

13
2eJ.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES



ACTIVIDAD DE CREATINA-CINASA EN LIQUIDO
INTRAQUISTICO DE Cysticercus cellulosa, SEPARA-
CION ELECTROFRETICA DE ISOENZIMAS
BB, MB, MM.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A N :
GUILLERMINA GONZALEZ MANCERA
GABRIEL DELGADO SEGUNDO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	IX
AGRADECIMIENTOS.....	X
RESUMEN	1
A) INTRODUCCION	2
I. Importancia biológica.....	2
II. Determinación de CK.....	5
III. Situación de creatina cinasa en <i>C. cellulosa</i> y en cerdo.....	6
IV. Ciclo de vida y anatomía de <i>C. cellulosa</i>	6
V. Cisticercosis.....	11
B) OBJETIVO	13
C) HIPOTESIS	14
D) METODOLOGIA	15
I.- Obtención y conservación del líquido intravesicular de <i>C. cellulosa</i> y del suero de cerdo.....	15
II.- Método espectrofotométrico	17
III.- Método electroforético	19
IV.- Determinación de proteínas en líquido intravesicular de cisticerco y en suero porcino.....	22
E) RESULTADOS	25
F) DISCUSION	39
G) CONCLUSION	42
H) BIBLIOGRAFIA	43
I) INDICE DE FIGURAS.....	49

RESUMEN.

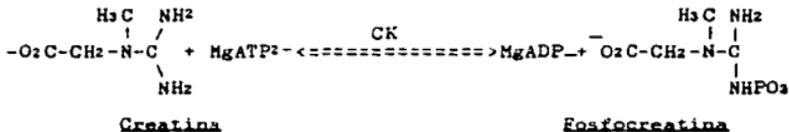
Se desconocen las razones biológicas de la selectiva localización de Cysticercus cellulosae en cerebro, corazón y músculo estriado. La presencia de elevadas concentraciones de creatina cinasa (CK) en el líquido intravesicular ha sugerido la hipótesis de que el parásito absorbe selectivamente CK del medio para su supervivencia. Este trabajo presenta la caracterización electroforética de las diversas isoenzimas de CK: MM, MB y BB en el líquido intravesicular con el objeto de esclarecer su posible origen tisular. Los cisticercos colectados en los rastros de Naucalpan y Ferrería de cerdos masivamente infestados, después de su separación quística se lavaron cuidadosamente con agua destilada, se extrajo el líquido con jeringas de insulina y se transportaron al laboratorio en frascos ámbar a 4 °C. Las muestras se analizaron por los siguientes métodos: CK-CREATINE-KINASE ISOENZYME ELECTROPHORESIS de Lab. BECKMAN y CK-NAC ACTIVADO (prueba UV optimada) de Lab. MERCK aplicando 5 y 100 µL de muestra respectivamente. Después de la electroforésis se tiñeron las isoenzimas de CK con nitro azul de tetrazolium y fenacina metosulfato y las proteínas con rojo de ponceau, cada placa se cuantificó con un densitómetro Beckman. Las actividades enzimáticas del líquido de cisticercos cerebrales fueron: CK-MM con 42.17 UI/L en el 100% de las muestras y CK-BB con 38.49 UI/L en el 17.6% ; musculares CK-MM con 473.09 UI/L en el 100% y CK-MB con 14.65 UI/L en el 5.35% ; cardíacos CK-MM con 61.22 UI/L en el 100%. Los resultados sugieren que la CK-BB y CK-MB representan contaminación tisular; la fracción CK-MM es la única isoenzima de CK que es incorporada por el cisticercos, indicando una gran selectividad de la membrana vesicular.

A). INTRODUCCION.

I.- IMPORTANCIA BIOLOGICA.

A diferencia de la mayoría de otras células, los músculos contienen compuestos diferentes del ATP que pueden almacenar cantidades relativamente grandes en enlaces de fosfatos de alta energía. Una de ellas es creatina, sustancia que contiene nitrógeno y que se encuentra en los músculos de la mayoría de los vertebrados y de algunos invertebrados. La creatina puede aceptar el grupo -O⁻P del ATP y convertirse en creatina fosfato, que se considera como un reservorio de enlaces de fosfatos de alta energía en: músculo, corazón y cerebro, generando ATP cuando aumenta la demanda de este compuesto. Recientes estudios de resonancia magnética nuclear con ³¹P sobre músculo y corazón intactos, han comprobado esta función (1).

Creatina cinasa (CK: adenosina-5'-trifosfato: creatina fosfotransferasa, EC-2.7.3.2) es una enzima que se encuentra generalmente en todos los vertebrados, cataliza la siguiente reacción reversible, (2)



cuya constante de equilibrio es de 0.038-0.042 a pH 8.55 (3). Lehman (4,5), demostró que el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la derecha conforme se eleva el pH.

La purificación parcial de la enzima que cataliza esta reacción fué reportada por primera vez por Banga (3) y Askonas (6).

La creatina cinasa (MM), especialmente la derivada de músculo esquelético de conejo ha sido objeto de gran número de estudios en diversos laboratorios, utilizando métodos fisicoquímicos para conocer la estructura del sitio activo y el mecanismo de transferencia del grupo fosfato (1).

En la fig (1) se muestra el mecanismo de acción de la enzima, sugerido por Crane y modificado posteriormente por Mildvan y Cohn (7), el cual consiste en dos pasos separados: el primero involucra la transferencia del grupo fosfato (1-->2) y el segundo un intercambio de ligando en el metal, acoplado a un cambio conformacional del complejo enzima-metal-nucleotido (2-->3).

La enzima se localiza principalmente en músculo, corazón, cerebro y en menor cantidad en otros tejidos, esta encargada de suministrar energía cuando altos niveles de ATP son requeridos, para las reacciones dependientes de ATPasa por ejemplo: la creatina cinasa esta involucrada en el transporte iónico a través de las membranas del retículo sarcoplásmico (8,9) y de superficie celular y participa en la fagocitosis de macrófagos peritoneales de ratón (10), en el control de la glicólisis, en la respiración mitocondrial durante la contracción muscular, en la liberación de sustancias neurotransmisoras dependientes de ATP en membranas sinaptosomales de cerebro y un nuevo papel estructural ha sido propuesto para explicar la unión de miofilamentos de la línea M de músculo y de las fibras de miosina, lo cual sugiere una función fundamental de la creatina cinasa en el proceso de contracción muscular. Koons y colaboradores (11) localizan por inmunofluorescencia a la creatina cinasa en los husos mitóticos de células no musculares, esto significa que la creatina cinasa suministra energía para la mitosis.

La creatina cinasa citoplásmica de tejidos de mamíferos es un dímero, constituido por las subunidades: tipo muscular (M) y tipo cerebral (B) (Tabla 1). De su combinación resultan tres isoenzimas: MM, MB, BB, cuyos tiempos de vida media son 15, 12 y 3 horas respectivamente (12).

TABLA (1). PESO MOLECULAR PROMEDIO (g/mol) DE LAS SUBUNIDADES "M" Y "B" DE CREATINA CINASA EN EL HUMANO Y EN EL CONEJO. (Refs. 4,9,10,11)

	"M"	"B"
HUMANO	42.750	42.500
CONEJO	41.600	44.250

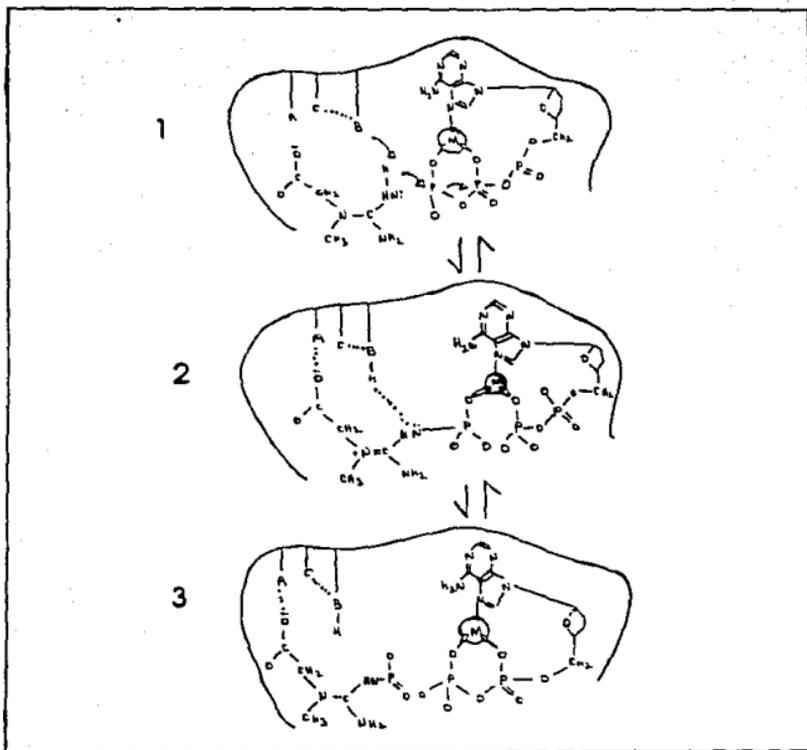


Fig. 1 MECANISMO DE ACCION DE CREATINA CINASA PROPUESTO POR MILDVAN Y COHN (24).

- 1-2) Ocurre la transferencia del grupo fosfato. El metal promueve la electrofiliidad del fosfato.
 2-3) Se lleva a cabo el cambio conformacional en el complejo enzima-metal-nucleotido-sustrato asociado a un cambio de ligando.

- A) Grupo catiónico, posiblemente un grupo α -amino de lisina.
 B) Grupo sulfhidrido esencial.
 C) Grupo básico. Carboxilato ó imidazol.
 M) Metal.

Las isoenzimas (MM, MB, BB) son de gran importancia en diagnóstico clínico, sus niveles en el suero humano se elevan en una gran variedad de enfermedades necrosantes (caracterizadas por células en condiciones de anoxia (16)), incluyendo distrofia muscular e infarto al miocardio y lesiones cerebrales. Las determinaciones de creatina cinasa son más confiables que los electrocardiogramas en el diagnóstico de infarto al miocardio (17,18,19).

II.- DETERMINACION DE CREATINA CINASA.

Un análisis conveniente de creatina cinasa lo representa la desaparición de NADH cuantificada espectrofotométricamente a 340 nm., originalmente desarrollado por Tanzer y Gilvarg (20,21), utilizando piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa, como enzimas acopladas :

CK

- 1).- Creatina + MgATP<=====>MgADP + Fosfocreatina.
Piruvato cinasa
- 2).- MgADP + Fosfoenolpiruvato<=====>MgATP + Piruvato.
Lactato deshidrogenasa
- 3).- Piruvato + NADH + H<=====>Lactato + NAD⁺

La reacción enzimática puede ser determinada también por la formación de NADPH, utilizando hexocinasa y glucosa-6-P deshidrogenasa como enzimas acopladas. Este análisis está basado en el análisis espectrofotométrico publicado por Oliver (22):

CK

- 4).- Fosfocreatina + MgADP<=====>MgATP + Creatina.
- 5).- Glucosa + MgATP<=====>Glucosa-6-fosfato + MgADP.
Hexocinasa
- 6).- Glucosa-6-fosfato + NADP<=====>Gluconato
-6-P + NADPH +H⁺
Glucosa-6-P-deshidrogenasa

La existencia de tres isoenzimas de creatina cinasa ha sido reportada por varios investigadores utilizando, electroforesis en gel de agarosa (17,23). Esta técnica separa la actividad de creatina cinasa de suero en tres zonas; cada una representando una isoenzima diferente. La fracción con la mayor movilidad es designada como CK₁(BB), con movilidad intermedia CK₂(MB) y la última con la menor movilidad como CK₃(MM) (24).

Generalmente se recurre a estos procedimientos porque la fosfocreatina es muy lábil y difícil de medir. No obstante, se pueden emplear otras técnicas que miden el ADP, el ATP y el fósforo inorgánico directamente, como un procedimiento sensible semicuantitativo que separa los productos liberados usando cromatografía en capa fina con polietilenimino-celulosa (25) y un método que compete en sensibilidad y que está acoplado con luciferasa de luciérnaga (26,27).

III.- SITUACION DE CK EN C. cellulosa. Y EN CERDO.

Los estudios existentes de C. cellulosa son en su mayoría de tipo biológico como el de Cañedo (28). Sin embargo las investigaciones sobre aspectos bioquímicos son escasas y se refieren: a la identificación histoquímica de ATPasas en los microtricos sobre el tegumento del cisticerco, presencia de una cubierta llamada glicocalix sobre la membrana vesicular externa del parásito que tiene un papel importante en la supresión de la respuesta inmune (29,30,31), composición del fluido vesicular en forma muy general (32), Bryant (33) y Barret (34) dan un panorama general de los caminos metabólicos a nivel celular necesarios para la obtención de energía de varios parásitos helmintos.

La presencia de las siguientes enzimas ha sido descubierta en varios cestodos: malato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, piruvato cinasa, fosforilasa, fosfohexomutasa, hexocinasa, aldolasa, fosfogliceraldehido deshidrogenasa y oxidasa láctica, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (34,35).

En general no existe información bibliográfica específica acerca de la presencia de la enzima CK en la larva de Taenia solium. Barret (34) menciona que unos pocos invertebrados presentan creatina (sustrato de CK).

Ocho tipos diferentes de guanidinas han sido identificadas como fosfógenos en la naturaleza, aunque la mayoría son de tipo arginina en invertebrados y creatina en vertebrados.

En un gran número de parásitos helmintos es usual que no posean cantidades detectables de fosfógenos. Al menos solo trazas se han encontrado en adultos de Fasciola hepática, Moniezia expansa e Hymenolepis diminuta.

La ausencia y presencia de fosfagenos y sus respectivas enzimas biosintéticas en varios helmintos parásitos adultos tiene implicaciones importantes para el control del metabolismo de éstos. En demanda súbita de energía el ATP es desdoblado a ADP y fosfato; en éstas condiciones el ADP es inmediatamente refosforilado por la vía fosfotransferasa (34).

Si no hay reserva de enlaces de fosfatos de alta energía en el parásito una demanda súbita debería llevar a una caída transitoria de la relación ATP/ADP. Los helmintos, viviendo en un ambiente sin grandes cambios de demandas energéticas podrían ser capaces de acelerar la glicólisis para aumentar su reserva de fosfatos de alta energía. Vías alternativas para mantener la relación ATP/ADP la representaría la reacción de miocinasa, catalizando la refosforilación de ADP (34,36).

Además se ha considerado que los helmintos y sus larvas son incapaces de sintetizar colesterol, ácidos grasos saturados e insaturados, purinas, pirimidinas, esteroides y porfirinas (34,36).

Recientemente se ha demostrado la presencia y síntesis de tetrapirroles (37,38), por lo que se requiere mayor investigación para confirmar la existencia de vías biosintéticas del parásito.

En relación al hospedero porcino, cuatro cretina cinasas séricas han sido separadas por técnicas electroforéticas; BB(CK¹), MB(CK²), MM(CK³) y CK⁴, datos experimentales sugieren que esta última fracción puede ser de naturaleza BB y estar unida a inmunoglobulinas (IgG) en suero. En musculo esquelético estriado solo CK³ se ha detectado; musculo cardiaco contiene principalmente CK-MM (95%), así como pequeñas cantidades de CK-MB(5%). En el tejido cerebral (materia gris y materia blanca) la fracción CK-BB domina, sin embargo algo de CK-MM (20-57%) ha sido detectada y adicionalmente en materia gris ha sido encontrada CK⁴ (24,39).

La actividad de CK ha sido encontrada ser diferente para cada tejido del cerdo: La mas alta actividad de CK se presenta en musculo esquelético, seguida por musculo cardiaco y tejido cerebral, mientras que las más bajas actividades se han detectado en la mucosa intestinal y gástrica y solo trazas en organos como riñón, suprarrenales, hígado, pulmones y vasos (39).

Es un hecho bien conocido que los cerdos son muy susceptibles al estrés, incrementando la actividad sérica de MM(CK³), por lo que se han estudiado diversos factores que influyen sobre ésta actividad en la determinación de laboratorio: la técnica de sangrado (aguja ó cateter) (26,40), contaminación de tejido muscular, hemólisis, tiempo de almacenamiento en refrigeración a 4 °C, liofilización, estabilidad a -20 °C y 70 °C e influencia del estrés, demostrándose que el factor más importante lo representa la contaminación de tejido muscular y el estrés (41,42).

IV.- CICLO DE VIDA Y ANATOMIA DE Cysticercus cellulosae (fig. 2).

La forma adulta de Cysticercus cellulosae es Taenia solium o "la solitaria del hombre". Es cosmopolita en distribución, sin embargo es común en Europa central, India, China, La Unión Soviética, Africa y México.

La tenia llega a medir hasta 7 metros de longitud, tiene un escolex con un rosetelo armado de dos coronas compuestas de 25 a 50 ganchitos cada una y cuatro ventosas. El estróbilo o cuerpo de la tenia esta formada de 800 a 1000 proglótidos. En seguida del cuello estan los proglótidos inmaduros los cuales son cortos y anchos, estan seguidos por proglótidos maduros más grandes y cuadrados y finalmente por los proglótidos grávidos más largos que los anteriores, son los más viejos y próximos al extremo del cuerpo de la tenia, en ellos los organos reproductores y demas estructuras estan degeneradas. Los proglótidos grávidos contienen de 30 a 50,000 huevecillos, son desprendidos del estróbilo y eliminados del cuerpo humano en las heces. Cuando los huevecillos son comidos por suinos ó humanos, la acción de los jugos gástricos seguida de los jugos intestinales causa la liberación de las oncosferas (de 30 a 43 micras de diametro), las cuales penetran en la pared intestinal y entran en la vena portal hepática; son llevadas por el torrente sanguíneo a través del hígado, corazón y pulmones entrando en la circulación general. Por último ellas dejan los vasos sanguíneos y se desarrollan en cisticerco (Cysticercus cellulosae), alojandose principalmente en los musculos estriados, particularmente del cuello, las extremidades, los hombros y la lengua, pero tambien se le halla algunas veces en el corazón, la pared abdominal, el hígado, los pulmones, el cerebro y los ojos. El cisticerco es un quiste traslúcido oval poseedor de un escolex invaginado opaco con cuatro ventosas y un circulo de ganchos. Generalmente está cerrado en un cápsula adventicia resistente excepto en el humor vitreo, en la pia madre o en los ventriculos laterales del cerebro, donde puede no existir. Adquiere su tamaño máximo en aproximadamente diez semanas, los quistes son ovales, de 5 mm. de largo por 8-10 mm de ancho, pero en cerebro se pueden desarrollar más grandes. Cuando la carne de cerdo parasitada es ingerida cruda ó poco cocida, el cisticerco queda libre, el escolex se evagina y se desarrolla un gusano adulto ó tenia (43,44,45).

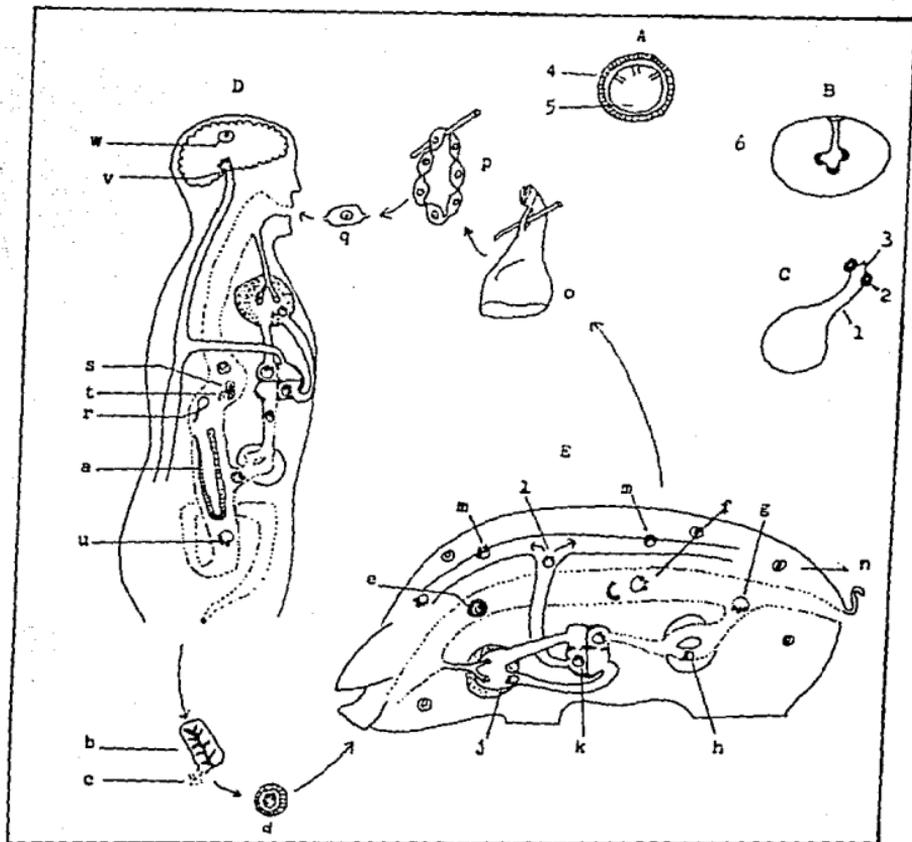
Fig. 2 CICLO DE VIDA DE *C. cellulosae* (44).

A, huevo. B, cisticerco invaginado. C, cisticerco evaginado. D, humano hospedero definitivo. E, cerdo hospedero intermedio. 1, escolex; 2, ventosas; 3, rostelo; 4, cubierta estriada del huevo (embriofo); 5, oncosfera ó hexacanto; 6, vesicula del cisticerco.

Descripción.

a, cestodo ó adulto en el intestino humano; b, proglótido grávido desprendido; c, huevecillos saliendo del proglótido; d, huevecillo libre; e huevo ingerido por suino; f, eclosión del huevo; g, oncosferas penetrando la pared intestinal y entrando a la vena portal hepática; h, oncosferas pasando a través del hígado; j, oncosferas en pulmones; k, oncosferas en el lado izquierdo del corazón; l, oncosferas entrando a la circulación general; m, oncosferas entrando a músculos esqueléticos; n, cisticercos en músculos esqueléticos y cardiacos; o, cisticercos en jamones; p, cisticercos en embutidos; q, infección en el humano por ingestión de cisticercos en carne de cerdos; r, cisticerco evaginado; s, proglótido grávido llevado al estómago por peristálsis reversiva donde los huevos son liberados; t, huevos en el intestino; u, oncosferas en intestino; v, oncosferas saliendo de los vasos sanguíneos en el cerebro; w, cisticercos en cerebro.

Fig. 2 CICLO DE VIDA DE *E. cellulosa*. (CONTINUACION).



IV. CISTICERCOSIS.

La cisticercosis representa un grave problema de salud pública endémico en América Latina que ha permanecido sin variación en los últimos 50 años consecuencia del fecalismo humano al aire libre y coprofagia de animales. La prevalencia de la teniasis y la cisticercosis se manifiesta en los humanos independientemente de su clase social. En la cisticercosis porcina es evidente que los sistemas de producción determinan de manera fundamental la presencia de la enfermedad. Los modelos de producción donde las inversiones de capital se canalizan para crear instalaciones ideales para el habitat del animal se abate considerablemente esta enfermedad. Lo que contrasta con los establecimientos de producción porcina medianamente tecnificados o con los establecimientos rústicos o de economía familiar, en los que en muchas ocasiones se permite que los cerdos deambulen libremente por el traspaso de la casa ó por todo el deambulo.

El hecho de que los cerdos sean sacrificados en su primer año de vida podría explicar la aparente ausencia de reportes de síntomas neurológicos. Varios autores han referido que durante la cisticercosis existe dolor en el hocico del animal, movimientos involuntarios, vértigo, crisis epileptiformes, curvatura del raquis, pleurostotonia, epistotonia, excitación signos y síntomas generales de una encefalitis aguda e inclusive muerte súbita. En general, este céstodo en estado adulto registra principalmente irritación en la mucosa intestinal en los sitios de adherencia, así como dolor abdominal sensación de hambre, indigestión y diarrea; en casos excepcionales puede presentarse oclusión intestinal, intoxicación por absorción de sus desechos metabólicos y aún peritonitis al perforar al excólex la mucosa intestinal (45).

La decomisación e incineración de los cerdos infestados constituye un gran problema económico que ocasiona cuantiosas pérdidas anuales: mil millones de pesos en México y 350 billones en Latinoamérica (46).

La información obtenida en el presente trabajo sobre la distribución de creatina cinasa en cisticerco puede contribuir a comprender mejor las bases bioquímicas y metabólicas del parasitismo en cerdos y seres humanos y ser de utilidad para el diseño de fármacos selectivos para la destrucción del parásito.

Recientemente ha sido identificada una intensa actividad de Creatina cinasa en el liquido vesicular del metacéstodo Cysticercus cellulosae (47) que requiere un estudio sistemático para aclarar su origen y función; ¿es una enzima que proviene del medio en que está colocado el quiste ó es introducido por el aumento de permeabilidad del tegumento durante el sufrimiento que ocurre en el sacrificio del hospedero porcino ó es sintetizado por el parásito?.

B) OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar el tipo de isoenzimas de Creatina cinasa (CK-MM, CK-MB y CK-BB) que presenta el líquido intravesicular de Cyathocercus cellulosa (LIC), aislado de diferentes órganos de cerdo: corazón, cerebro y músculo; para determinar el posible origen de las mismas. Por medio de electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría.

C) HIPOTESIS.

Se postula que el parásito absorbe las isoenzimas de Creatina cinasa (MM o muscular y BB o cerebral) de acuerdo al sitio de enquistamiento, almacenándola para sus requerimientos de ATP: vitales para su desarrollo y supervivencia. En estas condiciones los quistes cardiacos deberán contener principalmente la fracción MM(CK), el cerebral BB(CK) y el de músculo estriado MM(CK).

D) METODO.

I.- OBTENCION Y CONSERVACION DEL LIQUIDO INTRAVESICULAR Y DE SUERO PORCINO.

Material y Reactivos.

Centrifuga clinica BHG ROTO UNI Instrumenta S.A. mod. 901. tubos para centrifuga de 50 ml., jeringas de insulina de 1 ml. con agujas calibre 21 o 22, frascos ambar de 10 ml, estuche de disección, agua destilada.

Procedimiento.

Se obtuvo en los rastros de Naucalpan y Ferreria muestras de sangre porcina y carne parasitada, proveniente de cerdos masivamente infestados con Cysticercus cellulosae. Una vez localizados los parásitos en musculo, corazón y cerebro el tejido que se encontraba sobre ellos fué eliminado descubriendo una de sus caras (la mayor parte de los quistes fueron aislados completamente del tejido), enseguida fueron lavados con agua destilada y el liquido vesicular fué extraido con ayuda de jeringas de insulina, (fig. 3) clasificándolo en función del tejido proveniente. Las muestras se transportaron en frascos ambar a 4 °C al laboratorio (fig. 4) (48). El liquido vesicular y el suero colectado después de la centrifugación de la sangre a 5000 rpm. 5 min., se mantuvieron en refrigeración (2 a 8 °C) hasta el momento de utilizarse (15-27).

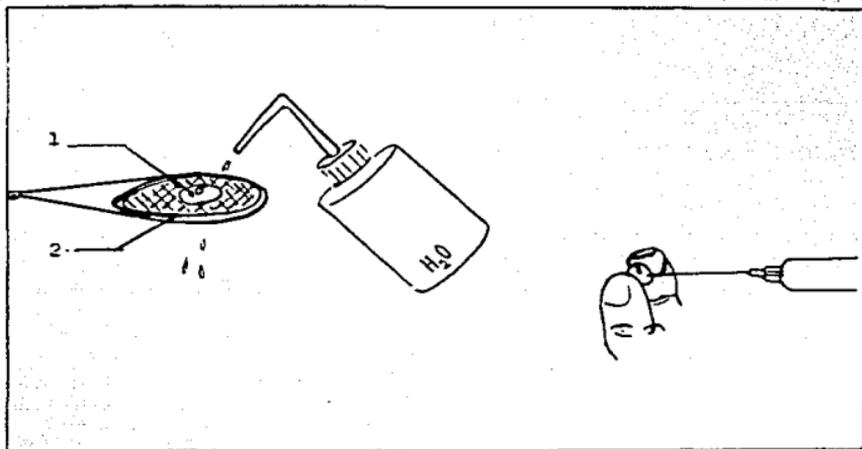


Fig. 3 OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Los cisticercos fueron lavados con ayuda de un cedazo² durante 30 seg. antes de extraer el líquido vesicular con jeringas de insulina.

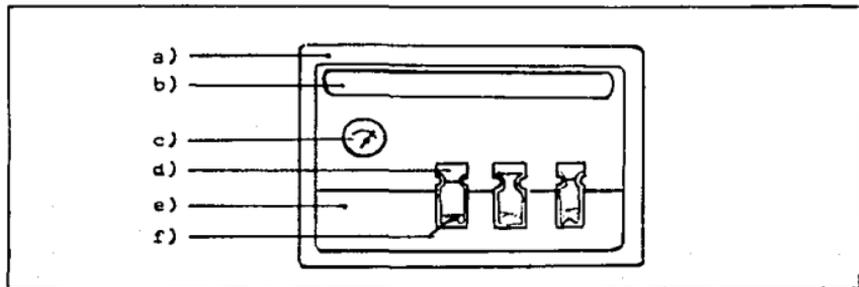
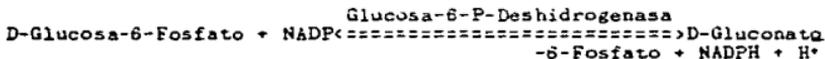
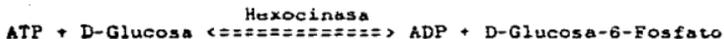
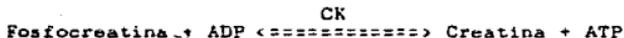


Fig. 4 CONTENEDOR UTILIZADO PARA EL TRANSPORTE DE MUESTRAS (TEMP. INTERIOR 4 °C).

- a) Envase térmico.
- b) Refrigerante para vacunas (congelado)
- c) Termómetro.
- d) Envase ámbar para muestras.
- e) Soporte para envase de muestras.
- f) Muestra.

II.- METODO ESPECTROFOTOMETRICO (49).
(Prueba UV optimada)

La actividad de CK total fué medida espectrofotométricamente en base a las reacciones siguientes (22):



Se mide la velocidad de aparición de NADPH fotométricamente a 340 nm; los valores de absorbancia son directamente proporcionales a la actividad de creatina cinasa en el material de muestra: actividad \propto absorbancia ; actividad = K (absorbancia).

MATERIAL Y REACTIVOS.

Celdas espectrofotométricas de 1 cm de espesor, espectrofotómetro Perkin-Elmer 35, pipetas de 2 y 5 ml y cronómetro.

Material biológico: suero porcino y líquido intravesicular.

Kit CK-NAC-activado prueba UV optimada de Diagnostica MERCK conteniendo: Solución amortiguadora de acetato-imidazol 100 mmol/L, pH 6.7. Mezcla reaccionante (enzimas, coenzimas y sustrato) compuesto por: Fosfocreatina 30 mmol/L, Glucosa 20 mmol/L; N-acetilcisteína 20 mmol/L; acetato de magnesio 10 mmol/L; EDTA 2 mmol/L; ADP 2 mmol/L, NADP 2 mmol/L, AMP 5 mmol/L Adenosina-5'-pentafofo-5'-adenosina, 10 μ mol/L, Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa \geq 1.5 kU/L; Hexocinasa \geq 2.5 kU/L.

Se disuelve la mezcla reaccionante liofilizada con 2.5 ml de la solución amortiguadora.

PROCEDIMIENTO.

A 2.5 ml de solución de la mezcla reaccionante se pipetearon 0.10 ml de líquido intravesicular ó plasma, se mezclaron y se mantuvieron a temperatura constante durante tres minutos (23 a 25 °C). El aumento de densidad óptica se registró durante 5 min. a una longitud de onda de 340 nm. Si durante la medición las diferencias de extinción molar (absorbancia) por minuto ($\Delta E/\text{min}$) a 340 nm eran mayores que 0.250 se repitió la determinación con el material problema diluido 1:10 con solución de cloruro de sodio (NaCl) y el resultado se multiplicó por 10.

Cálculo.

Datos experimentales demuestran que existe una relación directa entre la actividad de CK y el ΔE . Esta relación describe una curva cuya ecuación es $y=mx + b$, siendo $b=0$ y la pendiente= 4127 a 25 °C.

Se promediaron los cambios de densidad óptica por minuto ($\Delta E/\text{min}$) y se aplicó a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = \Delta E/\text{min} \times 4127$$

el resultado se expresa en unidades por litro (UI/L).

III.- METODO ELECTROFORETICO (50,51,52).

Se utilizo gel de agarosa Paragon Beckman para la separación electroforética de las isoenzimas de creatina cinasa; la visualización del patrón electroforético se efectuó colorimétricamente utilizando Fenazina metosulfato (FMS) y Nitro Azul de Tetrazolium (N-ATZ) (53,54). La técnica se basa en la tinción modificada por Rosalki para CK (57).

Material y Reactivos.

1. Caja para incubación, pipetas graduadas de 2, 5 y 10 ml, plantilla para aplicación de muestras, plantillas para secar el exceso de muestra de la plantilla de aplicación, plantilla para secar las placas, fuente de poder de 100 volt y 30 mA por gel, celdas de electroforésis para placas de 3 x 4 pulg. (76.2 x 101.5 mm), pipeta micrométrica de 5 μ L, incubadora ó estufa (45 °C), secador mantenido a 75 °C.

2. Material biológico; muestras de suero porcino y líquido intravascular.

3. Kit BECKMAN Paragon para electroforésis de CK conteniendo: Gel de agarosa Paragón, conservado a temperatura ambiente entre 18 °C y 25 °C (no se debe congelar ó refrigerar), Buffer de acetato imidazol pH 7. Solución sustrato compuesta por: Fosfocreatina 15 mmol/L, Adenosina-5'-difosfato (ADP) 4 mmol/L, Adenosina-5'-monofosfato (AMP) 5 mmol/L, Magnesio 15 mmol/L, D-Glucosa 20 mmol/L, Nicotinamida-adenina-dinucleotido fosfato (NADP) 4 mmol/L, N-acetilcisteina 20 mmol/L, Hexocinasa 6650 UI/L.

4. Solución colorimétrica compuesta por:

a) Fenazina metosulfato (FMS) (Sigma Chem.), 2mM en buffer morfolino pH 7.

b) Nitro-azul de tetrazolium (N-ATZ) (Sigma Chem.), 2mM en buffer morfolino pH 7.

Se mezclan 1 ml. de a y b al momento de utilizarse.

5. Solución Rojo de Ponceau de Beckman Instruments: Ponceau S, 1x.

6. Solución alcohol-ácido acético: 10% de ácido acético (Merck grado analítico), 60% de etanol (Merck grado analítico), 30% de agua.

7. Solución de ácido acético (Merck grado analítico) al 5% .

PROCEDIMIENTO (Fig. 5)

Cada compartimiento de la celda de electroforesis se llenó con 50 ml de buffer acetato-imidazol pH 7, después de secar la placa de gel con la plantilla secadora; se colocó la plantilla para aplicación de muestras sobre el mismo (alineándola con las marcas de la placa); se agregó 5 L de la solución problema (suero ó LIC) en los canales de la plantilla, después de 5 min. tiempo necesario para que se difundiera la muestra sobre el gel, se secó la plantilla y se colocó la placa de gel en la celda de electroforesis con la marca (-) en el cátodo; la celda se conectó a la fuente de poder calibrada a 100 volt y se corrió durante 35 min; una vez terminada la electroforesis el gel se cubrió con una plantilla secadora embebida en 2 ml. de solución sustrato y se incubó a 45 °C durante 20 min; al término de la incubación se removió la plantilla secante de la superficie del gel y se le agregó la solución colorimétrica (N-ATZ-FMS), después de observar las bandas de creatina cinasa de color violeta se lavó el gel con buffer acetato-imidazol pH 7 y se secó perfectamente a 75 °C. A continuación se tiñeron las proteínas con solución de Rojo de Ponceau durante 10 min. después se lavó la placa con ácido acético al 5 %, haciendo varios cambios de ésta solución. Por último se secó la placa a 75 °C. La concentración de proteína y CK se cuantificó en un densitómetro Beckman CDS-200.

EVALUACION DE LOS CROMATOGRAMAS.

Para la identificación de las distintas bandas de CK en cada patrón electroforético se calcularon los Rx (factor de corrimiento con respecto al compuesto de migración más rápida) utilizando la siguiente fórmula (58):

$$Rx = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el compuesto de referencia}}$$

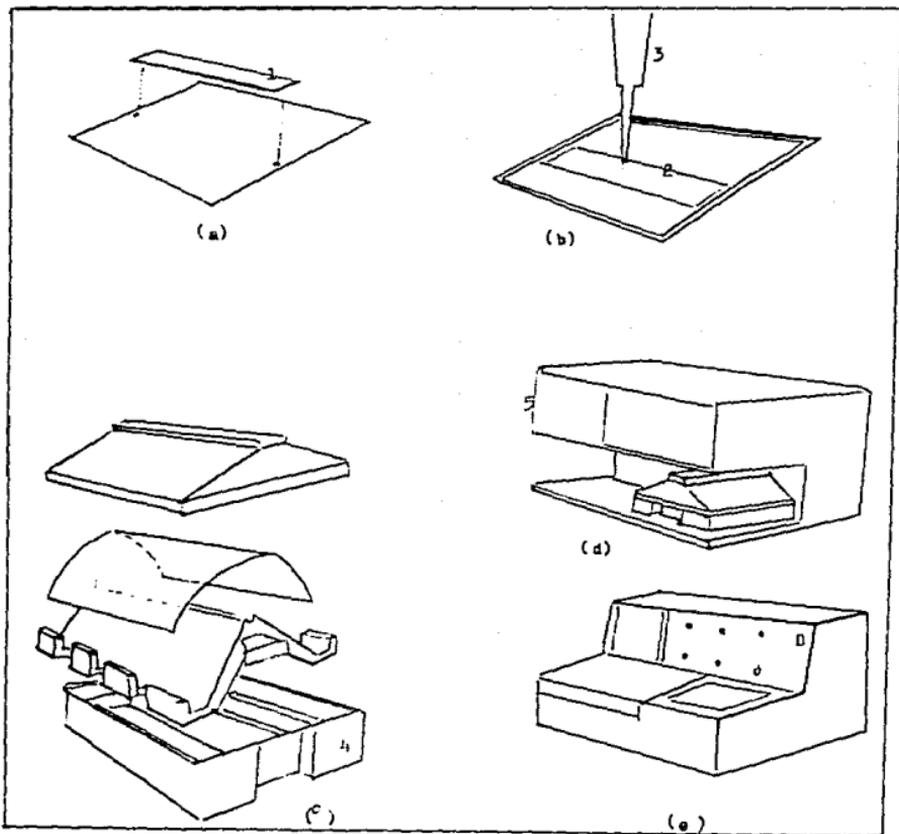


Fig. 5 TECNICA DE ELECTROFORESIS. EQUIPO PARAGON BECKMAN (50).

- a) Colocación de la plantilla¹ para muestras.
- b) Aplicación de la muestra en el gel² con micropipeta³.
- c) Colocación del gel en la celda de electroforesis⁴.
- d) Fuente de poder⁵ y celda de electroforesis.
- e) Densitómetro Beckman CDE-200.

IV. - DETERMINACION DE PROTEINAS.

La cuantificación de proteínas se realizó de acuerdo a las recomendaciones del laboratorio de análisis clínicos del IMSS (59).

MATERIAL Y REACTIVOS.

Centrifuga BHG ROTO UNI Instrumenta S.A. mod.901, espectrofotómetro Perkin-Elmer 35, celdas espectrofotométricas de 1 cm de espesor, pipetas de 1 y 5 ml, cronometro.

Materiai biológico.

Líquido intravesicular de C. cellulosa, suero porcino obtenido de la centrifugación de la sangre a 5000 rpm. durante 10 min.

Solución estandar de proteínas preparada con albúmina de suero bovino 0.1 g/100 ml (JT Baker, grado reactivo), solución de NaCl al 0.9% (IMSS, grado reactivo), ácido sulfosalicílico al 3% (Sigma chemical, grado reactivo), NaOH al 3% (Sigma chemical, grado reactivo), reactivo de Benedict (IMSS, análisis clínicos).

A). En el líquido intravesicular de C. cellulosa.

La cuantificación se realizó por el método del ácido sulfosalicílico (60) Se elaboró una curva patrón con concentraciones de 1 a 10 mg/100 ml de proteína, obteniendo una gráfica (fig. 8 a) cuya ecuación es $y = 0.5 x$;

Concentraciön mg/10 ml = 0.50 x (absorbancia).

1. - Se colocaron en celdas espectrofotométricas :

a). Solución patrón compuesta por: 0.1 ml de solución estandar de proteínas, 0.9 ml de solución salina al 0.9% , 3 ml. de ácido sulfosalicílico.

b). Blanco compuesto por. 3 ml. de ácido sulfosalicílico, 1 ml. de solución salina fisiológica.

c). Solución problema compuesta de: 0.1 ml. de líquido intravesicular del parásito, 0.9 ml de solución salina fisiológica, 3 ml. de ácido sulfosalicílico.

2.- Se dejó reposar 10 min. y se leyó la absorbancia del patrón (Ap) y del problema (Ax) frente al blanco de reactivos a 445 nm.

3.- Cálculo:

$$\text{g. de proteína/100 ml.} = \frac{\text{Concentración del patrón (g/100ml)}}{A_p} \times A_x$$

B). En suero porcino.

La cuantificación se realizó por el método de Biuret (61).

Se elaboro una curva patrón con concentraciones de 1 a 15 g/100 ml. de proteína, obteniendo una grafica (fig. 6b) cuya ecuación es:

$$\text{g. de proteína/100 ml.} = 30.31 \times (\text{absorbancia}) - 0.38$$

Los datos experimentales muestran que la concentración de proteína tiene una relación lineal con absorbancia dentro del intervalo empleado (1 a 15 g/100 ml). A concentraciones de proteína menores de 1 g/100 ml. la relación es de tipo exponencial.

1. Se coloco en celdas espectrofotométricas:

a). Solución patrón compuesta por: 0.1 ml de solución standard de proteínas, 4.9 ml de NaOH al 3% .

b). Blanco compuesto de: 5 ml de NaOH al 3% .

c). Solución problema: 0.1 ml de suero porcino, 4.9 ml de NaOH al 3% .

2. Se agregó inmediatamente a cada tubo 1 ml de reactivo de Benedict y se mezcló.

3. Despues de 15 min. se leyó la absorbancia del patrón (Ap) y del problema (Ax) frente al blanco de reactivos a 545 nm.

4. Calculo:

$$\text{g. de proteína/100 ml.} = \frac{\text{Concentración del patrón (g/100 ml)}}{A_p} \times A_x$$

RESULTADOS.

Durante la colecta de muestras la localización del parásito fué más frecuente en músculo esquelético y aun cuando este tejido estaba masivamente infestado en la mayoría de los casos se encontró que cerebro y corazón no presentaban el mismo grado de infestación. Estos datos están de acuerdo con los publicados por otros autores (62,63) respecto al sitio de preferencia para enquistamiento en el cerdo; estando el músculo en primer lugar; despues corazón y cerebro.

El patrón electroforético de las isoenzimas de CK en el líquido intravesicular de ~~C. cullulosa~~ enquistado en músculo, corazón y cerebro (fig. 7 a,b y c respectivamente) mostró la presencia solo de una banda que se localizó en la región globulina, correspondiente a la isoenzima CK-MM. En muestras de LIC proveniente de músculo y cerebro se observó la aparición de una segunda banda localizada en el primer caso en la región α_2 -globulina y en el segundo caso en la región de albumina que corresponden a las fracciones CK-MB y CK-BB respectivamente. La aparición de estas bandas ocurrió una vez en el LIC en músculo y tres veces en el LIC en cerebro.

En la fig. 7c se presenta el corrimiento de dos muestras de LIC localizado en cerebro: una fue colectada sin separar al cisticerco del tejido donde se localizaba, la otra fue tomada del cisticerco aislado del tejido de enquistamiento y separado de su quiste. Se observó que la fracción CK-BB apareció solo cuando la muestra se colectó sin aislar al parásito.

En suero de cerdo fueron detectadas las tres isoenzimas de CK (fig. 7d), encontrando una mayor proporción de CK-MM que de CK-MB y de ésta más que de CK-BB (tabla 2).

La actividad promedio de CK en suero de cerdo (tabla 3, fig.8) resultó ser más elevada que en las distintas muestras de LIC y de estas las localizadas en músculo presentaron la mayor actividad; despues con valores semejantes corazón y cerebro, esto se probó estadísticamente (tabla 4).



Fig. 7a PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE LAS ISOENZIMAS DE CK Y PROTEINAS EN SUERO PORCINO Y LIC REALIZADA EN GEL DE AGAROSA DURANTE 35 MIN. A 100 VOLTS.

- Indica el sitio de aplicación de la muestra, el movimiento de las bandas es a partir del cátodo (-) hacia el ánodo (+). CK se tiñe con EMS-NATZ y proteínas con rojo de ponceau.

(A) Esquema normal del patrón electroforético de proteínas en suero humano (55).

Los patrones electroforéticos de las isoenzimas de CK se presentan de color violeta y proteínas de color rojo en:

- (B) Suero porcino.
- (C-L) Líquido intravesicular de diferentes cisticercos localizados en músculo. Notar la presencia únicamente de CK-MM.

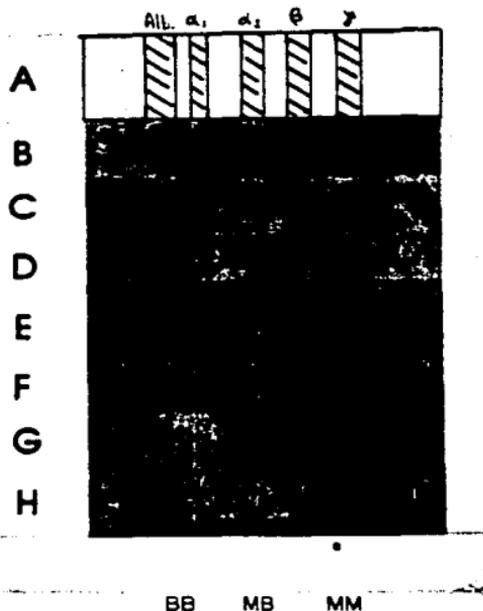


Fig. 7b. PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE LAS ISOENZIMAS DE CK Y PROTEÍNAS EN SUERO PORCINO Y LIC REALIZADA EN GEL DE AGAROSA DURANTE 35 MIN. A 100 VOLTS pH 7. (CONTINUACION).

- (A) Esquema normal del patrón electroforético de proteínas en suero humano (55).

Los patrones electroforéticos de las isoenzimas de CK se presentan de color violeta y proteínas de color rojo en:

- (B) Suero porcino.
 (C-H) Líquido intravesicular de diferentes cisticercos localizados en corazón porcino.

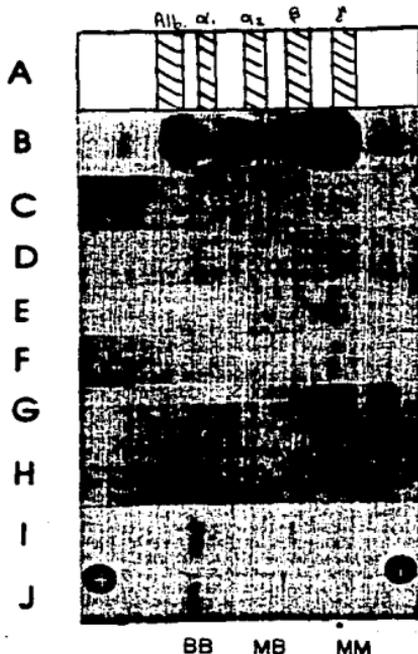


Fig. 7c PATRONES ELECTROFORETICOS DE LAS ISOENZIMAS DE CK Y PROTEINAS EN SUERO PORCINO Y LIC REALIZADAS EN GEL DE AGAROSA DURANTE 35 MIN. A 100 VOLTS, PH 7. (CONTINUACION).

- (A) Esquema normal del patron electroforético de proteínas en suero humano (55).

Los patrones electroforéticos de las isoenzimas de CK se presentan de color violeta y proteínas de color rojo.

- (B) Suero porcino.
 (C-H) Líquido intravascular de diferentes cisticercos cerebrales separados del sitio de enquistamiento.
 (I-J) Líquido vesicular de distintos cisticercos cerebrales sin separarlos del sitio de enquistamiento.

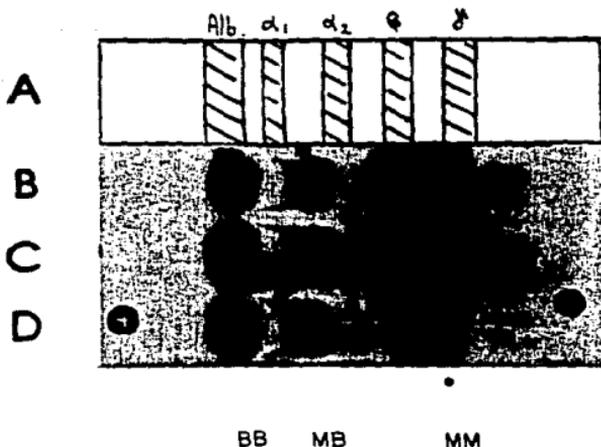


Fig. 7d PATRONES ELECTROFORETICOS DE LAS ISOENZIMAS DE CK Y PROTEINAS EN SUERO PORCINO Y LIC REALIZADA EN GEL DE AGAROSA DURANTE 35 MIN. A 100 VOLTS, pH 7. (CONTINUACION)

- (A) Esquema normal del patron electroforético de proteínas en suero humano (55).
- (B-D) Patrones electroforéticos de las isoenzimas de CK (color violeta) y proteínas (color rojo) en diferentes muestras de suero porcino. Obsérvese la gran concentración de CK-MM.

TABLA 2 **RESULTADOS DEL PATRON ELECTROFORETICO DE LAS**
ISOENZIMAS DE CK EN EL LIC AISLADO DE TRES
TEJIDOS Y SUERO DE CERDO.

MUESTRA.	NUMERO DE MUESTRAS ANALIZADAS	INTENSIDAD INDIVIDUAL DEL COMPONENTE ISOENZIMATICO.		
		MM	MB	BB
SUERO	5	+++	++	+
LIC. EN MUSCULO.	13	+++	@	@
LIC EN CORAZON.	8	++	@	@
LIC EN CEREBRO.	15	++	@	±

INTENSIDAD DE TINCION DE LA ISOENZIMA DE CK:

+++ Fuerte ++ Intermedio + Débil ± Presencia variable. @ Ausente

TABLA 3 VALORES DE ACTIVIDAD DE CK TOTAL EN SUERO Y EN LIC LOCALIZADO EN DIFERENTES TEJIDOS DE CERDO.

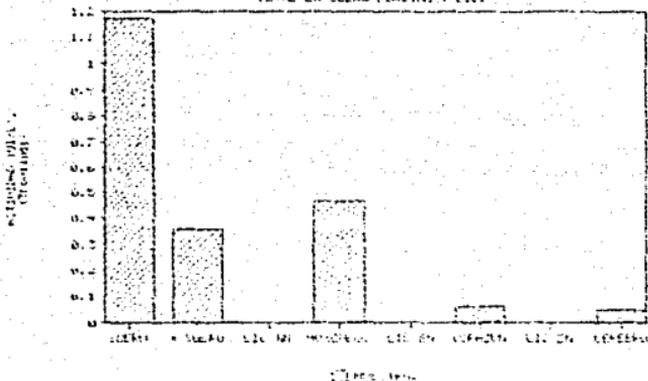
MUESTRA	NUM. DE MUESTRAS ANALIZADAS	ACTIVIDAD CK TOTAL X (UI/L).	INTERVALO (UI/L).
SUERO	7	1174.41	568.49 - 1829.80
*SUERO	5	357.60	270.01 - 450.00
**SUERO	5	699.60	180.00 - 1080.00
LIC EN MUSCULO	13	466.87	69.80 - 1478.90
LIC EN CORAZON.	8	61.22	16.92 - 139.66
LIC EN CEREBRO.	15	50.30	2.97 - 340.24

Se presentan valores reportados por T. Telling (31), obtenidos de suero colectado de cerdos diferentes:

* sin introducir el estrés y

** en animal estresado.

FIG. 9 ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CK EN
 SUERO EN CERDOS PORTADORES DE LIC.



Para graficar se utilizó valores promedio. Como puede verse la actividad de CK en suero de cerdos de matanza resultó ser bastante elevada (1174 UI/L); comparada con la reportada por:

* Thoren-Telling (31) con valores de CK de 807.6 UI/L para muestras de sangre colectadas sin introducir factores como el estrés y la excitación del cerdo durante el procedimiento de muestreo.

En el LIC el valor mas alto se presenta cuando el parásito se localiza en músculo tejido donde se ha determinado la mayor actividad de CK correspondiente a la fracción CK-MM (25)

TABLA 4 PRUEBA ESTADISTICA PARA DETERMINAR SI LAS MEDIAS DE LAS MUESTRAS SON DISTINTAS (64).

MUESTRAS COMPARADAS	ACTIVIDAD $X_1 - X_2$	$S_1 - S_2$	t' (VALORES CRITICOS).	t' CALCULADA	OBSERVACIONES.
SUERO vs. MUSCULO	1174.41- 466.87	441.47- 374.79	± 1.73	5.79	D*
MUSCULO vs. CORAZON	466.87- 61.22	374.79- 41.70	± 1.76	3.86	D*
CORAZON vs. CEREBRO	61.22- 50.30	41.70- 65.43	± 1.71	0.41	I*
SUERO vs. CORAZON	1174.41- 61.22	441.70 41.70	± 1.89	6.82	D*

Se utilizo la prueba t' student para poblaciones con distribución normal y varianza poblacional desconocida.

P_g 0.05.

- * D= Diferencia significativa.
- * I= Diferencia no significativa

El análisis densitométrico (fig.9) confirmó la presencia de la isoenzima CK-MM; independientemente del sitio de enquistamiento (tabla 5). La fracción CK-MM constituyó el 100 % de composición en el líquido intravesicular del cisticerco. En suero la fracción CK-MM localizada en el sitio de aplicación representó cerca del 85 %, la isoenzima migrando anódicamente (CK-BB) constituyó cerca del 5% y la fracción intermedia a estas dos (CK-MB) cerca del 10 %.

Los valores de R_x para las fracciones de CK fueron (tabla 6): CK₁-BB=1, CK₂-MB=0.60 y CK₃-MM=0, estos valores son iguales en las muestras de LIC, Suero y homogenados de músculo y cerebro de cerdo en donde aparecieron.

Los niveles de proteína en el fluido vesicular del parásito variaron de 0.32-10.4 mg/100 ml y en suero de cerdo el contenido estuvo en el intervalo de 7.40-10.47 g/100 ml (tabla 7).

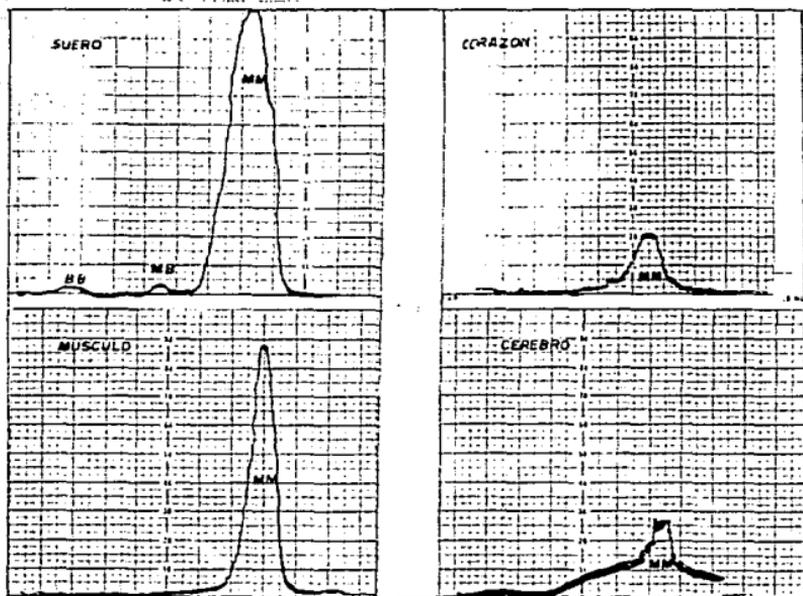


Fig. 9. Perfiles densitométricos de CK en suero de cerdo y líquido vesicular de cisticercos localizado en músculo corazón y cerebro, registrados a 600 nm.

TABLA 5 RESULTADOS DEL ANALISIS DENSITOMETRICO.

MUESTRA	NUM. DE MUESTRAS.	ISOENZIMA PRESENTE.	ACTIVIDAD FRACCION DE CK (%)	ACTIVIDAD PROMEDIO (UI/l).
SUERO	7	CK-MM	83.87	957.97
		CK-MB	10.70	106.39
		CK-BB	5.27	56.34
LIC EN MUSCULO	13*	CK-MM	100.00	473.09
		CK-MB	8.70	14.21
		CK-BB	0.00	0.00
LIC EN CORAZON	8	CK-MM	100.00	61.22
		CK-MB	0.00	0.00
		CK-BB	0.00	0.00
LIC EN CEREBRO	15**	CK-MM	100.00	42.17
		CK-MB	0.00	0.00
		CK-BB	27.20	40.10

* Una muestra presento CK-MB.

** Tres muestras presentaron CK-BB.

TABLA 6 FACTORES DE CORRIMIENTO ELECTROFORETICO (Rx) PARA LAS FRACCIONES DE CK EN MUESTRAS DE LIQUIDO VESICULAR DE CISTICERCO, SUERO, HOMOGENADO DE MUSCULO Y CEREBRO CON RESPECTO A ALBUMINA DE SUERO PORCINO.

MUESTRA	(Rx) PARA LAS FRACCIONES		
	CK ₃ -MM	CK ₂ -MB	CK ₁ -BB
Suero	0.00	0.60	1
LIC en musculo	0.00	*	*
LIC en corazón	0.00	*	*
LIC en cerebro	0.00	*	*
Homogenado de musculo.	0.00	0.60	*
Homogenado de cerebro.	0.00	*	1

Observese que CK₁-BB presente unicamente en suero y homogenado de cerebro tiene semejante corrimiento que albumina; CK₃-MM detectada en el punto de aplicación tiene identicos valores de corrimiento en las muestras.

* no se presento.

TABLA No. 7 PROTEINAS EN EL LIQUIDO INTRAVESICULAR DE C. cellulosa Y EN SUERO DE CERDO.

MUESTRA No.	LIC CONCENTRACION mg/100 ml.	SUERO CONCENTRACION µg/100 ml.
1	2.29	7.40
2	6.16	9.15
3	0.32	10.47
4	2.84	8.68
5	5.90	8.48
6	10.40	7.59
7	4.26	8.02
8	0.94	9.02
9	5.68	8.26
10	9.18	8.28
11	2.95	
12	3.27	
MEDIA	4.52	8.54
DESV. EST.	± 2.95	± 0.83

DISCUSION.

La creatina cinasa es una enzima de gran importancia dentro de los mecanismos celulares para la producción de ATP. La importancia de las propiedades de las isoenzimas de CK ha venido incrementándose recientemente ya que estudios realizados por varios autores (15-19) demuestran que se incrementan los valores séricos en algunas enfermedades por lo que su valor en el diagnóstico clínico es importante.

Thoren-Tollin (39) en un estudio realizado en 1981 indica que en el hombre la isoenzima característica de musculo es CK-MM, en cerebro CK-BB y en tejido cardiaco CK-MB, que comparado con la distribución de isoenzimas de CK en cerdo tiene semejanza; la diferencia es que en corazón la isoenzima predominante es CK-MM.

Martínez Zedillo en 1984 y 1988 (47,85) identificó la presencia de gran actividad de CK en el fluido vesicular de C. cellulosae postulando que el parásito la absorbe del cerdo y la utiliza como fuente de ATP en combinación con otras rutas metabólicas. La aceleración de la glicólisis y la reacción de la miocinasa son ejemplos de vías alternativas para la obtención de energía de metabolismo, propuestas por Barret (34). Este autor indica que para invertebrados la reserva de fosfatos de alta energía la compone arginina, cuya fosforilación y desfosforilación es catalizada por arginina cinasa.

No existe evidencia bibliográfica de la existencia de tal enzima en C. cellulosae. Los estudios realizados con el parásito están encaminados básicamente al diagnóstico de la cisticercosis humana.

Este parásito no posee un tracto digestivo para el transporte de nutrientes y metabolitos. Es a través de una membrana vesicular compuesta de: tegumento, membrana plasmática y pared externa que se lleva a cabo esto. Sosa y col. (29) señalan que esta membrana es el órgano principal que establece interrelaciones fisiológicas entre el parásito y los tejidos del hospedero.

La presencia del glicocalix en el tegumento de C. cellulosae ha sido demostrado por Sosa y col. (29) indicando que juega un papel determinante en las interrelaciones hospedero-parásito, principalmente en el transporte y absorción selectiva de sustancias.

Martínez Zedillo y col. (65) sugirieron que el estudio de las isoenzimas de CK en el cisticerco tomado de diferentes tejidos de cerdo: corazón, cerebro y músculo, podría ayudar a esclarecer su origen dentro del LIC, ya que se ha comprobado la existencia de diferentes isoenzimas de CK en cada uno de los tejidos antes mencionados (39). De acuerdo a esto los quistes deberían contener principalmente la fracción de CK característica del tejido de enquistamiento. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el cisticerco no absorbe todas las isoenzimas de CK, sino que selecciona específicamente a la fracción CK-MM, a pesar de encontrarse en tejidos cuya presencia de CK está dominada por BB como en el caso de cerebro.

Semejanzas bioquímicas entre el suero de cerdo y el fluido vesicular de *C. cellulosa* y el quiste hidatídico han sido reportadas por algunos autores (66,26). Canedo (28) compara la composición química del LIC y del suero de cerdo; indica que la concentración de carbohidratos totales, lecitina, colesterol, sodio y cloro tienen valores semejantes. En el presente estudio, el análisis espectrofotométrico reveló que el fluido vesicular de *C. cellulosa* contiene muy pequeñas cantidades de proteínas (0.32-10.4 mg/100 ml) en comparación con el suero del cerdo (7.40-10.47 g/100 ml), los valores tienen semejanza con los niveles totales de proteína reportados para el quiste hidatídico: Magath (67) reporta 1.4 mg/100 ml. y Vidor (68) 34 mg/100 ml. Sin embargo Rebolledo en 1965 (37) reporta una concentración de 1.23 g/100 ml. de proteína en el LIC.

Con base en el análisis electroforético en gel de agarosa, los patrones de la isoenzima de CK-MM en el líquido intravesicular y el suero del hospedero revelaron movilidads idénticas (Tabla 7); lo cual indica que el parásito presenta la misma isoenzima que su hospedero y permite creer que CK-MM del hospedero puede estar penetrando las membranas del metacestodo de *Taenia solium*, y que la permeabilidad selectiva del tegumento del parásito determine la presencia específica de CK-MM. Tal vez represente para él una vía alternativa para mantener su relación ATP/ADP en niveles óptimos. En estudios realizados en suero de cerdos sometidos al estrés se ha detectado un significativo incremento de la fracción de músculo esquelético (CK-MM) (41) por lo que existe la posibilidad de que al incrementarse la actividad de CK sérico durante el sacrificio violento del hospedero ésta penetre a través de la membrana del cisticerco, ya que los sistemas de transporte en membrana son dependientes del estado físico de la misma.

La presencia de la fracción CK-MM en el LIC sugiere algunas preguntas: ¿por qué no se introducen las fracciones CK-MB o CK-BB al interior del parásito?; ¿el mecanismo a través del cual esta enzima penetra es real ó debido a artefactos?; y si la isoenzima está presente en condiciones normales, ¿cuál es el mecanismo de entrada?.

En las muestras colectadas sin aislar al parásito del tejido de enquistamiento ocurrió la aparición esporádica de las fracciones CK-MB y CK-BB, situación que no se repitió cuando la muestra se colectó aislando al cisticerco del tejido de enquistamiento, sugiriendo que ocurría la contaminación de la muestra por tejido circundante, factor importante que influye en la determinación de la actividad de CK (41) y en consecuencia de su presencia en los patrones electroforéticos.

Para tomar una decisión más confiable con respecto a si la actividad de CK entre las distintas muestras estudiadas era distinta o igual se utilizó la prueba de t'student. Cuando en una investigación se desea saber si es razonable concluir que las medias de dos poblaciones son distintas se utiliza la prueba de hipótesis, en la cual existen tres diferentes contextos; en el presente estudio el muestreo se consideró a partir de poblaciones con distribución normal y varianza desconocida. En estas condiciones se establece que cuando la hipótesis nula es verdadera, la estadística de prueba sigue la distribución t'student (64).

CONCLUSION.

La caracterización de las isoenzimas de CK en el LIC aislados de diferentes tejidos del cerdo realizado en este trabajo indica que éste contiene sólo la fracción muscular de ésta enzima.

Los estudios señalan que esta fracción proviene del hospedero porcino; no se realizaron estudios inmunológicos ni de incubación "in vitro" para apoyar esta evidencia. El mecanismo a través del cual penetra al interior de la vesícula del cisticerco es desconocido.

La cantidad de proteína en el LIC con respecto al suero de cerdo es dos mil veces más baja, lo que indica una gran selectividad de la membrana vesicular del cisticerco.

La contaminación por enzimas del hospedero fue un grave problema durante la extracción del material biológico. Se recomienda tener extremo cuidado en la obtención de las muestras, porque la contaminación de la superficie por adherencia de material del hospedero a las microvellosidades puede influir en el análisis de CK.

Es necesario realizar análisis en condiciones más controladas en las que factores como el estrés por el manejo y sacrificio violento del cerdo no influyan en la determinación de CK en el LIC.

La incubación "in vitro" de *C. cellulosae* en suero porcino y soluciones de distintos metabolitos sería de gran ayuda para comprender los mecanismos metabólicos y de transporte. Conocimiento que se puede aprovechar para ser aplicado en la elaboración de fármacos que interfieran en los procesos metabólicos.

B I B L I O G R A F I A .

1. Kenyon, L. and Reed, H. G., Creatine kinase: Structure-activity relations. *Adv. Enzymol.* 54, 367-426. 1983.
2. Lohmann, K., über die enzymatische aufspaltung der kreatinphosphorsäure; zugleich ein Beitrag zum chemismus der muskelkontraktion. *Biochem. Z.*, 272: 17-277. 1934.
3. Banga, I., The adenosinetriphosphoric acid-creatine phosphorasa. *Studies Inst. Med. Chem.*, 3:59-63. 1943.
4. Lehmann, H., Enzymic synthesis of phosphocreatine by de-esterification. of phosphopyruvic acid. *Biochem. Z.* 281:271-291. 1935.
5. Lehmann, H., Reesterification of the adenylic acid system with phosphagens. *Biochem. Z.*, 286:336-343. 1935.
6. Askonas, B.A., Effect of thyroxine on Creatine phosphokinase activity. *Nature*, 167: 933-934. 1951.
7. Mildvan, A.S. and Cohn, M., Aspects of enzyme mechanisms studied by nuclear spin relaxation induced by paramagnetic probes. *Advan. Enzymol. Relet. Areas Mol. Biol.* 35:1-70. 1970.
8. Saks, V.A., Lipina, V., Sharov, V.G., Smirnov, V.N., Chazov, E. and Grosse, R., The localization of the myocardial cells and its functional coupling to Ouabain-inhibited (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Biophys. Acta.* 465:550-556. 1977.
9. Grosse, R., Spitzer, E., Kupriyanov, V.V., Saks, V.A. and Repka, K.R.H., Coordinate interplay between (Na⁺, K⁺)-ATPase and creatine phosphokinase optimizes (Na⁺/K⁺)-antiport across the membrane of vesicles formed from the plasma membrane of cardiac muscle cell. *Biochim. Biophys. Acta.* 603:142-155. 1980.
10. Loike D.J., Kozler, V.F., and Silverstein, S.C. Increased ATP and creatine phosphate turnover in phagocytosing mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 254: 9558-9564. 1979.
11. Koons, Stephen J., Eckert, B.S. and Zobel, C.R., Immunofluorescence and inhibitor studies on creatine kinase and mitosis. *Exp. Cell. Res.*, 140:401-409. 1982.

12. Lang, H., and Wirzburg, U., Creatine kinase, an enzyme of many forms. Clin. Chem. 28:1439-1447. Review. 1982.
13. Perryman, M.B. Strauss, A.W., Buettnier, T.L. and Roberts, R., Molecular heterogeneity of creatine kinase isoenzymes. Biochim. Biophys. Acta. 747:284-290. 1983.
14. Takasawa, T. and Ehiokawa H. Isolation of three creatine kinases MM from porcine skeletal muscle. J. Biochem. 93:375-382. 1963.
15. Dawson, D.M., and Fine, I.H., Creatine kinase in human tissues. Arch. Neurol. 16:175-180. 1967.
16. Robbins, S.L., and Angell, M., Basic Pathology. W.B. Saunders. Co. U.S.A., 1971.
17. Takahashi, K., Ushikubo, S., Oimomi, M. and Shinko, T., Creatine phosphokinase isozymes of human heart muscle and skeletal muscle. Clin. Chim. Acta. 58:285-290. 1972.
18. Hess, J. W., McDonald, K.P., Frederick, R. J., Jones, R.N., Neely, J. and Gross, D., Serum creatine phosphokinase (CPK) activity in disorders of heart and skeletal muscle, Anns. Internal Medicine. 61:1015-1028. 1964.
19. Cao, A., De Virgilis, S., Lippi, C. and Trabalza, N., Creatine kinase isoenzymes in serum of children with neurological disorders. Clin. Chim. Acta. 23:475-478. 1969.
20. Tanzer, M.L. and Gilvarg, C., Creatine and creatine kinase measurement. J. Biol. Chem. 234:3201-3204. 1959.
21. Barman, Th. E., Creatine kinase, in Enzyme Hand book. 1:439-440. 1969.
22. Oliver, I.T., A spectrophotometric Method for the determination of Creatine Phosphokinase and Myokinase. Biochem. J. 61:116-122. 1955.
23. Abbot, L. B. and Van Lente, F., Procedure for characterization of creatine kinase variants on agarose electrophoretograms. Clin chem. 31:445-447. 1985.
24. Thorén-Tolling, K., Creatine Kinase isoenzymes variants in porcine serum and tissue extracts, Zbl. Vet. Med. A. 29:99-106. 1982.

25. Rowley, G.L. and Canyon, G.L., PET-Cellulose thin layer chromatography. Product studies of the creatine kinase and pyruvate kinase reactions. Anal. Biochem. 58:525-533. 1974.

26. Wulff, K., Stahler, F., and Gruber, W., Basic Chemistry and Analytical applications, in Bioluminescence and Chemiluminescence. De Luca, M.A. and McElroy, W.D. Eds., Academic Press, New York. p. 209-225. 1981.

27. Witteveen, J.G.A.S., Sobel, E.B. and De Luca, M., Kinetic properties of the isoenzymes of human creatine phosphokinase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71:1384-1387. 1974.

28. Cañedo, L. Biology of cysticerci in cysticercosis in present state of knowledge and perspectives. Flisser A., Willms, K., Lacleste, J.P. and Larralde, C. Academic Press, N.Y. 1982.

29. Sosa, A., Giron, H., Alva, S. and Calzada, L. Presence and nature of a Glicocalyx-like coat on the external vesicular membrane of *Cysticercus cellulosae* a high resolution histochemical study. Life Sciences. 21:1021-1032. 1977.

30. Ramirez-Bon, E., Merchant, M.T., González-Del Pliego, M. and Cañedo, L., Ultrastructure of the bladder wall of the metacystode of *Taenia solium* in Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Larralde, C., Willms, K. and Lacleste, J.P., (Eds.) Academic Press. New York U.S.A. 1982.

31. Lumsden, R.D., Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. Exptl. Parasitol. 37:267-339. 1975

32. García-González, Eco., M. Romero, P., Diaz, Chemical composition of the vesicular fluid compared with serum, plasma and lymph pig. In: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Larralde, C., Willms, K. and Lacleste, J.P. (eds.) Academic press. New York, U.S.A., 1982.

33. Bryant, C. Biochemistry. In: Modern Parasitology, Cox, E.E.G. (ed.). Blackwell Scientific Publications. London. pp.84-115. 1982.

34. Barrett, J., Biochemistry of parasitic helminths. MacMillan Publishers LTD., Hong Kong, 308. 1981.

35. Grassé, P.P., Traité de zoologie. Masson et cie (eds.). Paris, France. IV: 426-431. 1961.

36. Larralde, C., Martínez-Zedillo, G., Lagunoff, D., Ludowyke, R., Montoya, R.M., Goddsaid, F., Dreyfuss, G., Sciutto, E., Govenansky, T. and Diaz, M., Porphyrin content of the cysticercus of Taenia solium. J. Parasit. 72: 569-577. 1986.
37. Rebollo, C.P., Separación y caracterización bioquímica de las porfirinas solubles del líquido intraquistico de Cysticercus cellulosae. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas. Xalapa, Ver. 1985.
38. Larralde, C., Sassa, S., Vanderkooi, J.M., Koloczak, H., Lacllette, J. P., Goodsaid, F., Sciutto, E., and Owen, C.S. Analysis of porphyrins and enzymes in porphirin synthesis in Taenia solium Cysticercus from man and pig. Mol. and Biochem. Parasitology. 22:203-213. 1987.
39. Thorén-Tolling, K., Creatine kinase isoenzymes in tissues and Serum from pigs. Zbl. Vet. Med. A. 29:89-98. 1982.
40. Moss, B.W., The effect of the duration and type of stress on some serum enzyme levels in pigs. Res. Vet. Sci 26:1-6. 1979.
41. Thorén-Tollin, K., Methodological aspects of serum creatine kinase determination in pigs. Zbl. Vet. Med. A. 30:195-205. 1983.
42. Nealon, D.A., and Henderson, A.K., Stability of commonly used thiols and of human creatine kinase isoenzymes during storage at various temperatures in various media. Clin. Chem. 23:816-829. 1977.
43. Marcial-Rojas, R.A., Pathology of protozoal and helminthic diseases. Williams & Wilkins Co., Baltimore, U.S.A. 1971.
44. Wilford, O.O., Animal parasites their cycles and ecology. 3a ed. University park press., Baltimore, U.S.A., pp. 348-350. 1974.
45. Gay, J.F.R., Cadena epidemiológica de la cisticercosis. UAM-Xochimilco, División ciencias biológicas y de la salud. Puebla, Pue. 1-40. 1986.
46. Martínez-Zedillo, G., Bobadilla-Vela, I., Historia de la cisticercosis porcina en México. Arch. Invest. Méd. (Mex.). 18: 77-90. 1987.
47. Martínez-Zedillo, G., Efecto del prazicuantel metrifonato y DDVP en la actividad de creatinocinasa del líquido intraquistico de Cysticercus cellulosae. V-reunión anual de parasitología veterinaria facultad de medicina. UNAM. pp. 23-25. 1984.

48. Whitner, V.S., Morin, L. G., Mckneally, S.S. and Samoson, E.J., Stability of creatine kinase-3 in lyophilized materials. Clin. Chem. 28:41-44. 1982.
49. Diagnostica Merck, CK-NAC-activado Prueba UV optimada 14328, Merck 1-Test. (Referencia técnica).
50. Beckman instructions 015-556461-A, Paragon electrophoresis system, CK-creatine kinase isoenzyme electrophoresis. 1981. (Referencia técnica).
51. Beckman instructions 015-556562, Paragon electrophoresis system, SPE Serum Protein Electrophoresis. 1981. (Referencia técnica).
52. Gebott, M.D., Beckman microzone electroforesis manual. A microzone methods for serum proteins. California, U.S.A. Beckman Instruments, Inc., pp. 2.1-2.13. 1975.
53. D. Trainer, T. and Guening, D., A rapid method for the analysis of Creatine phosphokinase isoenzymes. Clin. Chim. Acta. 21:151-154. 1968.
54. Somer, H., and Kontinen, A., A method allowing the quantitation of serum creatine kinase isoenzymes. Clin Chim. Acta. 36:531-536. 1972.
55. Sharov, G., V.A. Saks, V., N. Smirnov, V. and I. Chazov, E. An electron microscopic histochemical investigation of the localization of creatine phosphokinase in heart cells. Biochim. Biophys. Acta 468:495-501. 1977.
56. Everson-Pearse, A.G., Histochemistry: theoretical and applied. Vol. 11, 3rd. ed., Whitefriars Press LTD. London.: 860-920. 1972.
57. Rosalki, S.B., Creatine Phosphokinase isoenzymes. Nature. 207:414. 1965.
58. Block, R. J., Durrum, E.L., Zweig, G., A manual of paper chromatography and paper electrophoresis. 2a. ed. Academic Press Inc. New York, USA., pp. 61-82. 1968.
59. Manual de procedimiento del laboratorio clinico IMSS. México, 287-289, 394-397. 1978.
60. Lynch, M.J., Stanley, S.R., Leslie, D.M., Peter, D. S. and Martin, J. H.I.. Métodos de Laboratorio 2da. ed. . México p.114. 1972.

61. Henry, J.H., Cannon, D.C., Winkelman, J.W. Química Clínica. Edit. Jims. 2da. ed. España. 1:406-411, 1980.
62. Vargas, M.G.D., Saldierna, U., Navarro, F.R., Acevedo, H.A., Flisser de M.A. and Aline S. de A. Localización del cisticerco de la Taenia solium en diferentes regiones musculares del cerdo y su importancia para la inspección sanitaria. MVZ noticias, año VIII, 5:13-15, 1987.
63. Muñoz, G.M.. Localización anatómica del C. cellulosae en el cerdo. Tesis licenciatura. E.N.M.V.Z. Mexico. 1970.
64. Daniel, W.W., Bioestadística. Ed. Limusa. México, D.F.:221-254. 1987.
65. Martínez Z.G., Delgado, S.G., González, M.G., Composición bioquímica del líquido intraventricular de Cysticercus cellulosae obtenido de músculo en cerdo. Memorias VIII CONAPAR. UAH Esc. Med. CEUNI. Pachuca, 80. 1988.
66. Khorsandi, H.O. and Tabibi, V. Similarities of human Hydatid Cyst fluid components and the host serum. Bull. Soc. Path. Exot. 71:95-100. 1978.
67. Magath, T.B. The antigen of echinococcus. Am. J. Clin. Path. 31:1-8. 1959.
68. Vidor, E. Piens M.A., Abbas, M. and Petavy, A.F. Hydatid cyst fluid (Echinococcus granulosus) biochemistry. Influence of site on cyst permeability. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 61:333-340. 1986.

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

	pág.	
Tabla 1	Peso molecular promedio de las isoenzimas de creatina cinasa en humano y conejo.....	3
Fig. 1	Mecanismo de acción de creatina cinasa....	4
Fig. 2	Ciclo de vida de <i>C. cellulosa</i>	10
Fig. 3	Obtención del material biológico.....	16
Fig. 4	Contenedor utilizado para el transporte de muestras.....	16
Fig. 5	Procedimiento de electroforesis.....	21
Fig. 6	Curvas patrón de proteínas por el método del ácido sulfosalicílico y Biuret.....	23
Fig. 7	Patrones electroforéticos de las isoenzimas de creatina cinasa y proteínas en suero porcino y líquido intravesicular de cisticerco.....	26-29
Tabla 2	Resultados del patrón electroforético de las isoenzimas de creatina cinasa en el líquido intravesicular del cisticerco.....	30
Tabla 3	Valores de actividad de creatina cinasa....	31
Fig. 8	Gráfica de los valores de actividad de creatina cinasa en suero porcino y líquido intravesicular.....	32
Tabla 4	Prueba estadística.....	33
Fig. 9	Perfiles densitométricos.....	35
Tabla 5	Resultados del análisis densitométrico....	36
Tabla 6	Factores de corrimiento (Rx) de las diferentes muestras.....	37
Tabla 7	Concentración de proteínas en el líquido intravesicular de <i>C. cellulosa</i> y en suero porcino.....	38