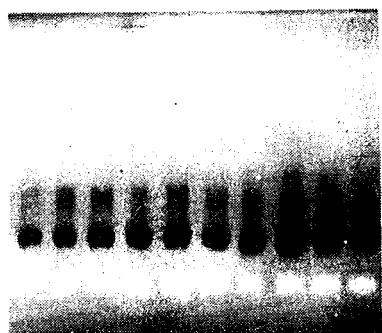
En los zimogramas correspondientes a ME, G6PD, PGM y GPI se puede observar que ninguno de los aislados muestra diferencias. Sin embargo, se puede notar una menor intensidad en las bandas correspondientes a los aislados 2, 5 y 10 de G6PD y en los aislados 2, 8 y 9 de ME.

En el caso de ALAT, se puede notar que en los aislados 1 y 4 no aparece la banda rápida que está presente en los demás, y no es porque no exista, ya que cuando se deja incubar hasta dos horas, sí se puede detectar, pero simultáneamente a la aparición de esta banda, ocurre una gran difusión de la banda lenta que impide visualizar el zimograma. Se podría pensar que las bandas rápidas de los aislados 1 y 4 no aparecen (Fig. 2B) porque están en menor cantidad que las demás, si se toma como referencia la intensidad de la banda, sin embargo, la intensidad de la

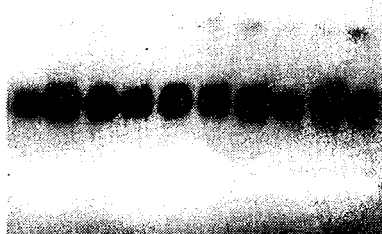
banda lenta del aislado 8 muestra una intensidad equivalente o al menos muy similar a la banda correspondiente de los aislados 1 y 4 y sí es posible observar la banda rápida. Esto sugiere que existen diferencias ya sea en la cantidad o en la actividad de la isoenzima rápida entre los aislados 1 y 4 y el 8.

En el zimograma correspondiente a ASAT se observa que los aislados del 1 al 7 y el 10 solo tienen 2 isoenzimas, mientras que el 8 y el 9 muestran una tercera isoenzima más rápida, sin embargo, si se comparan las intensidades de las bandas más lentas también se puede notar que existe una mayor cantidad de muestra en estos aislados. Esto indica que la menor cantidad de muestra en los aislados no permite detectar la isoenzima más rápida en los aislados de 1 al 7 y en el 10. Cuando se dejó incubar hasta 90 min., apareció la banda más rápida.

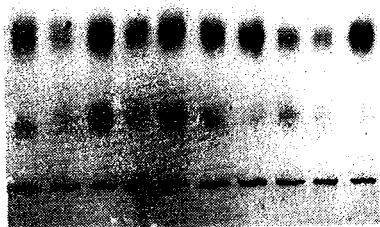
El análisis de los 6 zimogramas muestra que no existen diferencias, tanto en el número como en la movilidad electroforética, de las isoenzimas entre los 10 aislados mexicanos de T. cruzi.



2 A: ASAT



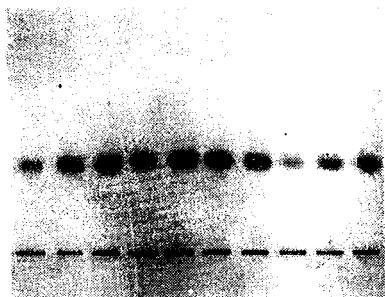
2 B: ALAT



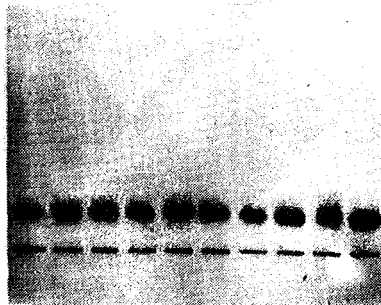
2 C: ME



2 D: G6PD



2 E: PGM



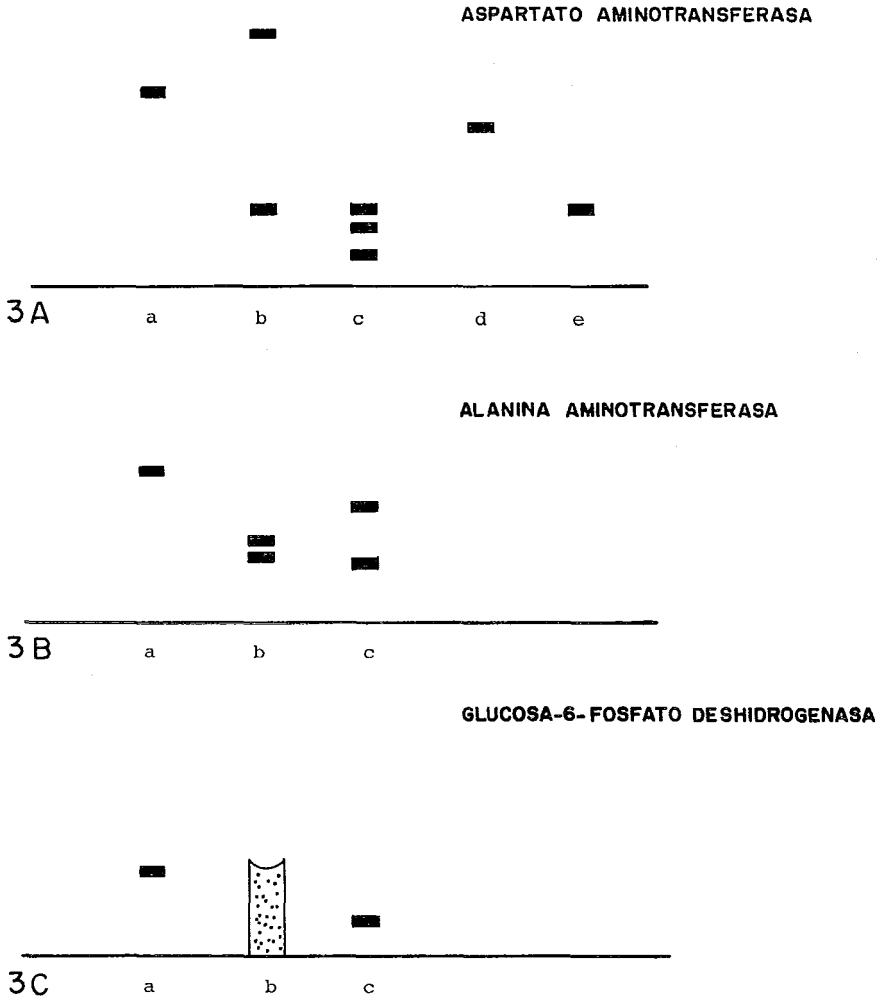
2 F: GPI

FIG. 2. Zimografía de las 6 enzimas estudiadas en los diez aislados mexicanos de *L. guthi*. Los números del 1 al 10 corresponden a los aislados caracterizados en la tabla 1.

IV.- DISCUSION

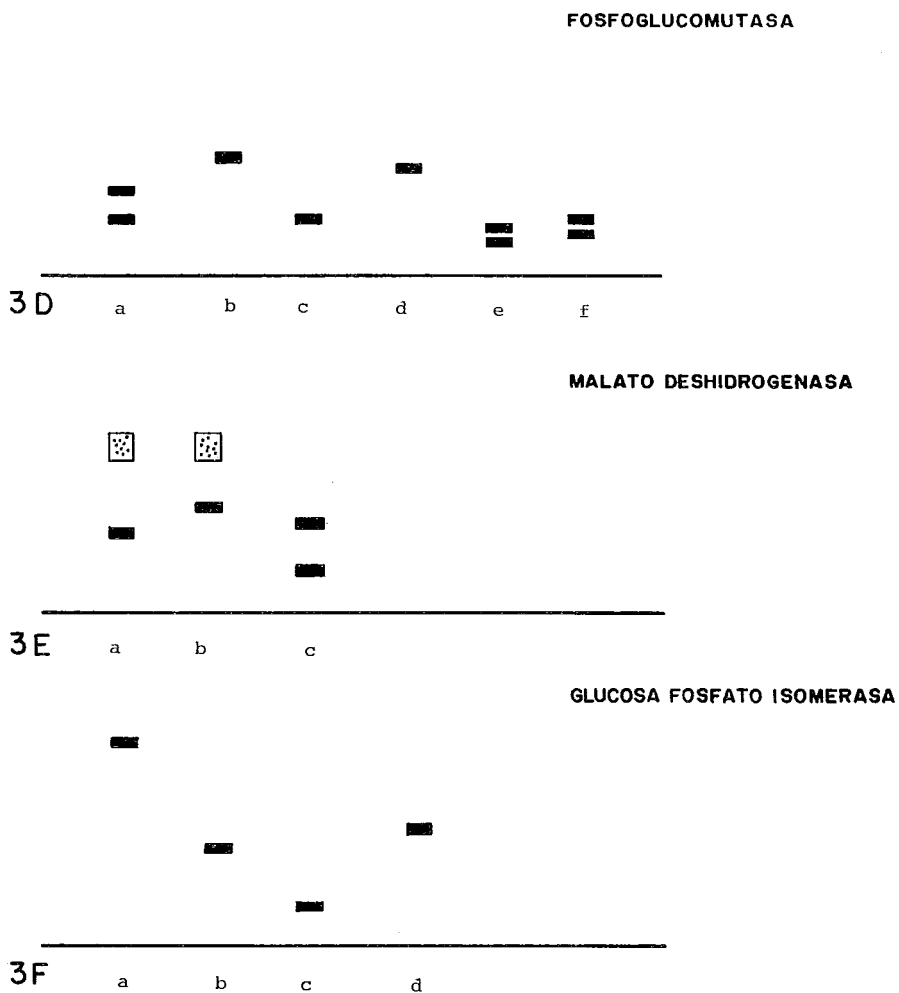
Es en cierta manera sorprendente el hecho de no encontrar diferencias significativas en los patrones isoenzimáticos obtenidos de aislados mexicanos provenientes de una zona geográfica tan amplia que comprende desde estados situados al norte del país como Sonora hasta los del sureste como Yucatán y además procedentes de distintos ciclos de desarrollo de T. cruzi, esto es, de humanos (huésped mamífero) y de triatomas (insecto vector). En otros estudios, principalmente los hechos en Brasil y usando un número relativamente grande tanto de aislados provenientes de diferentes regiones como de enzimas, si se han encontrado diferencias entre los aislados.

Es interesante hacer notar las diferencias que se observan entre los patrones de isoenzimas de aislados mexicanos y los de aislados brasileños, estas diferencias se manifiestan tanto en número de bandas como en la velocidad de migración de éstas. Las figuras 3A a 3F presentan los patrones de isoenzimas de aislados de T. cruzi de dos regiones de Brasil; (Sao Felipe, Bahía y Belem, Pará, situadas a 2500 Km de distancia) y los de aislados mexicanos. La table 5 muestra los patrones de isoenzimas agrupados según su sitio de aislamiento, en ella se observa que todos los patrones de aislados brasileños, aún los



FIGS. 3A, 3B Y 3C. COMPARACIÓN DE PATRONES ISOENZIMÁTICOS DE AISLADOS MEXICANOS Y BRASILEÑOS DE I. CRUZI

2.0 cm



FIGS. 3D, 3E Y 3F. COMPARACIÓN DE PATRONES ISOENZIMÁTICOS DE AISLADOS MEXICANOS Y BRASILEÑOS DE I. CRUZI

—|—
2.0 cm

Tabla 5. Comparación de la combinación de patrones isoenzimáticos entre aislados de T. cruzi de México y Brasil.

ISOENZIMAS	SAO FELIPE (BRASIL)					BELEM (BRASIL)				MEXICO
	SF ₁	SF ₂	SF ₃	SF ₄	SF ₅	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	
ASAT	e	a	b	a	b	e	a	b	e	c
GPI	a	a	b	a	b	b	a	b	d	c
PGM	e	a	b	a	b	f	a	b	d	c
ALAT	-	a	b	a	b	-	a	b	-	c
G6PD	-	a	b	a	b	-	a	b	-	c
ME	-	a	b	a	b	-	a	b	-	c

provenientes de una misma región, muestran diferencias, en contraste con los patrones de aislados mexicanos que son idénticos entre si, pero distintos a todos los de brasileños.

Como se mencionó anteriormente, Miles (26,27) clasificó los aislados brasileños de T. cruzi en tres grupos que son independientes del huésped y del medio de cultivo empleado para mantenerlos. Dos de estos grupos causan el cuadro agudo de la enfermedad de Chagas y el tercero provoca tanto el cuadro agudo como el crónico. Los dos primeros grupos fueron denominados selváticos, ya que los triatomas transmisores del parásito son de hábitos selváticos y el tercero fue clasificado como doméstico, pues el vector responsable es un vector de hábitos domésticos.

Recientemente, en dos especies de naegleria (31), Naegleria fowleri y Naegleria gruberi, se diferenciaron cepas patógenas y cepas no patógenas, mediante su patrón de isoenzimas, usando 7 enzimas. Este interesante hallazgo abre una importante línea de estudio, ya que permite correlacionar el patrón de isoenzimas de un organismo con su patogenicidad.

Las consideraciones anteriores alientan a la realización de un estudio epidemiológico para tener la historia lo más

completa posible del aislado, que incluya la clasificación y la localización geográfica del vector así como sus hábitos, la caracterización de los síntomas, los rasgos serológicos y electrocardiográficos etc. Esto permitiría contar con todos los factores que intervienen para poder determinar si existe o no alguna relación entre patrones de isoenzimas y patogenicidad. Ya que en este estudio no se pudieron encontrar diferencias significativas en los aislados mexicanos, una ventaja que ofrece la realización de un estudio epidemiológico, sería el poder contar con un número mucho más grande de aislados, lo cual ampliaría las posibilidades de encontrar diferencias en los patrones isoenzimáticos.

En resumen, estos datos conducen a las siguientes conclusiones:

1. Que existe una gran homogeneidad entre todos los aislados mexicanos de T. cruzi independientemente de su procedencia geográfica y de su ciclo de vida.
2. Que este conjunto de aislados mexicanos, es distinto en las seis enzimas estudiadas a todas las cepas brasileñas.
3. Que no obstante de que en cepas de Nagleria se ha visto que

las patógenas presentan un patrón isoenzimático diferente al de las no patógenas, a la fecha todavía no se ha podido observar este tipo de correlación en cepas de T. cruzi, aunque los resultados de los estudios de aislados brasileños indican una posible asociación de los diferentes patrones isoenzimáticos con el grado de patogenicidad.

V.- BIBLIOGRAFIA

1. Chagas, C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n.g., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1, 159-218 (1909).
2. Simpson, L. The kinetoplast of hemoflagellates. Int Rev Cytol 32: 139-207 (1972).
3. Brener, Z. and Chiari, E. Susceptibilidades de diferentes amostras de Trypanosoma cruzi a varios agentes quimioterápicos. Rev Inst Méd Trop Sao Paulo 9: 129-207 (1967).
4. González Cappa, S.M. and Kagan, L.G. Agar gel and immunoelectrophoretic analysis of several strains of Trypanosoma cruzi. Exp Parasitol 25: 50-57 (1969).
5. Rezende, J.F.M. De proceedings of an international symposium. Belo Horizonte Minas Gerais, Brazil 195-205 (Washington: Pan American Health Organization Scientific Publication No. 318, (1976).

6. Peters, W. Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Ciba Foundation Symposium No. 20. Elsevier Excerpta Medica North-Holland (1974).
7. Hoare, C.A. Evolutionary trends in mammalian trypanosomes. Adv Parasitol 7: 47-95 (1967).
8. Newton, B.A. and Burnett, S.K. DNA of Kinetoplastidae: A comparative study. Comparative Biochemistry of Parasites 185-198 Academic Press, N.Y., London (1972).
9. Mattei, M., Goldenberg, S. Morel, C., Azevedo, H.P. and Zoitman, I. Biochemical strains characterization of Trypanosoma cruzi by restriction endonuclease cleavage of Kinetoplast-DNA. FEBS Lett 74: 264-268, (1977).
10. Markert, C.L. and Moller, F. Multiple forms of isoenzymes: tissue ontogenetic, and species specific patterns. Proc Natl Acad Sci USA 45: 753-763 (1959).
11. Neilands, J.B. Studies on lactic dehydrogenase of heart I. purity, kinetics, and equilibria. J Biol Chem 199: 373-381 (1952).

18. Tait, A. Enzyme variations between synges in Paramecium aurelia. Biochem Genet 4: 461-470 (1970).
19. Carter, R. and McGregor, L.A. Enzyme variation in Plasmodium falciparum in the Gambia. Trans R Soc Trop Med Hyg 67: 830-837 (1973).
20. Godfrey, D.G. and Kilgour, V. Species characteristic isoenzymes of two aminotransferases in trypanosomes. Nat New Biol 244: 59-70 (1973).
21. Bagster, I.A. and Parr, G.W. Trypanosome identification by electrophoresis of soluble enzymes. Nature 244: 364-366 (1973).
22. Kilgour, V., Gardener, P.J., Godfrey, D.G. and Peters, W. Demonstration of electrophoretic variation of two aminotransferases in Leishmania. Ann Trop Med Parasitol 68: 245-246 (1974).
23. Gardener, P.J., Chance, M.L. and Peters, W. Biochemical Taxonomy of Leishmania II. Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. Ann Trop Med Parasitol 68: 317-325 (1974).

12. Neilands, J.B. The purity of crystalline lactic dehydrogenase. Science 115: 143-144, (1952).
13. Vessel, E.S. and Bearn, A.G. Localization of lactic acid dehydrogenase activity in serum fractions. Proc Soc Exp Biol Med 54: 96-99 (1957).
14. Smithies, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. Biochem J 61: 629-641 (1955).
15. Hunter, R.L. and Markert, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science, 125: 1294-1295 (1957).
16. Markert, C.L. Isozymes. Molecular structures Vol I Clement L. Markert ed. Academic Press (1975).
17. Reeves, R.E. and Bischoff, J.M. Classification of Entamoeba species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes. Parasitol 54: 594-600 (1968).

24. Godfrey, D.G. and Kilgour, V. Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of Gambian Trypanosomiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 70: 219-224 (1976).
25. Kilgour, V. and Godfrey, D.G. The persistence in the field of two characteristic isoenzyme patterns in Nigerian Trypanosome vivax. Ann Trop Med Parasitol 72: 387-389 (1977).
26. Miles, M.A., Toyé, P.J., Oswald, S.C. and Godfrey, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of Trypanosoma cruzi circulating independently in a rural area of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 71: 217-225 (1977).
27. Miles, M.A., Souza, A. Povoá, M. Shaw, J.J., Lainson, R. and Toyé, P.S. Isozymic heterogeneity of Trypanosoma cruzi in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. Nature 272: 819-821 (1978).

28. Enfermedad de Chagas en México, Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste No. 1. Serie de documentos. San Cristobal Las Casas, Chis. México (1978).
29. Camargo, R.P. Growth and differentiation in Trypanosoma cruzi and other haemoflagellates I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 6: 93-100 (1964).
30. Wraxall, B.G.D. and Culliford, B.J. A thin-layer starch gel method for enzyme typing of bloodstains. J Foren Sci Soc 8: 81-82 (1968).
31. Nerael, T.A. and Dagget, Pierre-Marc. Starch gel electrophoresis: an effective method for separation of pathogenic and nonpathogenic Naegleria strains. J Protozool 26: 613-615 (1979).