

La Creatinina Fosfoquinasa en la Fase Aguda de la Enfermedad de Chagas Experimental en Ratones Blancos (*Mus musculus*)

Dr. Pedro Mármol León*

INTRODUCCION

Es notable el progreso de la aplicación clínica de las determinaciones enzimáticas en suero, para comprender la fisiopatología y ayudar al diagnóstico de múltiples enfermedades.

Las enzimas son de origen tisular y no hay pruebas que permitan suponer que éstas puedan sintetizarse a nivel del suero, siendo éste sólo un receptáculo pasivo, al cual llegan las enzimas de los tejidos, incluyendo las de los elementos celulares de la sangre. Su concentración en el suero es constante en condiciones no patológicas; por el contrario la lesión aguda de un órgano determinado, da lugar a la elevación de los niveles de ciertas enzimas, prueba evidente de destrucción tisular resultante de necrosis, isquemia, infección, traumatismos, etc., factores que condicionan la liberación de las enzimas contenidas en los tejidos, y la aparición en el suero del diagrama enzimático característico del órgano lesionado.

* Profesor agregado IV de la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

De las enzimas de uso común en el diagnóstico, las más utilizadas frecuentemente en Medicina Clínica son: Amilasa, Transaminasa glutámico-oxalacética y pirúvica, Dehidrogenasa láctica y Fosfatasas. La dosificación de las cantidades séricas de algunas de estas enzimas, encuentran su máxima aplicación en las enfermedades del hígado y miocardio, sin embargo, en los últimos años se ha multiplicado el número de determinaciones enzimáticas aplicadas al estudio de las enfermedades parasitarias, buscando la obtención de datos útiles con finalidad diagnóstica y de interpretación fisiopatológica.

Recientemente la Creatina Fosfoquinasa (CPK), por su mayor especificidad y precocidad en los infartos del miocardio y enfermedades del músculo esquelético, ha adquirido una gran importancia en el diagnóstico, pronóstico y evolución de estas miopatías. Esta enzima descubierta por K. Lohmann en 1934¹, es considerada una enzima muscular, cuya tasa en el músculo esquelético y miocardio es 10 a 20 veces más elevada que en los otros órganos. Fue enunciada por primera vez como de valor diagnóstico en patología clínica por Ebasshi y col.² quienes reportaron su aumento en el suero en la distrofia muscular progresiva. En 1960 Dreyfus y cols.³ demuestran no sólo las elevaciones de la CPK en el suero de pacientes con infarto del miocardio, sino también su sensibilidad y especificidad en las enfermedades miopáticas, confiriéndole a la enzima un valor diagnóstico diferencial importante con los infartos pulmonares y hepatopatías, en las cuales no hay elevación de dicha enzima. Hess y MacDonald⁴ y Hess y col.² comprueban que la CPK es más específica para la determinación del daño miocárdico y músculo esquelético que otras enzimas comúnmente utilizadas en el Laboratorio, como la Dehidrogenasa láctica y las Transaminasas glutámico oxalacética y pirúvica. Dumas y Siegel² sugieren que la CPK puede ser frecuentemente usada como útil en el diagnóstico del daño miocárdico y en especial en casos complicados con insuficiencia cardíaca congestiva.

La Creatina Fosfoquinasa (CPK) se encuentra principalmente en la musculatura esquelética y cardíaca, faltando por completo en los eritrocitos y órganos parenquimatosos⁵.

Con el objeto de comprobar las posibles modificaciones de la Creatina Fosfoquinasa (CPK) en la enfermedad de Chagas experimental en su fase aguda, hicimos dosificaciones de dicha enzima en ratones blancos (*Mus musculus*) aparentemente sanos y en ratones inoculados con **Trypanosoma cruzi**.

MATERIAL Y METODOS

Cepa empleada. La cepa de **Trypanosoma cruzi** empleada tiene origen humano, es la conocida como Cepa Y, aislada por Silva y Nussenzweig⁶ de un caso de enfermedad de Chagas y que mantenemos en nuestro Laboratorio a través de inoculación intraperitoneal de sangre en ratones jóvenes, la cual según Carvalheiro y col.⁷ se muestra altamente virulenta para estos animales, produciendo regularmente infecciones graves en todos los ratones inoculados que presentan alta parasitemia y mueren en más del 95% de los casos; además está dotada de intenso histotropismo, particularmente reticulotropismo.

Animales de experimentación empleados. Utilizamos en nuestras experiencias 65 ratones blancos (30 machos y 35 hembras) aparentemente sanos y 65 inoculados (30 machos y 35 hembras) de 2 a 3 meses de edad; ambas series de ratones mantenidos en las mismas condiciones ambientales.

El procedimiento seguido para la inoculación y obtención de los sueros fue el siguiente:

1.— Utilizamos la prueba del Chipo³, para lo cual hicimos picar ninfas de **Rhodnius prolixus** en 5º estadio evolutivo a ratones infectados.

2.— Una vez que las ninfas se alimentaron hasta repleción total, retiramos la sangre ingerida por ellas por punción abdominal e inoculamos un lote de ratones por vía intraperitoneal a la dosis de 0,2 c.c. para cada uno y conteniendo entre 10 a 20 tripanosomas por campo microscópico, utilizando objetivo 25X y ocular 10X.

3.— Los animales inoculados fueron examinados entre los 6 y 10 días después de la inoculación para la investigación de tripanosomas en sangre tomada de la cola.

4.— Cada lote fue sacrificado entre los 10 y 12 días para la obtención de los sueros e inoculación de un nuevo lote de ratones a partir del lote anterior, siempre utilizando la prueba del Chipo⁸.

5.— La sangría de los animales para la obtención de los sueros se hizo por corte de los vasos axilares previa anestesia y la muestra se obtuvo mediante el uso de tubos de ensayo pequeños (10 x 75), a los cuales se les adaptó un embudo de cartón para facilitar la recolección de la muestra.

6.— Los tubos se dejaron a temperatura ambiente hasta la coagulación de la sangre e inicio de la retracción del coágulo.

7.— Los sueros obtenidos por centrifugación se guardaron en refrigeración hasta el momento de hacer las dosificaciones de la Creatina Fosfoquinasa (CPK), la cual fue practicada dentro de las 24 horas siguientes, para evitar la posible pérdida de actividad, ya que esta enzima es inactivada muy rápidamente a 4°C⁹.

8.— Se practicaron cortes de corazón de los ratones inoculados para estudiar histológicamente las lesiones del miocardio.

Para la dosificación de la enzima (CPK) se utilizó el método de Nuttal y Wedin (modificado)¹⁰ con reactivos de DADE Reagents Inc.¹¹, cuyo fundamento es el siguiente: La Creatina Fosfoquinasa cataliza la transferencia de un grupo fosfato de la adenosina-5-trifosfato a la creatina, formando adenosina-5-difosfato y creatina fosfato. En una reacción acoplada, la quinasa pirúvica cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfato-piruvato a la adenosina-5-difosfato, formando adenosina-5-trifosfato y piruvato. El piruvato producido se hace reaccionar con la 2,4 dinitrofenilhidracina e hidróxido de sodio, para formar la hidrazona pirúvica de gran intensidad de color.

Este color se compara en una curva de calibración construida con patrón de piruvato.

Los resultados se expresan en Unidades Internacionales (U.I.); es decir micromoles de piruvato (equivalentes a creatina fosfato) producidos por litro de suero, por minuto, a 37°C.

RESULTADOS

En la primera serie (ratones sanos), el análisis matemático estadístico nos ofreció los siguientes resultados:

U.I. de Actividad CPK.

Media 306
Desv. Stand. 237.
Error Stand. ± 29.6
Coef. de Var. 77.4
Cif. Lim. Norm. 0-780.

El gráfico Nº 1 nos muestra el histograma de distribución de frecuencia para los ratones sanos.

El análisis matemático estadístico de la segunda serie (ratones inoculados), aportó los siguientes resultados:

U.I. de Actividad CPK.

Media 848
Des. Stand. 516
Error Stand. ± 64.5

El gráfico Nº 2 nos muestra el histograma de distribución de frecuencia para los ratones inoculados.

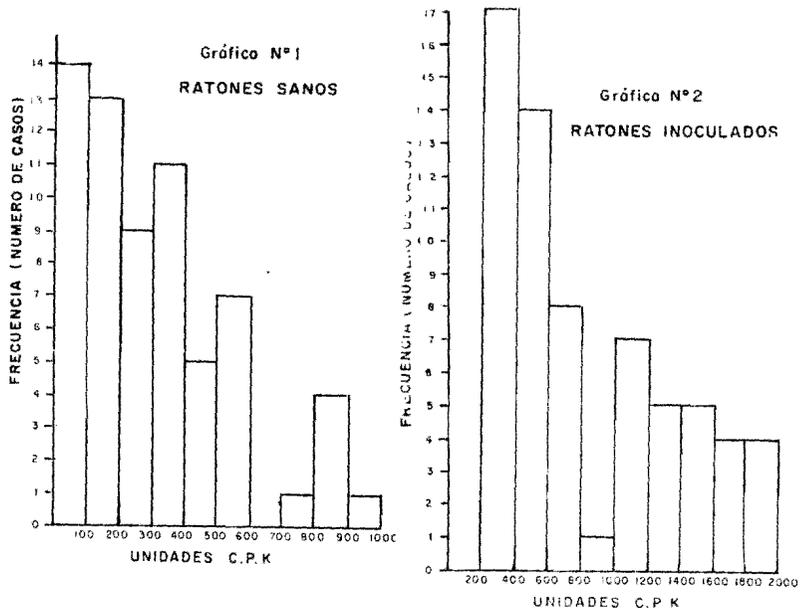
COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

Desde los estudios de Vianna (1911)¹², es bien conocido el proceso de multiplicación y localización tisular del **Trypanosoma cruzi** Chagas, 1909. Margarinos Torres en 1917¹³, estudia las lesiones directas que ocasiona **Trypanosoma cruzi** sobre la fibra muscular cardíaca. Posterior a estos trabajos, la literatura médica se ha enriquecido con numerosos estudios sobre la patogenia del **Trypanosoma cruzi** y su gran afinidad por el músculo estriado y en especial por el miocardio. En estas localizaciones hay alteraciones inflamatorias y degenerativas, que según Zilton A. Andrade¹⁴ son debidas fundamentalmente a la exagerada multiplicación parasitaria. Okumura y col.¹⁵ en una revisión sobre la

patogenia de la enfermedad de Chagas, concluyen por la existencia de una teoría de acción local o focal, una teoría tóxica y una teoría alérgica para explicar la acción del **Trypanosoma cruzi** sobre las varias estructuras del organismo parasitado, en las formas aguda y crónica de dicha enfermedad.

El examen histopatológico realizado en los cortes de corazón de los 65 ratones inoculados, nos mostraron constancia de las lesiones de la fibra muscular cardíaca, muchas de ellas ocupadas por nidos de formas amastigota del **Trypanosoma cruzi**.

Del estudio comparativo de las dos series de ratones (sanos e inoculados), podemos apreciar que la actividad de la Creatina Fosfoquinasa (CPK) se encuentra alterada, ya que de las 65 determinaciones realizadas en los ratones inoculados, el 40% de los casos está por encima de la cifra límite normal y el 93.8% está por encima del promedio normal. (Ver gráficos 1 y 2).



El cálculo del Test de Student demostró, que las alteraciones de la Creatina Fosfoquinasa (CPK) halladas en el análisis matemático estadístico, son independientes del sexo, ya que no

hubo diferencia significativa entre machos y hembras, en cambio para ambas series de ratones (sanos e inoculados), se encontró que P es menor que 0.001, habiendo por lo tanto una diferencia significativa.

Consideramos que los resultados obtenidos aun cuando son de índole experimental, pueden servir de base a un estudio del comportamiento de la Creatina Fosfoquinasa en la enfermedad de Chagas humana en su fase aguda y ser utilizado como un dato complementario de significación para valorar la evolución de dicha enfermedad.

RESUMEN

Se practicaron determinaciones de la Creatina Fosfoquinasa (CPK) en sueros de ratones blancos (*Mus musculus*) aparentemente sanos y en ratones inoculados con la Cepa Y de **Trypanosoma cruzi**, utilizando el método de Nuttal y Wedin (Modificado) y reactivos de DADE Reagents Inc.

Se encontraron alteraciones de la Creatina Fosfoquinasa (CPK) en los ratones inoculados, ya que el 40% de los casos está por encima de la cifra límite normal y el 93.8% está por encima del promedio normal.

El cálculo del Test de Estudent demuestra que las alteraciones halladas en el análisis matemático estadístico, son independientes del sexo, ya que no hubo diferencia significativa entre machos y hembras, en cambio para ambas series de ratones (sanos e inoculados), se encontró que P es menor que 0.001, habiendo por lo tanto una diferencia significativa.

AGRADECIMIENTO

Bio. Gabriel Sulbarán Solís, por su valiosa colaboración en el desarrollo de este trabajo.

Br. José Suárez, por su invalorable ayuda.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Saddy, J. C., Pereira da Silva, J. J., Vieira, W. A. y Coura, J. R. Avaliação da Atividade Enzimática da Creatina-Fosfoquinase

no soro de pacientes com Leptospirose. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. V(6): 322-331, 1971.

2 Sigma Tentative Technical Bulletin N° 520, Nov., 1965. Creatine Phosphokinase (CPK) in Serum and Possibly Other Fluids. Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. 63118. U.S.A.

3 Dreyfus, J. C., Schapira, G., Resnais, J., et Scebat L., La Creatine-Kinase Sérique dans le Diagnostic de L'infarctus Myocardique. Rev. Fr. Etud. Clin. et Biol. V: 386, 1960.

4 Hess, J. W., MacDonald, R. P. Serum Creatine Phosphokinase (CPK) Activity in Disorders of Heart and Skeletal Muscle. (abstract). Annals of Intern. Med. 61(6):318, 1964.

5 López, J. CH. Enzimología. Editorial Científico Médica, Barcelona (España): 357-362, 1969.

6 Silva, L. H. P. y Nussenzweige, V. "Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco". Separata de Folia Clin. et Biol. 20(3): 191-208, 1953.

7 Carvalheiro, J. e Collares, E. "Estudos sobre o comportamento em camundongos, de uma amostra altamente virulenta de Trypanosoma cruzi" (Amostra Y) após passagens em triatomíneos, ratos e culturas. Rev. Bras. Biol. 25(2); 169-175, 1965.

8 Díaz Ungría, C., Gallardo, Z. M. y Yopez, S. Uso de la prueba del Chipo en las investigaciones sobre Trypanosoma cruzi. Rev. Iber. Paras. 26(2): 193-201, 1966.

9 Henley, K. S., Schmidt, E. y Schmidt, F. W. Enzimas en el suero y su valor diagnóstico. Editorial Espaxs, Barcelona (España) p 30. Primera edición española, 1968.

10 Nuttal, F. Q. y Wedin, D. S. J. Lab. and Clin. Med. 68:324, 1966.

11 DADE. Creatine Phosphokinase (CPK). DADE División, American Hospital Supply Corporation. Miami, Florida, U.S.A.

12 Vianna, G. Contribuicao para o estudo da anatomia patologica da molestia de Chagas. Memorias do Inst. Oswaldo Cruz. 111(1): 277-292, 1911. Rio de Janeiro, Brasil.

13 Torres, M. Estudio de miocardio na molestia de Chagas (forma aguda) 1. Alteracoes da fibra muscular cardiaca. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. IX(1): 114-139, 1917. Rio de Janeiro, Brasil.

14 Andrade, Z. A. Doenca de Chagas por um grupo de colaboradores especializados. Organizador e Editor J. Romen Cancado. Belo Horizonte (Brasil), 1969. Capitulo 15. Anatomia Patologica.

15 Okumura, M., Franca, L. C. M. y Correa Netto, A. Comentarios sobre a patogenia da molestia de Chagas. Rev. Hosp. Clin. Sao Paulo, 3: 151-164, 1963.