

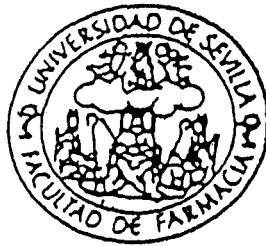
R.9818

T-519

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA



**DIFERENCIACION INTER E INTRA ESPECIFICA DE NEMATODES
PULMONARES PARASITOS DE LA GANADERIA ESPAÑOLA
MEDIANTE TECNICAS ELECTROFORETICAS**

Memoria, que para optar al grado de

Licenciatura en Farmacia, presenta:

Carlos Espina Mateos

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Espina Mateos', written over a horizontal line.

Esta Tesina ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

En Sevilla, a 10 de Octubre de 1993.

Los directores

Fdo: Prof. Dr. D.

Diego Carlos Guevara Benítez

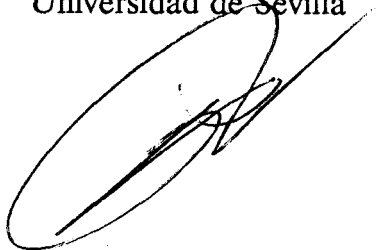
Profesor Catedrático del

Dpto. de Microbiología y

Parasitología de la

Facultad de Farmacia de la

Universidad de Sevilla



Fdo: Profra. Dra. Dña.

Cristina Cutillas Barrios

Profesora Titular del

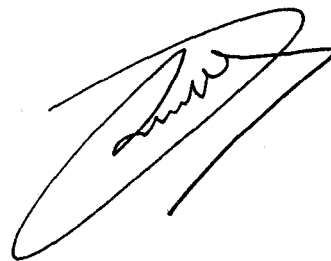
Dpto. de Microbiología y

Parasitología de la

Facultad de Farmacia de

la Universidad de

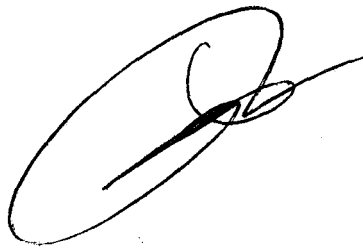
Sevilla



DIEGO CARLOS GUEVARA BENITEZ, Director del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la Tesina titulada "Diferenciación inter e intraespecífica de nematodos pulmonares parásitos de la ganadería española mediante técnicas electroforéticas" realizada por D. Carlos Espina Mateos, se ha llevado a cabo en los laboratorios del citado Departamento.

Sevilla a 10 de Octubre de mil novecientos noventa y tres.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'D' followed by a series of loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo. Diego Carlos Guevara Benítez

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer constar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que de un modo u otro han hecho posible la realización de esta Tesina.

En primer lugar a los directores de la Tesina, al Doctor Diego Carlos Guevara Benítez por su dirección, consiguiendo que este trabajo haya llegado a buen término; de igual forma agradezco a la Doctora Cristina Cutillas Barrios por su apoyo continuo y ayuda en todo momento, así como sus consejos y trato amistoso de ella recibidos.

A los Doctores José Manuel Ubeda Ontiveros y Concepción Ariza Astolfi por su apoyo y buen trato en todo momento.

A mis compañeras Pastora Arias y Paloma Germán, por la entrañable amistad y colaboración que han tenido en todo momento.

A Marta, por su amistad, ayuda y material sin el cual no hubiera sido posible este trabajo.

A Miguel Fernandez y Manuel de Rojas por la amistad que me han ofrecido.

A todo el Departamento de Bioquímica por el apoyo metódico.

A todo el Departamento de Microbiología por dejarme utilizar sus efectivos en todo momento que ha sido necesario.

A toda mi familia y amigos.



a mis padres.

INDICE

<u>I. INTRODUCCION</u>	1
I.A.- Importancia de los estudios parasitológicos en ganadería.	2
I.B.- Objetivo del trabajo.	5
<u>II. ANTECEDENTES</u>	8
II.A.- Concepto de enzima.	9
II.B.- Heterogeneidad de las enzimas.	10
II.C.- Métodos de estudios de proteínas. Electroforesis y tipos de electroforesis.	13
II.D.- Relación gen-enzima.	16
II.E.- Antecedentes de estudios isoenzimáticos en parásitos.	18
<u>III. MATERIAL Y METODOS</u>	30
III.A.- Material.	31
III.A.1.- Parásitos	31
III.A.1.a.- <i>Dictyocaulus filaria</i> .	31
III.A.1.b.- <i>Dictyocaulus viviparus</i> .	31
III.B.- Métodos: Técnicas electroforéticas.	32
III.B.1.- Estudio del perfil proteico en las distintas especies.	32
III.B.1.a.- Determinación de la concentración proteica: Método de Bradford.	33
III.B.1.b.- Preparación de extractos de las especies parásitas para el estudio del perfil proteico.	34
III.B.1.c.- Técnicas electroforéticas utilizadas para el estudio del perfil proteico de las especies parásitas.	34
III.B.1.c.1.- Preparación del gel.	35
III.B.1.c.2.- Desarrollo electroforético.	39
III.B.1.c.3.- Localización de las proteínas en el gel.	39

III.B.2.- Estudio de la actividad de la LDH y MDH en las distintas especies objeto de estudio.	40
III.B.2.a.- Estudio espectrofotométrico de la LDH. Técnica de Hertejp.	40
III.B.2.b.- Preparación de los extractos de las especies parásitas para el estudio electroforético de la LDH y MDH.	42
III.B.2.c.- Técnicas electroforéticas utilizadas para el estudio del patrón isoenzimático de la LDH y MDH en las distintas especies parásitas.	42
III.B.2.d.- Estudio del patrón isoenzimático de la LDH y MDH en geles de almidón.	45
III.B.2.d.1.- Introducción a los geles de almidón.	45
III.B.2.d.2.- Método de preparación del gel.	46
III.C. <u>TINCIONES</u>	53
III.D. <u>REACTIVOS</u>	55
<u>IV. RESULTADOS</u>	57
IV.A.- Estudio del perfil proteico en las distintas especies parásitas objeto de estudio.	58
IV.A.1.- Estudio del perfil proteico en <i>Dictyocaulus filaria</i> .	58
IV.A.2.- Estudio del perfil proteico en <i>Dictyocaulus viviparus</i> .	59
IV.B.- Estudio del patrón isoenzimático de la LDH en las especies parásitas objeto de estudio.	68
IV.B.1.- <i>Dictyocaulus filaria</i> .	68
IV.B.1.1.- Patrón isoenzimático de la LDH en <i>D. filaria</i> (Cepa española)	68
IV.B.1.2.- Patrón isoenzimático de la LDH en <i>D. filaria</i> (Cepa eslovaca).	69
IV.B.2.- <i>Dictyocaulus viviparus</i> .	70
IV.C.- Estudio del patrón isoenzimático de la MDH en las especies parásitas objeto de estudio.	79
IV.C.1.- <i>Dictyocaulus filaria</i> .	79
IV.C.2.- <i>Dictyocaulus viviparus</i> .	79

<u>V. DISCUSION</u>	86
V.A.- Discusión del perfil proteico de las especies parásitas objeto de estudio.	87
V.B.- Discusión del patrón isoenzimático de la LDH en <i>D. filaria</i> y <i>D. viviparus</i> .	89
V.C.- Discusión del patrón isoenzimático de la MDH en <i>D. filaria</i> y <i>D. viviparus</i> .	93
<u>VI. CONCLUSIONES</u>	96
<u>VII. BIBLIOGRAFIA</u>	99

INTRODUCCION

I.A.- Importancia de los estudios parasitológicos en ganadería.

Son los parasitismos uno de los factores negativos que inciden en la rentabilidad de las explotaciones ganaderas. Los brotes clínicos de fasciolosis, gastroenteritis parasitarias, dictiocaulosis, por ejemplo, con elevada morbilidad y grave mortalidad son bien conocidos por Veterinarios y ganaderos. Sin embargo, las pérdidas principales parecen debidas a infestaciones subclínicas que, sin alterar visiblemente el estado de salud dan lugar a una disminución de las producciones útiles que frecuentemente pasa desapercibida al no disponer de un término de comparación.

Precisamente por su desarrollo insidioso y por la escasa importancia que en general se da a estos procesos, no se cuenta con muchos datos concretos a la hora de hacer un estudio económico.

Por otra parte, el cifrar las pérdidas económicas es siempre una labor delicada, ya que la simple evolución de los precios modifican todos los cálculos.

Existen observaciones realizadas en experimentos de acción patógena de parásitos y, más abundante, de ensayos de antihelmínticos. En ambos casos existen testigos no infestados o no tratados, respectivamente, que permiten la comparación del crecimiento o aumento de peso, de las producciones de leche, lana y del índice de transformación de los piensos, que evidencian la influencia negativa de los parasitismos sobre estos parámetros. Son muy abundantes en la bibliografía las publicaciones de estos aspectos y no faltan tampoco las investigaciones españolas en este sentido (Tarazona, 1970 (109); Leonart, 1972 (71); Uriarte, 1982 (113) y Martínez Gómez et al., 1983 (75)) y más numerosas las relaciones con la pérdida del decomiso del matadero.

También ha habido intentos de valoración de pérdidas basados en estimaciones aproximadas de la difusión e intensidad de los parasitismos y de las pérdidas parciales que estas estimaciones podrían producir, como las de Respaldiza (1967) (96) y más recientemente las de Flores (1981)(40). Este último autor cifra las pérdidas causadas por algunas parasitosis de los rumiantes (fasciolosis, estrongilosis gastrointestinales y pulmonares) en 35.795 millones de pesetas. Este mismo autor da una serie de puntos de referencia que permiten formar criterio sobre el volumen de las pérdidas, independientemente del significado absoluto de las cifras totales que se barajen.

Aunque la mayoría de las explotaciones de ganado bovino tienen carácter intensivo, todavía, en muchos casos, se recurre al pastoreo durante largos periodos, práctica que favorece las infestaciones parasitarias.

Las tasas de mortalidad en el ganado bovino, por distintos tipos de parasitismos, se calcula en un 0.4%, lo que significa en el plano económico importantes pérdidas de:

Carne posible de estos animales.

Crías que se dejaron de producir.

Leche no producida.

Trabajo no desarrollado.

Estiércol no producido.

Según Flores (1981)(40), las pérdidas totales en el ganado bovino asciende a 13.150.000.000 de pesetas. Tradicionalmente explotada en régimen de pastoreo, aún hoy se mantiene mayoritariamente bajo este sistema, y es quizá la más afectada por los procesos parasitarios, precisamente por su sistema de vida, ya que, como se ha dicho, es el pastoreo la sistemática básica para las infestaciones parasitarias.

Las tasas de mortalidad en ganado ovino a causa de enfermedades parasitarias, se calcula en el 0,5 % del censo parasitado, acarreando estas muertes unas pérdidas derivadas del:

Valor de la carne posible de esos animales.

Valor de crías que se dejaron de producir.

Valor de la leche no producida.

Valor de la lana no producida.

Valor de estiércol no producido.

Las pérdidas totales en la especie ovina ascienden a: 11.660.000.000. pesetas.

El ganado caprino, en número reducido, se sigue explotando, al igual que la oveja, en régimen de pastoreo, y es la más indicada para padecer las parasitosis. La muerte por parasitación puede estimarse en el 0,2 % del censo parasitado, y esto conlleva consigo pérdidas en carne, cría y estiércol. Las pérdidas totales en la especie caprina ascienden a 975.000.000 pesetas.

Los mecanismos por los que los parásitos ocasionan estas pérdidas económicas están relacionados con la actividad patógena de las diferentes especies y, en algunos casos, comienzan a ser bastante bien conocidos en los estudios sobre la patogenicidad de las parasitosis.

En los últimos años ha habido un enorme desarrollo en la industria químico-farmacéutica en el sector de los fármacos antiparasitarios y su uso se ha extendido en todos los países y también en el nuestro. Sin embargo, no siempre estos medicamentos se utilizan convenientemente. En unos casos por que el ciclo biológico no se conoce en toda su extensión y en otros por que el ganadero -al menos en condiciones españolas-, piensa que ese antiparasitario actúa como una vacuna y produce un estado de resistencia que persiste en el animal durante algún tiempo, se tiene la idea errónea de que lo importante es la administración del

tratamiento, sin importar ni el momento en que se aplica al rebaño ni el manejo de los animales jóvenes en los pastos tras su aplicación. A juzgar por lo que Michel y col. (1981)(Citado por Tarazona 1985)(109) señala, este uso inadecuado de los antihelmínticos no es sólo un problema de nuestro país. En muchos casos, la administración de antihelmínticos en tales condiciones no tiene más resultado que el encarecimiento de la producción por el coste del medicamento y el de la mano de obra necesaria para su administración.

Por otra parte, en pastos que admiten una carga ganadera alta, el riesgo de que se presenten problemas parasitarios a niveles clínicos y subclínicos, ha obligado a la administración de los tratamientos con reiteración y la consecuencia ha sido la aparición de cepas de parásitos resistentes a los antihelmínticos, eliminándose la población sensible y aumentando la frecuencia y gravedad de las parasitosis. El empleo controlado de los medicamentos, su utilización en el momento más oportuno y las medidas de manejo del pastoreo adecuadas, dentro de las que deben contar, el pastoreo mixto de ovinos y bovinos, y la disposición de pastos limpios especialmente en animales jóvenes más sensibles a los parasitismos, son las orientaciones que se marcan actualmente en la explotación en pastoreo de los animales domésticos (Flores Lasarte , 1981) (40).

I.B. Objetivo del trabajo

El estudio de los parásitos de la ganadería española ha tenido y tiene un interés extraordinario por producir infestaciones en su mayoría enzoóticas y en bastantes casos en forma epizoótica, dando porcentajes que oscilan del 68 al 78%, ocasionando pérdidas cuantitativas por morbilidad, mortalidad, producción y económicas aterradoras; pero al margen de estas pérdidas hay que considerar también la predisposición y receptividad de los animales parasitados para contraer otras muchas enfermedades tanto bacterianas y rickettsianas, como parasitarias. Por

lo tanto, la importancia del estudio de estos parásitos puede plantearse bajo diversos ángulos:

- Desde el punto de vista clínico o patológico.
- Desde el punto de vista de producción o zootécnico.
- Desde el punto de vista bromatológico.
- Desde el punto de vista sanitario.

La complejidad morfológica de muchos helmintos parásitos, plantea un gran problema para la distinción entre especies. Los ciclos de vida complejos, frecuentemente, dan origen a una serie de formas larvarias y adultos distintas que complican el establecimiento de relaciones entre distintos estados de desarrollo entre las especies.

Hasta hace muy pocos años, el estudio taxonómico de los nematodes se ha basado en diferencias fenotípicas, más o menos constantes, entre las distintas especies. Así, la taxonomía, tradicionalmente, se ha basado en consideraciones morfológicas externas de los individuos como base para su clasificación. No obstante, las características morfológicas externas se encuentran sometidas a cambios de muy distinta índole que haría, en algunos casos, difícil la diferenciación de especies alejadas entre sí y cuyos rasgos fenotípicos son, aparentemente, iguales.

Así, el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones parásitas representaría un paso significativo para fijar la continuidad taxonómica entre distintos estadios dentro de los ciclos de vida, tan bien como entre parásitos similares que infestan varios hospedadores.

El estudio genético de *D. filaria* y *D. viviparus* ha sido llevado a cabo mediante técnicas citogenéticas (Cutillas y col., 1985 (29)); no obstante, el estudio genético mediante técnicas electroforéticas de estas dos especies, no ha sido abarcado hasta el momento.

Por todo lo anteriormente dicho, el primer y más inmediato objetivo de la presente Tesina ha sido la utilización de técnicas electroforéticas para el estudio del perfil proteico en las especies parásitas objeto de estudio como una nueva técnica de estudio taxonómico no sólo entre especies distintas de nematodes (pertenecientes al mismo género) sino también, en los casos en que nos ha sido posible, entre cepas de distintas zonas geográficas de la misma especie parásita.

Asimismo, se ha llevado a cabo, un estudio de la relación gen-enzima, valorando el patrón isoenzimático de la LDH y MDH observado en **D.filaria** (procedente de ganado ovino y caprino de España y Eslovaquia) y **D.viviparus** recolectados a partir de ganado bovino de Eslovaquia.

Una vez obtenido un zimograma característico, queremos determinar cuantos genes cromosómicos, o cuantos loci, son responsables del patrón electroforético observado y como este patrón puede ser explicado en términos de genotipos individuales.

Esta falta de información a nivel isoenzimático de estas dos especies, así como la necesidad y conveniencia de prestar atención a los procesos parasitarios de nuestra ganadería, tan olvidados y en no pocos casos infravalorados, pero que realmente representan un importante capítulo negativo en el balance económico de una explotación, intenta justificar la realización de esta Tesina que viene a significar el comienzo, o los primeros pasos, de un estudio más profundo a realizar en un futuro próximo.

ANTECEDENTES

II.A. Concepto de enzima.

Los enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Se encuentran entre las más notables biomoléculas conocidas, debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico, que es mayor que el de los catalizadores hechos por el hombre (Lehninger, 1979)(65).

El nombre de enzima no se empleó hasta 1977, pero mucho antes ya se sospechaba que ciertos catalizadores biológicos intervenían en la fermentación del azúcar para la obtención del alcohol (de ahí el nombre inicial de fermento). La primera teoría general sobre la catálisis química, publicada por Berzelius en 1835 (citado en Lehninger, 1979)(65), se realizó sobre la diastasa de la malta.

Aunque Luis Pasteur reconoció que la fermentación es catalizada por enzimas, postuló, en 1860, que éstos se hallaban ligados de modo inexplicable con la estructura y la vida de las células de la levadura. Constituyó, por ello un logro importante en la historia de la investigación enzimática, que en 1897, (citado por Lehninger, 1979), Büchner consiguiera extraer de las células de la levadura los enzimas que catalizaran la fermentación alcohólica. Este hecho demostraba claramente que estos importantes enzimas, que catalizan una ruta metabólica principal productora de energía, pueden actuar independientemente de la estructura celular (Citado por Lehninger)(65).

Hasta muchos años después, sin embargo no fue aislado, por primera vez, un enzima en forma cristalina. Fue Sumner quien lo consiguió, en 1926(citado por Lehninger, 1979) (65), con la ureasa aislada de los extractos de la alubia *Cannavalia zeyformis*. Sumner, también demostró que los cristales se hallaban constituidos por proteínas y llegó a la conclusión, contraria a la prevalencia por aquel entonces, que los enzimas son proteínas.

Sus puntos de vista no fueron aceptados inmediatamente, y hasta el período comprendido entre 1930 y 1936, durante el cual Northoop aisló la pepsina cristalizada, y la quimiotripsina, no quedó bien establecida la naturaleza de los enzimas. En la actualidad se han identificado cerca de 2000 enzimas diferentes. Muchos de ellos se han aislado en forma pura y homogénea y alrededor de unos 200 se han podido cristalizar. Aunque se han identificado la mayor parte de los enzimas relacionados con el metabolismo básico de la célula, quedan por resolver muchos problemas importantes, entre ellos el control genético de la síntesis enzimática, los mecanismos moleculares mediante los cuales se regulan la actividad enzimática y el papel de las formas múltiples de algunos enzimas en el desarrollo y en la diferenciación (Lehninger 1979) (65).

II.B. Heterogeneidad de las enzimas.

Aunque puede haber ligeras diferencias físicas en un enzima determinado cuando es producido por diferentes células, estas circunstancias suelen ser poco importantes y el enzima continúa siendo el mismo, en esencia. En efecto, lo normal en enzimología desde el punto de vista práctico, es que el origen de un enzima sea generalmente, un asunto un tanto secundario. Para el enzimólogo, el origen de un enzima podrá merecer poca consideración, pero para el bioquímico clínico es de importancia primordial (King 1968) (58).

Es difícil encontrar identidad molecular o enzimática entre las enzimas funcionales similares pero procedentes de distintas especies, por tanto, se deduce que deben existir numerosas proteínas con funciones biológicas muy parecidas. Aunque la existencia de enzimas funcionalmente similares, pero distinguibles entre sí, había sido aceptada provisionalmente. Este fenómeno no fue reconocido universalmente hasta la demostración, por Wieland y Pfeiderer (1957) (123), de la presencia, en un mismo tejido, de varias lactodeshidrogenasas separables físicamente.

Por medio de electroforesis de almidón, Vesell y Bearn (1957)(117), 1958(118)) consiguieron la separación en tres componentes cada una, de las lactato-deshidrogenasas séricas humanas y Sayre y Hill (1957)(103) y Hill (1958)(50) demostraron también la heterogeneidad de la lactato-deshidrogenasa sérica humana, usando electroforesis en papel con flujo continuo y elución con un gradiente constante de sulfato amónico, procedimientos gracias a los cuales consiguieron separar cuatro fracciones. Estos estudios señalan la posible existencia de formas orgánicas específicas de dichas enzimas, presentes por doquier.

Debido a que tales formas podrían ser de la mayor importancia diagnóstica, esta posibilidad dió un considerable impulso a nuevas investigaciones. Se sabe actualmente que los tejidos humanos contienen cinco proteínas que manifiestan actividad lactato-deshidrogenasa; aunque ninguna de ellas es específica de un determinado órgano, las concentraciones relativas de estas formas varían de un órgano a otro y dan lugar a una regla órgano-específica con potencialidad diagnóstica.

Desde entonces, muchos de los trabajos realizados se han concentrado en el fraccionamiento de la lactato-deshidrogenasa sérica, pero el principio de la enzimo-electroforesis, es decir, la separación y localización de enzimas por procedimientos electroforéticos y la interpretación de los consiguientes zimogramas han sido ampliados a otros enzimas séricos (King , 1968) (58).

Wieland y Pflieger (1957)(123) han sugerido el nombre de heteroenzima para las proteínas de diferente origen y que ejerzan la misma acción biológica, pero difieran en sus propiedades físicas, químicas o bioquímicas y que el nombre de isoenzima o forma múltiple, sea dado a los enzimas del mismo origen con propiedades muy similares pero distinguibles.

Market y Möller (1959)(72) propusieron el nombre de isoenzima para las

diversas formas moleculares en que puede presentarse las proteínas con la misma especificidad, pero estos investigadores señalaron que todos los isoenzimas de la LDH eran semejantes en la eficiencia catalítica relativa que presentan para estos diferentes sustratos.

Webb (1960)(122) indicó, además, que la distinción fundamental entre aquellos que son reconocidos como enzimas e isoenzimas diferentes (Wroblewski y Gregory, 1960)(124) podría radicar en que los primeros son sintetizados bajo el control de genes diferentes, en tanto que los isoenzimas serían modificaciones del producto de un sólo gen. Sin embargo, en nuestro estado actual de conocimientos no tiene repercusión práctica ni esta definición ni la dada por Augustinsson (1961)(12), quien sugiere que el término isoenzima o isozima sea reservado para los enzimas cuya estructura molecular difiera sólo en aquellas partes de la molécula que no estén implicadas directamente en la reacción enzimática.

La aspartato-transaminasa (Boyd 1961)(18) y la malato-deshidrogenasa (Thorne 1960)(111) procedentes de extractos de tejidos simples, han sido separadas en dos componentes cada una por medio de procedimientos electroforéticos. Una de las formas de cada enzima está localizada en las mitocondrias celulares y probablemente se halla ligada a un componente lipóide, pero estos enzimas mitocondriales manifiestan también diferencias en el comportamiento cinético comparativamente con las formas solubles citoplasmáticas. Webb (1960)(122) cree que tales especies enzimáticas pueden ser, razonablemente, consideradas como enzimas diferentes.

La Comisión de Nomenclatura Bioquímica exigió en 1971 que además de diferenciarse las proteínas que catalizan la misma reacción, por la carga eléctrica, las constantes cinéticas, el pH óptimo, la termoestabilidad o incluso la acción sobre un sustrato secundario, debían ser determinadas genéticamente, de esta forma se excluía las variantes o alelos y las modificaciones post-sintéticas.

Sin embargo, los términos de formas multimoleculares, formas múltiples, isoenzimas, isozimas, han sido empleados sin reglas precisas. Según las últimas recomendaciones de la Unión Internacional de Bioquímica en 1978, el término de isoenzima se emplea para designar las formas múltiples que tienen por origen una modificación del genoma y que no pueden concernir a las modificaciones diversas introducidas después de la síntesis de la molécula proteica.

Cuando la acción de dos o más loci son detectados mediante tinciones enzimáticas, cada uno de los genes involucrados corresponden a diferentes enzimas, pero todos los enzimas tienen la misma función. Juntas constituyen un sistema enzimático, el cual es revelado por el mismo protocolo, por ejemplo el sistema lactato deshidrogenasa está constituido por una serie de enzimas puestas de manifiesto mediante tinciones: LDH1, LDH2, LDH3 ... etc. Para la Comisión Enzimática cada sistema enzimático es sólo un enzima, teniendo en cuenta su actividad fisiológica. Para los genéticos, sin embargo, cada sistema es más una categoría de enzimas que un simple enzima (Pasteur y col. 1988)(88).

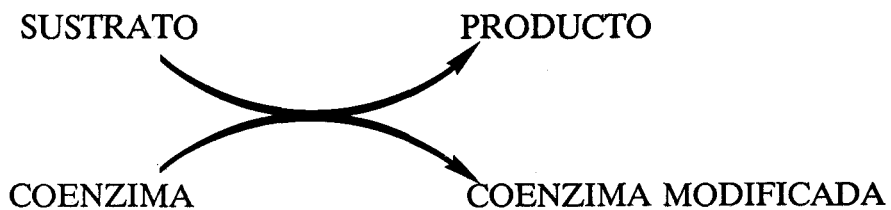
II.C. Métodos de estudios de proteínas. Electroforesis y tipos de electroforesis.

Las técnicas electroforéticas fueron usadas por primera vez por Tiselius (1937) (Citado por Fondevila 1978)(41), para distinguir la fracción múltiple de proteínas del suero, migrando a través de una solución bajo la influencia de una corriente eléctrica.

Durante los 25 años siguientes los avances en métodos electroforéticos y conocimientos se centraron en tres frentes:

- Mejoramiento del medio de soporte, incluyendo el desarrollo de geles de empaque (Smithies 1955)(106).
- Aplicación de métodos de tinción histoquímica (Hunter y Market 1957)(54), los cuales permitieron analizar las variaciones electroforéticas en proteínas enzimáticas.

Muchas proteínas catalizan reacciones enzimáticas; cuando se ponen en contacto con el sustrato, en presencia de las diversas sustancias necesarias para su actividad (coenzimas, iones, etc), transforman el sustrato de acuerdo a la reacción general:



Si uno de los componentes de la reacción enzimática es coloreado o puede teñirse, puede determinarse la posición a la que la proteína migra. En esto se basan las técnicas de tinción para detectar la actividad enzimática de una proteína.

-Demostración que muchas de las variaciones eran mendelianas.

Ya a mediados de 1960 las técnicas electroforéticas estaban suficientemente refinadas para permitir examinar un gran número de proteínas en **Drosophila** (Hubby 1963(51), Hubby y Throcknorton 1965(52), Hubby y Lewontin 1966(53), Jhonson y col. 1966(57), Harris 1966(48)). Estos estudios multiloci fueron el inicio de un nuevo y prolifero método de análisis de niveles de variación genética y estructura de poblaciones.

Las primeras electroforesis de proteínas solubles se llevaron a cabo en un medio líquido en los años posteriores a la segunda Guerra Mundial. Las proteínas eran identificadas por su absorción de luz diferencial. La introducción de medios rígidos y porosos a partir de 1950, primero el papel y posteriormente acetato de celulosa, agarosa, almidón y poliacrilamida, han hecho que el método de electroforesis sea mucho más fácil. El papel y el acetato de celulosa son medios de soporte relativamente inertes y que se utilizan principalmente para minimizar la convección, y por tanto, la separación de proteínas en estos medios de soporte

se basa principalmente en la densidad de la carga de las proteínas al pH elegido.

Por el contrario, en los geles no sólo se previene la convección y se minimiza la difusión sino que, en algunos casos, también participan activamente en el proceso de separación, interaccionando con las moléculas migratorias. Estos geles pueden ser considerados como medios porosos, en los cuales, el tamaño de poro está relacionado con el tamaño de las moléculas proteicas, de forma que se produce un efecto de tamiz molecular y la separación depende tanto de la densidad de carga como del tamaño.

Los primeros trabajos de electroforesis de proteínas en gel se hicieron en almidón. Posteriormente este medio de soporte fue sustituido por el gel de poliacrilamida, teniendo en cuenta que éstos son altamente reproducibles y las condiciones de polimerización están estandarizadas, ya que al ser un polímero sintético de un monómero de acrilamida, puede ser preparado de forma reproducible a partir de reactivos altamente purificados, mientras que en los geles de almidón el éxito de la electroforesis depende en gran parte de la calidad del almidón utilizado, ya que éste se prepara a partir de un producto biológico que puede contener contaminantes y por lo tanto afectar a los resultados obtenidos.

No obstante, Pasteur y col. (1988)(87) se muestran más partidarios del uso de geles de almidón para el estudio de isoenzimas, utilizando geles de poliacrilamida sólo para la detección de amilasas. Las razones dadas para esta preferencia se basan en las siguientes consideraciones: el gel de almidón es más fácil de usar, ya que puede cortarse el mismo gel en trozos pequeños y revelarse de esta forma distintos sistemas enzimáticos, (ahorrando así tiempo y dinero); su uso, además, no envuelve ningún aparato complejo, todo el equipo necesario puede encontrarse en el laboratorio. Es más, a diferencia de la acrilamida, el almidón no es tóxico. Por último, los resultados obtenidos con geles de almidón son tan buenos, con frecuencia incluso mejores, que los obtenidos con acrilamida.

Actualmente la electroforesis de proteínas es la única técnica que nos permite estudiar simultáneamente algunos genes en el mismo individuo de forma rápida y relativamente barata. A priori, se podría considerar que estos genes son una muestra al azar del genoma estructural del organismo; la detección depende solamente de la adaptación de los métodos y, a veces, del coste. Las técnicas electroforéticas (tanto en geles de almidón, como en acrilamida) nos permiten procesar a la vez entre 20 y 30 individuos y por lo tanto estudiar de forma comparativa las diferencias inter o intraespecíficas.

II.D. Relación gen-enzima.

El soporte físico del material genético son los ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (ADN) en la mayoría de los seres vivos y ácido ribonucleico (ARN) en algunos virus. Un gen es una parte de ácido nucleico que determina, a través de un proceso complejo, el orden de los aminoácidos en la síntesis de las cadenas polipeptídicas, las cuales constituyen las proteínas. Los genes pueden dirigir también la síntesis de ARN que interviene directamente en el metabolismo celular. La función de las proteínas es básica, no sólo por que constituye un importante material estructural de los seres vivos, sino, sobretudo, porque ciertas moléculas proteicas, los enzimas, permiten que lleven a cabo las reacciones metabólicas (Lehninger 1979)(65).

Para un genético, el estudio de las proteínas representa la posibilidad de estudiar funciones sencillas determinadas directamente por uno o pocos genes. De este modo, la relación entre fenotipo (proteína) y genotipo (gen) se hace más clara. Para un genético de poblaciones, el estudio de la variabilidad proteica representa, además, la posibilidad de cuantificar la variabilidad o no del locus a estudiar (Fondevila 1978)(41).

La estructura genética de una población es un conocimiento básico para

entender el mecanismo evolutivo, por esta razón la posibilidad de separar las distintos variantes de un mismo enzima (isoenzima) mediante técnicas físicas, abrió a la genética evolutiva nuevas posibilidades de estudio.

Las técnicas de estudios de proteínas, permiten distinguir no sólo los distintos isoenzimas producto de loci diferentes, sino también reconocer las isoenzimas determinados por alelos de un mismo locus (alozimas o aloenzimas). Mediante el estudio estadístico de las frecuencias con que aparecen las bandas alozímicas en una población se puede hacer un recuento de la heterocigosis media para un conjunto representativo de loci alozímicos (Fondevila 1978)(41).

La genética molecular ha descifrado que las mutaciones genéticas determinan cambios estructurales en el ARN, que se traducen en cambios proteicos. Muchos de estos cambios consisten en sustituciones de un aminoácido por otro. Por ejemplo, el mutante que produce la anemia falciforme en el hombre provoca en la hemoglobina la sustitución del ácido glutámico por la valina.

Las mutaciones que provocan sustituciones de aminoácidos se producen continuamente en la evolución de los seres vivos y muchas consiguen fijarse en homocigosis.

Algunas de estas sustituciones producen cambios en la carga superficial de las proteínas que se detecta mediante las técnicas de electroforesis. Si estudiamos la secuencia de aminoácidos de una misma proteína en distintos organismos encontraremos distinto número de sustituciones. Es lógico que cuanto más alejadas evolutivamente estén dos especies, mayor número de aminoácidos diferentes contendrá la misma proteína en ambas. Utilizando estas diferencias moleculares se pueden construir árboles filogenéticos (Fondevila 1978)(41).

La electroforesis ha sido utilizada por los genéticos desde el año 1957, en el

que Hunter y col.(54) tuvieron la idea de utilizar las propiedades catalíticas de los enzimas para revelar su presencia con métodos histoquímicos (electroforesis de zona). De esta forma, es posible identificar unas pocas moléculas con actividad catalítica a partir de un extracto sin purificar, conteniendo miles de proteínas diferentes. Tales sustancias se conocen como isoenzimas. En cada organismo, el número de isoenzimas con actividad catalítica dada, es generalmente muy pequeño, de forma que en el gel solamente aparecen unas pocas bandas coloreadas. Cada una de estas bandas corresponde a una proteína diferente, cuya síntesis está controlada por 1, 2 o más genes. Los fenotipos enzimáticos observados en los geles pueden, por lo tanto, ser interpretados en términos de genotipo, o lo que es lo mismo, en términos de genes y sus alelos.

Los genes que codifican proteínas tienen dos propiedades básicas que los hace un material de elección para los genéticos. La primera de ellas es que una importante proporción de estos genes son polimórficos, de manera que existen en la forma de uno o más alelos. Esta propiedad que fue descrita por Hubby y Lewontin en 1966(53) en *Drosophila* y por Harris en 1966(48) en el hombre, se ha encontrado presente prácticamente en todas las especies animales y vegetales que se han estudiado (Pasteur, 1974(87), Tanskey y Orton, 1983(108)).

La segunda propiedad es que los alelos de los genes que codifican proteínas son generalmente codominantes, es decir que ambos alelos se expresan en los organismos heterocigóticos. Este fenómeno permite relacionar los fenotipos observados con un determinado genotipo.

II.E. Antecedentes de estudios isoenzimáticos en parásitos.

Las técnicas usadas en los estudios de los últimos años para medir diferencias genéticas entre especies son la secuenciación de aminoácidos de una proteína,

fijación del complemento, hibridación DNA-DNA y DNA-RNA y electroforesis en gel (Lehninger 1979(65), Pasteur y col 1988(88)).

Esta última técnica realizada con geles de poliacrilamida se ha popularizado como método taxonómico tanto de nematodos como de otros helmintos parásitos de animales, debido a su extremada sensibilidad, fácil manejo, rapidez y reproductividad (Agatsuma y Takeuch, 1976)(6).

El estudio electroforético de la variación de proteínas en poblaciones inició una nueva era con la comprensión de las bases genéticas de los procesos de especiación (Fondevila 1978(41), Freeman 1982(42)).

Realizando electroforesis de distintos individuos para enzimas específicos y estudiando sus migraciones, podemos observar y deducir si son codificadas por el mismo gen y si existen diferentes alelos en el gen que codifican esa proteína.

Los estudios electroforéticos de sistemas gen-enzima han hecho posible:

- a) analizar los patrones de variación genética en poblaciones naturales y comprobarlos en diferentes biotopos, subespecies o especies en conexión con su ecología, sus modos de reproducción, su variación morfológica y cromosómica, su historia evolutiva, etc.
- b) estimar el incremento de divergencia genética entre poblaciones uniespecíficas y/o heteroespecíficas,
- c) evaluar por medio de métodos alternativos relaciones filogenéticas y tiempo de divergencia,
- d) investigar genes e hibridación natural entre poblaciones y especies evaluando sus consecuencias evolutivas,
- e) analizar la tendencia genética y los fenómenos de selección natural, etc.

Todo esto es particularmente provechoso en el estudio de parásitos y vectores (Ayala 1972)(13).

La técnica electroforética de estudios de enzimas se ha utilizado recientemente para detectar variaciones genéticas en muchas especies de parásitos (revisado en Tait, 1985(107); Bryant y Flockhart, 1986(20); Nadler, 1987(78); Thompson, 1988(110)).

Muchos de estos estudios, particularmente aquéllos relacionados con helmintos parásitos, se han referido más a la diferenciación de especies descritas o cepas, que a la investigación de la estructura genética.

La electroforesis multilocal, hasta el momento, es uno de los métodos más eficaces para la medida de la variación genética, dentro y entre las poblaciones de una especie. La principal ventaja de esta técnica es su capacidad para detectar la variación de un gran número de loci en uno solo aislado. La principal desventaja es su incapacidad para detectar cualquier sustitución de cualquier nucleótido que no altere la carga neta del producto polipeptídico de un gen estructural.

Los estudios electroforéticos son pocos, pero muchas especies de helmintos endoparásitos que han sido examinados mantienen niveles de polimorfismo y heterozigosidad dentro de las poblaciones comparables a aquellas de organismos de vida libre (Nadler, 1987)(78).

El uso de métodos bioquímicos para el análisis de relaciones genéticas entre taxones morfológicamente similares está bien aceptado en sistemática (Oxford & Rollinson, 1983)(86). Una de las aproximaciones útiles es el análisis de alozimas, principalmente para la detección de especies parásitas humanas, que están presentes en muchos grupos de animales incluyendo los helmintos (Bullini, 1985(22); Nascetti y col., 1986(81)).

Las primeras experiencias que tenemos registradas sobre electroforesis en parásitos, son las realizadas por Bursey y col. en 1960 (23). Estos autores

analizaron las proteínas totales de diferentes especies del género *Taenia*, mediante geles electroforéticos de poliacrilamida, encontrando marcadas diferencias en el patrón de bandas de *Taenia taeniformis*, *Taenia macrocystis* y *Taenia pisciformis*.

En 1.964, Rhodes y col. (97), estudiaron el patrón isoenzimático de la Mállico deshidrogenasa observando 3 isoenzimas en extractos procedentes de *Ascaris suum*. Este mismo enzima, junto con la láctico deshidrogenasa, fueron investigadas por Conde del Pino y col. en 1.966 (26) en *Schistosoma mansoni*. En machos, hembras y cercarias, encontraron 2 isoenzimas de MDH y sólo una banda de actividad LDH, se detectó en machos y hembras, pero no en cercarias.

Estudios electroforéticos en almidón, revelaron que la MDH de *Ascaris suum* está compuesta por 2 subunidades separadas genéticamente. Estos resultados los obtuvieron Zee y Zinkhan en 1.968 (128), quienes al encontrar 3 bandas anódicas y 1 banda catódica, postularon la naturaleza dimérica de este enzima en esta especie parásita. Zee y col. en 1.970 (129), confirman sus hipótesis. La MDH, de *Ascaris suum* se encuentra bajo el control de 2 loci separados genéticamente: MDH₁ y MDH₂.

Coles, también en 1.970 (25), realiza una comparación de algunos isoenzimas de *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma haematobium*. Las pruebas electroforéticas se realizaron para fosfatasa ácida, esterasa no específica, leucin-amino-peptidasa, lactasa, malato deshidrogenasa, &-glutamato deshidrogenasa. Los patrones fueron comparados entre sexos, adultos, cercarias y entre especies; encontrando diferencias entre sexos y especies.

Diferentes proteínas se pusieron de manifiesto por focalización isoelectrica en geles de poliacrilamida en 4 especies de *Diphyllbothrium*. Los patrones proteicos difirieron en número, posición y densidad relativa de las fracciones separadas. Estos trabajos realizados por Bylund y Djupsund en 1.977 (24),

mostraron que la sensibilidad de los métodos quimiotaxonómicos puede ser usada para ayudar a la caracterización y delimitación de especies.

Vrijenhoek 1.975 (119), encontró mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, isoenzimas adicionales, analizando tejidos de ojos de peces (*Poeciliopsis lucida*) infestados con metacercarias de *Neascus sp.*. Exámenes histoquímicos posteriores revelaron que los isoenzimas adicionales eran contribuciones del parásito. Este mismo autor en 1.978 (121), estudiando electroforéticamente los enzimas producidos por 11 genes, estableció la existencia de 2 semiespecies del género *Contracaecum* parásito de peces (*Poeciliopsis sp.* y *Cichlasoma baenil*).

Bullini y col. 1.979 (21), utilizaron 27 loci enzimáticos de *Parascaris univalens* y *Parascaris equorum*; los resultados electroforéticos indicaron que estas especies son el producto de un, muy creciente, proceso de especiación el cual ha afectado en gran parte al genoma.

Extractos de quistes hidatídicos recolectados de camellos, caballos, osos y ovejas, fueron comparados electroforéticamente para la glucosa fosfato isomerasa, por Le Riche y Sewell en 1.978 (64) apareciendo diferencias en los patrones isoenzimáticos de quistes de *Echinococcus granulosus*, procedentes de camellos y ovejas.

Nerad y Daggett en 1.979 (83), utilizaron los resultados de la electroforesis isoenzimática de 7 enzimas, para comparar 24 cepas de *Naegleria fowleri* y 6 de *Naegleria gruberi*.

Ese mismo año, 1.979, Cordeiro y Gazzinelli (27), estudiaron las proteínas totales del tegumento de *Schistosoma mansoni* estimando sus pesos moleculares por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida.

Estatus taxonómicos y diferenciaciones genéticas de *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum* fueron investigados por Nascetti y col. 1.979 (79), por métodos electroforéticos, realizando un seguimiento de loci enzimáticos. Los resultados mostraron que *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum* son especies bien diferenciadas con una distancia genética de 0.315. Esto indica un relativo proceso de especiación de aproximadamente 1.6 millones de años.

Estudios similares se realizaron en *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, en 1.981 por el grupo de Nascetti(79), calculando la distancia genética de estas especies en 1.145.

Agatsuma, (1.981) (1), encontró diferencias en la movilidad electroforética de la fosfoglucomutasa en diferentes estadios larvarios de *Anisakis spp*, pudiéndose utilizar por tanto, dicho enzima para la identificación de formas inmaduras de *Anisakis spp*.

También en 1.981 (2), Agatsuma demuestra electroforéticamente el polimorfismo de la glucosa fosfato isomerasa en poblaciones de *Paragonimus miyazakkii* y junto con Suzuki (5), compara el patrón isoenzimático de *Paragonimus ohirai* y *Paragonimus miyazakkii*.

Fletcher y col., 1.981 (37), analizaron cepas de adultos de *Schistosoma mansoni* de alta o baja infectividad a cepas de caracoles, que actúan como hospedadores intermediarios (*Biomphalaria glabrata*). Diferentes extractos fueron sometidos a electroforesis enzimática con marcadores asociados con genes para la infectividad de caracoles.

El análisis alozímico como método de estudio de la composición genética de *Trichinella* fue primeramente citado por Flockhart y col., (1982)(38).

Cercarias y formas adultas de *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma rodhaini* fueron el tema de investigación de Boissezon y Jelnes en 1.982 (17); quienes estudiaron las movilidades isoenzimáticas de la PGI, PGM, HK, AK, FK, MPI, G6PD y MDH, apareciendo diferencias electroforéticas entre la PGI y la PGM de *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma rodhaini*, proponiéndose estas enzimas para la identificación de las cercarias.

Leslie y col. 1.982 (66), compararon poblaciones de *Ascaris suum* por electroforesis en geles de almidón, procedentes de Iowa, New Jersey y Maryland.

Yarzabol y col. en 1.983 (126), investigaron los patrones isoenzimáticos de fosfatasa ácida en microfilarias de *Onchocerca volvulus* procedentes de Venezuela. Distinguieron entre individuos recolectados a 20 y 90 metros sobre el nivel del mar.

Utilizando discos electroforéticos de geles de poliacrilamida en el estudio de la malato deshidrogenasa de *Schistosoma japonicum*, Xiu-Zhen y col. 1.983 (125), obtuvieron 3 bandas de diferente movilidad MDH₁, MDH₂ y MDH₃.

Jelnes, 1.983 (56), tras investigaciones electroforéticas sobre la fosfoglucoisomerasa, sugirió que podría existir un polimorfismo controlado por los cromosomas sexuales, pero debía ser confirmado.

En 1.985, Esbenshade y Triantaphyllou (31), trataron de demostrar la utilidad de los fenotipos enzimáticos para la identificación de especies de género *Meloidogyne*. Sus resultados les llevaron a la conclusión de que el polimorfismo de las esterasas, hacía que se pudiesen considerar como las enzimas más útiles para la identificación de esta especie.

Paragonimus ohirai tiene 3 variantes electroforéticas: F₁, FS y S de la tetrazolium oxidasa. Estas fueron las conclusiones a las que llegaron el grupo de

Zurita en 1.989 (130).

Onchocerca sp. fue el tema de investigación de varios grupos; ese mismo año 1.985 (3) Agatsuma y Habe compararon las movilidades electroforéticas de 4 enzimas (GPI, LDH, MDH y PGM) de **Onchocerca volvulus** y **Onchocerca gutturosa**, procedentes de Guatemala. Flockhart y Biando 1.985 (38), analizaron el patrón isoenzimático de la GPI de **Onchocerca volvulus** y **Onchocerca linealis**, comparando su valor diagnóstico; y el grupo de Cianchi en 1.985, estudió la estructura genética de 2 poblaciones de **Onchocerca volvulus** procedentes de Mali, la costa de Ivory y Zaire. El análisis electroforético de 25 sistemas enzimáticos mostró marcadas diferencias entre poblaciones del Zaire y del este africano.

Varias cepas del género **Trichinella** fueron evaluadas electroforéticamente por Mydyski y Dick, 1.985 (77), con objeto de encontrar diferencias genéticas entre cepas procedentes de diferentes hospedadores. Estas cepas se pudieron agrupar en 3 patrones básicos: especies de **Trichinella** procedentes de cerdos, carnívoros salvajes y **Trichinella spiralis var. pseudospiralis**.

Pernin y col., 1.985 (91), utilizaron el método de focalización isoelectrica para investigar el zimograma de 16 enzimas distintas de **Naegleria sp.**

Estudios electroforéticos de enzimas diploides y tetraploides de **Paragonimus westermani**, fueron realizadas por Agatsuma y Habe, (1.985) (4).

En 1.986 Flockhart (39), investigó la especiación de **Trichinella sp.**, detectando diferencias al menos entre **Trichinella spiralis** y **Trichinella pseudoespiralis**, para la actividad de enzimas respiratorios (lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y PEP carboxilasa).

Este mismo autor y su grupo de investigación en el año 1.986 (39),

analizaron poblaciones de **Onchocerca volvulus** de Liberia, la Costa de Ivory, Burkina, Faso y Sudán, encontrando polimorfismo enzimático relacionado con la procedencia de los parásitos de bosque o sabana.

El estudio de la variación genética de **Anisakis simplex A y B**, por análisis electroforético de 22 enzimas en larvas y adultos, fue realizado por Nascetti y col., 1.986 (81). Posteriormente este mismo autor y su grupo, aportaron datos para la identificación electroforética de larvas y adultos de **Anisakis** procedentes del mar Mediterráneo y del océano Atlántico y más tarde también en 1.986 (81), analizaron la estructura genética de **Anisakis physeteris** y **Anisakis simplex complex**.

También en 1.986, Rollison y col. (99), compararon enzimáticamente **Schistosoma mansoni** de ratas y humanos, procedentes de Guadalupe y **Schistosoma rodhaini** aislado en Burundi. Analizaron la LDH, MDH, AP, GPM, GPI, G6PD y HK por focalización isoelectrica en geles de poliacrilamida.

Asimismo, los enzimas glicolíticos se han demostrado en diferentes filarias parásitas como **Onchocerca volvulus**, **Dirofilaria immitis**, **Dipetalonema vitae**, **Brugia panhagi**, **Litosomoides carinii**, y adultos y estados microfilariales de **Setaria cervi**. La lactato deshidrogenasa se asocia con la reoxidación del NADH en estas filarias parásitas y este enzima ha sido utilizado como blanco para la quimioterapia en infecciones por **Onchocerca** y **D. immitis** (Saxena y col., 1986)(102).

Las relaciones entre enzimas y evolución en el género **Meloidogyne** fueron probadas por Esbenshade y Triantaphyllou en 1.987 (32).

Comparando proteínas solubles y patrones isoenzimáticos de 8 enzimas extraídos del músculo de larvas de **Trichinella sp.**, el grupo de Fukumoto en 1.987 (44), comenzó sus investigaciones, que concluirían un año más tarde (Fukumoto y col, 1988(43)) con la publicación del árbol filogenético del género **Trichinella**

construido a partir de patrones isoenzimáticos.

Pozio (1987)(94), y Murrell y col. (1987)(76) demostraron diferencias alozímicas entre aislados de *Trichinella* de diferentes regiones geográficas y diferentes especies de hospedadores (La Rosa y col., 1992)(61).

Esbenshade y Triantaphyllou 1.988 (33), analizaron genéticamente el polimorfismo de las esterasas de *Heterodera glycinae*, encontrando 3 líneas de nematodos, cada una fijada para un fenotipo diferente de esterasa.

Mediante técnicas electroforéticas se investigó también, la variación genética de *Echinococcus granulosus* de animales domésticos en Australia (Lymbery y Thompson 1.988) (68).

Cepas de *Paragonimus westermani* de Filipinas fueron utilizadas por el grupo de Agatsuma en 1.988 (4), en sus investigaciones. Cuarenta enzimas de *Paragonimus westermani* de 2 localidades de Filipinas se testaron mediante geles electroforéticos.

Veintitrés loci enzimáticos fueron establecidos por el grupo de Andrews, 1.989 (8), para la caracterización de 3 especies de *Onchocerca* (*Onchocerca gibsoni*, *Onchocerca gutturosa* y *Onchocerca linealis*).

Bobek y col. 1.989 (16), analizaron los genes proteicos de los huevos de *Schistosoma haematobium* y su expresión.

En la búsqueda de marcadores genéticos para la identificación y clasificación de *Giardia intestinalis*, Andrews y col. en el año 1.989 (9), utilizaron la técnica de electroforesis aloenzimática, encontrando 26 loci como marcadores genéticos. A raíz de los resultados, estos autores sugirieron que *Giardia intestinalis* es un

complejo de especies.

G6PD, PGM y MDH de *Schistosoma matteei*, fueron testadas electroforéticamente por Kruger, 1.989 (60).

Ortega y Valero, efectuaron en 1.989(85) un estudio electroforético de 14 loci codificadores de enzimas, en 2 poblaciones biométricas diferentes (A y B) del complejo *Bothriocephalus scorpii*, parásito del rodaballo. Los resultados confirman que ambas poblaciones son dos especies gemelas separadas por una distancia genética de 0.892 según el índice de Nei (Nei, 1972 (82)).

En 1.990 Pasteur y col. (89), compararon cercarias de *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* y *Schistosoma bovis* y sus híbridos. Analizando patrones isoenzimáticos encontraron diferencias significativas entre ellas.

Las técnicas electroforéticas sirvieron también, para que Esbenshade y Triantaphyllou 1.990 (34), estudiaran las esterases del género *Meloidogyne*. Pocos estudios se han llevado a cabo en estrombilidos del tracto digestivo (Baker y Fisk, 1976(14); Andrews y Beveridge, 1989(8)) y en estos casos la electroforesis se llevó a cabo a partir de pools de varios gusanos. Gasnier y col., 1992(45) estudiaron la variación alozímica entre cepas de laboratorio y poblaciones salvajes de *Teladorsagia circumcincta*, parásito intestinal de la oveja.

Por último en España se ha llevado a cabo estudios isoenzimáticos en *Trichuris ovis* (Hermoso y col, 1983(49); Rodriguez y col., 1991(98)), *Ascaris suum* (Cutillas y col., 1992(28); Cutillas y col.,1993(30)), *Bothriocephalus scorpii* (Ortega y Valero, 1989)(85), así como estudios mediante técnicas electroforéticas del perfil proteico de *Hymenolepis nana fraterna* y *H. diminuta* (Valero y col.,1984)(115), *Dipylidium caninum*, *Neoctenotaenia ctenoides*, y *Paranoplocephala cuniculi*

(Valero y col., 1983)(114).

MATERIAL Y METODOS

III.A.- Material

III.A.1.- Parásitos

III.A.1.a.- *Dictyocaulus filaria* (Rudolphi, 1809) Railliet y Henry, 1907.

Un total de ciento noventa individuos (48 machos y 142 hembras) de *Dictyocaulus filaria* se recolectaron de pulmones de Capra hircus y Ovis aries sacrificadas en distintos mataderos de las provincias de Sevilla y Huelva, España. Asimismo, se recogieron pulmones procedentes de O. aries sacrificados en Eslovaquia. Una vez en el laboratorio se procedía a la extracción del material parasitario con la ayuda de agujas enmangadas; posteriormente, los nematodes eran depositados en cajas de Petri conteniendo solución salina fisiológica al 0.9%, siendo lavados repetidamente en solución salina al 0.9% (w/v), con el fin de eliminar, en lo posible, todos los productos procedentes del hospedador. A continuación, los gusanos eran congelados y almacenados a -80°C hasta su posterior uso.

III.A.1.b.-*Dictyocaulus viviparus* (Bloch, 1782) Railliet y Henry, 1907.

Un total de 258 individuos de la especie *Dictyocaulus viviparus* han sido recolectados a partir de pulmones procedentes de Bos taurus sacrificados en Eslovaquia.

Posteriormente, con ayuda de pinzas, tijeras y agujas enmangadas, eran extraídos los nematodes del pulmón y depositados individualmente en placas Petri de pequeño diámetro, conteniendo solución salina al 0.9% (w/v).

Los gusanos eran inmediatamente lavados y desprovistos de restos

procedentes del hospedador, y, así mismo, eran clasificados y separados por sexos, siendo depositados individualmente en tubos Eppendorf que eran almacenados y congelados a -80°C hasta su posterior estudio electroforético.

III.B.- Métodos: Técnicas electroforéticas.

Las técnicas electroforéticas utilizadas en el presente trabajo, han sido diversas debido a los dos objetivos de estudio que se han pretendido cubrir. Así, podríamos enumerar las distintas técnicas utilizadas atendiendo a los diferentes objetivos cubiertos:

1.- Estudio del perfil proteico de cada especie parásita. Estos se han llevado a cabo en geles desnaturalizantes homogéneos de poliacrilamida, con un sistema de tampón discontinuo (Laemli, 1970)(62).

2.- Estudios isoenzimáticos de la LDH y MDH de *Dictyocaulus filaria* y *Dictyocaulus viviparus*. El patrón isoenzimático de la LDH en *D. filaria* se llevó a cabo tanto en geles de poliacrilamida como en geles de almidón; mientras que la MDH sólo se ensayó en geles de almidón.

III.B.1.- Estudio del perfil proteico en las distintas especies parásitas

El estudio del perfil proteico de cualquier organismo conlleva un paso previo de determinación cuantitativa de proteínas. Es decir, el cálculo de la concentración proteica presente en cada uno de los extractos individuales. Esta determinación se ha llevado a cabo mediante el método de Bradford (1976)(19).

III.B.1.a.- Determinación de la concentración proteica: Método de Bradford (1.976) (19).

Se realizaron los siguientes pasos:

1.- Valoración cuantitativa de las proteínas presentes en cada uno de los extractos, utilizando como patrón una solución de albúmina bovina (1mg/ml) en Tris-ClH ph 7.1.

2.- Preparación de diluciones a partir de la solución patrón de albúmina:

dilución a: 100 μ l solución madre + 900 μ l de Tris-ClH ph 7.1

dilución b: 300 μ l de dilución a + 100 μ l de Tris-ClH ph 7.1

dilución c: 200 μ l de dilución a + 200 μ l de Tris-ClH ph 7.1

dilución d: 100 μ l de dilución a + 300 μ l de Tris-ClH ph 7.1

dilución e: 100 μ l de dilución a + 900 μ l de Tris-ClH ph 7.1

blanco: 200 μ l de Tris-ClH ph 7.1

3.- Adición a 200 μ l de cada una de las diluciones preparadas anteriormente, de 2 ml de reactivo Bradford.

4.- Preparación de diluciones de la muestra problema:

Tanto en *Dictyocaulus filaria* como en *D. viviparus* los extractos se prepararon por homogenización del gusano en 200 μ l de Tris-ClH pH 7.1.

A continuación, los extractos obtenidos se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos, a 10.000 r.p.m.. Los sobrenadantes recogidos se utilizaron como soluciones madre de cada especie parásita.

De cada una de las soluciones madre referidas, se prepararon 3 diluciones distintas: 1/10, 1/50 y 1/100; y de cada una de ellas se tomaron 200 μ l, a los que se añadieron 2 ml de reactivo Bradford. Se agitó y se esperó 5 minutos.

5.- Preparación de 3 tubos con 200 μ l de Tris-ClH ph 7.1, que se utilizaron como blanco.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-160 A UV-VISIBLE RECORDING SPECTROPHOTOMETER leyendo a 595 nm.

Primero se hizo la lectura de los 3 tubos que se utilizaron como blanco y posteriormente se realizó la curva patrón.

III.B.1.b.- Preparación de extractos de las especies parásitas para el estudio del perfil proteico.

Una vez conocida la concentración proteica de los distintos extractos, se procedió al cálculo del volumen necesario para que la concentración proteica total en las muestras ensayadas electroforéticamente para el estudio del perfil proteico, fuese de 50 μ g. El volumen final se mezcla en una proporción 1:4 con tampón mizel (ver reactivos) y se calienta a 95°C durante 4 minutos (Bio Rad Laboratories Manual) (15). Mediante este procedimiento al tratar con agentes desnaturalizantes, se rompen los puentes de enlace entre los péptidos, y al tratar con SDS se consigue que las proteínas migren exclusivamente por su peso molecular.

III.B.1.c.- Técnicas electroforéticas utilizadas para el estudio del perfil proteico de las distintas especies parásitas.

El estudio del perfil proteico de las distintas especies parásitas se llevó a cabo en geles discontinuos de poliacrilamida constituidos por un gel homogéneo al 10% de resolución o separación (abajo) y un gel de empaque (arriba). El gel de empaque actúa concentrando grandes volúmenes de muestra y por lo tanto se consigue una mejor resolución de la banda que la que se consigue utilizando el mismo volumen de muestra en un gel sin empaque. Las moléculas se separan completamente en el gel de resolución. El sistema de tampón discontinuo más

utilizado es el de Laemmli (1.970)(62).

III.B.1.c.1.- Preparación del gel

Preparación de soluciones stock:

- 30% Acrilamida

Acrilamida 29 g.

NN'- metil bis-acrilamida . 1 g.

H₂O hasta 100 ml.

La acrilamida contenida en un gel puede variar desde el 30% al 3%. Los geles son muy frágiles al 3%, pero pueden ser fortalecidos por la adición de agarosa. Los geles de poliacrilamida de más bajo porcentaje son útiles para la separación de proteínas grandes (de peso molecular del orden de 1.000.000.000). Las proteínas pequeñas se resuelven mejor en geles de poliacrilamida de alto porcentaje, pero el mínimo tamaño es alrededor de 5.000 daltons y para péptidos más pequeños es mejor utilizar electroforesis en capa delgada o en papel.

Las soluciones acuosas de acrilamida y bis-acrilamida juntas o separadas, son estables durante algunos meses a 4°C en oscuridad.

- 3% Amonio persulfato

Amonio persulfato .. 0,3 g.

H₂O hasta 10 ml.

La solución debe almacenarse a 4°C durante períodos no superiores a 1 semana.

- Tampón de electrodos

Tris (hidroximetil) Aminometano .. 6 g.

Glicocola purísima 28,8 g.

SDS 20 ml.

H₂O destilada hasta 2 litros

Esta solución se preparó en el momento de su utilización.

Preparación del gel de resolución

Los volúmenes utilizados para el sistema en placa PROTEAN II de Bio-Rad fueron los detallados en la Tabla I.

	Gel de resolución (10%)	Gel de empaque (5%)
Acrilamida-Bis	5.3 ml	1.5 ml
Tris ClH 8.8	4 ml	-----
Tris ClH 6.8	-----	2.24 ml
Agua destilada c.s.p.	16 ml	9 ml
PSA	160 µl	90 µl
TEMED	5 µl	4 µl
SDS (10%)	160 µl	90 µl

Tabla I. Volúmenes de reactivos a utilizar por un gel en placa procesado en un sistema Protean II de Bio-Rad para el análisis del perfil proteico de las distintas especies parásitas.

Una vez mezclado se procedía a la desgasificación de la mezcla de acrilamida-bis, Tris-ClH ph 8.8 y H₂O destilada.

El desgasificador utilizado fue un aspirador EYELA, Tokyo Rikakika, Selecta, manteniéndose este paso hasta la total eliminación de burbujas.

Preparación de las placas de cristal.

Para ello fueron lavadas en solución de detergente caliente y aclaradas bien en agua del grifo y en agua destilada; finalmente las placas electroforéticas fueron desengrasadas mediante tratamiento con etanol y dejando secar al aire.

Los geles de poliacrilamida son utilizados generalmente bajo alguna de las 2 formas básicas siguientes: en tubo (cilíndro estrecho) y en placa. La diferencia más importante entre ellas es el número de muestras que pueden ser procesadas en cada sistema. En un gel en tubo el número es sólo 1 o 2, mientras que en placa el número está determinado por el tamaño del aparato. En nuestro caso, se desarrollaron simultáneamente 15 muestras en una placa de 16 cm de ancho. El sistema en placa suele ser más económico y permite la comparación de distintas muestras bajo idénticas condiciones de electroforesis y, en consecuencia, es el más frecuentemente utilizado.

Una vez lavadas, las placas se cargan con el gel desgasificado, adicionado de la cantidad de PSA según la Tabla I y 30 μ l de TEMED por 100 ml de gel desgasificado, bien con una pipeta Pasteur o con mezclador, si el gel se realiza en gradiente de concentración.

Es necesario conseguir una correcta estanqueidad de las placas de vidrio para evitar la salida del gel por los bordes de las placas. Para ello se ponen entre las dos placas de cristal unos separadores de plástico o de otro material. Estos separadores pueden fijarse para evitar que se muevan, con vaselina de petróleo. Para la electroforesis en vertical las placas son selladas con silicona pasta B (Panreac) o con cinta o tira de plástico, para retener el líquido mientras

polimeriza. Este sellado se retira antes de procesar el gel.

Finalmente, y una vez que se ha introducido el gel entre las placas de vidrio, se cubre inmediatamente con alcohol isobutilico para evitar el contacto con el aire y conseguir una buena superficie de gel. Cuando ha polimerizado se retira el alcohol isobutilico y se lava con tampón de corrido, quedando el sistema preparado para recibir el gel de empaque. Este se prepara al 5% de acuerdo con lo indicado en la Tabla I.

Una vez incorporado el gel de empaque sobre la superficie del mismo se mete un "peine" destinado a marcar los pocillos para la muestra. El "peine" utilizado permite formar pocillos para la muestra de unos 3 mm de anchura, separados entre sí por 2 mm.

Tras este paso, se deja polimerizar el gel de empaque a temperatura ambiente.

Después de polimerizado el gel, se quita el "peine" y se lava inmediatamente con agua destilada, siendo finalmente rellenados los pocillos con tampón de electrodos.

Tras depositar las muestras en los pocillos correspondientes, las placas se colocan en una cubeta Bio-Rad Protean II TM.

El aparato básico para realizar una electroforesis consta de dos recipientes, uno para el tampón y otro donde se colocan las placas con el gel. Cada uno posee un electrodo, que se conecta directamente a una fuente de alimentación, que proporciona el campo eléctrico. La fuente utilizada en el presente trabajo fue Bio-Rad Model 100/5000 Power Supply. (Fig. 1).

III.B.1.c.2.- Desarrollo electroforético

Tan pronto como la muestra se coloca en el gel, comienza la electroforesis aplicando el campo eléctrico, que puede ser a voltaje o a amperaje constante. La movilidad electroforética está directamente relacionada con la fuerza del campo eléctrico. De esta forma, un alto voltaje causará una electroforesis más rápida que un voltaje bajo, así se puede evitar una pequeña pérdida de resolución, la que origina al difundir las bandas durante un tiempo largo de corrido. Sin embargo, si aumentamos la fuerza del campo eléctrico se calienta más el gel, lo cual incrementa la velocidad de difusión. Enfriando el gel se evita este problema ya que retrasa la electroforesis.

El desarrollo electroforético se realizó a una corriente constante de 30 mA y se detuvo la electroforesis al llegar el frente a la parte final de éste.

III.B.1.c.3.- Localización de las proteínas en el gel

Debemos considerar una serie de puntos en la localización de las proteínas en el gel. Lo más común es usar un colorante específico, que tiña las bandas pero no el gel de poliacrilamida. La elección del colorante dependerá de una serie de puntos tales como:

- 1.- El colorante debe teñir las proteínas en el tipo de electroforesis usado.
- 2.- La tinción deber ser sensible, para detectar la mínima cantidad de proteína en el gel.
- 3.- Si se quiere cuantificar la proteína presente, será necesario utilizar un colorante que se una cuantitativamente a la proteína.

Las bandas proteicas se pusieron de manifiesto empleando la tinción de azul de Coomassie. Como marcadores de peso molecular se emplearon los de los laboratorios Bio-Rad para bajos pesos moleculares. (SDS-PAGE Molecular weigh

standars low range), con un rango de pesos moleculares de 14.400 a 97.400 daltons, incluye fosforilasa b, albúmina de suero bovino, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y lisozima.

Para teñir el gel se introduce este en la solución colorante (azul de Coomassie) adecuada y se deja durante un período de tiempo suficiente para que difunda (aproximadamente 15 minutos). Esta operación se realiza a temperatura ambiente o bien se introduce en una estufa a 30°C.

Finalmente, los geles se fotografiaron en un transiluminador. Los geles pueden conservarse en tampón acético al 10% o pueden ser secados en un papel soporte para evitar la distorsión del gel.

III.B.2.- Estudio de la actividad de la LDH en las distintas especies objeto de estudio

III.B.2.a.- Estudio espectrofotométrico de la LDH. Técnica de Hertejp (Recogido por Peces, 1987 (90)).

El estudio de la actividad de la LDH en las distintas especies parásitas objeto de estudio fue llevado a cabo, inicialmente, mediante medidas espectrofotométricas, calculando la actividad absoluta de la LDH en cada uno de los extractos, por el método de Herztejp. Con esta técnica, y aplicando la ley de Lambert-Beer, se obtiene la actividad enzimática, en unidades por mililitro (U/ml). Por Acuerdo internacional, 1 unidad de actividad enzimática se define: como la cantidad de proteína que origina la transformación de 1 micromol (1/1.000.000) de sustrato por minuto, a 25°C, en condiciones óptimas de medida.

La actividad específica es el número de unidades del enzima por miligramo, que aumenta durante el proceso de purificación, y llega a ser máxima y constante

cuando éste se halla en estado puro. La actividad molecular o molar, que antiguamente se llamaba número de recambio, es el número de moléculas de sustrato transformado por minuto, por una sola molécula de enzima (o por un sólo centro activo), cuando el enzima es el factor limitante de la velocidad.

La actividad se define como la relación: actividad absoluta/ mg de proteínas totales.

La determinación de la actividad absoluta, mediante la técnica de Herztejp , se lleva a cabo por la reacción siguiente:



Los materiales necesarios para la determinación de la medida espectrofotométrica de la enzima son:

- Enzima (gusano).
- Tampón fosfato 67 mM (9.118 g/l) pH 7.2.
- Piruvato solución 25 mM (2.75 mg/ml).
- NADH solución 1 mM (11 mg/ml).

Preparación de la cubeta para el extracto a ensayar (problema); añadir:

- 1.- 950 µl de tampón Fosfato.
- 2.- 20 µl de solución de Piruvato.
- 3.- 20 µl de solución de NADH.
- 4.- 10 µl extracto objeto de estudio.

Los extractos se preparan por homogenización en frío del gusano en Tris-ClH ph 7.1, posterior centrifugación y recogida del sobrenadante.

Seguidamente, de cada uno de los extractos se preparan 3 diluciones (ver preparación de extractos). La lectura se realiza a una longitud de onda de 340 nm. La medida dada por el aparato se divide por 6.22 y se multiplica por la dilución, aplicando la ley de Lambert-Beer, obteniéndose la actividad absoluta en U/ml.

El cálculo de la actividad específica para cada uno de los extractos ensayados se obtiene tras la aplicación de la fórmula descrita anteriormente, en la que las proteínas totales son calculadas mediante la técnica cuantitativa de Bradford (1.976) (19), ya descrita en el apartado anterior.

III.B.2.b.- Preparación de extractos de las especies parásitas para el estudio electroforético de la LDH y MDH.

El estudio de la actividad de la LDH y MDH mediante técnicas electroforéticas se llevó a cabo a partir de las especies parásitas clasificadas, aisladas por sexos y almacenadas a -80°C para evitar la pérdida de la actividad.

Tanto en *D. filaria* como en *D. viviparus* se añadió $50\ \mu\text{l}$ de Tris-ClH ph 7.1 por individuo y se procedió a su homogenización en frío. A continuación se centrifugaron a 4°C y 10.000 r.p.m., tras lo cual se recogió el sobrenadante y se pasó a un tubo Eppendorf conteniendo $5\ \mu\text{l}$ de Azul de Bromofenol, utilizado como indicador de la marcha de la electroforesis. Finalmente las muestras fueron colocadas en los pocillos practicados en el gel a tal efecto.

III.B.2.c.- Técnicas electroforéticas utilizadas para el estudio del patrón isoenzimático de la LDH y MDH en las distintas especies parásitas.

Los estudios del patrón isoenzimático de la LDH se han realizado tanto en geles de poliacrilamida como en geles de almidón.

Método electroforético para el estudio del patrón isoenzimático de la LDH en *Dictyocaulus filaria* en geles de poliacrilamida.

Gel homogéneo de poliacrilamida al 8%

El sistema tampón utilizado se preparó a partir de una solución stock

compuesta por:

- Tris 0.188M y ácido cítrico 0.063M ph 6.8 en 1 litro de agua destilada.
- Sistema tampón del gel: dilución de la solución stock en una proporción 1:19.
- Sistema tampón de electrodos: dilución 1:9 de la solución stock indicada anteriormente. (Vrijenhoek 1.978) (121).

Los geles se prepararon según lo indicado en la tabla II. Así mismo, la electroforesis se llevó a cabo a una corriente constante de 30 mA, manteniéndose el proceso hasta que el marcador (Azul de Bromofenol) desaparecía por la parte inferior del gel.

Tabla II: Gel homogéneo al 8% de poliacrilamida utilizado para el estudio del patrón isoenzimático de la LDH en *D. filaria*:

Acrilamida al 30%	13.3 ml
Tampón Tris-Citrato (1:19)	5 ml
Agua destilada	30.6 ml
Persulfato amónico al 3%	1.05 ml
TEMED	15 µl

Los volúmenes se han calculado para dos placas procesadas por el sistema Protean II de Bio-Rad.

La actividad de la LDH se puso de manifiesto por incubación de los geles en 177.6 ml de Tris 0.2 M pH 8 (4.3 g), 0.044 g de NAD, 7.92 ml de solución de Lactato (0.6 ml de ácido D-L láctico 85%, 49 ml (5.19 g CO Na) de CO H ONa 1M, agua destilada para 100 ml, 8.88 ml de MTT (0.0444 g), 0.01776 g PMS y 144 ml agar 2%. La tinción se realizó en incubación a 37°C hasta que las bandas azules

aparecían en el gel (Shaw y Prasad, 1970 (105)).

Finalmente, los geles se lavaban con agua destilada, se fotografiaban y se desecaban al vacío para su almacenamiento.

Controles utilizados en el estudio del patrón isoenzimático de la LDH y MDH en el material objeto de estudio.

Una vez seleccionadas las condiciones ideales de electroforesis, con objeto de descartar posibles contaminaciones del hospedador, se prepararon extractos de pulmón del hospedador, para determinar en él el patrón isoenzimático de la LDH y MDH.

Así, en el caso de *Dictyocaulus filaria* se prepararon extractos a partir de pulmón de ovejas y cabras sanas; mientras que en *Dictyocaulus viviparus* se prepararon a partir de pulmón de vaca parasitada. La preparación de estos extractos se llevó a cabo por homogenización de la muestra en Tris-CIH ph 7.1.

Por otra parte, la especificidad de la tinción fue comprobada preparando mezclas de tinción (ver reactivos) en ausencia del sustrato y del coenzima.

Para comprobar el efecto que tenían las proteasas en nuestros ensayos, se realizaron estudios paralelos de actividad de la LDH y MDH en presencia y en ausencia de inhibidores de proteasas. Para ello, se prepararon geles simétricos con individuos homogeneizados en tampón Tris-CIH 7.1 e individuos homogeneizados en presencia de inhibidores de proteasas. Los métodos de preparación de los geles y las tinciones efectuadas fueron las mismas que las descritas anteriormente.

El coctel de inhibidores utilizado fue: Tris (Hidroximetil aminometano), EDTA, DTT, Benzamidina, PMSF, STI, H₂O destilada y CIH c.s.p. hasta ph 7.4-7.5.

La preparación de éste viene reflejada en el apartado de reactivos.

III.B.2.d.- Estudio del patrón isoenzimático de la LDH y MDH en geles de almidón.

III.B.2.d.1.- Introducción

El gel de almidón es un medio de soporte que permite una buena separación de proteínas y lipoproteínas. Resuelve fracciones que pueden ponerse de manifiesto mediante tinción e inmunodifusión, radioisótopos u otros métodos, (Lewis, 1.966) (67). Esta técnica fue descrita por primera vez por Smithies en 1.955 (106). Usaba un hidrolizado parcial de almidón de patata, con el que formaba una lámina, que utilizaba como medio de soporte en la separación electroforética de macromoléculas, incluyendo proteínas y lipoproteínas. La electroforesis horizontal con almidón-gel de Smithies se realizaba con un sistema tampón continuo de borato.

Una modificación de esta técnica se produjo en 1.957 por Poulik (93), que utilizó un sistema de tampón discontinuo, en el que el tampón libre, localizado en los compartimentos exteriores (borato), eran diferentes del tampón en el que se hace el gel (Tris-Citrato). Poulik descubrió que con esta disposición se obtenían mejores separaciones y resoluciones que con el sistema de tampón continuo de borato.

En 1.955 Smithies (106) puso a punto la electroforesis vertical con geles de almidón, especialmente diseñada para su aplicación con muestras grandes.

Latner y Skiller, 1.961 (63), utilizando un tampón Tris y una modificación del procedimiento de almidón-gel vertical de Smithies, y un gradiente de potencial de 10-12 voltios/cm, obtuvieron separaciones satisfactorias después de 2 horas y media

de desarrollo electroforético.

Fine y col., (1.962) (36), describieron un procedimiento para la separación de proteínas, en el que usaban el aparato de Wieme pero sustituyendo el agar-gel por almidón-gel. Estos investigadores hallaron los mejores resultados con el sistema de tampón discontinuo de Poulik (93).

La cubeta empleada para la realización de una electroforesis horizontal consta, básicamente, de un recipiente con 3 compartimentos, uno interior donde se coloca el almidón-gel, limitado por dos trampillas que le separan de los otros dos compartimentos exteriores. Los electrodos están situados en estos últimos compartimentos y se conectan directamente a una fuente de alimentación, que origina el campo eléctrico.

El sistema de cubetas utilizado en el presente trabajo es la mini-gel horizontal Unit model M60-100, mientras que la fuente de alimentación es el modelo 500/1000 de Bio-Rad. (Fig. 2).

III.B.2.d.2.- Método de preparación de geles de almidón

Basado en el método de Smithies 1.955 (106).

A. Reactivos para el estudio isoenzimático de la LDH en gel de almidón.

- 1.- Tampón Tris-Glicina ph 8.8, tanto para el gel como para los electrodos.
- 2.- Gel de almidón: 12.5g de almidón hidrolizado para electroforesis, Merck, en 100 ml de tampón Tris-Glicina ph 8.8.

B. Reactivos para el estudio isoenzimático de la MDH en gel de almidón:

- 1.- Tampón de gel: 0.6 g Tris, 0.288 g de ácido cítrico con agua destilada para

500 ml.

Tampón de electrodos: 9.39 g Tris, 4.13 g ácido cítrico con agua destilada para 500 ml.

2.- Gel de almidón: 7.5 g de almidón hidrolizado para electroforesis, Sigma, en 100 ml de tampón Tris-Citrato pH 6.8

En un vaso de precipitado calentar con suavidad al baño María hasta que se gelifique y quede un gel transparente y líquido. Verter sobre la cubeta con las trampillas levantadas hasta conseguir una lámina de 1 cm de espesor y colocar un peine aproximadamente a un tercio de la longitud del gel, a partir del extremo catódico, con dientes de 3 mm para la formación de pocillos para cargar las muestras individualmente.

La solución caliente de almidón se deja en reposo durante 3 horas para que solidifique bien. Como solución puente se utilizó el mismo tampón que el empleado en la fabricación del gel, Tris-Glicina pH 8.8.

Con una micropipeta Hamilton, inyectamos de 5 a 10 μ l de muestra en los pocillos. La electroforesis se desarrollaba aplicando una intensidad de corriente constante de 30 mA, durante 2-3 horas.

La solución tampón utilizada en la fabricación del gel de almidón puede variarse ampliamente en cuanto a pH y constituyentes, dependiendo de la enzima que se esté ensayando. Además el tampón puente, localizado en los compartimentos externos, puede diferir del empleado en la fabricación del gel (sistemas discontinuos).

La movilidad electroforética dependerá, igual que en los geles de poliacrilamida, del campo eléctrico, es decir, un alto voltaje causará una electroforesis más rápida.

Fig. 1.- Sistema electroforético Protean II y fuente Bio-Rad 500/1000 utilizada en el estudio del perfil proteico de las especies parásitas.

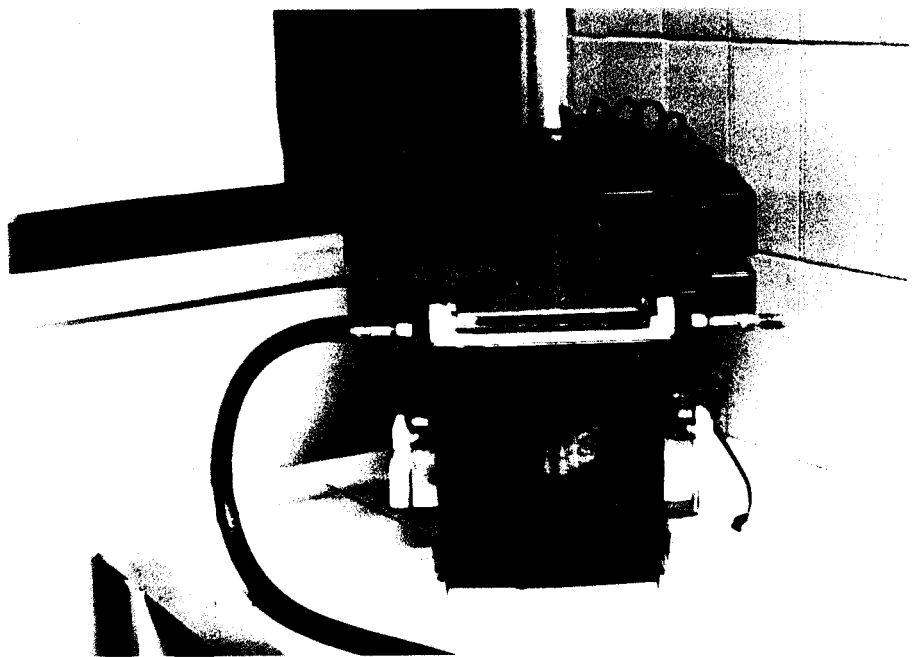
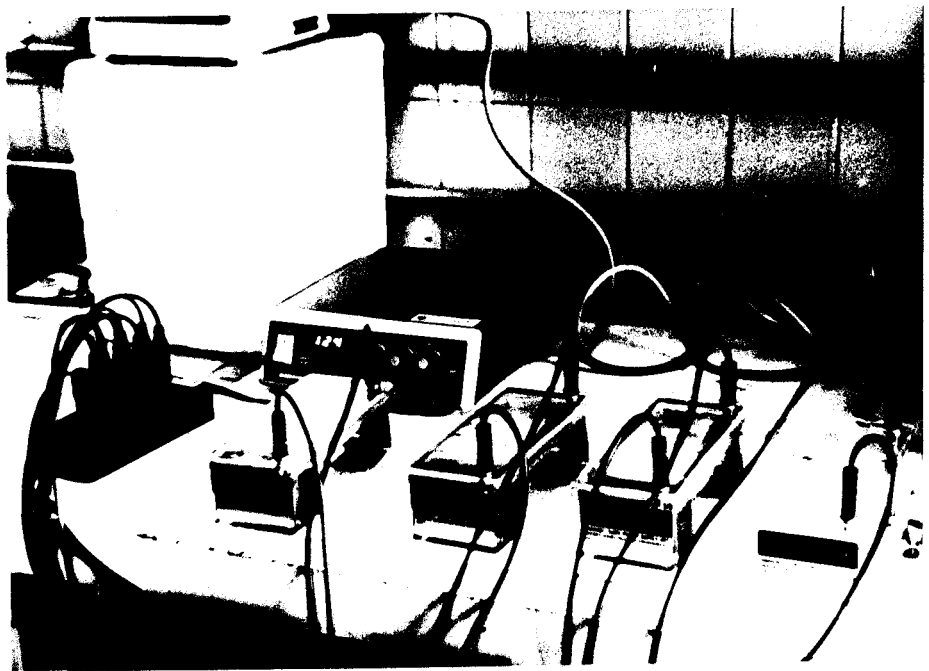




Fig.2.- Sistema de cubetas horizontales utilizadas en el estudio isoenzimático en geles de almidón.



III.C. TINCIONES

Tinción de la LDH.- (Shaw y Prasad 1.970) (105)

NAD+	44 mg
NBT	44 mg
PMS	17 mg
Lactato sódico	7.92 ml
0.5M Tris-ClH 8	177.5 ml
Agar 2%	144 ml

Dejar teñir hasta que se observen las bandas. Posteriormente lavar con agua destilada y conservar en frío.

Tinción de la MDH.

NAD+	10 mg
NBT	10 mg
PMS	2 mg
Acido L-Málico	40 mg
buffer Tris ph 8	25 ml

Incubar a 37°C hasta que se observen las bandas, después lavar con agua destilada y conservar en frío.

Tinción de Azul-Coomassie.

Metanol 50%	100 ml
Acético 7.5%	15 ml
Azul Coomassie 0.5%	1 ml

Dejar teñir durante 1 hora, después desteñir con Acético al 10%.

III.D.- REACTIVOS

Tampones.-

- Tris-Glicina-SDS ph 8.8 (Laemmli 1.970) (62)

Tris (Hidroximetil) Aminometano	6 g
Glicola purísima	28.8 g
SDS	20 ml
H2O destilada c.s.p.	2 l

- Tampón de la muestra (Mizzel) (Bio-Rad) (15)

H2O destilada	4 ml
0.5M Tris ClH ph 6.8	2 ml
Glicerol	1.6 ml
10% (w/v) SDS	3.2 ml
2B mercaptoetanol	0.8 ml
0.05% (w/v) azul de bromofenol	0.4 ml

- Tris Glicina ph 8.8 (Laemmli 1.970) (62)

Tris (Hidroximetil) Aminometano	6 g
Glicocola purísima	28.8 g
H2O destilada c.s.p.	2 litros.

Inhibidores de proteasas.-

Tris (Hidroximetil) Aminometano	0.093 g
EDTA	0.019 g
DTT	0.0190 g
Benzamidina	0.0436 g
PMSF	250 μ l (300 mM de PMSF en
etanol)	
STI	0.0025 g
H ₂ O destilada	250 ml
ClH c.s.p. pH 7.4-7.5	

Reactivo de Bradford.-

Coomassie blue Brilliant (G-250)	100 mg
Metanol 95%	50 ml
H ₃ PO ₄ 85%	100 ml
Agua destilada	850 ml

Filtrar a través de tres capas de papel de filtro.

Colorante Azul de Bromofenol.-

Azul de bromofenol	0.25%
Xileno-Cianol	0.25%
Ficol tipo 400 en agua	15%

Guardar a temperatura ambiente.

IV.A. Estudio del perfil proteico en las distintas especies parásitas objeto de estudio.

IV. A. 1. Estudio del perfil proteico en Dictyocaulus filaria.

El estudio de las proteínas totales de **D. filaria**, se ha llevado a cabo tanto en la cepa procedente de España como en la de Eslovaquia; en ambos casos la cantidad de proteína cargada en el gel fue siempre la misma, calculandose la concentración proteica total para cada extracto individual mediante el método de Bradford,(1976)(19) (Tabla I); siendo posteriormente calculado el volumen de muestra necesario para que la cantidad de proteínas en todas las muestras ensayadas fueran 50 ug.

En la cepa de **D. filaria** procedente de España, el perfil proteico se caracterizó por la presencia de un total de 53 bandas tanto en el macho como en la hembra de esta especie (Fig. 3A).

Un total de 11 bandas correspondían a proteínas con peso molecular superior a 97.400 Da, de las cuales 3 se presentaban más fuertemente teñidas.

Con pesos moleculares comprendidos entre 97.400 Da y 66.200 Da se revelaron 8 bandas. De ellas sólo 3 destacaban por su intensidad, estando el resto debilmente teñidas.

Entre los pesos moleculares 66.200 Da y 42.699 Da se encontraban 14 proteínas, de las cuales 7 se presentaban con una mayor concentración, mientras que el resto se observaba más difícilmente.

Un conjunto de 10 bandas podían observarse con un peso molecular comprendido entre 42.699 Da y 30.000 Da, siendo dos de ellas las más

características por su mayor intensidad.

Con pesos moleculares comprendidos entre 30.000 Da y 21.500 Da se detectaron 8 proteínas, estando 3 de ellas más fuertemente teñidas. Finalmente pudieron observarse 2 proteínas de peso molecular inferior a 21.500 Da.

Por otra parte, el perfil proteico de la cepa de *D. filaria* procedente de Eslovaquia no varió prácticamente del ya observado en la cepa española (Fig.4A), así sólo pudo observarse la ausencia de la banda de migración menos anódica, siendo, por lo tanto, el número de bandas presentes de 52 y siendo la distribución de proteínas según su peso molecular exactamente igual al de la cepa española (Fig. 4 A y B).

IV. A. 2. Estudio del perfil proteico en Dictyocaulus viviparus.

El estudio del perfil proteico de *D. viviparus* se ha realizado a partir de cepas procedentes de Eslovaquia, no habiéndose podido recolectar esta especie en España.

El número de bandas totales observado fue de 56 bandas (Fig. 5A). La descripción de éstas según su peso molecular fue la siguiente:

Con un peso molecular superior a 97.400 Da se observaron un total de 12 proteínas.

Entre 97.400 y 66.200 Da se pudieron detectar un total de 8 bandas proteicas, destacando 3 de ellas más intensas.

14 proteínas presentaban un peso molecular comprendido entre 66.200 y 42.699 Da, estando 6 de ellas más fuertemente teñidas.

Entre los pesos moleculares 42.699 y 30.000 Da se observaron un total de 12 proteínas destacando 2 de ellas más concentradas.

Las 10 restantes proteínas fueron las mismas ya observadas en **D. filaria**, estando 8 de ellas comprendidas entre los pesos moleculares 30.000 y 21.500 Da y presentando 2 de estas proteínas un peso molecular inferior a 21.500 Da (Fig. 5A y B).

El estudio comparativo de los tres perfiles proteicos vienen esquematizados en la figura 6. A la vista de ésta puede observarse unos perfiles proteicos muy similares viniendo expresadas las bandas diferenciales en la figura 7.

	ABSORV.	CONCT. dilución 1:10	CONCT. MUESTR A ug/ml	ul PARA 50 ug PROT.
D. filaria (ESP) Hembra 1	0.303	81.086	810.86	25
D. filaria (ESP) Hembra 2	0.100	26.488	264.8	75.5
D. filaria (ESP) Hembra 3	0.234	62.700	627	31.8
D. filaria (ESP) Macho 1	0.079	20.929	209.29	95.5
D. filaria (ESP) Macho 2	0.045	11.621	116.21	172.1
D. filaria (ESP) Macho 3	0.202	54.17	540.17	37
D. filaria (ESL) Hembra 1	0.473	89.328	893.28	22.4
D. filaria (ESL) Hembra 2	0.428	69.549	695.49	28.75
D. filaria (ESL) Macho 1	0.534	116.16	1161.6	17.22
D. filaria (ESL) Macho 2	0.571	132.31	1323.1	15.11
D. viviparus Hembra 1	0.478	91.519	915.19	21.85
D. viviparus Hembra 2	0.330	26.515	265.15	75.42
D. viviparus Macho 1	0.575	133.97	1339.7	14.92
D. viviparus Macho 2	0.357	38.650	386.5	51.75

Tabla I. Método de Bradford (1976)(19) para calcular el volumen de muestra que contiene 50 ug de proteína.

ESP=cepa española; ESL=cepa eslovaca.

Fig. 3:

A.- Perfil proteico del macho y la hembra de la cepa de *D. filaria* procedente de España.

B.- Marcadores de Peso Molecular.



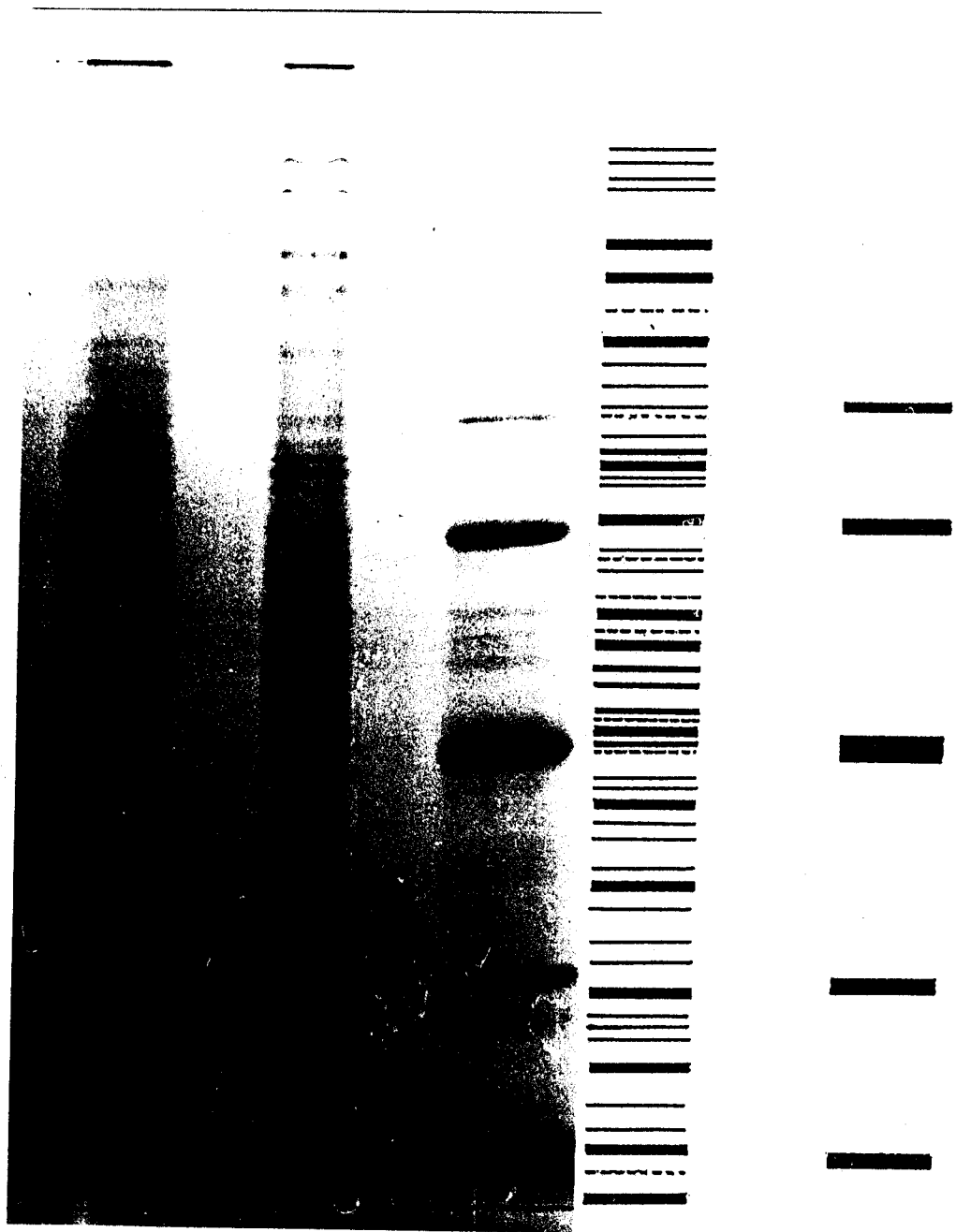
A

B

Fig. 4:

A.- Perfil proteico del macho y la hembra de la cepa de *D. filaria* procedente de Eslovaquia.

B.- Marcadores de Peso Molecular.



A

B

A

B

Fig. 5:

A.- Perfil proteico del macho y la hembra de la cepa de *D. viviparus* procedente de Eslovaquia.

B.- Marcadores de Peso Molecular.



Fig. 6: Esquemas de los perfiles proteicos observados en las especies parásitas objeto de estudio.

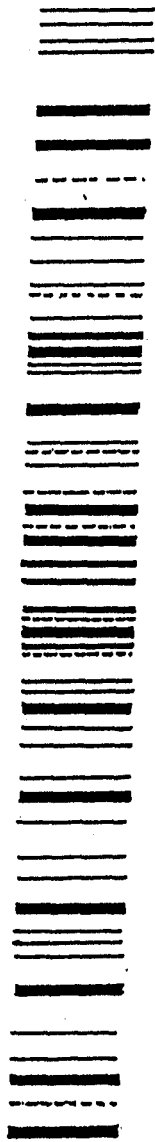
A.- **Dictyocaulus viviparus**

B.- **Dictyocaulus filaria** (cepa eslovaca)

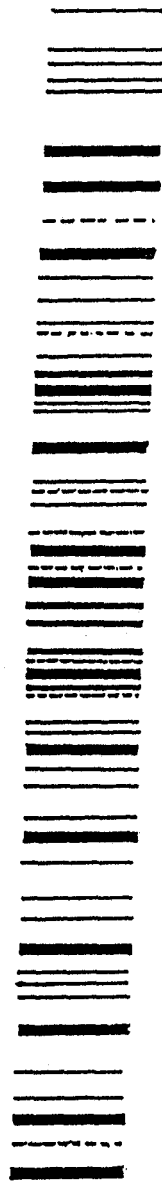
C.- **Dictyocaulus filaria** (cepa española)



A



B



C



M

Fig. 7: Esquema de las bandas diferenciales observadas en las especies objeto de estudio.

A.- *Dictyocaulus viviparus*.

B.- *Dictyocaulus filaria* (cepa eslovaca).(No tiene bandas específicas).

C.- *Dictyocaulus filaria* (cepa española).

M.- Marcador de Pesos Moleculares.

—

—

—

—

==

—

—

—

—

A

B

C

M

IV.B. Estudio del patrón isoenzimático de la LDH en las especies parasitarias objeto de estudio.

IV.B.1. Dictyocaulus filaria.

Para el estudio de la LDH en **Dictyocaulus filaria** se han utilizado un total de 127 ejemplares (49 hembras y 78 machos) procedentes de ovejas y cabras sacrificadas en el Matadero del Sur (Camas), Sevilla, así como 65 ejemplares de Présor (Eslovaquia) procedentes de pulmones de ovejas. Como control positivo se ha utilizado pulmón de cabra y oveja.

IV.B.1.1. Patrón isoenzimático de la LDH en D. filaria (cepa española)

El patrón isoenzimático de la LDH en ejemplares machos y hembras procedentes de cabra se caracterizó, en un principio, por la presencia de tres bandas de migración anódica, estando el isoenzima menos anódico más fuertemente teñido (Fig. 8 A); sin embargo, el patrón isoenzimático de los ejemplares de ambos sexos procedentes de ovejas se caracterizó por la presencia de 5 isoenzimas: 4 de ellos con migración anódica (el segundo isoenzima menos anódico se presentaba fuertemente teñido) y un isoenzima de migración catódica. Este último patrón se correspondía con el observado en el extracto de pulmón utilizado como control (Fig. 8 A).

No obstante, se realizaron distintos ensayos, con el fin de corroborar el patrón observado anteriormente. Para ello, se aumentó la concentración de los extractos procedentes de cabra que habían sido ensayados previamente, mientras que se diluyeron los extractos de **D. filaria** recolectados de oveja. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la figura 8 B. A la vista de ésta puede comprobarse la presencia de 5 isoenzimas en la hembra de **D. filaria** procedente de cabra, aunque los isoenzimas de migración catódica y menos anódica se observaba muy

débilmente teñidos, siendo en el caso del macho prácticamente imperceptible. El ejemplar hembra de *D. filaria* procedente de oveja (previamente diluido) exhibía un patrón isoenzimático compuesto por 5 bandas que aparecían teñidas con mucha menor intensidad que la observada anteriormente.

Posteriormente, y con el fin de corroborar los resultados obtenidos, se ensayaron machos y hembras de *D. filaria* procedente de *Ovis aries* que llevaban mucho tiempo de almacenaje. El patrón observado en este caso viene reflejado en la figura 8 C.

Por último, se ensayaron individuos de ambos sexos procedentes de cabra y ovejas recientemente sacrificadas quedando reflejado su patrón isoenzimático en la figura 8 D.

IV.B.1.2. Patrón isoenzimático de la LDH en *D. filaria* (cepa eslovaca).

Todos los ejemplares machos y hembras de *D. filaria* (cepa eslovaca) procedían de pulmones de *Ovis aries* sacrificadas en Présor (Eslovaquia).

También en esta cepa se observaron los dos posibles fenotipos ya vistos anteriormente en la cepa española (Fig. 9). Así, de igual manera, los individuos más activos mostraban un patrón isoenzimático caracterizado por la presencia de 5 bandas isoenzimáticas (Fig. 9 A) que coincidían en su migración con las observadas en el pulmón utilizado como control (fig. 9 C) y de las cuales la tercera se observaba más fuertemente teñida (Fig. 9 A), mientras que otros ejemplares (machos y hembras) mostraban tres bandas (Fig. 9 B) que podían convertirse en 5 cuando se aumentaba la concentración de estos extractos (Fig 9 D).

Este mismo estudio se ha llevado a cabo en geles de poliacrilamida, observándose, en todos los casos ensayados, un solo fenotipo caracterizado por 4

bandas anódicas, estando ausente la banda catódica debido al propio sistema electroforético utilizado (Fig. 10 A). Como control se utilizó extracto de *Ascaris suum*, cuyo patrón isoenzimático venía definido como una mancha de migración menos anódica (Fig. 10 B). De estas 4 bandas, la segunda de migración menos anódica se presentaba más fuertemente teñida.

IV.B.2. Dictyocaulus viviparus

El estudio del patrón isoenzimático de la LDH en *D. viviparus* se llevó a cabo a partir de 73 individuos (48 hembras y 25 machos) recolectados a partir de Bos taurus sacrificados en Kapisany y Présor (Eslovaquia).

El patrón isoenzimático de la LDH observado más frecuentemente en las hembras de esta especie se caracterizó por la presencia de una sola banda de migración anódica, cuya localización en el gel era intermedia entre la 3ª y 4ª banda más anódica del pulmón utilizado como control (Fig. 11 A y B). Esta banda tampoco coincide en su migración con ninguna de las presentes en *D. filaria* (Fig. 11 C). En algunos casos, cuando el extracto se preparaba más concentrado (doble concentración) se podía detectar la presencia de un 2º isoenzima débilmente teñido y de migración anódica más rápida que el primero (Fig. 11 D); asimismo, si este extracto doblemente concentrado se dejaba sobreteñirse, se podía observar la presencia de otra banda muy débilmente teñida y de migración anódica, prácticamente imperceptible y más lenta que la primera, además de una banda de migración catódica (Fig. 11 E).

Por otra parte, en los machos de *D. viviparus* el fenotipo más frecuentemente observado para la LDH se caracterizó por la presencia de 2 bandas: una de migración anódica y otra de migración catódica, presentándose esta última menos teñida (Fig. 11 F). En los extractos más concentrados o sobreteñidos se pudo observar un isoenzima débilmente teñido de migración anódica más rápida (Fig 11G).

TABLA DE ACTIVIDAD

	ABS/MIN	VOL. MUESTRA (ml)	VOL. TOTAL * (ml)	ACTIVIDAD
D. filaria (Esp) HEMBRA	0.318	$10 \cdot 10^{-6}$	1	$9.55 \cdot 10^3$
D. filaria (Esp) MACHO	0.392	$10 \cdot 10^{-6}$	1	$11.7 \cdot 10^3$
D. filaria (Esl) HEMBRA	0.093	$10 \cdot 10^{-6}$	1	$2.8 \cdot 10^3$
D. filaria (Esl) MACHO	0.0762	$10 \cdot 10^{-6}$	1	$2.28 \cdot 10^3$
D. viviparus HEMBRA	0.1056	$10 \cdot 10^{-6}$	1	$3.17 \cdot 10^3$
D. viviparus MACHO	0.096	$10 \cdot 10^{-6}$	1	$2.9 \cdot 10^3$

Resultados obtenidos tras la aplicación de la técnica de Hertjep al estudio espectrofotométrico de la actividad de la LDH en machos y hembras de **D. filaria** y **D. viviparus**.

Fig. 8.- Patrón isoenzimático de la LDH en **D. filaria** procedente de Ovis aries y Capra hircus.

A.- Patrón de bandas observado tras la homogenización del parásito en 50 ul de Tris- ClH pH 7.1.

B.- Patrón isoenzimático de la LDH en **D. filaria** tras concentrar los extractos procedentes de cabra y diluir los de oveja.

C.- Patrón isoenzimático de extractos de **D. filaria** procedente de Ovis aries tras largo tiempo de almacenaje.

D.- Patrón de isoenzimas observado en ejemplares machos y hembras de **D. filaria** procedentes de Ovis aries y Capra hircus recientemente sacrificadas.

C_a -> Capra hircus

O -> Ovis aries

♂ -> individuos machos

♀ -> individuos hembras

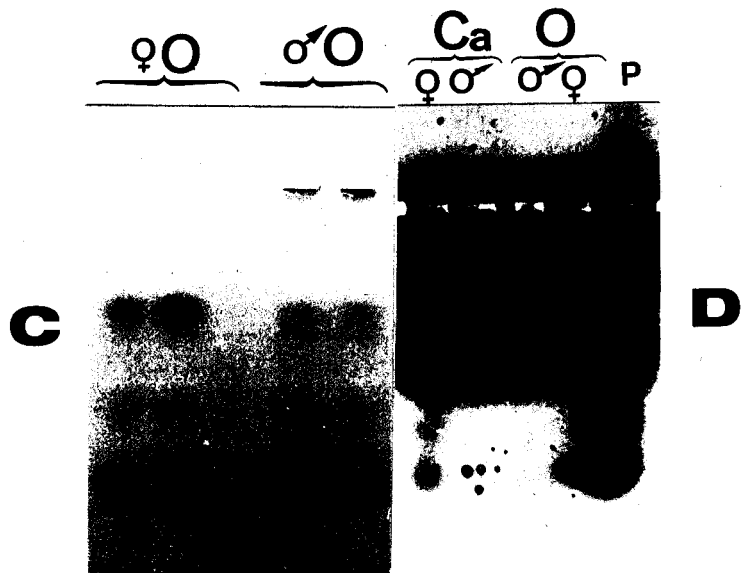
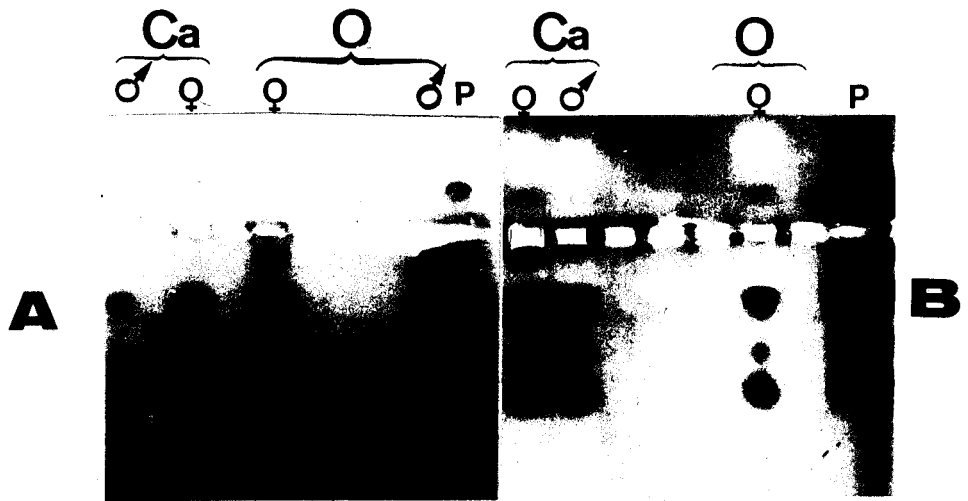


Fig. 9: Patrón isoenzimático de la LDH en *D. filaria* en:

A.- Extractos recientes

B.- Extractos almacenados durante mucho tiempo

C.- Patrón isoenzimático de la LDH en pulmón de cabra

D.- Extractos concentrados

o -> Origen

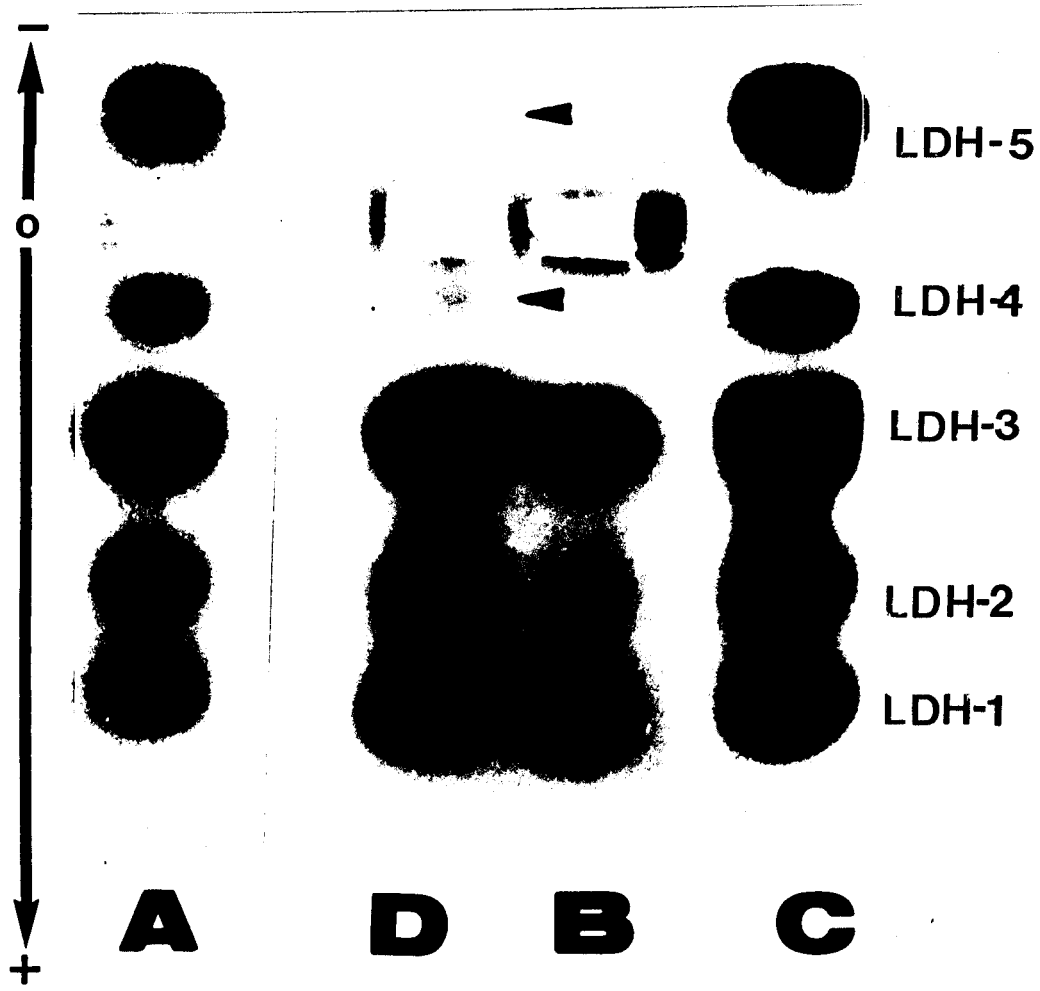


Fig. 10:

A.- Patrón isoenzimático de la LDH de *D. filaria* procedente de Ovis aries y Capra hircus observados en geles de poliacrilamida.

♂-> macho

♀-> hembra

B.- Patrón de la LDH observada en *Ascaris suum* utilizados como control.

o -> Origen

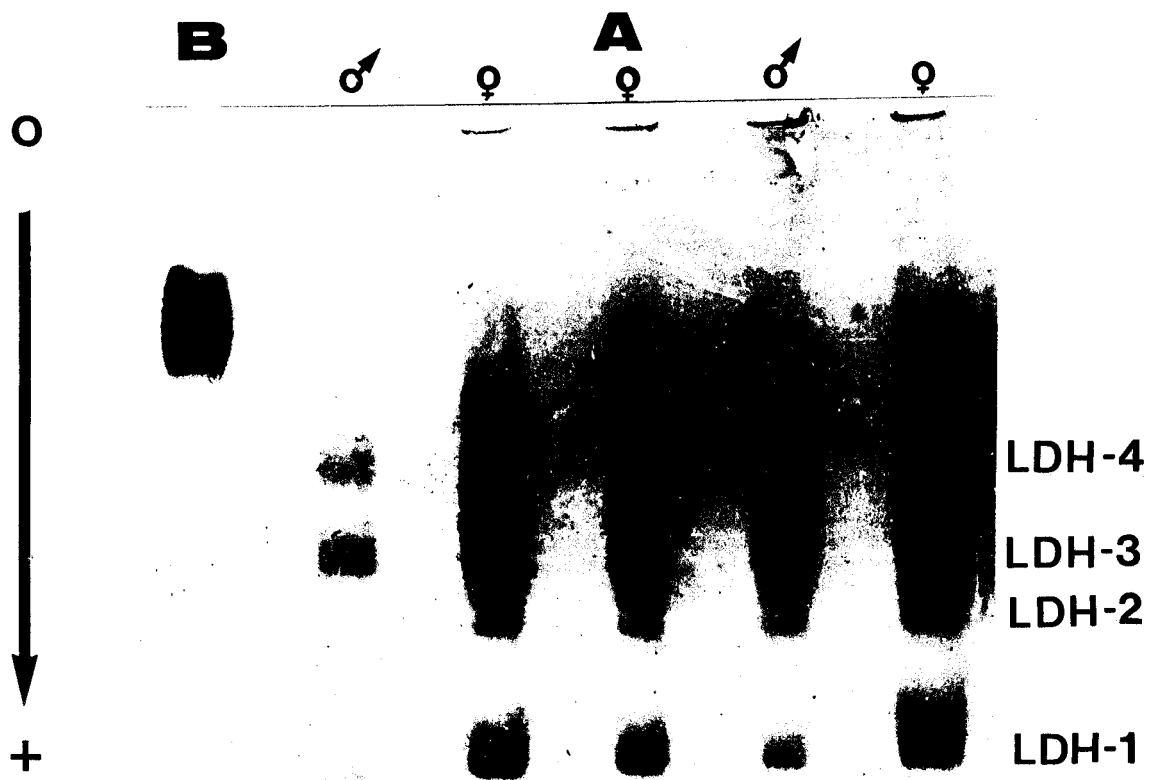


Fig. 11: Patrón isoenzimático de la LDH en:

A.- Extractos de *D. viviparus* hembras.

B.- Extractos de pulmón de cabra.

C.- Extractos de *D. filaria*.

D.- Extractos concentrado de *D. viviparus* hembra.

E.- Extractos de *D. viviparus* tras sobretinción del extracto D.

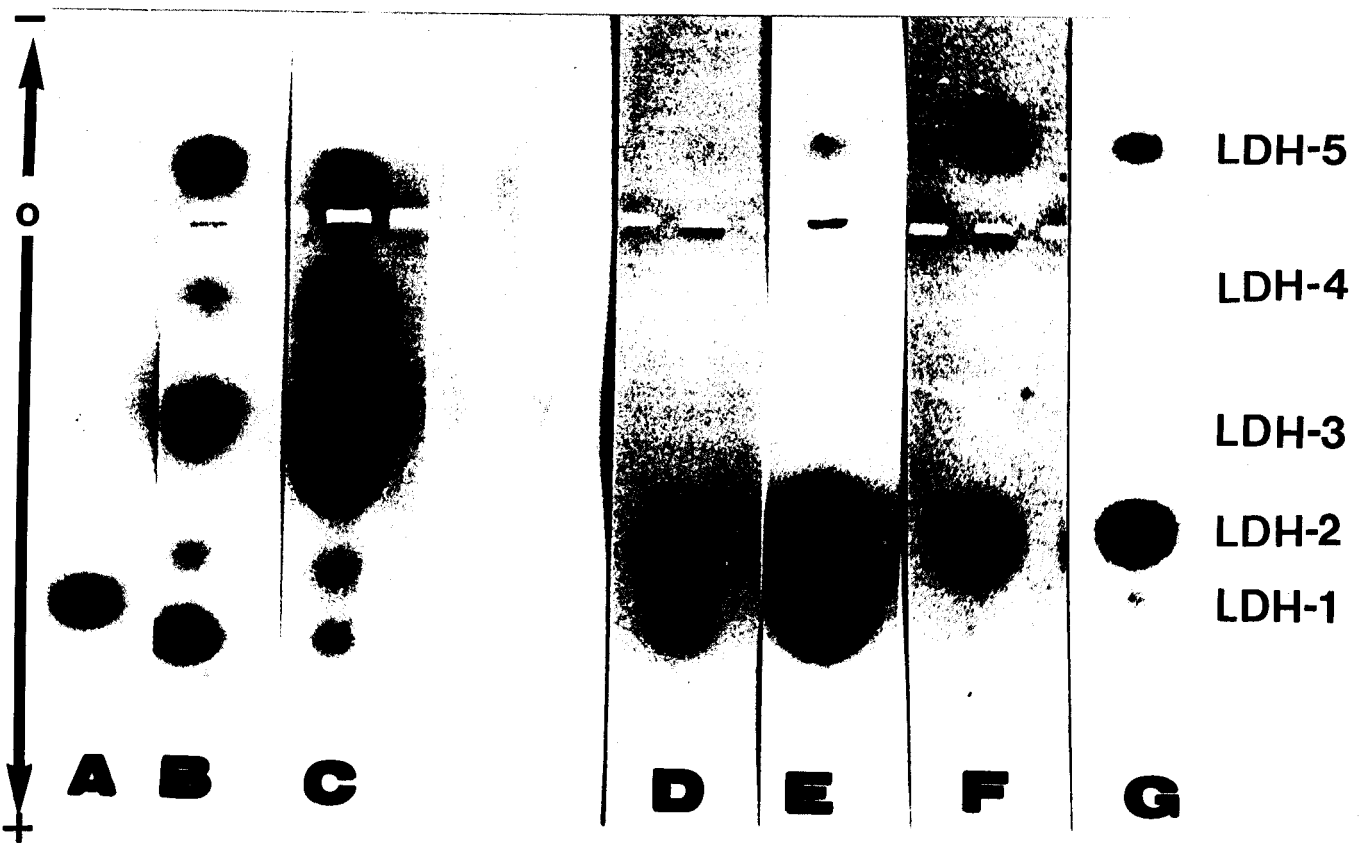
F.- Extractos de *D. viviparus* machos.

G.- Extractos de *D. viviparus* machos concentrados.

o -> Origen

+ -> Anodo

- -> Catodo



IV.C. Estudio del patrón isoenzimático de la MDH en las especies parásitas objeto de estudio.

IV.C.1. Dictyocaulus filaria.

El estudio de la MDH en *D. filaria* se caracterizó por la existencia de un sólo fenotipo tanto para los individuos procedentes de España como los de Eslovaquia. Asimismo, no se observaron diferencias a nivel del sexo. Una sola banda de migración anódica lenta, respecto al extracto de pulmón utilizado como control, pudo ser detectada en todos los individuos ensayados (Fig. 12 A).

IV.C.2. Dictyocaulus viviparus.

El estudio del patrón isoenzimático de la MDH en *D. viviparus* se ha llevado a cabo a partir de 70 ejemplares (44 hembras y 26 machos) procedentes de pulmón de Bos taurus sacrificados en Présor y Kaprisany (Eslovaquia).

El patrón isoenzimático de la MDH en *D. viviparus* se caracterizó por la presencia de 2 fenotipos: uno de ellos (fenotipo A) caracterizado por la presencia de una sola banda de migración anódica más lenta con respecto a la observada en el extracto de pulmón utilizado como control. Este fenotipo se observó en prácticamente la totalidad de los individuos (43 hembras y 26 machos) (Fig. 12 B, 13).

El 2º fenotipo (Fenotipo B) (Fig. 13) sólo se detectó en una hembra de las 44 ensayadas y se caracterizó por 1 banda de migración anódica más lenta a la observada en el fenotipo A (Fig. 12).

Asimismo, el fenotipo A de *D. viviparus* coincidía exactamente con el patrón isoenzimático de la MDH observado en *D. filaria* (Fig. 12 A y B).

En ninguna de las 2 especies se detectaron diferencias en el sexo.

Fig. 12: Patrón isoenzimático de la MDH observado en machos y hembras de:

A.- *Dictyocaulus filaria*

B.- *Dictyocaulus viviparus* (Fenotipo A)

o -> Origen

♂-> Machos

♀-> Hembras

P -> Patrón isoenzimático de la MDH en pulmón de cabra.

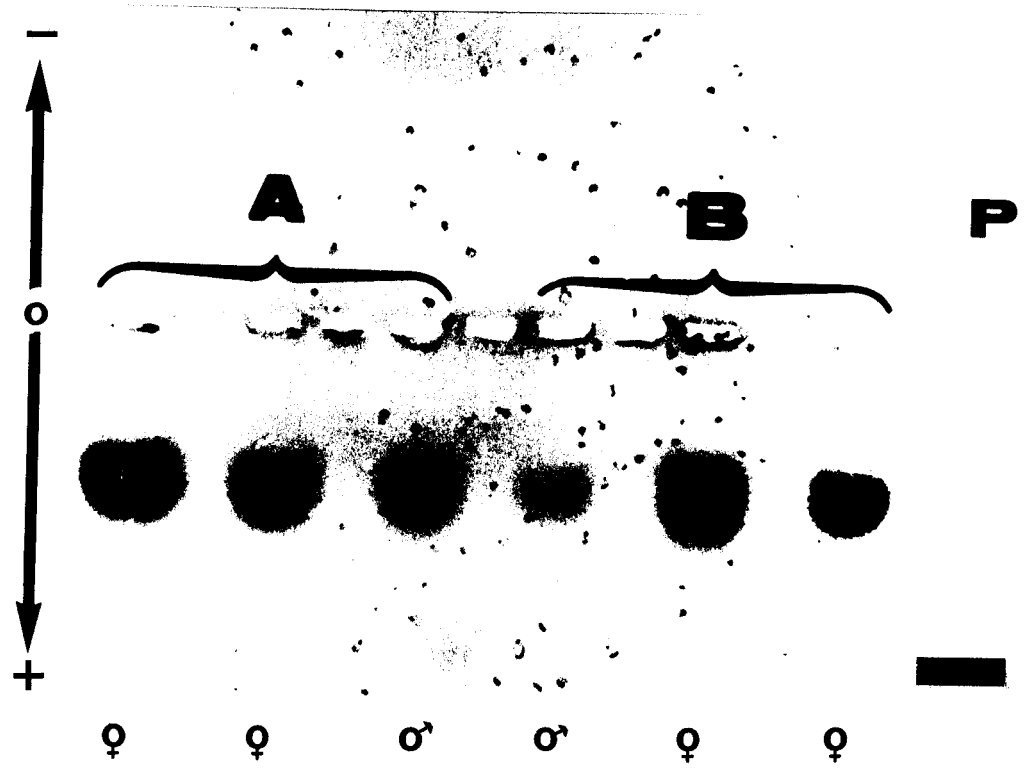


Fig. 13: Fenotipos observados en el patrón isoenzimático de la MDH en **D. viviparus**.

A.- Fenotipo observado en la mayoría de las muestras ensayadas.

B.- Fenotipo observado en una hembra de **D. viviparus**.

o -> Origen

A B A A A



DISCUSSION

V.A. Discusión del perfil proteico de las especies parásitas objeto de estudio.

El patrón proteico obtenido mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en las distintas especies parásitas objeto de estudio ha revelado la existencia de un total de 52 bandas proteicas en **D. filaria** (cepa eslovaca), 53 bandas en **D. filaria** (cepa española) y 56 proteínas en **D. viviparus**.

No se han detectado diferencias muy significativas en el patrón de proteínas de machos y hembras en ninguna de las 2 especies.

Si bien tanto las 2 cepas de **D. filaria** como **D. viviparus** mostraron un patrón proteico muy similar, las 2 cepas de **D. filaria** se diferenciaron por la presencia de 1 banda de gran peso molecular en la cepa de España. Lo anteriormente indicado no parece ser propio de **D. filaria** pues los estudios intraespecíficos del perfil proteico en distintas especies parásitas, parecen indicar que las cepas de algunas especies de Platyhelminthes parásitos tienen patrones proteicos muy similares (Ruff y col.(101), 1973; Arme, 1975)(11). Así, en el caso de **Schistosoma japonicum**, se piensa que la similitud de patrones proteicos observados entre cepas de esta especie, viene a ser un reflejo de las filogenias similares existentes entre cepas de las especies de caracoles que actúan como su hospedador intermediario (Ruff y col., 1973)(101).

En nuestro caso parece lógico que los perfiles proteicos de ambas cepas de **D. filaria** sean prácticamente el mismo, teniendo en cuenta que la diferencia entre ambas cepas no estriba en la existencia de distintos hospedadores, que podrían justificar una mejor o mayor adaptación a ellos, sino simplemente en la distinta localización geográfica de aquéllas.

Por otra parte, el perfil proteico de **D. viviparus** es muy semejante al de **D. filaria** (ambas cepas), hecho que vendría justificado por la pertenencia de esta

especie, no solo a la misma familia sino al mismo género.

Asímismo, Hermoso y col (1984)(49) llevan a cabo un estudio de las proteínas solubles de algunos nematodos de la superfamilia Oxyuroidea en geles de poliacrilamida, destacando un perfil específico para cada especie estudiada, si bien se pone de manifiesto una similitud de bandas proteicas, hecho que cabría esperar si se tiene en cuenta que todas ellas se incluyen dentro de la superfamilia Oxyuroidea. Por todo ello, estos autores concluyen que existe una mayor semejanza en el perfil proteico de aquellas especies que desde el punto de vista taxonómico se encuentran más próximas entre sí.

A esta misma conclusión llegan Kumaratilake y Thompson (1979)(59) en su estudio comparativo, mediante geles de poliacrilamida, de las proteínas solubles de distintas especies de cestodes. Así, estos autores, encuentran perfiles proteicos específicos para **Taenia crassiceps**, **Mesocestoides corti**, **Echinococcus granulosus** y **Spirometra erinacei**, no sorprendiéndose por estas diferencias en la constitución génica de estos organismos que vendrían justificadas por su separación taxonómica.

Evans (1971)(35) estudió la estabilidad de los patrones proteicos y enzimáticos de especies de **Aphelenchus** bajo distintas condiciones ambientales y procedentes de distintos hospedadores. Concluyó que "los patrones proteicos y enzimáticos de extractos de tejido de nematodos tienen el potencial de ser usados como caracteres taxonómicos estables". Hussey y col (1972)(55) citó perfiles proteicos y enzimáticos muy similares para distintas poblaciones de la misma especie de **Meloidogyne**, aunque las poblaciones procedieran de regiones geográficas muy separadas y tuvieran distintos hospedadores.

Los resultados obtenidos por Yoshimura (1979)(126) también indican una gran estabilidad de los caracteres bioquímicos de los parásitos frente a las condiciones ambientales. Investigó las proteínas totales de distintas especies de **Paragonimus**

procedentes de distintas especies de hospedadores, como por ejemplo, perro y gato, encontrando perfiles proteicos prácticamente idénticos, no existiendo diferencias significativas en el perfil proteico entre gusanos procedentes de distintas regiones geográficas.

V.B. Discusión del patrón isoenzimático de la LDH en Dictyocaulus filaria y Dictyocaulus viviparus.

La LDH cataliza la interconversión de piruvato a lactato en la ruta glucolítica y sirve como una importante reserva del coenzima oxidado (NAD) durante períodos transitorios de anaerobiosis (Market & Ursprung, 1962)(74).

Se han observado dos posibles fenotipos tanto en el patrón isoenzimático de la LDH en *D. filaria* procedente de España como de Eslovaquia. El primer fenotipo se caracteriza por la presencia de 5 bandas de las cuales 4 presentan migración anódica y 1 de ellas migración catódica apareciendo la banda intermedia fuertemente teñida. Este tipo de patrón fue observado en la mayoría de los individuos ensayados, no habiéndose detectado, en ningún caso, ningún individuo con una sola banda; por lo tanto, y teniendo en cuenta, la ley de equilibrio de poblaciones de Hardy-Weinberg, no podría considerarse este patrón como un estado heterocigoto de un gen codificando una proteína tetramérica, ya que en ningún caso se observó estado de homocigosis para ese gen. Este patrón observado en *D. filaria* coincide con el patrón presente en aves y mamíferos, donde la enzima (LDH) está constituida por 2 subunidades A y B codificadas por 2 loci génicos separados. Las subunidades A y B se asocian al azar para formar 5 formas moleculares tetraméricas que pueden ser visualizadas como 5 bandas distintas mediante electroforesis en gel. Parece que estos dos loci se produjeron por duplicación génica de un ancestro común y que los productos de los 2 loci son aún capaces de reconocerse el uno al otro y entre ellos mismos con igual afinidad

(Ohno y col., 1968)(83). Ohno y col. concluyeron que en la evolución de los vertebrados, la primera duplicación de un locus génico para una subunidad LDH se produjo en estado amandibulados.

Por otra parte, los invertebrados, protistas y bacterias tienen una variedad de LDH, algunas específicas para D-lactato y algunas específicas para L-lactato; estas LDH presentan un peso molecular cuyo rango oscila desde 70.000 hasta aproximadamente 140.000 y presentan una variedad de propiedades cinéticas inusuales (Long y Kaplan, 1968)(70). Selander y Yang (1970)(104) encontraron que la D-LDH en Limulus polyphemus se produce en 6 formas isozímicas que se presentan como grupos de 2 triadas en gel de almidón y sugieren que la D-LDH es un dímero y que las subunidades polipeptídicas de las 2 triadas de isoenzimas están bajo distinto control génico. No obstante, las relaciones evolutivas entre muchas LDH de organismos inferiores y, por lo tanto, su posible relación con la LDH de vertebrados se desconoce hasta el momento (Agatsuma y Tsukii, 1980)(7).

Este tipo de patrón isoenzimático de la LDH observado en **D. filaria** no parece ser frecuente en invertebrados, pues según Pesch (1972) (92) la LDH en Mercenaria se presenta con 1 o 2 bandas sin diferencias fenotípicas entre sexos y controlada por 1 solo gen. Se ha encontrado 1 sola banda de actividad en la LDH del gusano de seda, Hyalopora cecropia y 3 bandas de actividad en un gusano relacionado, Samia cynthia.

Por otra parte, Rechesteiner (1970)(95) sugiere 1 o 2 bandas de la LDH en Drosophila.

En especies parásitas como **Schistosoma mansoni**, tanto los machos como las hembras mostraban 1 sola banda de actividad LDH (Conde del Pino y col., 1966)(26).

En protozoos, tales como Paramecium caudatum, Agatsuma y Tsukii (1980)(7), han descrito patrones de 1 y 3 bandas sugiriendo una estructura dimérica para este enzima, mientras que La Rosa y col. (1992)(60) han encontrado patrones de bandas sencillas para la LDH en *Trichinella*, detectándose 2 alelos distintos. Por otra parte, se ha descrito un patrón de 1 y 5 bandas para la LDH en *Onchocerca volvulus* sugiriendo una estructura tetramérica para la LDH codificada por 1 solo gen.

La presencia de un 2º fenotipo caracterizado por la presencia de 3 bandas de migración anódica, apareciendo la 1ª y la 3ª más fuertemente teñidas, nos hizo sospechar en un principio si éstas eran debidas a la distinta procedencia de las muestras; no obstante, este fenotipo se detectó tanto en muestras procedentes de cabra como de oveja y asimismo en cepas de Eslovaquia y España. El hecho de que al aumentar la concentración de estas muestras pudieran observarse débilmente las isoenzimas ausentes nos confirmaron que los individuos presentando este fenotipo habían sufrido algún tipo de contratiempo (aumento de temperatura, mala conservación, problemas de transporte, etc.) que hizo que la actividad de estos isoenzimas decayera, hecho que fue corroborado posteriormente. Por lo que en *D. filaria*, a la vista de nuestros resultados, sólo existe un fenotipo para la LDH.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente dicho podríamos denominar los distintos isoenzimas de la LDH observados en *D. filaria* como LDH 1, LDH 2, LDH 3, LDH 4, LDH 5, siendo los isoenzimas LDH 1, 2 y 3 los de migración más anódica y a la vez más resistentes a las condiciones adversas. En la figura 14 se representa esquemáticamente la estructura cuaternaria que sugerimos para cada uno de los isoenzimas LDH presentes en esta especie parásita.

El estudio del patrón isoenzimático de la LDH en *D. viviparus* se ha llevado a cabo a partir de cepas procedentes de Eslovaquia. El patrón observado en hembras de esta especie muestra 1 banda de actividad fuertemente teñida y de

migración anódica (Fig. 11 A). Esta banda de actividad no coincide en su migración con ninguna de las isoenzimas de *D. filaria* (Fig 11 C), por lo tanto podríamos considerar a la LDH como un enzima de valor diagnóstico entre las especies de *Dictyocaulus*. No obstante, cuando los extractos se concentran, se observa en *D. viviparus* una 2ª banda anódica ligeramente teñida (Fig 11 D). Este mismo patrón ha sido también observado en *S. mansoni* por Conde del Pino y col. (1966) (26) que encontraron una sola banda compacta de actividad LDH, más una zona de migración anódica observada en machos y hembras de esta especie. Esta zona podría haber representado más isoenzimas que se producían en cantidades tan pequeñas que no se separaban por los métodos utilizados por estos autores. Este mismo hecho fue citado posteriormente por Viyanant y Upathan en 1985(119), quienes encontraron que los patrones enzimáticos de machos y hembras de esquistosomas son similares, pero difieren en la intensidad de la actividad enzimática. Estos mismos autores piensan que puede ser debido a la variación en la cantidad de enzima en los extractos. Ross (1976)(100) encontró que los extractos de 3 machos de *Schistosoma* producían un nivel de actividad LDH superior a la obtenida en los extractos del mismo número de hembras, y la actividad enzimática óptima se obtenía cuando se utilizaban extractos conteniendo 3 machos o 4 hembras.

Este mismo hecho ocurre en los machos de *D. viviparus*, cuyo patrón isoenzimático de la LDH se caracteriza por la presencia de 2 bandas, una de migración anódica (igual que la hembra) y otra de migración catódica (Fig.11 F), esta última sólo podía ser observada en las hembras tras extractos concentrados y dejando tiempos de tinción superiores a los utilizados normalmente lo cual iba en detrimento de la nitidez en la observación de otros isoenzimas (Fig.11 E).

Por lo tanto, tanto en machos como en hembras de *D. viviparus* parece factible suponer que los isoenzimas de la LDH serían presumiblemente 5, al igual que ocurría en el caso de *D. filaria*, sólo que algunos de ellos están en cantidades

tan ínfimas que no pueden ser detectados mediante ensayos a partir de extractos individuales y sin concentración. Esta presunción nos llevaría a sugerir una estructura tetramérica de la LDH, estando esta proteína codificada por 2 genes distintos.

Este hecho podría ser explicado mediante la hipótesis de la subunidad dada por Market y Ursprung (1962)(74) según la cual se asume que el gen A es el primeramente activo en el embrión temprano y da lugar a la LDH-5 (migración catódica). Posteriormente el gen B va aumentando su actividad y va a ser responsable de la LDH-1 (migración más anódica). Ajustando las contribuciones relativas de ambos genes para los polipéptidos A y B, pueden generarse la mayoría de los patrones isoenzimáticos, simplemente por asociación al azar de estos polipéptidos en grupos de 4. Por ejemplo, los patrones para el riñón y el corazón en ratón (predominio de la LDH-1, LDH-2, LDH-3) se obtiene si la subunidad B es 3 o 4 veces más abundante que la A.

Si aceptamos esta hipótesis, en el caso de la LDH en *D. viviparus*, el patrón isoenzimático se ve favorecido por una mayor proporción de genes B que de A, siendo la proporción de este gen B aún mayor en el caso de la hembra que en el macho.

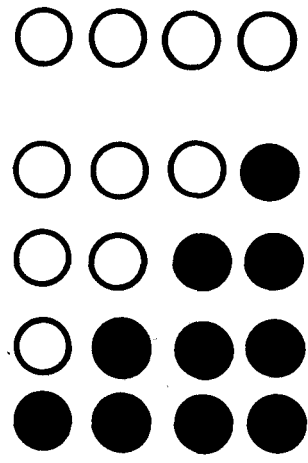
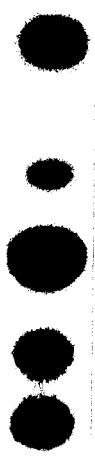
Este asunción nos lleva a sugerir, al igual que en el caso de *D. filaria*, una estructura tetramérica de la LDH, estando esta proteína codificada por 2 genes distintos A y B. Solamente quedaría sin aclarar por qué en *D. viviparus* es la LDH-2 la más frecuentemente observada, en lugar de la LDH-1.

Fig. 14: Representación esquemática de la composición monomérica propuesta para cada una de los isoenzimas (LDH 1 a LDH-5) observados en el patrón isoenzimático de la LDH de *D. filaria*.

○ -> Cadena polipeptídica codificada por el gen A.

● -> Cadena polipeptídica codificada por el gen B.

-
↑
○
↓
+



LDH-5
LDH-4
LDH-3
LDH-2
LDH-1

A

V.C. Discusión del patrón isoenzimático de la MDH en Dictyocaulus filaria y D. viviparus.

El estudio del patrón isoenzimático de la MDH se ha llevado a cabo en cepas de D. filaria procedentes de España y cepas procedentes de Eslovaquia. Ambas cepas presentaron el mismo comportamiento isoenzimático, presentando un carácter totalmente monomórfico (Fig. 12 y 13). La única banda de migración anódica estuvo tanto en machos como en hembras de esta especie siendo su migración más lenta que la correspondiente al extracto de pulmón utilizado como control. Por lo tanto solo se ha detectado un alelo en el patrón isoenzimático de la MDH en esta especie presentándose el gen codificando la proteína en estado homocigótico. Este carácter monomórfico de la MDH ha sido citado en otros nematodos parásitos. Así, La Rosa y col.(1992)(61) cita este carácter en la MDH de distintas especies de Trichinella. Asimismo, Viyanant y Upatham (1985)(119) describen la MDH en Schistosoma mansoni y S. japonicum como un patrón sencillo en el cual se detecta una banda bien teñida y una zona no definida entre pI 7.1-7.2.

Tanto la Lactato deshidrogenasa como la Malato deshidrogenasa (LDH y MDH, respectivamente) se sabe que existen en distintas fracciones isoenzimáticas en tejidos animales y humanos (Vessell & Beam, 1961(116); Market & Ursprung, 1962(74); Lindsay, 1963(69); Thorne y col.,1963(112)). Estas formas múltiples de la LDH y MDH también han sido observadas en tejidos invertebrados (Goldberg y Cather, 1963 a(46); Goldberg y Cather, 1963 b(47)). En 1964, Rhodes y col.(97) estudiaron la MDH Ascaris suum citando la presencia de 3 isoenzimas mediante electroforesis en gel de almidón.

El estudio de la MDH en Echinococcus granulosus llevó a Lymbery & Thompson (1988) (68) a concluir que la MDH producía bandas múltiples, pero en ausencia de una variación independiente, estas bandas se interpretaban como los productos de un locus sencillo.

El patrón isoenzimático de la MDH en *D.viviparus* presentó 2 fenotipos distintos consistentes cada uno de ellos en una sola banda de migración anódica más lenta que la observada en el extracto de pulmón utilizado como control (Fig. 13). Ambos fenotipos fueron interpretados como los 2 alelos de un mismo gen en estado homocigótico. No se observó heterocigosis, por lo que no podemos sugerir nada respecto a la posible estructura de este enzima en *D.viviparus*, si bien los estudios llevados a cabo por otros autores apuntan hacia una estructura dimérica para la MDH en invertebrados.

Por otra parte, el fenotipo A de *D. viviparus* coincidía exactamente con el único fenotipo observado en *D. filaria* (Fig. 12) por lo que esta enzima no tiene ningún valor diagnóstico entre especies distintas del género *Dictyocaulus*.

En *Teladorsagia circumcincta*, Gasnier y col. (1992)(45) describieron 3 fenotipos distintos para la MDH-1, dos de ellos con bandas únicas y un tercero constituido por tres bandas, sugiriendo una estructura dimérica para esta enzima.

CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que hemos llegado a partir de los resultados obtenidos son:

1.- Tras el estudio del perfil proteico en distintas cepas de **Dictyocaulus filaria** mediante técnicas electroforéticas podemos concluir, que no existen diferencias significativas entre ellas.

2.- El estudio del perfil proteico de **Dictyocaulus filaria** y **Dictyocaulus viviparus** mediante técnicas electroforéticas, reveló la presencia de tres bandas diferenciales poco significativas en esta última especie.

3.- A la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que el estudio del perfil proteico entre cepas de **Dictyocaulus filaria**, así como entre especies del género **Dictyocaulus** no debe de utilizarse como una técnica de gran valor diagnóstico.

4.- Tras el estudio del patrón isoenzimático de la LDH en **Dictyocaulus filaria** podíamos concluir que éste es el mismo tanto en individuos procedentes de Capra hircus como de Ovis aries. Asimismo no se observaron diferencias isoenzimáticas entre los dos sexos.

5.- El patrón de isoenzimas de la LDH en **Dictyocaulus filaria** se caracterizó por la presencia de 5 isoenzimas: 4 de migración anódica y 1 de migración catódica tanto en la cepa española como la procedente de Eslovaquia.

6.- Los ensayos llevados a cabo en los geles de poliacrilamida corroboran los resultados obtenidos en geles de almidón observandose en aquellos la presencia de 4 bandas de migración anódica, para la LDH en **Dictyocaulus filaria**.

7.- Tras el estudio del patrón isoenzimático de la LDH en **Dictyocaulus viviparus** podemos concluir que existen diferencias isoenzimáticas entre machos y

hembras de esta especie.

8.- El patrón isoenzimático de la LDH en machos de **Dictyocaulus viviparus** se caracterizó por la presencia de dos bandas: una de migración anódica y otra de migración catódica, ésta última más débilmente teñida.

9.- Un sólo isoenzima de migración anódica se observó en las hembras de **Dictyocaulus viviparus**, por lo tanto, y a la vista de los resultados obtenidos podemos concluir que el patrón isoenzimático de la LDH en **Dictyocaulus viviparus** se ve influenciado por el sexo.

10.- El patrón de isoenzimas de la LDH observado en **Dictyocaulus filaria** y **Dictyocaulus viviparus** es netamente diferente, por lo cual podemos concluir que esta enzima es de gran valor diagnóstico entre estas especies.

13.- El estudio de la MDH en **Dictyocaulus filaria** nos permite concluir el carácter monomórfico de esta enzima en ambas cepas.

12.- Tras los estudios llevados a cabo en **Dictyocaulus viviparus**, concluimos que existen dos fenotipos en el patrón isoenzimático de la MDH, caracterizado cada uno de ellos por una sólo banda de migración anódica, coincidiendo uno de éstos con el observado en **Dictyocaulus filaria**.

BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- AGATSUMA, T. (1981). Electrophoretic studies on glucose phosphatase isomerase and phosphogluconate in two types of *Anisakis* larvae. *Inter. J. Parasitol.* 12, (1): 35-39.
- 2.- AGATSUMA, T. (1981). Electrophoretic demonstration of polymorphism of glucose phosphate isomerase in natural populations of *Paragonimus miyazakii*. *J. Parasitol.*, 67: 452-454.
- 3.- AGATSUMA, T. & HABE, S. (1985). Electrophoretic studies on enzymes of diploid and triploid *Paragonimus westermani*. *J. Parasitol.*, 91: 489-497.
- 4.- AGATSUMA, T.; HABE, S.; KAWASHIMA, K. & BLAS, B. L. (1988). Population genetic studies on isozymes in *Paragonimus westermani* from the Philippines. *J. Parasitol.* 37(4): 195-202.
- 5.- AGATSUMA, T. & SUZUKI, N. (1981). Electrophoretic studies on enzymes in *Paragonimus* sp. I. Comparison of isozymes patterns between *Paragonimus ohirai* and *Paragonimus miyazakii*. *Jpn. J. Parasitol.* 30: 37-43.
- 6.- AGATSUMA, T. & TAKEUCHI, T. (1976). Genetic control of LDH isozymes in the house fly, *Musca domestica*. *Biochem. Genet.* 14: 5-6.
- 7.- AGATSUMA, T. & TSUKII, Y. Genetic control of LDH isozymes in *Paramecium caudatum*. *Biochem. Genet.* 18: 1-2.
- 8.- ANDREWS, R. H.; BEVERIDGE, ADAMS, M. & BAVERSTOCK, P.R. (1989). Genetic characterization of the three species of *Onchocerca* at 23 enzymes loci. *J. Helminthol.* 63: 87-92.

-
- 9.-ANDREWS, R.H.; ADAMS, M.; BOREHAM, P.; MAYCHOFER, G. & MELONI, B. P. (1989). *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *J. Parasitol.* 19 (2): 183-190.
- 10.- ANDREWS, R.H. & BEVERIDGE, I. (1990). Apparent absence of genetic differences among species of *Teladorsagia* (Nematoda: Trichostrongylidae). *J. Helmit.* 64: 290-294.
- 11.- ARME, C. (1975). Tapeworm- host interactions. *Symp. Societ. Experim. Biol.* 1: 505-532.
- 12.- AUGUSTINSSON, K.B. (1961). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 94: 884-860. (Citado por King 1968).
- 13.- AYALA, F.; JEFFREY, R.; POWELL, R. & TRACEY, M.L. (1972). Enzyme variability in the *Drosophila willistoni*. Group V. Genetic variation in natural populations of *Drosophila equinoxialis*. *Genet. Res.* 20: 19-42.
- 14.- BAKER, N.F. & FISK, R.A. (1976). Seasonal occurrence of infective nematode larvae in California Sierra foothill pastures grazed by cattle. *Am. J. Vet. Res.* 47 (8): 1680-1685.
- 15.- BIO-RAD LABORATORIES MANUAL. Catalogo nº 170. 3930-3935.
- 16.- BOBEK, L.A.; LOVERDE, P.T. & REKOSH, D.H. (1989). *Schistosoma haematobium*: analysis of eggshell protein genes and their expression. *Exp. Parasitol.* 68: 17-30.
- 17.- BOISSEZON, B. & JELNES, J.N. (1982). Isozyme studies on cercarie from

monoinfections and adults worms of *Schistosoma mansoni* (10 isolates) and *S. rodhain* (one isolate) by horizontal polyacrilamide gel electrophoresis and staining of eight enzymes. *Parasitenkd.* 67: 185-196.

18.- BOYD, J.W. (1961). *Biochem. J.* 81: 434-441.(Citado por King 1968).

19.- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 248-254.

20.- BRYANT, C. & FLOCKHART, H.A. (1986) Biochemical strain variation in helminths. *Adv. Parasitol.* 25: 275-319.

21.- BULLINI, L.; NASCETTI, G.; CIAFRE, S.; RUMORE, F. & BIOCCHA, E. (1979). Recherche cariologique et électroforétique sur *Parascaris univalens* e *P. equorum*. Estratto dal fasc. 3-4. serie VIII, vol. LXV - Ferie 1978. 151-159.

22.- BULLINI, L. (1985). The electrophoretic approach to the study of parasites and vectors. *Parasit.* 27 1-11.

23.- BURSEY, C.C.; MCKENZIE, J.A. & BURT, M.D. (1980). Polyacrilamide gel electrophoresis in the differentiation of *Taenia* (Cestoda) by total protein. *J. Parasitol.* 10: 167-174.

24.- BYLUND, G.R. & DJUPSUND, B.M. (1977). Protein profiles as an aid to taxonomy in the genus *Diphyllobothrium*. *Z. Parasitenkd.* 51: 241-247.

25.- COLES, C.G. (1970). A comparison of some isoenzymes of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*. *Comp. Biochem. Physiol.* 33: 549-558.

-
- 26.- CONDE DEL PINO, E.; PEREZ-VILAR, H.; CINTRON-RIVERA, A.A. & SEÑERIZ, R. (1966). Studies in *Schistosoma mansoni*, I. Malic and Lactic dehydrogenase of adults worms and cercariae. *Exp. Parasit.* 18: 320-326.
- 27.- CORDEIRO, M.M. & GAZZINELLI, G. (1979). *Schistosoma mansoni*: resolution and molecular weight estimates of tegument Glucoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Exp. Parasitol.* 48: 337-344.
- 28.- CUTILLAS, C.; RODRIGUEZ, B. & GUEVARA, D.C. (1992). Isoenzymatic pattern and structure of glutamate dehydrogenase from *Ascaris suum*. *J. Helmintol.* 66: 310-312.
- 29.- CUTILLAS, C.; VALERO, A.; GONZALEZ-CASTRO, J. & GUEVARA, D.C. (1985). The spermatogenesis of *Dictyocaulus filaria* (Nematoda, Trichostrongyloidea). *J. Parasitol.* 71 (4): 500-503.
- 30.- CUTILLAS, C.; RODRIGUEZ, B.; GERMAN, P.; GUEVARA, D.C. (1993). Isoenzymatic pattern of Glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Ascaris suum*. *J. Helminthol.* 67.
- 31.- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. (1985). Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 17 (1): 6-20.
- 32.- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. (1987). Enzyme relations and evolution in the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Tylenchida). *J. Nematol.* 19 (1): 8-18.
- 33.- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. (1988). Genetic analysis of esterase polymorphism in the Soybean Cyst Nematode, *Heterodea glycines*. *J. Nematol.* 20 (3): 486-492.

-
- 34.- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. (1990). Isoenzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 22 (1): 10-15.
- 35.- EVANS, A.A.F. (1971). Taxonomic value of gel electrophoresis of proteins from mycophagus and plant-parasitic nematodes. *J. Biochem.* 2: 72-79.
- 36.- FINE, J.M.; MOURAY, H. & MORETTI, J. (1962). *Clin. Chim. Act.* 7: 346-354. (Citado por King 1968).
- 37.- FLETCHER, M. & LOVERDE, P.T. (1981). *Schistosoma mansoni*: Electrophoretic characterization of strain selected for different levels of infectivity to snails. *Exp. Parasitol.* 52: 362-370.
- 38.- FLOCKHART, H.A. (1986). *Trichinella* speciation. Reprinted from *Parasitology today.* 2, (1):1-3.
- 39.- FLOCKHART, H.A.; CIBULSKIS, R.E.; KARAM, M. & ALBIEZ, J. (1986). *Onchocerca volvulus*: enzyme polymorphism in relation to the differentiation of forest and savannah strains of this parasite. *Trop. Med. Hyg.* 80: 285-292.
- 40.- FLORES, M. (1981). Enfermedades parasitarias: incidencia económica. El campo. *Boletín de información agraria del Banco de Bilbao.* Septiembre-
Noviembre, nº 83: 1-15.
- 41.- FONDEVILA, A. (1978). El mantenimiento de la variabilidad genética de las poblaciones. *I. & C. (I)*: 94-103.
- 42.- FREEMAN, W.H. (1982). *Physical Biochemistry applications to Biochemistry and molecular Biology.* Cap. 9. Electrophoresis. Edited by W.M. Freeman and company. San Francisco.

-
- 43.- FUKUMOTO, S.; NAGAI, S.; YAZAKI, H.; KAMO, D. & YAMAGUCHI, T. (1988). The molecular phylogenetic tree of the genus *Trichinella* constructed from isozyme patterns. *Parasitol. Res.* 74: 574-580.
- 44.- FUKUMOTO, S.; TAKECHI, M.; KAMO, D.; YAMAGUCHI, T. (1987). Comparative studies on soluble profiles and isozyme patterns of seven *Trichinella* isolates. *J. Parasitol. Res.* 73: 352-357.
- 45.- GASNIER, N.; CABARET, J. & MOULIA, C. (1992). Allozyme variation between laboratory reared and wild populations of *Teladorsagia circumcincta*. *J. Parasitol.* 22, (5): 581-587.
- 46.- GOLDBERG, E. & CATHER, J.N. (1963)a. Molecular heterogeneity of lactic dehydrogenase during development of the snail *Argbriccinum oregaense* Redfield. *J. Cel. Comp. Physiol.* 61: 31-35.
- 47.- GOLDBERG, E. & CATHER, J.N. (1963b). Multiple molecular forms of malate dehydrogenase in molluscan ova. *Amer. Zool.* 3: 486-489.
- 48.- HARRIS, H. (1966). Enzyme polymorphisms in man. *Proc. Roy. Soc. London* 164 B: 298.
- 49.- HERMOSO, R.; VALERO, A.; LEON, P. & MONTEOLIVA, M. (1983). Análisis comparativo de *Trichuris suis* y *T. ovis* por electroforesis de enzimas. *Rev. Iber. Parasitol.* 43 (3): 299-303.
- 50.- HILL, B.R. (1958). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 75: 304-310.(Citado por King 1968).
- 51.- HUBBY, J.L. (1963). Protein difference in *Drosophila* I. *Drosophila melanogaster*. *Genet.* 48: 871-879.

-
- 52.- HUBBY, J.L. & THROCKMORTON, L.H. (1965). Protein differences in *Drosophila* II. Comparative species genetics and evolutionary problems. *Genet.* 52: 203-215.
- 53.- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.E. (1966). A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudobscura*. *Genetics.* 54: 577-594.
- 54.- HUNTER, R.L. & MARKERT, C.L. (1957). Histo-chemical demonstration of isozymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science.* 125: 1294-1295.
- 55.- HUSSEY, R.S.; SASSER, J.N.; HUISINGH, D. (1972) Disc electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *J. Nematol.* 4: 183-189.
- 56.- JELNES, J.E. (1983). Phosphoglucose isomerase: a sex-linked character in *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 69 (4): 780-781.
- 57.- JHONSON, F.M.; KONAPI, C.G.; RICHARDSON, H.R.; WHEELER, M.R. & STONE, W.S.(1966) An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light *Drosophila ananassae* strains from American and Western Samoa. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 56: 119-125.
- 58.- KING, J. (1968). *Enzimología clínica práctica*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- 59.- KUMARATILAKE, L.M. & THOMPSON, C.A.(1979). A standardized technique for the comparison of tapeworm soluble proteins by thin-layer isoelectric focusing in polyacrilamide gels, with particular reference to *Echinococcus granulosus*. *Science tools*, 26: 21-24.

-
- 60.- KRUGER, F.J. (1989). Enzyme polymorphism in *Schistosoma matteei* from cattle in the Eastern Transvaal Lowveld. *J. Helmintol.* 63: 191-196.
- 61.- LA ROSA, G.; POZIO, E.; ROSSI, P. & MURRELL, K.(1992). Allozyme analysis of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *J. Parasitol.* 78(4): 641-646.
- 62.- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.
- 63.- LATNER, A.L. & SKILLER, A.W.(1961). *Lancet* 1286-1288. (Citado por King 1968).
- 64.- LE RICHE, P.D. & SEWELL, M. (1978). Identification of *Echinococcus granulosus* strains by enzyme electrophoresis. *Res. Vet. Sci.* 25: 247-248.
- 65.- LEHNINGER, A.L. (1979). *Bioquímica*. 2ª ed. Ed. Omega S. A. Barcelona.
- 66.- LESLIE, J.F.; CAIN, G.D.; HEFFE, G.K. & VRIJENHOEK, R.C.(1982). Enzyme polymorphism in *Ascaris suum*. *J. Parasitol.* 84(4): 576-587.
- 67.- LEWIS, L.A.(1966). Thin-layer starch gel electrophoresis. A simple accurate method for characterization and quantitation of protein components. *Clin. Chem.* 12: 596.
- 68.- LYMBERY, A.J. & THOMSON, T.C.(1988). Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australia. *J. Parasitol.* 18: 803-811.
- 69.- LINDSAY, D.T.(1963). Isozymic patterns and properties of Lactate

dehydrogenase from developing tissues of the chicken. J. Exp. Zool. 152: 75-81.

70.- LONG, G.L. & KAPLAN, N.O.(1968). D-Lactate specific pyridine nucleotide-linked lactate dehydrogenase in animals. Science 162: 685.

71.- LLEONART, F. (1972). Influencia del levamisol en la productividad de los corderos de engorde. Terapeutica y veterinaria.

72.- MANIATIS, T.; FISTSCH, E.F. & SAMBROOK, J. (1982). Gel electrophoresis. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory.

73.- MARKERT, C.L. & MOLLER, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissues, ontogenic and species specific patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. 45: 753-763.

74.- MARKERT, G.L. & URSPRUNG, H. (1962). The ontogeny of isozyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse. Dev. Biol. 5: 363.

75.- MARTINEZ GOMEZ, F. (1983). Experiencia con un método nuevo para el tratamiento y control de la gastroenteritis parasitaria en bovinos de carne explotados en régimen extensivo. Rev. Iber. Parasitol. 43: 387-399.

76.- MURRELL, K.; STRINGFELLOW, F.; DAME, A.; LEIBY, C. DUFFY, C. AND SCHAD, G.A. (1987). *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem II. Evidence for natural transmission of *Trichinella spiralis* from domestic swine to wildlife. J: Parasitol. 73: 103-109.

77.- MYDYNski, L.J. & DICK, T.A. (1985). The use of enzyme polymorphisms to identify genetic differences in the genus *Trichinella*. J. Parasitol. 71 (5): 671-677.

-
- 78.- NADLER, S.A. (1987). Genetic variability in endoparasitic helminths. *Parasitology Today* 3: 154-155.
- 79.- NASCETTI, G.; GRAPPELLI, C.L. & BULLINI, L. (1979). Ricerche sul differenziamento genetico di *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum*. *Strato del f.a.s.c. 6, serie VIII, vol. LXVII. Acc. Nazionale dei Lincei*, 67(6): 457-465.
- 80.- NASCETTI, G.; ORECCHIA, P.; PAGGI, L.; CAGNOLATTI, V.; GRAPPELLI, C. & BULLINI, L. (1981). Ricerche sul differenziamento genetico dei generi *Toxocara* e *Neoascaris*. *Parasitol. XXIII*: 206-207.
- 81.- NASCETTI, G.; PAGGI, L.; ORECCHIA, P.; SMITH, J.W.; MATIUCCI, S. & BULLINI, L. (1986). Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (*Ascaridida anisakidae*) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *J. Parasitol. Vol. 16*(6): 633-640.
- 82.- NEI, M. (1972). Genetic distance between populations. *Amer. Nat.* 106: 283-292.
- 83.- NERAD, T.A.; DAGGETT, P.M. (1979). Starch gel electrophoresis an effective method for separation of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* strains. *J. Protozool.* 26(4): 613-615.
- 84.- OHNO, S.; WOLF, U. & ATKIN, N.B. (1968). Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas* 59: 169.
- 85.- ORTEGA, J.E. & VALERO, A. (1989). Diferenciación genética entre dos poblaciones del complejo *Bothriocephalus scorpii* (*Pseudophyllidea: Bothriocephalidae*). *Rev. Iber. Parasitol.* 49: 139-145.

-
- 86.- OXFORD, G.S. & ROLLINSON, D. (1983). Protein polymorphism: Adaptive and taxonomic significance. *System. Ass. Spec.* 24, Acad. Press, London, 405p.
- 87.- PASTEUR, G. (1974). Génétique biochimique et populations ou: pour quoi sommes-nous polymorphes? In La motte, L. (ed.) *Le polymorphisme dans le règne animal*. Société zoologique de France, Paris, 473-531.
- 88.- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J. & BRITTON-DAVIDIAN, J. (1988). Practical isoenzyme genetics. Ellis Horwood series in Gene Technology. Halsted Press: a division of John Wiley & sons. New York.
- 89.- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTON-PAGES, J.R. & THERON, A. (1990). Analysis and comparison of cercarial emergence rhythms of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. bovis* and hybrid progeny. *J. Parasitol.* Vol. 20 n° 2: 193-197.
- 90.- PECES, A.J. (1987). Lactate dehydrogenase in: methods in Clinical Chemistry. The C.V. Mosby Company St. Louis: 903-906.
- 91.- PERNIN, P.; CARIOU, M.L. & JACQUIER, A. (1985). Biochemical identification and phylogenetic relationships in free-living amoebas of the genus *Naegleria*. *J. Protozool.* 32(4): 592-603.
- 92.- PESCH, G. (1972). Isozyme of lactate dehydrogenase in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.* 43 B: 33.
- 93.- POULIK, H. D. (1957). Starch-gel immunoelectrophoresis. *J. Immunol.* 83: 502.
- 94.- POZIO, E. (1987). Isoenzymatic typing of 23 *Trichinella* isolates. *Trop. Med.*

Parasitol. 38: 111-116.

95.- RECHESTEINER, M. (1970). *Drosophila* lactate dehydrogenase: Partial purification and characterization. J. Insect. Physiol. 16: 957.

96.- RESPALDIZA CARDEÑOSA, E. (1967). Valoración económica de las parasitosis. Veterinaria 32: 227-248.

97.- RHODES, M.B.; MARSH, C.L. & KELLEY, G.W. Jr. (1964). Studies in Helminth Enzymology. III. Malic dehydrogenase of *Ascaris suum*. Exp. Parasit. 15: 403-409.

98.- RODRIGUEZ, B.; CUTILLAS, C.; GERMAN, P. & GUEVARA, D. (1991). Glucose 6-phosphate dehydrogenase: Isoenzymatic pattern in *Oesophagostomus venulosum*, *Trichuris ovis* and *Trichuris suis*. J. Helminthol. 65 (4): 289-295.

99.- ROLLINSON, D.; IMBERT-ESTABLET, D. & ROSS, G.C. (1986). *Schistosoma mansoni* from naturally infected *Rattus rattus* in Guadalupe: identification, prevalence and enzyme polymorphism. J. Parasitol. 93: 39-53.

100.- ROSS, G.C. (1976). Isoenzymes in *Schistosoma* spp.: LDH, MDH & Acid Phosphatase separated by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. Comp. Biochem. Physiol. 55B: 343-346.

101.- RUFF, M.D.; DAVIS, G.M. & WERNER, J.K. (1973). *Schistosoma japonicum*: Disc electrophoretic protein patterns of Japanese, Philippine and Formosan strains. Exp. Parasitol. 33: 437-446.

102.- SAXENA, J.K.; BHARADWAJ, N.; RATHAUR, S. & GHATAK, S. (1986). Purification and characterization of lactate dehydrogenase from *Setaria cervi*. Ind.

-
- J. Med. Res. 84: 264-269.
- 103.- SAYRE, F.W. & HILL, B.R. (1957). Proc. Soc. exp. Biol. Med. 96: 695-697. (Citado por King 1968).
- 104.- SELANDER, R.K. & YANG, S.Y. (1970). Horseshoe crab lactate dehydrogenase: Evidence for dimeric structure. Science. 169: 179.
- 105.- SHAW, C.R. & PRASSAD, R. (1970). Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. Biochem. Genet. 4: 297-320.
- 106.- SMITHIES, O. (1955). Zone electrophoresis in starch gel: group variation in the serum proteins of normal human adults. J. Biochem. 61: 629.
- 107.- TAIT, A. (1985). Genetics of protein variation in populations of parasitic protozoa. Ecol. Genet. Host-Parasite Interaction: 185-203.
- 108.- TANSKESLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds.) (1983). Polymorphisme biochimique de la palourde, *Venerupis decusata*, de l'étang du Prévost (France). Oceanol. Acta 5: 395-397.
- 109.- TARAZONA, J.M. (1970). Valor del tratamiento antihelmíntico en las tricostrongiloidiosis ovinas subclínicas. Rev. Patronato Biol. Anim. 14: 35-25.
- 110.- THOMPSON, R.C.A. (1988). Intraspecific variation and epidemiology. Parasites in focus. Springer, Berlín.
- 111.- THORNE, C.J.R. (1960). Biochem. Biophys. acta 42: 175-176. (Citado por King 1968).

-
- 112.- THORNE, C.J.R. ; GROSSMAN, L.I. & KAPLAN, N.O. (1963). Starch gel electrophoresis of malate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta* 73: 193-203.
- 113.- URIARTE, J. (1982). Parasitos gastrointestinales de terneros en praderas de regadio. Interés de un tratamiento antihelmíntico a la entrada en cebadero. *An. Inst. Nac. Inv. Agrar. Serie Ganadera*, 14: 133-142.
- 114.- VALERO, A.; PRETEL, A. & ROMERO, J. (1983). Estudio citogenético comparativo de *Trichuris suis* y *Trichuris ovis*. *Rev. Iber. Parasitol.* 43 (1): 51-59.
- 115.- VALERO, A.; HERMOSO, R.; MONTEOLIVA, M. (1984). Electrofocusing of soluble proteins of *Hymenolepis nana fraternus* and *Hymenolepis diminuta*. *Rev. Iber. Parasitol.* 2: 213-214.
- 116.- VESELL, E.S. (1961). Significance of the heterogeneity of lactic dehydrogenase activity in human tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 94: 877-889.
- 117.- VESELL, E.S. & BEARN, A.G. (1957). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94: 96-99. (Citado por King 1968).
- 118.- VESELL, E.S. & BEARN, A.G. (1958). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 75: 286-291. (Citado por King 1968).
- 118.- VIYANANT, V. & UPATHAN, E.S. (1985). Isoenzyme analyses of Malaysian *Schistosoma*, *S. mekongi* and *S. japonicum* by electric focusing in polyacrylamide gel. *J. Trop. Med.* 16 (4): 539-545.
- 119.- VRIHENHOEK, R.C. (1975). Effects of parasitism on the esterase isozyme patterns of fish eyes. *Comp. Biochem. Physiol.* 50B: 75-76.

-
- 121.- VRIHENHOEK, R.C. (1978). Genetic differentiation among larval nematodes infecting fishes. *J. Parasitol.* 64(5): 790-798.
- 122.- WEBB, E.C. (1960). Proceedings of the Fourth International Congress on Clinical Chemistry: 89-90. Livingstone, Edinburgh. (Citado por King 1968).
- 123.- WIELAND, T & PFEIDERER, G. (1957). *Biochem. Z.* 329: 112-116. (Citado por King 1968).
- 124.- WROBLEWSKI, F. & GREGORY, K. (1960). Proceedings of the Fourth International Congress on Clinical Chemistry: 62-76. Livingstone, Edinburgh (1961). (Citado por King 1968).
- 125.- XIU-ZHEN, W.; GUANG-MIN, Y.; FENG-LIN, W.; YONG-FANG, S.; XIAN-KUN, Z. & ZHOUNG-GIN, H. (1983). Malate dehydrogenase isozymes in *Schistosoma japonicum* (Chinese Mainland strain) by electrophoresis. *Chin. J. Med.* 96(7): 507-510.
- 126.- YARZABOL, L.; PETRALANDA, Y.; ARANGO, H.; LOBO, L. & BOTTO, C. (1983). Acid Phosphatase patterns in Microfilariae of *Onchocerca volvulus* from the Upper Orinoco, Basin, Venezuela. *Trop. Med. Parasit.* 34: 109-112.
- 127.- YOSHIMURA, K. (1969). *Paragonimus westermani*, *P. ohirai* and *P. miyazakii*: electrophoretic comparison whole body proteins. *Exp. Parasit.* 25: 118-130.
- 128.- ZEE, D.S. & ZINKHAM, W.H. (1968). Malate dehydrogenase in *Ascaris suum*: Characterization, ontogenic and genetic control. *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 574-584.

129.- ZEE, D.S.; ISENSEE, H. & ZINKHAM, W.H. (1970). Polymorphism of malate dehydrogenase in *Ascaris suum*. *Biochem. Genetic.* 4: 253-257.

130.- ZURITA, M.; BIEBER, D. & MANSOUR, T.E. (1989). Identifications, expression and in situ hybridization of an eggshell protein gene from *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem Parasitol.* 37: 11-18.