

90



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"LA ACTIVIDAD DE LA CITOCROMO C PEROXIDASA EN LARVAS DE *Taenia crassiceps*."

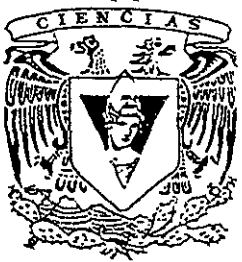
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A:

ALBERTO GUEVARA FLORES

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. IRENE PATRICIA DEL ARENAL MENA

MEXICO. D. F.

2001



292314





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



REPUBLICA NACIONAL
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
ESTADO LIBRE Y SOBERANO DE
MEXICO

L. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Catedrática de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

La actividad de la citocromo c peroxidasa en larvas de Taenia crassiceps"

Realizado por Alberto Guevara Flores

Con número de cuenta 90262920, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Directora de Tesis Dra. Irene Patricia del Arenal Mena

Propietario

Propietario Dra. Annie Pardo Semo

Propietario Dr. Guillermo Salgado Maldonado

Suplente M. en I.B.B. Oscar Flores Herrera

Suplente M. en C. Agustín Plancarte Crespo

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología U.N.A.M.

Dra. Luisa A. Alba Lois



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A mi padre:

Por ser como es y a quién le estoy agradecido por orillarme a ser lo que soy. De quien tengo presente la frase "*las cosas no se mandan*". A él que a pesar de a veces mostrarse duro y gruñón, tiene un corazón blando.

A mis hermanos:

Gabriel, Ma. Eugenia, Verónica, Raquel, Jorge, Fernando, Javier y Gerardo por tolerar mi forma de ser, que sé que es difícil y por todo el apoyo sin interés que me han ofrecido y que sin ustedes no hubiera logrado esto.

A la Dra Patricia del Arenal:

Por ayudarme a incursionar en este campo de la investigación y a quien le debo el que ahora me guste más la investigación, asimismo por toda la paciencia, disponibilidad, confianza y calidad humana que siempre mostró hacia mi persona.

A los miembros del jurado:

A la Dra. Annie Pardo, al Dr. Guillermo Salgado, Al Mtro Agustín Plancarte y Al recién (felicidades) Dr. Oscar Flores, A la Dra. Patricia del Arenal a todos ellos gracias por sus valiosos comentarios y ayuda en la revisión de este trabajo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio:

Patricia Torres, Melchor Roa, Adelina y al Dr Marco Antonio por el apoyo, tolerancia, y amistad brindada. Y por permitirme ser parte de esta familia académica.

A mis amigos:

Aurelio, Angel, Pablo, Claudio, Ariel, Blas, Giovanni, Rodolfo, Paula, Elia, Angélica y Alicia Cea con especial cariño por creer en mí, por brindarme su apoyo y amistad en las adversidades y en la dicha. Ahora que estoy escribiendo éstas palabras me di cuenta de lo difícil que es mencionar a todas las personas, que han influido en mi formación universitaria y que han sido importantes en mi vida, a los que me faltaron mencionar mil disculpas, pero también para ustedes va dirigida.

A la DGAPA:

Por apoyarme en la obtención de una beca dentro del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) del proyecto No. IN212600

INDICE

Abreviaturas	I
Resumen	II
1 INTRODUCCION	
1.1 Generalidades de los céstodos	1
1.1.1 Ciclo biológico	2
1.1.2 Ultraestructura	3
1.2 <i>Taenia crassiceps</i> como modelo experimental	4
1.3 Metabolismo energético en los céstodos	6
1.4 Radicales libres derivados de oxígeno	6
1.5 Enzimas antioxidantes	6
1.5.1 La CcP	8
1.5.2 Peso molecular en diferentes organismos	9
1.5.3 El grupo hemo	9
1.5.4 Localización de la enzima	9
1.5.5 Identificación de la enzima mediante su espectro de absorción	10
2 ANTECEDENTES	12
3 HIPOTESIS	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos particulares	16
4 MATERIAL Y METODOS	
4.1 Material químico	17
4.2 Material biológico	17
4.2.1 Cultivo y obtención de los cisticercos	17
4.2.2 Obtención de sus etapas adultas	17
4.3 Ensayo enzimático	18
4.4 Obtención del homogenado y las fracciones subcelulares	18
4.5 Obtención de las mitocondrias	19
4.6 Obtención de las fracciones mitocondriales de alta velocidad	20
4.7 Obtención de las fracciones mitocondriales tratadas con el detergente tritón X- 100	21
4.8 Obtención de fracciones totales de los cisticercos tipo I, II y adultos de <i>T. crassiceps</i>	21
4.9 Producción de monóxido de carbono	23
4.10 Espectros de absorción diferenciales	23
4.11 Determinación de la concentración de proteína	24
4.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	24
4.13 Técnica para revelar grupos hemos	25

4.14 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas	26
-----------------------------------------------------------------------	----

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Distribución de la CcP en fracciones subcelulares	27
5.2 Distribución de la CcP en la mitocondria	28
5.3 Solubilización de la CcP	29
5.4 Identificación de la CcP en SDS-PAGE	33
5.5 Identificación de la CcP en base a espectros de absorción diferenciales	36
5.6 Actividad enzimática en los diferentes estadios del ciclo biológico de <i>T. crassiceps</i>	39

6 CONCLUSIONES	43
-----------------------	-----------

7 BIBLIOGRAFIA	44
-----------------------	-----------

ABREVIACIONES:

Cit. aa₃ = Citocromo c Oxidasa
A.M. = Amortiguador mitocondrial
Cit c = Citocromo c
CcP = Citocromo c Peroxidasa
CO = Monóxido de carbono
Dit. = Ditionita
E = Coeficiente de extinción molar
EDTA = Ácido etilenoaminotetraacético
Fm = fracción membranal
Fs = fracción soluble
g = fuerza centrífuga relativa
H₂O₂ = Peróxido de hidrógeno
Hepes = Ácido hidroxietilpiperazina etanosulfónico
Red = reducido
M.C. = Mitocondrias del carcass
M.T. = Mitocondrias del tegumento
nm = nanómetro
Ox = oxidado
PBS = amortiguador fosfatos salina
PMSF = Fenil-metil-sulfonyl-fluoruro
Pp = precipitado
S.D. = Desviación estándar
SOD = Superóxido dismutasa
SDS = Dodecil-sulfato de sodio
Ste = sobrenadante
T.A. = temperatura ambiente
TEA = Trietanolamina
TMBZ= tetra-metil-benzina

RESUMEN

Al igual que en diversos parásitos helmintos, en el cisticerco de *Taenia crassiceps* hemos encontrado la formación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en cantidades elevadas durante la respiración mitocondrial. Tanto la catalasa como la glutatión peroxidasa, enzimas encargadas de degradar este compuesto en la mayoría de los organismos, en *T. crassiceps* se encuentran, sino ausentes, sí en baja cantidad.

Como sustituta de estas enzimas se ha propuesto que la citocromo c peroxidasa (CcP) presente en las bacterias y en los eucariotes inferiores, puede ser la encargada de destruir al peróxido de hidrógeno en este tipo de organismos.

La actividad enzimática de la CcP en el cisticerco de *T. crassiceps* fue encontrada en la fracción mitocondrial. Aproximadamente el 95 % de la actividad siempre estuvo asociada a las fracciones membranales de este organelo. Esta enzima se ha descrito principalmente soluble dentro de las mitocondrias, sin embargo, el uso de detergentes, fuerza iónica baja y/o sonicación, no permitieron la solubilización de la CcP de la membrana mitocondrial lo que indica que es una proteína integral de membrana.

Por otro lado, asociada a la actividad de la CcP siempre encontramos la actividad de la citocromo c oxidasa (aa₃), lo que indica que estas dos actividades pueden ser parte de una misma enzima como lo reporta Orri (1982) quién encuentra la actividad de la CcP como una actividad adicional de la citocromo c oxidasa en el caso de las mitocondrias de corazón de bovino.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los céstodos

Los helmintos son metazoarios, generalmente parásitos cuyas formas adultas viven en hospederos vertebrados. Son muy diversos en cuanto a sus estructuras corporales, ciclos de vida, fisiología nutricional y respiratoria, etc. Parte de esta diversidad es el resultado de la complejidad filogenética del grupo, que contiene dos tipos de organismos diferentes: Los acelomados (sin cavidad corporal) como son los Platyhelminths y los pseudocelomados (con cavidad corporal) constituidos por nemátodos y acantocéfalos. Dentro de los Platyhelminths existe la clase céstoda, que es un grupo enteramente parasitario. Generalmente los miembros adultos son endoparásitos del aparato digestivo de varios vertebrados, debido a marcadas especializaciones del gusano adulto “dorsoventralmente aplanado” adaptada para una existencia endoparásita (Whitfield, 1982)

Entre las enfermedades más frecuentes en México, y en el resto del mundo, se encuentran las ocasionadas por este grupo de parásitos, causantes de enfermedades mortales en el hombre y en sus animales domesticados. Esto lo convierte en un modelo fascinante para su estudio.

La estructura de un céstodo típico, en fase adulta, está dividida en tres regiones características que son: escólex, cuello y estróbilo (Figura 1).

A) El escólex o la “cabeza,” localizada en la parte anterior del organismo puede estar equipada con una variedad de estructuras de fijación para mantener al animal en el intestino del hospedero. Tales estructuras pueden ser ventosas, canales, ganchos, espinas, o combinaciones de éstas.

B) El cuello es una zona relativamente indiferenciada, que se encuentra entre el escólex y el estróbilo, la cual puede ser corta o larga. Contiene células germinales que aparentemente son las que originan y forman los nuevos proglótidos.

C) El estróbilo es una estructura situada después del cuello, consiste en una serie lineal de segmentos llamados proglótidos. Los proglótidos situados en la parte más cercana al escólex son inmaduros, ya que sus órganos reproductivos no son

funcionales; los proglótidos intermedios son sexualmente maduros y los últimos se encuentran generalmente grávidos o llenos de huevos. En algunas especies los proglótidos grávidos se desprenden del estróbilo cada cierto tiempo, permitiendo su liberación junto con la materia fecal del hospedero, (Smyth and McManus, 1989a).

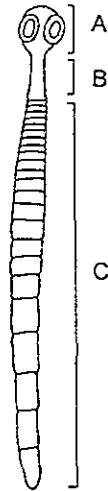


Fig.1. Diagrama general de *Taenia*, en donde se muestra a) El escólex, b) El cuello, y c) El estróbilo.

1.1.1 Ciclo biológico

Casi todos los céstodos hasta ahora estudiados tienen un ciclo de vida indirecto pasando por uno, dos o más hospederos intermediarios, hasta llegar al estado adulto. Sólo algunas excepciones tienen el ciclo de vida directo. En dichos ciclos, el hospedero definitivo generalmente un vertebrado, es donde se lleva a cabo la reproducción sexual del parásito mientras que en el hospedero intermediario, que puede ser un invertebrado o vertebrado según el caso, frecuentemente puede llevarse a cabo la reproducción asexual (gemación). Además muchos céstodos son hermafroditas y durante su vida reproductiva un adulto puede producir millones de huevos, de los cuales sólo unos pocos llegan a su fase adulta.

1.1.2 Ultraestructura

Los céstodos carecen de boca y de intestino por lo que todo el material nutritivo debe pasar a través de la superficie del cuerpo, la cual también sirve para eliminar los materiales de desecho. Esta superficie del cuerpo llamada "tegumento" sirve para las funciones absortivas, similar a lo que ocurre en la mucosa intestinal de vertebrados. Este tegumento está cubierto por pequeñas proyecciones llamadas microtrícas, las cuales cubren completamente la superficie del organismo y son similares, en algunos aspectos, a las microvellosidades de algunas células epiteliales que se han propuesto que sirven para aumentar la superficie de absorción; estas estructuras reciben el nombre de borde de cepillo (Smyth and Mcmanus, 1989). Debajo de la membrana se encuentra el sincicio tegumental, el cual contiene una gran cantidad de cuerpos electrodensos, mitocondrias y vesículas que contribuyen a la formación del glicocálix. (Schmidt and Roberts, 1981). La parte inferior del sincicio se encuentra limitado por una membrana basal; por debajo de ésta se encuentra un parénquima celular que contiene fibras musculares ricas en mitocondrias: esta zona es conocida comúnmente como "carcass" (Gray, 1984). (Figura 2).

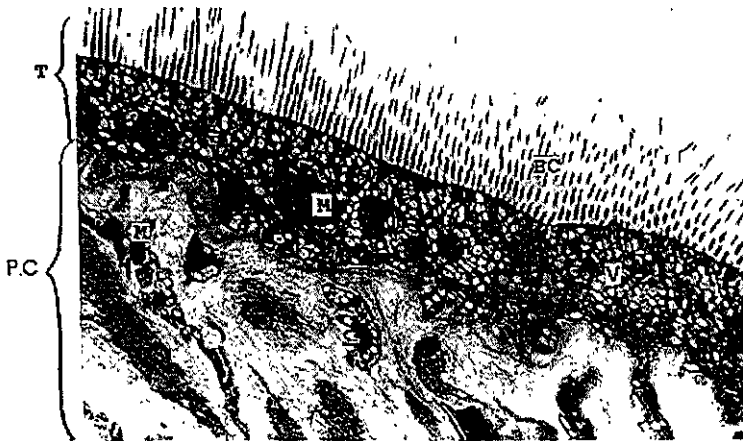


Figura 2 Micrografía de corte transversal de un cisticerco de *T. crassiceps*, en el cual, se muestran dos regiones fácilmente diferenciables el "Tegumento" (T), que contiene: células formando un borde de cepillo (B.C); mitocondrias (M); vesículas (V); y el "Carcass", que contiene; parénquima celular (P.C): con fibras musculares.

1.2 *T. crassiceps* como modelo de estudio

Taenia crassiceps (Zeder, 1800; Rudolphi, 1810) es un parásito común del zorro rojo (*Vulpes vulpes*, L.) en Europa, su estado larvario conocido como *Cisticercus longicollis* (Rudolphi, 1819) se encuentra a menudo bajo la piel y en las cavidades corporales de diversas especies de pequeños roedores, (Freeman, 1962).

Debido a su capacidad reproductiva asexual se ha logrado obtener con facilidad la fase larval y la adulta con dificultad. La primera se obtiene, inoculando cisticercos a nivel intraperitoneal al ratón (huésped): ahí se reproducen asexualmente hasta saturar el espacio de la cavidad corporal del ratón; aproximadamente 6 meses después se sacrifica al huésped para recuperar los cisticercos (Figura 3).

El adulto se obtiene en el laboratorio administrando cisticercos con escólex bien desarrollado a hámsters machos dorados inmunosuprimidos, por vía oral (Kitaoka y Col. 1990).

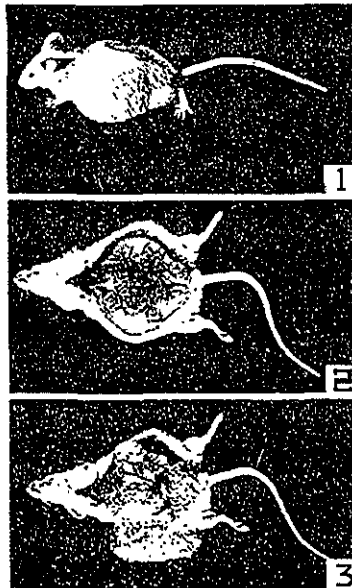


Figura 3. Ratón infectado por cisticercos de *Taenia crassiceps* 1) el ratón, seis meses después de la infección, 2) ratón con abdomen expuesto, 3) ratón con abdomen expuesto, mostrando los cisticercos.

El desarrollo del cisticerco de *Taenia crassiceps* (Figura 4). Durante su ciclo de vida, las *Taenias* adultas son hermafroditas, viven y maduran sexualmente en el intestino del zorro rojo (*Vulpes vulpes*), que es el hospedero definitivo. Ahí pueden producir millones de huevos, de los cuales sólo unos pocos llegan a su fase adulta. Los huevos son infectivos cuando salen del hospedero definitivo; pero sólo eclosionan cuando son ingeridos por los hospederos intermediarios roedores (Cheng, 1987). Los huevos penetran a través de las células epiteliales del intestino de los roedores y son transportados mediante el sistema sanguíneo o linfático hasta el músculo, donde se desarrollan en la larva (Smith y McManus, 1989)

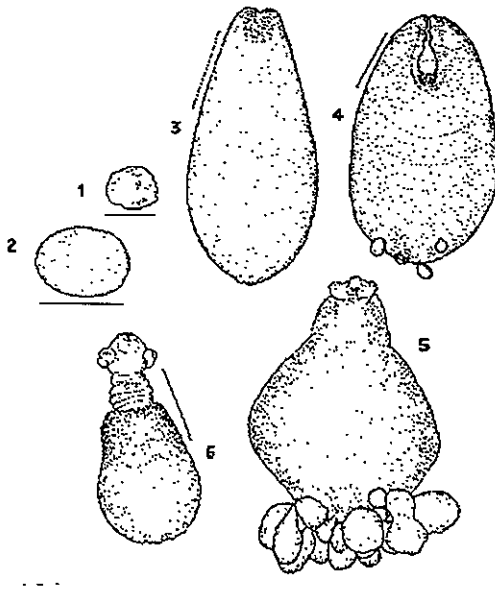


Fig. 4 Desarrollo del cisticerco de *Taenia crassiceps* en el ratón 1) huevo 2) larva con laguna pequeña 3) larva con laguna desarrollada 4) cisticerco con gemas pequeñas 5) cisticerco con gemas grandes 6) cisticerco totalmente desarrollado.

El hecho de que este parásito prácticamente no tiene efecto patógeno en el ser humano, y también porque su reproducción asexual facilita su cultivo en el ratón en una forma segura y económica, lo hace atractivo como modelo experimental.

1.3 Metabolismo energético en los céstodos.

En diversos parásitos helmintos, como en el caso de *T. crassiceps*, se ha demostrado experimentalmente que producen cantidades ostensibles de peróxido de hidrógeno (Cheng, 1987; Cheah y Chance, 1970; Del Arenal, 1997). Sin embargo, no se sabe si esto mismo ocurre *in vivo*, (Paul y Barret, 1980).

Dado que el peróxido de hidrógeno es un oxidante tóxico por su efecto secundario sobre los tejidos, (Von Brand, 1973). Su presencia en los cisticercos de *T. crassiceps* permite especular acerca de la existencia de un mecanismo de defensa en este parásito.

1.4 Radicales libres derivados de Oxígeno

Los radicales libres derivados de oxígeno son producidos durante los procesos metabólicos celulares normales, por efectos de radiaciones ionizantes y por ciertos medicamentos anti-parasitarios. Cuando la producción es excesiva o anormal éstos pueden dañar principalmente a las membranas, los ácidos nucleicos y a las proteínas, que puede producir la muerte de las células e incluso del organismo completo (Callahan, y col. 1988).

1.5 Enzimas antioxidantes

Existen diversos mecanismos de defensa que han desarrollado los parásitos al igual que otros organismos, para reducir los niveles de oxidantes y, consecuentemente, el daño que producen. Entre estos mecanismos se encuentran la presencia de diversas enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (Scandios, 1992).

En los organismos superiores, el peróxido de hidrógeno es destruido principalmente por la enzima antioxidante llamada catalasa, que se encuentra comúnmente dentro de los peroxisomas, aunque a veces se ha demostrado su presencia en la mitocondria (Rubio, 1997). Por otro lado, en los protozoarios y los helmintos parásitos se ha reportado que la actividad de la catalasa es baja o está

ausente (Von Brand, 1973) al igual que la de otras enzimas antioxidantes frecuentemente encontradas, como muestra la Tabla 1.

Tabla 1. Enzimas antioxidantes de los helmintos y los protozoarios.

ORGANISMO	ACTIVIDAD		
	SOD (U mg)	CATALASA (U mg)	GSH-Px (mU mg)
HELMINTOS			
<i>Trichinella spiralis</i> larva recién nacida	6.8	0	0
adultos	19.2	0	16
larva muscular	15.0-30.8	0	36
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> Adultos	15.34	1.13	29
<i>Nematospiroides dubius</i> Adultos	31.63	3.78	23
<i>Onchocerca cervicalis</i> Microfilarias Adultos	29.5 27.6	0.0004 0.0001	9 6.8
<i>Taenia taeniformis</i> Adultos	34.29	ND	ND*
<i>Hymenolepis diminuta</i> Adultos	7.9	0	0
<i>Moniezia expansa</i> Adultos	9.5	0	0
<i>Fasciola hepatica</i>	ND	0	ND
PROTOZOARIOS			
<i>Trypanosoma brucei</i> Extracelular	4.83	ND	ND
<i>Trypanosoma cruzi</i> Epimastigotes	0.054 ó 0.56	0	0
<i>Leishmania donovani</i> Promastigotes Amastigotes	4.1 12.8	0.0009 0.0025	1.0 17600
<i>Crithidia fasciculata</i> fase tardía fase de vida libre	9.16 14.2	ND ND	ND ND

Adaptado de Callahan, y col., 1988

*N.D. no detectado

1 unidad de SOD -es la cantidad de enzima requerida para inhibir la cantidad de reducción del citocromo c un 50%.

1 unidad de catalasa – es la cantidad de enzima requerida para descomponer un 50% de 20 mM de peróxido de hidrógeno en un minuto.

1 unidad de GSH-px – es la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 µM de glutation reducido en un minuto a 25°C.

Observando los datos de esta tabla, la superóxido dismutasa (SOD) es la única enzima que tiene valores representativos de actividad, quizá debido a que se trata de la fuente principal de producción de H_2O_2 , por medio de la dismutación del radical superóxido (O_2^-), mientras que, la catalasa y glutatión peroxidasa destruyen el H_2O_2 . Los valores de estas dos últimas enzimas, son realmente despreciables y, no parecen ser las responsables de eliminar en su totalidad el peróxido de hidrógeno producido endógenamente.

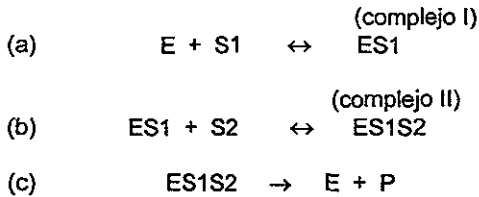
Por otro lado, en un sobrenadante mitocondrial de alta velocidad (centrifugado a 105,000 g) del cisticerco y del adulto de *T. crassiceps* se determinaron las actividades de glutatión peroxidasa y catalasa, y al igual que a las reportadas (tabla 1) resultaron bajas (Rubio, 1997).

También, Paul y Barret (1980) cuantificaron las actividades catalíticas de las enzimas involucradas en el metabolismo de peróxido de hidrógeno en *Hymenolepis diminuta* y *Moniezia expansa*, y no encontraron actividad detectable de la catalasa, la glutatión peroxidasa, la lipoxigenasa y la NADH peroxidasa. Pero sí detectan ligera actividad de la glutatión reductasa y la superóxido dismutasa. Con respecto a la peroxidasa, estos autores la detectan dependiendo del sustrato, desde una moderada a una alta actividad en *H. diminuta* y *M. expansa*. Ya que la enzima tiene una alta especificidad por el citocromo c reducido en *H. diminuta* y *M. expansa*, la llamaron "citocromo c peroxidasa", (Paul y Barrett, 1980).

1.5.1 La citocromo c peroxidasa (CcP)

La citocromo c peroxidasa es una hemoproteína que se encuentra presente en la levadura de cerveza (Yonetani, 1965), en bacterias (Ronnberg y Elfolk, 1979; Goodhew col.,1990), en protozoarios (Kusel y col.,1973) y en helmintos (Paul y Barrett., 1980; Campos, 1995; Campos, 1999).

Esta enzima cataliza la oxidación de ferrocitocromo c a ferricitocromo c, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), como está indicado en las siguientes reacciones (a) , (b), y (c), donde E es la enzima; S1 es H_2O_2 ; S2 es ferrocitocromo c, y P es ferricitocromo c.



La formación del complejo I es muy rápida, además de que es muy estable en ausencia de reductores, e incluso ha sido posible detectarlo por su señal espectrofotométrica (Yonetani col.,1966).

1.5.2 Peso molecular de la enzima en distintos organismos.

El peso molecular de la CcP ha sido determinado en diferentes organismos, como en *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de pan), donde existe como monómero que tiene un peso molecular aproximado de 34.1 KDa (Yonetani, 1965), mientras que en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* es de 50.0 KDa (Ellfolk, 1984) y en *Paracoccus denitrificans* es de 42.0 KDa (Goodhew y col. 1990).

1.5.3 El grupo hemo

La enzima de la levadura del pan contiene una protoporfirina férrica IX, la cual no está unida covalentemente a la apoproteína (Yonetani, 1965). Sin embargo, en las bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Paracoccus denitrificans*, la enzima contiene dos grupos hemo c, (uno de bajo spin y otro de alto spin), unidos covalentemente a una cadena polipeptídica (Gilmour, y col.,1993).

1.5.4 Localización de la enzima.

Yonetani y Ohnishi (1966) observaron que la actividad enzimática de la CcP de la levadura de pan está en la fracción mitocondrial.

Paul y Barret (1980) demostraron que en el céstodo *Himenolepis diminuta* la CcP está asociada a la membrana mitocondrial en un 82% y el resto se encuentra en la fracción mitocondrial soluble.

Sin embargo, existen datos contrarios en donde Mckelvey y Fioravanti (1986) demostraron que en las fracciones submitocondriales del mismo parásito la actividad

de la enzima está asociada con la fracción soluble mitocondrial. De ésta, el 55% fue encontrada en la matriz mitocondrial, y el 32% en el espacio intermembranal. Asimismo, mostraron que el 78% de la actividad de la citocromo *c* oxidasa está asociada a la membrana interna mitocondrial.

1.5.5 Identificación mediante espectros.

La CcP se puede identificar por medio de espectros de absorción, debido a que presenta señales características cuando forma complejos *c*/CO y *c*/H₂O₂.

Yonetani (1965) trabajando con la CcP de la levadura del pan, comprobó que la enzima oxidada forma el complejo CcP-H₂O₂ (complejo I), que en un espectro de absorción, presenta una señal en soret en forma de pico en 419 nm. Adicionalmente encontró la formación del complejo CcP-CO el que presenta una banda en soret en forma de pico en 423 nm. Este último complejo también ha sido detectado por Fioravanti (1986) en el protozooario *Crithidia fasciculata*, con la presencia de una banda en forma de pico en soret en 419 nm. También Soinien y Ellfolk (1973) encontraron que la CcP de *Pseudomonas* presenta una señal en forma de pico en soret de 415 nm, al formar el complejo con CO. (Figura 12).

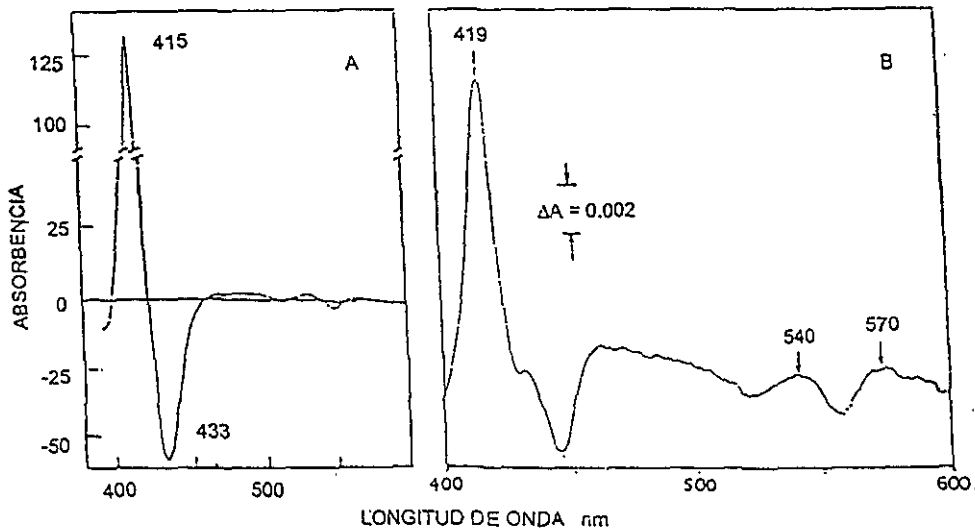


Figura 5 Espectros diferenciales con CO en A) CcP de *Pseudomonas*, (Soinien y Ellfolk 1973) y en B) CcP de *Crithidia fasciculata*, (Kusel y col. 1973).

En un estudio posterior Yonetani observó el efecto de pH sobre los espectros de absorción del complejo ferroso-CO de la CcP (Fe^{2+}/CO), y encontró un corrimiento de la banda en soret de 423 a 420 nm, al incrementar el pH de 6.5 a 8.5 respectivamente. El cambio espectral fue reversible. Este corrimiento de la banda por efecto del pH indica formas una alcalina y una ácida de la enzima ferrosa-CO. Con irradiación de un flash de luz (100J de poder y 30- μs de duración), la unión hemo-CO fue rápidamente disociada, en ambas formas (Tetsutaro, 1985).

2. ANTECEDENTES

Al igual que en diversos parásitos helmintos, en el cisticerco de *T. crassiceps* se ha identificado la formación de H_2O_2 en cantidades significativas durante el curso de la respiración mitocondrial (aproximadamente 25-30 veces más que en mamíferos).

En la Figura 6 se muestra el consumo de O_2 mitocondrial cuando se usa NADH como sustrato y también el efecto que se obtiene al adicionar catalasa al ensayo, en diferentes tiempos durante el consumo de O_2 (Lineas punteadas). Aquí se puede observar la producción de O_2 como resultado de la acción de la catalasa sobre el H_2O_2 producido en dicha reacción.

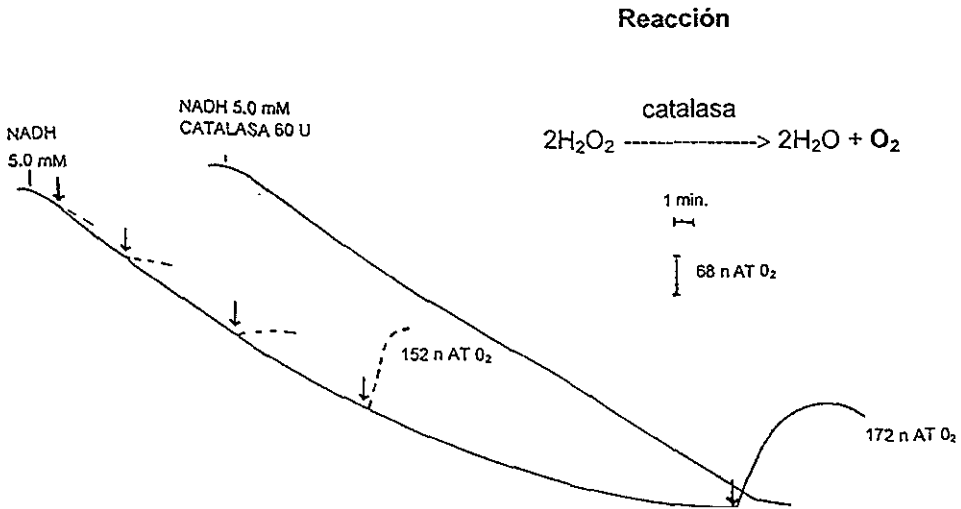


Figura 6. Trazos obtenidos al incubar mitocondrias del cisticerco de *T. crassiceps* con 5 mM de NADH (control) y con NADH más catalasa (60 U) desde el inicio del ensayo. Las flechas indican el resultado de adicionar catalasa en diferentes tiempos a muestras idénticas a la usada como control, (líneas punteadas).

Rubio E. (1997) evaluó la actividad enzimática de la glutathion peroxidasa y de la catalasa tanto en el cisticerco como en formas adultas de *T. crassiceps*, observó una actividad baja para ambas enzimas, lo que sugiere que debe de existir otra enzima o mecanismo para degradar al peróxido de hidrógeno.

Por otro lado, en muestras mitocondriales del cisticerco analizadas por espectros diferenciales red+CO – red (Figura 7), se observan dos señales en la región de solet; una de éstas da un pico entre 409-418 nm y la otra en 432 nm; esta última, característica del citocromo aa₃ (Figura 7A). De acuerdo con lo reportado por Jones y Poole, (1985), se sugiere que que esta primera señal podía corresponder a un citocromo de tipo o, que funcionara como una oxidasa terminal alterna.

Si la muestra mitocondrial en las condiciones anteriores se fotodisocia, únicamente aquellos citocromos que tienen función de oxidasa terminal serán capaces de fotodisociarse. En la Figura 7B se observa que sólo el pico correspondiente a la citocromo c oxidasa (aa₃) se invirtió a pico 448, valle 432 nm y, en el caso del supuesto citocromo "o", la señal a 412 no se modifica, lo que indica que este componente no está funcionando como oxidasa terminal.

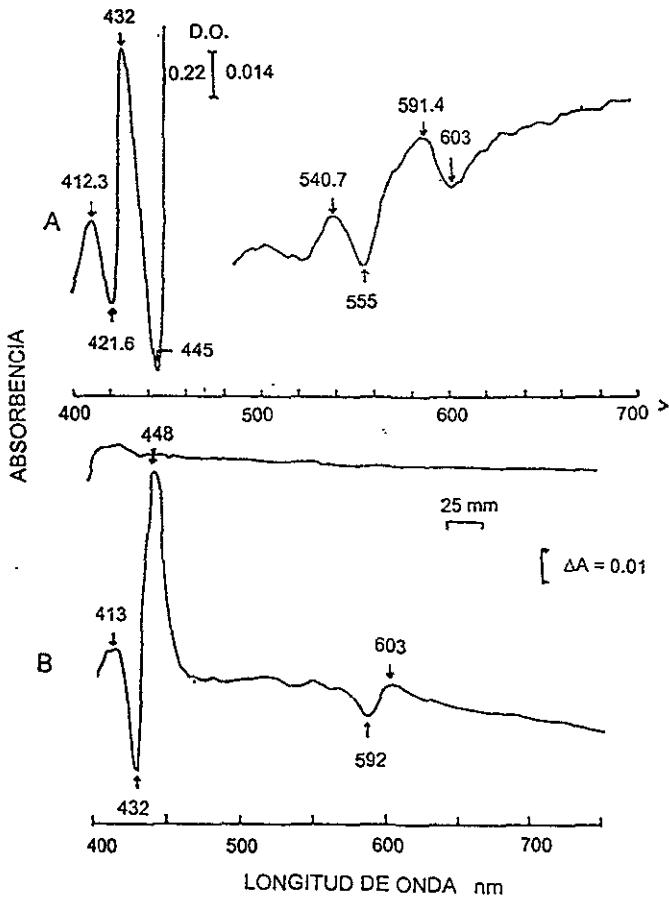


Figura 7. Espectros diferenciales a temperatura ambiente (T.A.) de mitocondrias de *T. crassiceps* tratadas con monóxido de carbono. A) reducido con ditionita más CO menos reducido (red+CO – red), mantenidos en oscuridad B) La muestra del panel A se congela a -90°C, se hace la basal y el complejo red+CO se fotodisocia iluminando durante dos minutos la muestra. El trazo se obtuvo 5 minutos después de la fotodisociación.

Para corroborar si existe o no el citocromo "o," se aislaron a los grupos hemo de la fracción mitocondrial del cisticerco de *T. crassiceps*, así como también mitocondrias de corazón de bovino y *E. coli* (estos dos últimos fueron tomados como controles). El análisis por HPLC mostró señales para grupos hemo "a y b," pero no para un grupo hemo "o" (figura 8). (del Arenal, Molecular and Biochemistry parasitology en prensa).

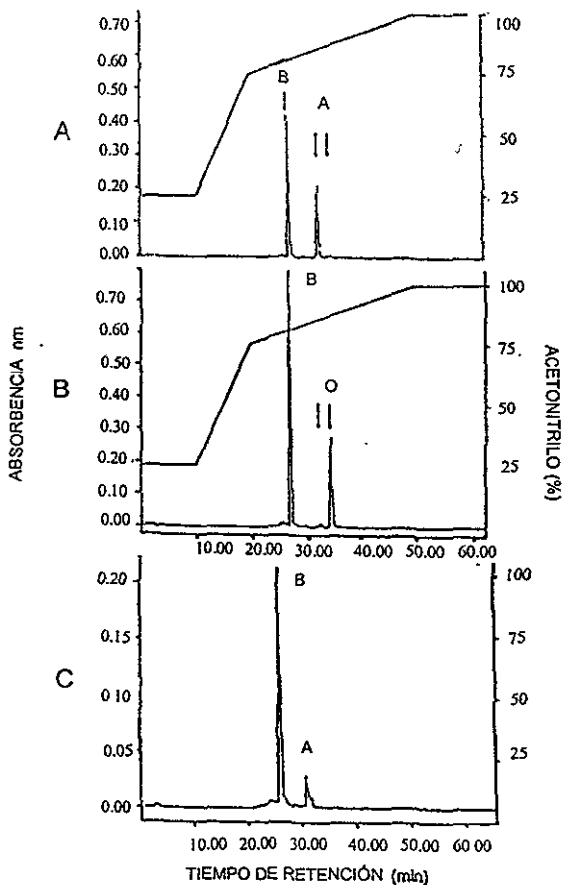


Figura 8. Análisis por HPLC de los grupos hemo, obtenidos de las siguientes muestras: mitocondrias de corazón de bovino, (A); *E. coli* (B) y mitocondrias de *T. crassiceps* (C).

Estos dos análisis confirmaron que el componente no identificado que reacciona con monóxido de carbono no es una oxidasa terminal, ni tampoco contiene un grupo "hemo o" característico del citocromo "o" (Puustinen y Wikstrom, 1991).

Por lo tanto, proponemos que la CcP es la enzima encargada de la degradación del peróxido de hidrógeno, y ésta es la que presenta una señal espectroscópica c/CO, que se observa entre 409-418 nm.

Como ya se mencionó existen reportes en la literatura, que indican que la CcP se encuentra presente en este tipo de organismo (Paul y Barrett, 1980; Fioravanti y Mckelvey, 1986), lo que apoyaría esta propuesta.

3. HIPÓTESIS.

La citocromo c peroxidasa es la enzima encargada de eliminar el peróxido de hidrógeno que se produce durante la respiración mitocondrial del cisticerco de *T. crassiceps* y que además sea responsable de ese otro componente que forma un complejo con el CO y tiene una señal espectroscópica alrededor de 412 nm.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar si existe la CcP en los cisticercos de *Taenia crassiceps*, y caracterizar su señal espectroscópica en presencia de CO.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Demostrar si existe actividad de la CcP en el cisticerco de *Taenia crassiceps*.
- Localizar y cuantificar la actividad de la CcP en la mitocondria.
- Determinar por medio de los espectros de absorción, la formación de los complejos CcP-H₂O₂ y CcP-CO.
- Corroborar por electroforesis, la presencia de la CcP en las muestras mitocondriales.

4. MATERIAL Y METODO

4.1 Material químico:

La trietanolamina, el H₂O₂ y el hidrosulfito de sodio fueron (MERCK) los fosfatos de sodio monobásico y el cloruro de sodio de (J.T.BAKER) la 3'3'5'5' Tetrametilbenzidina, el tritón X-100, el SDS y el persulfato de amonio de (SIGMA)

La Bis-acrilamida, acrilamida, el azul de bromofenol y el TEMED de (Bio-Rad)

4.2 Material biológico:

Se utilizó el estado larval (cisticerco) y adulto de *T. crassiceps* de la cepa HYG, utilizando como hospederos a ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad, de la cepa Balb/c y hámsters machos dorados (*Mesocricetus auratus*) de un mes de edad.

4.2.1 Cultivo y obtención de cisticercos:

Los ratones hembras de 15-18 g fueron inoculados intraperitonealmente con 20 cisticercos poco desarrollados; aproximadamente después de seis meses los cisticercos fueron recuperados del interior de cada ratón (Figura 3 de Introducción) y fueron lavados de 5 a 6 veces en una solución amortiguadora de fosfatos-salina (PBS) 10 mM pH 7.4.

4.2.2 Obtención del estado adulto de *T. crassiceps*.

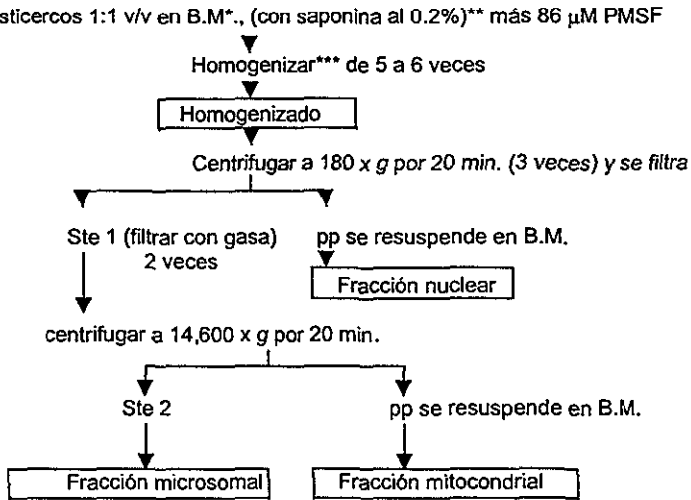
Los adultos se obtuvieron administrando por vía oral a los cisticercos con el escólex bien desarrollado a hamsters dorados machos de 6 semanas de edad. De manera simultanea los hamsters fueron inyectados subcutáneamente con acetato de cortisona (150 mg por kg de peso) el día de la infección y cuatro días post-infección (DPI). Los hamsters fueron desparasitados de forma oral con praziquantel (30 mg por kg de peso) 8 días antes de la infección. Después de 34-50 días fueron sacrificados y se extraen la *Taenias* adultas del intestino delgado, de donde se colectaron (Rubio E.1997).

4.3 Ensayo enzimático.

Basado en la técnica de Yonetani y Ohnishi (1966), el ensayo contiene en 1 ml: 100 mM Trietanolamina-HCl (TEA) pH 7.6, 1 mM de EDTA, 20 μ M de citocromo c reducido (corazón de caballo) y una cantidad variable de muestra biológica mitocondrial, se traza la línea basal y se inicia el ensayo adicionando 40 μ M de H_2O_2 , (Figura 8). La oxidación del citocromo c, fue registrada a 550 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-70 (Figura 5). La actividad se expresa en nmoles de citocromo c oxidado/min/mg de proteína. Para calcular la actividad específica se usó su coeficiente de extinción molar ($E=19.6 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$).

El citocromo c se reduce de la siguiente forma: A partir de una solución de ditionita de sodio (250 mg/ml), se tomó una alícuota de 20 μ l y se adicionó a 180 μ l de citocromo c (12 mg/ml). La solución final tiene una concentración de 1 mM de citocromo c reducido, (Paul y Barrett, 1980).

4.4 Obtención de un homogenado total y las fracciones subcelulares del cisticerco de *T. crassiceps*. Esquema 1



* Buffer mitocondrial: Hepes 10 mM, sacarosa 250 mM, EGTA 2 mM, 0.1% albúmina desgrasada, pH 7.4

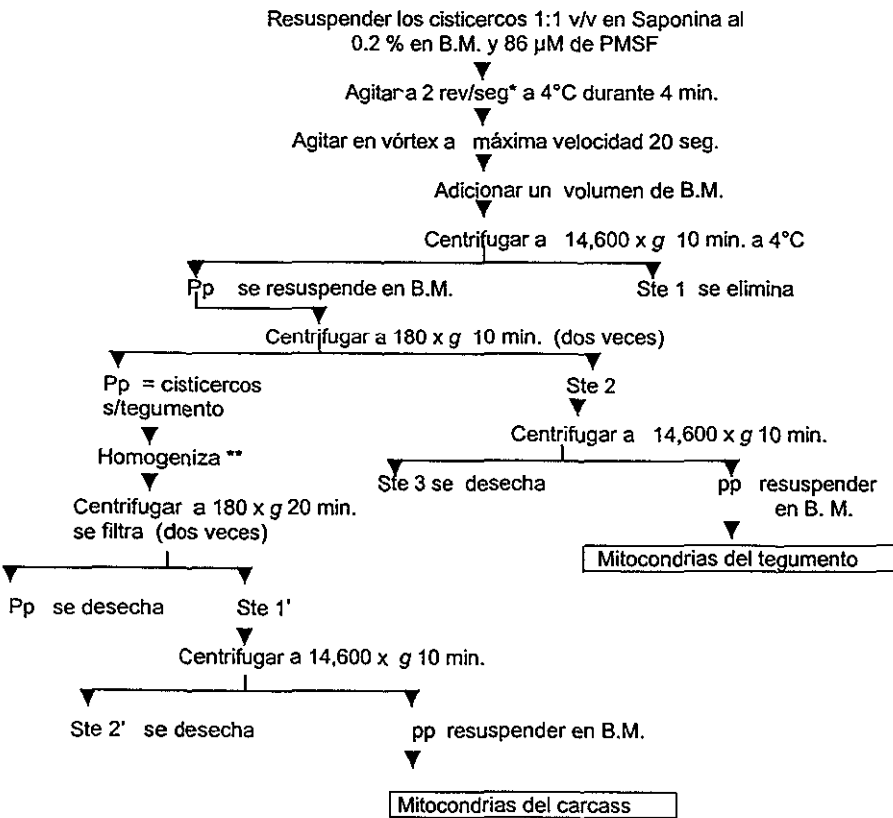
** En los primeros ensayos la saponina estuvo ausente y se adiciona sólo cuando se indica

*** Homogenizar con un vástago de teflón Potter-Elvehjen y se guarda una alícuota para homogenado total

4.5 Obtención de mitocondrias del cisticerco de *T. crassiceps*.

Las mitocondrias del tegumento y del carcass se obtuvieron por separado: al tegumento se le adiciona saponina al 0.2 %, para evitar que las mitocondrias queden encerradas en vesículas, mientras que el carcass es homogenizado como se indica en el siguiente Esquema 2. Finalmente las mitocondrias del tegumento y el carcass se reunieron en un solo lote.

Esquema 2 Obtención de mitocondrias del cisticerco de *T. crassiceps*.



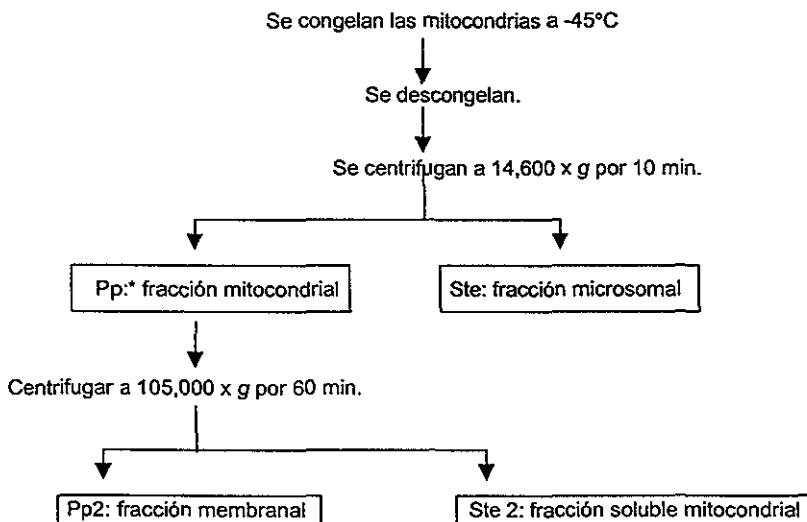
* rev/seg: revoluciones por segundo.

**Homogenizar: con un vástago de teflón Potter-elvehjen.

4.6 Obtención de fracciones mitocondriales del cisticerco de *T. crassiceps* por centrifugación a alta velocidad.

Las mitocondrias obtenidas de acuerdo al Esquema 2 se guardaron a -45°C y un día después se descongelaron y se centrifugaron (sorrall RC 26 plus) a $14,600 \times g$ por 10 min. Se obtienen una fracción "microsomal" y otra "mitocondrial." Esta última se centrifuga (Ultracentrifuga Beckman XL-90) a $105,000 \times g$ por 40 min. y se obtienen un precipitado de alta velocidad (fracción membranal) y su sobrenadante (fracción soluble). Esquema 3.

Esquema 3. Obtención de fracciones mitocondriales de alta velocidad, del cisticerco de *T. crassiceps*.

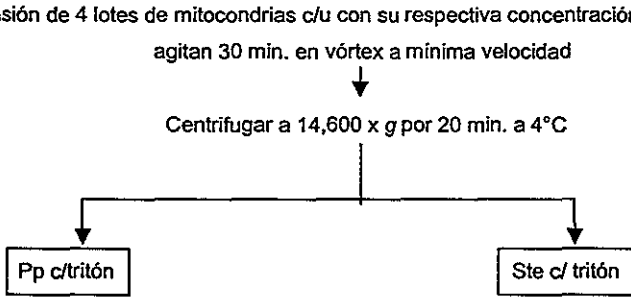


*Nota: La fracción mitocondrial se resuspende en amortiguador de fosfatos de sodio 100 mM, pH 7.4

4.7 Obtención de fracciones mitocondriales después de tratar a las mitocondrias con tritón X-100

Las mitocondrias obtenidas por el esquema 2, fueron separadas en cuatro lotes idénticos, con 4.5 mg de proteína c/u. A cada lote se le agregó una concentración de tritón X-100 de 65, 100, 210 y 222 µg/mg de proteína, respectivamente, (Esquema 4). Se agitan 30 minutos con un vórtex a mínima velocidad, posteriormente se centrifuga a 14,600 x g por 20 min. a 4°C

Esquema 4. Obtención de fracciones mitocondriales, después de tratar las mitocondrias con tritón X-100.



4.8 Obtención de fracciones totales de los cisticercos tipo I, II y adultos de *T. crassiceps*.

Los cisticercos son clasificados en dos tipos principales; el I cuya característica principal es la de presentar una vesícula grande y translúcida y el II que presenta una vesícula pequeña y el escólex invaginado. Para su clasificación se utilizó una solución al 10 % de sacarosa, en donde se observa cómo los tipo I flotan y los tipo II se van al fondo del tubo. Una vez separados, fueron lavados 3 a 4 veces, al igual que los estadios adultos, con una solución salina PBS.

Los cisticercos y los adultos por separado, se ponen en un volumen igual de una solución hipotónica 10 mM de amortiguador de Fosfatos de sodio, y 100 µM EDTA pH 7.6 y 86 µM PMSF. Se homogenizan a 3,000 rpm de 5 a 6 veces

utilizando un vástago de teflón accionado por un motor homogenizador potter-elvehjen como describe Zenka (1987) y se fracciona de acuerdo al Esquema 5.

Esquema 5. Obtención de fracciones soluble e insoluble totales de los cisticercos tipo I, II y del estadio adulto de *T. crassiceps*.

Resuspender cisticercos 1:1 v/v con 10 mM de amortiguador de fosfatos de sodio pH 7.6
100 μ M EDTA y 86 μ M PMSF

Homogenizar* de 5 a 6 veces

Centrifugar a 14,600 x g por 20 min. a 4°C

Ste 1 (guarda) pp 1

El pp 1 se resuspende en 10 mM de amortiguador de fosfatos de sodio pH 7.6, y es nuevamente homogenizado y centrifugado, (paso anterior)

Sonicar 20 seg x 5, con descanso de 1 min.

Centrifugar a 14,600 x g por 20 min. a 4°C

Ste 2 (se reune con el Ste 1) pp 2 (guarda)

La mezcla del Ste 1 y Ste 2 se centrifugan a 14,600 x g por 10 min.

Ste 3 pp 3 junta con pp2

El sobrenadante Ste3 se centrifuga a 140,000 x g por 3 hrs

Ste 4 pp 4** junta con pp 3 y pp 2

*Nota: Es homogenizado usando un vástago de teflón Potter-elvehjen y se guarda una alícuota.

**Nota: El pp 4 al juntarse con lo otros precipitados da un precipitado total, y éste es resuspendido en un buffer de fosfatos de sodio 100 mM pH 7.6, EDTA 1 mM.

4.9 Producción de monóxido de carbono (CO)

La producción de monóxido de carbono se realizó al dejar gotear ácido sulfúrico concentrado sobre aproximadamente 25 g de formiato de sodio; dicha reacción produce CO.

4.10 Espectros de absorción diferenciales.

Las muestras mitocondriales o fracciones mitocondriales membranales y solubles se analizaron por espectroscopia empleando un espectrofotómetro de doble haz, Beckman DW-2a uv-vis. Se hicieron espectros a temperatura ambiente (25°C) y con nitrógeno líquido (-196°C).

Se hicieron tres tipos de espectros con las muestras:

- a) El estado oxidado en presencia de peróxido de hidrógeno menos el estado oxidado (ox + H₂O₂ - ox). La oxidación se lleva a cabo por agitación, y se traza la basal (ox - ox) después se adiciona el H₂O₂ a una concentración final de entre 100 – 300 μM para promover la formación del complejo CcP-H₂O₂, y se traza el espectro diferencial.
- b) El estado reducido menos el estado oxidado (red-ox). La oxidación se realiza por agitación y se traza la basal oxidada. La reducción se lleva a cabo por la adición de ditionita en solución o en polvo, se deja incubar por un tiempo de 5 min. y es trazado el espectro diferencial.
- c) El estado reducido en presencia de CO menos el estado reducido (red+CO-red). Después de hacer una línea basal de las muestras reducidas con ditionita, una de estas muestras se burbujea con una corriente constante de CO durante 1 ó 2 minutos, en presencia de una alícuota de anti-espumante. El tratamiento con CO se realizó en la oscuridad, y se dejó 10 minutos reaccionando para promover la formación del complejo CcP-CO.

4.11 Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (1951) modificado por Markwell y col. (1981).

Sol. "A" Na_2CO_3	5.0 g
NaOH	1.0 g
Tartrato de Sodio	0.4 g
SDS	2.5 g

Sol. "B" $\text{CuSO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}$

Sol. "C" Se mezclan 100 partes de Sol. "A" con una parte de sol. "B" y se agita

Se utiliza un estándar de albúmina sérica bovina con una concentración de 1 mg/ml y se hace una curva patrón (25,50,75,100 y 150 μl). En otros tubos se coloca la muestra problema (10-30 μl) por triplicado, y se afora a 250 μl con agua destilada al igual que los tubos de la curva patrón. Posteriormente se agrega 750 μl de la sol. "C" a c/u de los tubos, y se deja reposar por 60 min.

Después se prepara una solución de Folin-Ciocalteu-fenol 1:1 con agua destilada, y se agrega 75 μl a c/u de los tubos, y se deja reposar por 45 min.

Después de haber transcurrido el tiempo se lee a 660 nm en un espectrofotómetro PM2 DL (Zeiss), tomando como blanco el tubo que solo tiene agua y los reactivos.

4.12 Electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de SDS.

Se preparó un gel discontinuo siguiendo la técnica de Davis, (1964) y modificado por Hedrick y Smith (1968). En una cámara de electroforesis BIO-RAD, modelo miniprotean II con placas de vidrio de 8 cm x 7 cm con separadores y peine de 1.5 mm.

Los geles se prepararon a partir de una solución de acrilamida al 30 % y bis-acrilamida al 0.8 % en presencia de SDS al 1 % final. El gel concentrador fue preparado al 4.5 %, Tris-HCl 125 mM pH 6.7, mientras que el gel de resolución se

preparo con acrilamida al 12 %, Tris 375 mM pH 8.7. Después se eliminó el O₂ de la solución al vacío durante algunos minutos y se usaron como catalizadores persulfato de amonio y TEMED con la concentración final de 0.04 % y 6 mM, respectivamente.

Se hizo una preelectroforesis (para eliminar el exceso de persulfato de amonio) durante 4 -12 hrs. a 1 mA, en un amortiguador que contiene 0.025 M Tris, 0.192 M glicina, y SDS al 0.1%.

Posteriormente las muestras membranales mitocondriales (350-450 µg) se mezclan 1:1 v/v con una solución que contiene SDS al 5 %, Tris 0.15 M pH 6.7, mercaptoetanol al 3 %, glicerol al 15 %, y azul de bromofenol al 0.005 mM. Inmediatamente se colocaron en baño María por tres minutos, y se depositaron en los pozos del gel. Se utilizó un marcador de peso molecular bajo (6,500 - 66,000 KDa) (sigmamarker).

Una vez terminada la electroforesis, se emplearon dos geles (duplicado) para ser teñidos con azul de coomassi y para identificar a los grupos hemo de acuerdo al método de Thomas y col. (1976)

4.13 Técnica para visualizar grupos hemo.

El gel con las proteínas separadas, se hace reaccionar con una técnica específica para identificar a los grupos hemo (Thomas y col. 1976) con algunas modificaciones. El gel se hizo reaccionar con 1.5 mM TMBZ diluido en metanol y acetato de sodio 0.25 M pH 5.0, (30:70) v/v por una hora, enseguida se adicionó la solución reveladora compuesta por 0.29 mM de H₂O₂ por 30 minutos. Todo este procedimiento debe de ser en oscuridad; posteriormente se observan las bandas teñidas de color azul (reacción de los grupos hemo) y por último, este mismo gel se tiñe con azul brillante de Coomassie (R 250).

4.14 Electroforesis en geles discontinuos en condiciones nativas.

Se preparó un gel de resolución al 8 % siguiendo el método del gel discontinuo de poliacrilamida, pero ahora en ausencia de SDS y en la presencia de tritón X-100 y glicerol, con una concentración final de 0.1 % y 15 %, respectivamente. Al amortiguador con el cual se hace la preelectroforesis se adiciona tritón X-100 al 0.1 %. Y a la solución con la que se mezclan las muestras biológicas, se le adiciona tritón X-100 al 0.1 % y mercaptoetanol. Esta electroforesis se lleva a cabo a 4°C.

Un gel nativo en condiciones iguales al anterior se corta horizontalmente cada 0.5 cm. y en cada fragmento se identifica a CcP por su actividad, una vez terminada la corrida.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Distribución de la CcP en las fracciones subcelulares.

Los estudios referentes a la presencia de la CcP en los céstodos hasta ahora reportados fueron realizados exclusivamente en las formas adultas de *Himenolepis diminuta* y de *Moniezia expansa* (Barrett, 1980 y McKelvey, 1985).

En este trabajo se presentan los resultados de la distribución de la CcP, principalmente en la forma larvaria (metacéstodo) de la *Taenia crassiceps*. La razón por la que nos interesó enfocar el estudio de la enzima en el metacéstodo, es porque durante esta etapa encontramos una elevada producción de H₂O₂, y ausencia de la catalasa así como una señal espectrofotométrica que, en presencia de CO, tiene características similares a las que da el complejo CcP-CO.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la actividad de CcP en un homogenado total y en las fracciones subcelulares obtenidas de acuerdo al esquema 1 de Material y Métodos.

Tabla 2 Actividad de la CcP en las fracciones de los cisticercos de *T. crassiceps*.

MUESTRA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA*	ACTIVIDAD TOTAL	%
Homogenado total	18.1 ± 0.04	12,666	100.0
Fracción mitocondrial	42.6 ± 4	6,505	45.3
Fracción microsomal	1.3 ± 1	406	2.8
Fracción nuclear	48.8 ± 17	7,450	51.8

*nmol cit. c. ox/min/mg de proteína

Los resultados obtenidos indican que la CcP está presente en el organismo, y tiene un porcentaje importante de la actividad en el precipitado de baja velocidad (51.8 %), inclusive en cantidades ligeramente mayores a las de la fracción mitocondrial (45.3 %). Esto se debe a que, cuando se homogenizan los cisticercos, un gran número de

mitocondrias se encuentran atrapadas en vesículas membranales que sedimentan a baja velocidad (Figura 9), de acuerdo a lo reportado por del Arenal (1998).

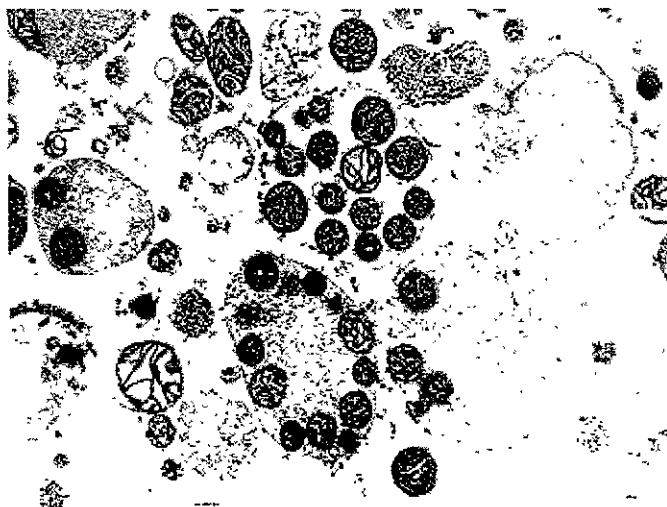


Figura 9 Micrografía de mitocondrias atrapadas en vesículas, obtenidas al romper mecánicamente a los cisticercos.

Para evitar que se pierdan mitocondrias en la fracción de baja velocidad, y tener un mayor rendimiento en la fracción mitocondrial, usamos saponina al 0.1 % para eliminar la formación de las vesículas y liberar las mitocondrias atrapadas, de acuerdo al método reportado por del Arenal (1998) de esta forma encontramos que la actividad de la enzima está asociada principalmente a la fracción mitocondrial.

5.2 Distribución de la CcP en la mitocondria.

En los organismos eucariotes en donde se ha descrito, la CcP se encuentra localizada en la mitocondria. En los céstodos con estadio adulto en los que se ha reportado, la localización dentro de la mitocondria es contradictoria, y mientras que Paul y Barrett (1980) reportan que en *H. diminuta* esta enzima está asociada a las membranas mitocondriales, Mckelvey y Fioravanti (1986) en este mismo organismo, encuentran que en la matriz mitocondrial y en el espacio intermembranal hay un 55.0 % y un 32.0 % de la actividad, respectivamente.

En la Tabla 3 se muestra el análisis comparativo entre los resultados reportados para *H. diminuta*, y los de *T. crassiceps*. Los resultados indican que los niveles de actividad de la CcP en la larva están dentro del mismo intervalo que el reportado por Paul y Barrett (1980) y Fioravanti y McKelvey (1986). Sin embargo, los resultados para *T. crassiceps* se asemejan más a los reportados por Paul y Barrett (1980) ya que encontramos que la actividad de la CcP está asociada a la fracción membranal.

Tabla 3 Actividad de la CcP en *H. diminuta* y *T. crassiceps*.

Fracción	Actividad específica*		
	<i>Himenolepis diminuta</i>		<i>Taenia crassiceps</i> ***
	Paul y Barrett (1980)	Fioravanti y Mckelvey (1986)	
Fracción membranal	215.7	16.5	228 ± 76
Fracción soluble**	47.3	307.0	3.8 ± 1.2

*nmol cit.c.ox/min/mg de proteína

** Matriz mitocondrial y espacio intermembranal

*** Las fracciones se obtuvieron de acuerdo al esquema 3 de material y método.

5.3 Solubilización de la CcP

Los datos anteriores nos indican que la CcP se encuentra unida a la membrana mitocondrial de los cisticercos de la *T. crassiceps*. Sin embargo, en los organismos en donde la CcP se ha reportado, la enzima se encuentra soluble en levaduras (Yonetani, 1966), en bacterias (Goodhew y col., 1990) y en *Crithidia* (Kusel y col., 1973), lo que la hace fácilmente diferenciable de la actividad de la citocromo c oxidasa, que es una enzima integral en la membrana interna mitocondrial y que también oxida al citocromo c reducido. Es por lo tanto muy importante en el ensayo de actividad de la CcP de una fracción cruda, el restar la actividad de la citocromo c oxidasa de la de CcP, ya que esta última también oxida al citocromo c reducido pero sólo en presencia de H₂O₂.

Yonetani (1966) y Paul y Barrett (1980) para determinar la actividad de la CcP han utilizado acetato de sodio pH 6.0 y trietanolamina pH 7.6, respectivamente. Se decidió

hacer el ensayo enzimático en condiciones similares a las utilizadas por cada uno de estos dos autores, y se corroboró que no existe diferencia significativa en la actividad enzimática entre los pH utilizados (datos no mostrados), por lo que, decidimos trabajar con trietanolamina pH 7.6, debido a las condiciones similares de Paul y Barrett (1980) al trabajar con extractos crudos.

El separar ambas actividades (cit. c oxidasa y CcP) tiene ventajas, ya que por un lado permite cuantificar con mayor exactitud la participación de cada una de estas enzimas en la oxidación del citocromo c y por otro lado, facilitaría su eventual purificación y caracterización.

Es importante mencionar que la CcP es una hemoproteína con un grupo hemo de alto spin (Elfolk, 1983), por lo cual, puede unirse con inhibidores como la azida, el cianuro y el fluoruro (Paul y Barrett, 1980). Estos inhibidores actúan también sobre la citocromo c oxidasa, por lo que no podemos separar ambas actividades enzimáticas, utilizando estos inhibidores y además no se han descrito inhibidores específicos para CcP.

En algunos estudios realizados en los protozoarios y los tremátodos, se reporta a la CcP como una enzima soluble; dichos estudios describen que durante la obtención de las fracciones mitocondriales, se empleó fuerza iónica baja, o bien un detergente. Kusel (1973) encontró en el protozoario *Crithidia fasciculata* la presencia de la CcP en la fracción soluble de 100,000 g, la que se obtiene después de tratar a las mitocondrias en un medio hipotónico durante 30 minutos y de sonicar varias veces. Campos (1995) reportó que la enzima está presente en el espacio intermembranal en el tremátodo *Schistosoma mansoni*, cuando trata a las mitocondrias con concentraciones crecientes de digitonina, encontraron que, usando 200 µg del detergente por mg de proteína mitocondrial, la actividad aparece en el sobrenadante.

Los datos anteriores, hacen pensar que la CcP, al menos en algunos organismos, es una proteína periférica membranal, y que se puede separar de la membrana fácilmente.

En este sentido, las mitocondrias fueron sonicadas en un medio hipotónico (hepes 10 mM pH 7.4), antes de obtener el sobrenadante de 105 000 g; la actividad de la CcP continuó asociada a las membranas, logrando sólo solubilizar cerca de un 6.0 % (Tabla

4). En esta fracción, se encontró una actividad de citocromo c oxidasa (2 %), aunque en pequeña proporción. Este hallazgo fue inesperado ya que ésta es una enzima integral de la membrana interna mitocondrial.

Tabla 4 Actividad de la Cit. c oxidasa y la CcP en las fracciones mitocondriales.

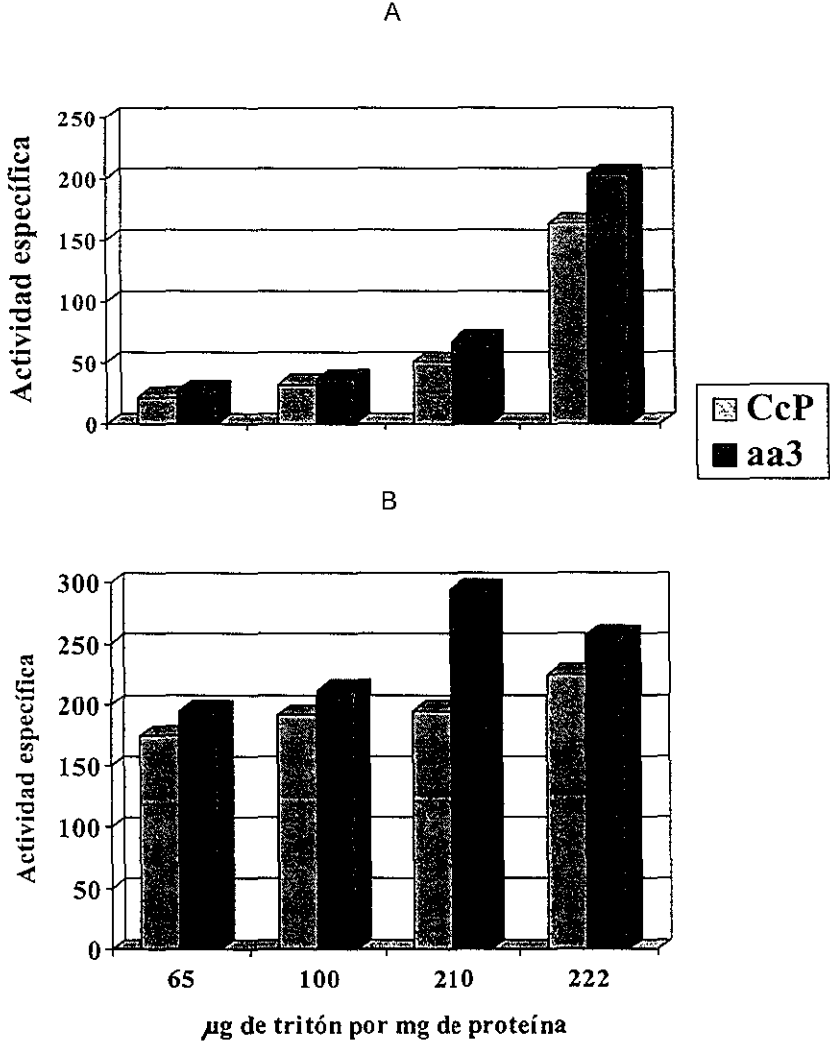
Fracción	Actividad específica*	
	Cit. c oxidasa	CcP
Membranal	458.0 (97.3 %)	218.5 (94.3 %)
Soluble	12.9 (2.7 %)	13.3 (5.7 %)

* nmol cit.c ox/min/mg de proteína

Las mitocondrias fueron centrifugadas a 105.000 g; estas mitocondrias fueron previamente incubadas en un medio hipotónico y sonicadas.

Un segundo método para liberar a la CcP de las membranas mitocondriales fue con el uso de tritón X-100 en cantidades crecientes, de acuerdo a lo descrito en el Esquema 4 de Material y Métodos. En la fracción soluble (Figura 1A) se observa el incremento de la actividad de CcP al igual que la citocromo c oxidasa al aumentar la concentración de tritón X-100, lo cual resulta lógico, pero en la fracción insoluble (Figura 1B) también se observa un incremento en la actividad de ambas enzimas lo cual no se espero encontrar, ya que si efectivamente se esta liberando la (s) enzima (s) encontraríamos una disminución gradual al aumentar la concentración de tritón X-100 en la fracción insoluble, debido a su liberación a la fracción soluble. Otra posibilidad es que el detergente estimule la actividad enzimática, como se ha propuesto en algunos casos (Campos, 1995), ya que se empleo una fracción mitocondrial con actividad específica para la CcP de 102 nmol de cit. c oxidado/min/mg. de proteína. Asimismo uno de los resultados que parece más interesante es el comportamiento paralelo entre CcP y citocromo c oxidasa (gráfica 1), similar a los resultados de la Tabla 5 (p-41).

Gráfica 1 Oxidación del ferrocitocromo c por CcP y citocromo c oxidasa en las fracciones A) soluble e B) insoluble, obtenidas después de tratar a las mitocondrias del cisticerco de *T. crassiceps* con diferentes cantidades de tritón X-100.



*nmol cit c oxidado/min/mg de proteína.

Como se mencionó, la citocromo c peroxidasa no ha sido reportada en organismos superiores, Sin embargo, Orri (1982) reportó que en condiciones anaerobias, la citocromo c oxidasa obtenida de músculo cardiaco de bovino, puede catalizar la oxidación de ferrocitocromo c en presencia H_2O_2 por la actividad de la CcP y en presencia de O_2 por la actividad de cit. c oxidasa, actuando como una enzima con dos actividades enzimáticas. Los datos mostrados en la tabla 4 y la gráfica 1, apoyados a los reportados por Orri, (1982) permiten especular que en *T. crassiceps*, no exista una actividad de la CcP única para una enzima, sino una actividad asociada a la citocromo c oxidasa.

5.4 Identificación de CcP en SDS-PAGE

El peso molecular reportado para la citocromo c peroxidasa, por electroforesis en presencia de SDS, varía entre 31 KDa para el caso de *F. hepática* (Campos, 1999), 34 KDa para levadura (Yonetani, 1966), 50 KDa para *Pseudomonas* (Ellfolk, 1984), y 42 KDa para *Paracoccus denitrificans* (Goodhew y col. 1990). Por otro lado, la CcP es una hemoproteína que se ha reportado en algunos casos que tiene su grupo hemo unido covalentemente a la proteína (Gilmour y col. 1993). Esta propiedad ha sido utilizada para identificarla por medio de zimogramas, usando benzidina para revelarla en geles de acrilamida (Thomas y col. 1976).

En la Figura 10 se presenta la imagen de un gel en condiciones desnaturizantes. Las muestras membranales mitocondriales se aplicaron por duplicado de tal forma que se realizó la tinción de la proteína total con el azul de coomassie R250 (A) y la identificación de los grupos hemo unidos covalentemente a las proteínas por medio de TMBZ (B). Los resultados indican la presencia de una hemoproteína con un peso molecular de 33.1 KDa que puede estar relacionada con la CcP (Yonetani, 1966; Soenien, 1973; Campos, 1999), Sin embargo, también se puede tratar del citocromo c_1 contenido en el complejo bc_1 , que debe estar presente en la preparación.

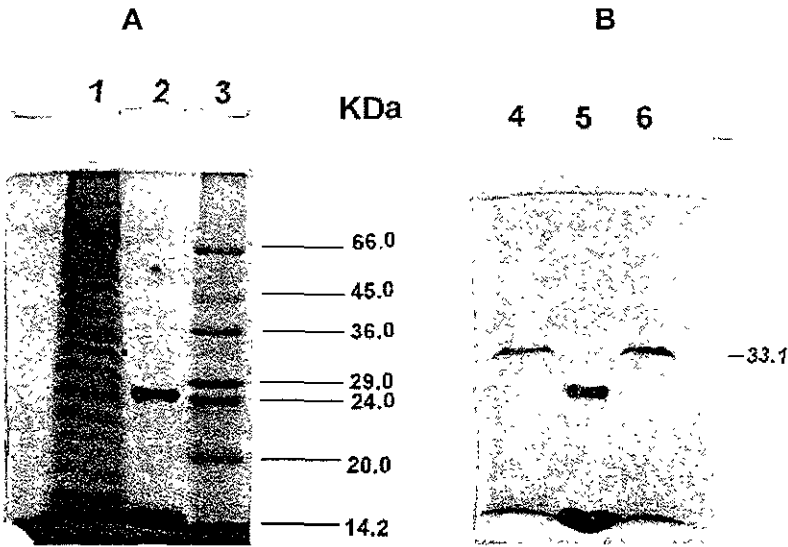


Figura 10 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de un gel de poliacrilamida al 12 %. A) tinción con azul de coomassie B) revelado de grupos hemo con TMBZ. Los carriles contienen: La fracción membranar (carril 1 y 4; 300 µg de proteína, carril 6, 400 µg de proteína). El citocromo c de corazón de caballo (carril 2 y 5, 24 µg de proteína). El marcador de peso molecular (carril 3).

Debido a que no se le puede asignar de forma inequívoca la identidad de la banda proteica de 33.1 KDa, se procedió a realizar un gel nativo, en el cual se corrieron los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación a 14,600 g de las mitocondrias tratadas con tritón X-100. En la Figura 11 se presenta la imagen de las muestras teñidas con coomassie (A) y las muestras reveladas con benzidina (B).

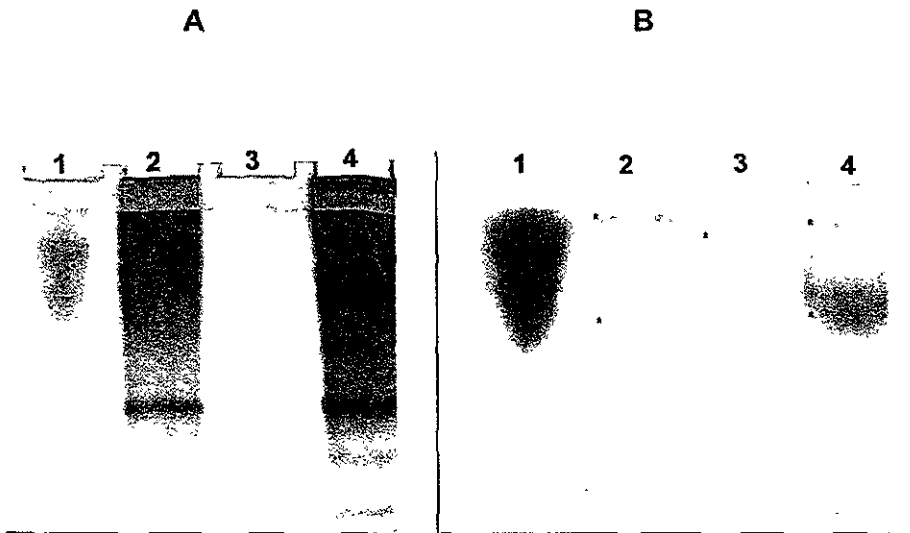


Figura 11 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % en condiciones nativas. Las mitocondrias fueron tratadas con 0.10 y 0.30 % de tritón X-100 y centrifugadas a 14,600 g, y los sobrenadantes fueron utilizados. A) Tinción con azul de coomassie R 250 B) Revelado de los grupos hemo con TMBZ. Los carriles contienen: 1 y 3; hemoglobina bovina 10 y 1 μ g; 2 y 4; 340 y 440 μ g de proteína, respectivamente.

Se observan dos bandas en los carriles 2 y 4 (asteriscos del gel B) que pueden pertenecer a hemoproteínas que se encuentran en el sobrenadante, pero también puede ser que una de esas dos bandas corresponda a CcP.

Por esto se decidió identificar a la CcP por su actividad en el gel, comprobando que es posible medir su actividad en estas condiciones. Al realizar el experimento la actividad fue encontrada en la parte del gel concentrador, donde sólo se encuentran componentes de gran peso molecular. Este dato indicaría que CcP tiene una actividad asociada a una proteína de alto peso molecular.

Sin embargo, como ya se mencionó, la citocromo c oxidasa es capaz de oxidar al citocromo c reducido. Incluso la actividad enzimática fue detectada en la parte del gel concentrador al igual que la CcP: Hasta ahora ambas actividades se han encontrado acompañadas en todas las muestras. Inclusive, es sabido que la citocromo c oxidasa es una proteína de alto peso molecular, lo cual apoyaría que esta enzima puede tener las dos actividades.

5.5 Identificación de la CcP en base a espectros de absorción diferenciales

Otro de los objetivos de este trabajo fue saber si la señal encontrada en el espectro diferencial (red+CO – red) en la región de Soret en forma de pico entre 411-418 nm. de la preparación mitocondrial del cisticerco de *T. crassiceps* puede corresponder a la CcP, ya que esta señal es muy parecida a la que presenta en *Pseudomonas* (Soinien y Elfolk, 1973) y a la de *Crithidia fasciculata* (Kusel y col. 1973). Por otro lado, las mitocondrias del cisticerco de *T. crassiceps* presentan dos señales muy cercanas en forma de pico en Soret, lo cual dificulta el análisis del espectro en esta zona (Figura 7 de Antecedentes). Sin embargo, las señales de la zona alfa y beta son muy distinguibles y se observa que son prácticamente iguales las señales de *Pseudomonas* y *Crithidia*, como se observa en la Figura 5 de Introducción y 7 de Antecedentes. Nos referimos a estas señales porque estas señales frecuentemente se encuentran asociadas al complejo con monóxido de carbono.

La CcP de algunos organismos tales como levadura (Yonetani, 1966); *Crithidia fasciculata* (Kusel y Col 1973) y en *Schistosoma mansoni* (Fioravanti, 1986) se ha encontrado en estado soluble, por lo tanto, inicialmente se buscó a la CcP en un sobrenadante de alta velocidad (105,000 g). En un espectro diferencial red-ox, se observa picos en 420, 519 y 548 nm (Figura 12).

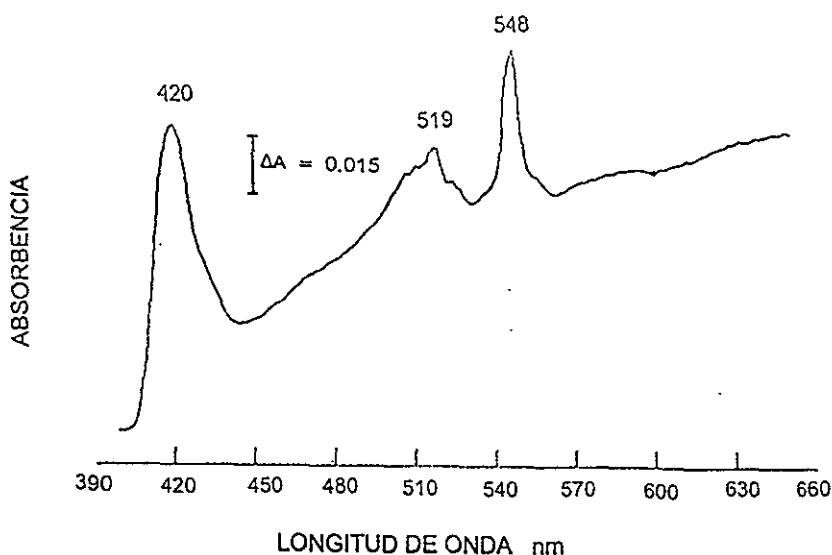


Figura 12 Espectro diferencial red-ox de un sobrenadante de alta velocidad (105,000 g) del cisticerco de *T. crassiceps*.

El espectro diferencial red-ox de la CcP semipurificada de *Pseudomona* presenta señales en 420, 524 y 551 nm (Soinien y col. 1973); en el caso de la enzima pura de levadura en espectros reducidos absolutos, las señales reportadas se encuentran en 438, 560 y 591 nm. (Yonetani, 1966). Los resultados de *T. crassiceps* son muy similares a los reportados por Soinien, (1973), Sin embargo, este espectro tiene señales que pueden corresponder también a los reportados para un citocromo tipo c (Weston, 1973) de tal suerte que para distinguir entre un citocromo tipo c y la CcP es necesario hacer espectros en presencia de CO.

En espectros diferenciales red+CO-red de un sobrenadante de alta velocidad y de otros sobrenadantes obtenidos después de sonicar o de tratar con fuerza iónica baja, según el procedimiento reportado en el protozoario *Crithidia fasciculata* (Kusel y col. 1973), se encontraron señales similares a las de un citocromo tipo c. Sin embargo, no fue posible observar señales para complejos con monóxido de carbono en ninguna de las muestras, inclusive modificando las condiciones de reacción, ya que como se sabe

sólo los grupos hemo de alto spin fijan CO. La CcP de *Paracoccus denitrificans* (Gilmour, y col. 1993) y la de *Pseudomonas* (Ellfolk, y col. 1983) presenta una transición de bajo a alto spin de su grupo hemo, ocasionada por las condiciones de pH del medio en donde se lleva a cabo la reacción.

Esta escasa reactividad con CO y la baja actividad de CcP en los sobrenadantes, sugieren que las señales en los espectros red-ox pueden corresponder al citocromo c.

Otra forma de identificar a la CcP es haciendo espectros en presencia de H_2O_2 , ya que la enzima forma un complejo con el peróxido (complejo I). Este complejo es estable y presenta señales en el espectro a 419, 529 y 561 nm como está reportado para la CcP purificada de levadura del pan (Yonetani, 1966). Asimismo, la cit. c oxidasa purificada de corazón de res, que también es capaz de formar este complejo, presenta una señal en 422 nm (Bickar, 1982).

Se trató de identificar en una fracción membranal con elevada actividad de CcP, al complejo I, lo que indicaría la presencia de esta enzima. (Figura 13). Solamente en una ocasión se encontró un pico en 417 nm de un espectro diferencial $ox+H_2O_2 - ox$. Este resultado no fue reproducible.

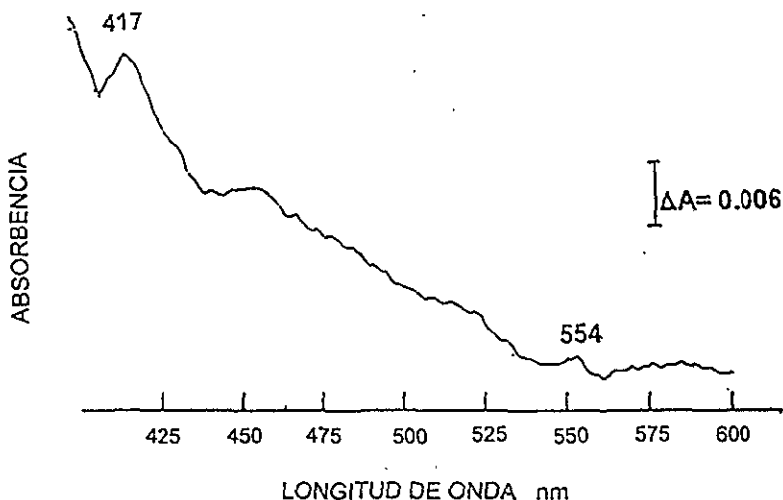


Figura 13 Espectro diferencial con peróxido de hidrógeno de una fracción mitocondrial en su forma oxidada de mitocondrias del cisticerco de *T. crassiceps*.

5.6 Actividad enzimática en diferentes estadios del ciclo biológico.

Durante sus diferentes estadios, los céstodos están expuestos a hábitats muy diferentes. En una estrecha relación con las condiciones del medio está su metabolismo, en especial el energético, el que varía de anaerobio en los estados adultos a aeróbico en los estados larvarios (Kita K. y col., 1997). Cuando se determinan las actividades enzimáticas propias de cada tipo de metabolismo (fumarato reductasa, enzima málica, cit. c oxidasa) se refleja el tipo de metabolismo presente.

Cuando en el laboratorio se extraen los cisticercos del peritoneo de ratones previamente infectados, se obtiene una población heterogénea de organismos: una población con el escólex poco desarrollado y con una gran vesícula a los que se llama cisticercos tipo I y otra población, con el escólex más desarrollado y una vesícula reducida, que se denomina tipo II (Figura 14).

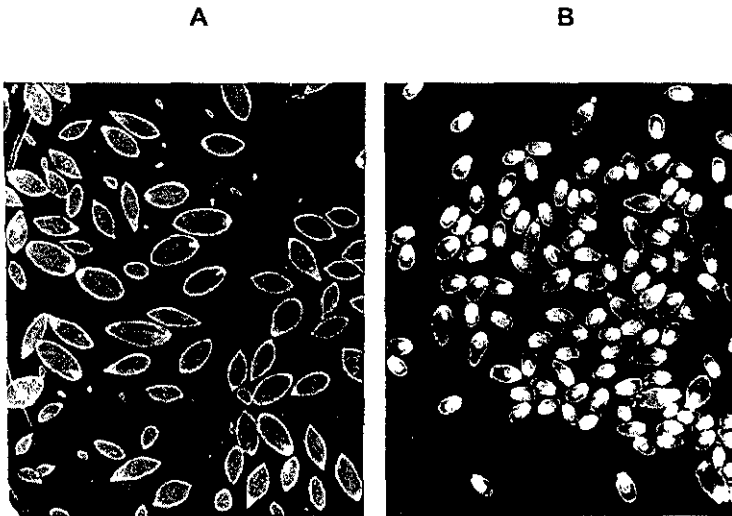


Figura 14 Imagen (A) cisticercos tipo I con vesícula desarrollada y escólex poco desarrollado. (B) cisticercos tipo II con vesícula poco desarrollada y escólex desarrollado.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Como se mencionó en la introducción los estudios realizados de CcP en céstodos, han sido realizados en organismos adultos, en este caso se cuenta con algunos especímenes de la forma adulta de *Taenia crassiceps*, de tal forma que, teniendo organismos en diferentes etapas de desarrollo, se decidió medir la actividad de CcP y saber por un lado, si al igual que lo que sucede para enzimas respiratorias, también en ésta, se presentan niveles de actividad diferentes, y por otro lado tener datos que puedan compararse con los reportados para otros céstodos e inclusive saber si en el adulto existe una actividad de CcP, independiente de la oxidasa (Mckelvey y Fioravanti, 1986).

Los tres tipos de organismos se homogeneizaron por separado, de acuerdo al esquema 4 de Material y Métodos. En una fracción total del precipitado y en otra soluble total, se determinaron las actividades tanto de CcP como de cit. c oxidasa; Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Nuevamente se encuentran estas dos actividades asociadas, tanto en los cisticercos, como en el adulto y en un nivel comparable, en los 3 tipos de organismos procesados.

Tabla 5 Actividad específica de Citocromo c Peroxidasa y citocromo c oxidasa en las fracciones solubles (Ste) y precipitados (Pp) de alta velocidad (105,000 g) en cisticercos tipo I, II y adulto

MUESTRA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA*	
	CcP	aa ₃
Ste total tipo I	2.6	3.2
Pp total tipo I	127	168
Ste total tipo II	2.3	2.8
Pp total tipo II	58	77
Ste total adulto	2	2
Pp total adulto	102	153

*nmol cit. c oxidado/min/mg de proteína.

Asimismo se encontró una actividad enzimática de la CcP al igual que la cit. c oxidasa en los cisticercos tipo II que es aproximadamente la mitad de la encontrada en

los cisticercos tipo I y el adulto. Para esto no se propone una explicación ya que los tres tipos de organismos habitan en un medio con tensión de oxígeno similar, y sin embargo, la actividad de CcP es diferente.

Tratando de entender esta diferencia, se aislaron las mitocondrias del tegumento y del carcass de los cisticercos como indica el esquema 5 de materiales y métodos para medir la actividad de CcP, bajo el siguiente razonamiento; Los cisticercos tipo I, tienen una mayor superficie que los tipo II, como se muestra en la figura 7 y, por lo tanto, un tegumento más abundante, en este tejido existen mitocondrias muy grandes (1.2 – 1.5 μ) y con crestas muy desarrolladas, lo que es indicativo de un metabolismo energético elevado. En el carcass, existen mitocondrias que son más pequeñas (0.3-0.5 μ) y con crestas escasas.

Si tomamos en cuenta que el O₂ difunde de la superficie hacia el interior del organismo, las mitocondrias más expuestas a éste, son las del tegumento y muy posiblemente las que producen mayor cantidad de H₂O₂. Si esto es cierto, tendrían mayor cantidad de oxidasa y CcP en comparación con las del carcass.

En la Tabla 6 se presentan los resultados de CcP y Oxidasa medidas en las fracciones soluble y membranal de mitocondrias obtenidas del tegumento y del carcass.

Tabla 6 Actividad de CcP en fracciones mitocondriales (105,000 g) del tegumento (T) y carcass (C) de cisticerco de *Taenia crassiceps*.

MUESTRAS	ACTIVIDAD ESPECIFICA*	
	CcP	aa ₃
Fracción soluble T	5.1	6.1
Fracción membranal T	612.2	832.6
Fracción soluble C	3.5	3.8
Fracción membranal C	228.0	258

*nmol cyt.c oxidado/min./mg proteína

Los resultados están de acuerdo a lo esperado y nuevamente, si los cisticercos tipo II tienen un tegumento reducido, ésta podría ser la explicación de que tengan una menor actividad de CcP.

Por el momento, no existen posibilidades de obtener mitocondrias del carcass y tegumento de organismos adultos y saber si en éstos también existe esta diferencia. Tampoco existe el dato comparativo de la cantidad de H_2O_2 que producen ambos tipos de mitocondrias y que apoyaría los resultados obtenidos.

Es importante mencionar que se trató de inducir la expresión de CcP con O_2 de manera similar a la reportada por Sels y Cocriamont, (1968). Se mantuvo a los cisticercos en agitación (200 rpm) a $37^\circ C$ durante 18 hrs. De esta forma se intentó estimular una mayor actividad en la cadena de transporte de electrones y que a su vez, que esto trajera como consecuencia una mayor activación de la CcP (Datos no mostrados). Pero las actividades enzimáticas entre los cisticercos inducidos y los usados sin el proceso de inducción fueron muy similares.

El hecho de que los niveles de actividad de CcP siempre se encuentren asociados a citocromo c oxidasa, y que por ninguno de los métodos usados (hipotónicamente, sonicación y solubilización por detergente) se hallan separado estas dos actividades, llevan a pensar que la actividad de CcP encontrada, pertenece a una actividad adicional de la citocromo c oxidasa, como refiere Orri (1982) en mitocondrias de corazón de bovino.

6. CONCLUSIONES

- Existe una actividad de CcP asociada a las mitocondrias del cisticercos de *T. crassiceps*.
- La actividad de CcP está principalmente asociada a la fracción membranal mitocondrial aproximadamente en un 95 %.
- El tratar a las mitocondrias con fuerza iónica baja, sonicación y detergente, no libera la CcP a la fracción soluble, lo que indica que es una proteína integral de la membrana mitocondrial.
- En fracciones mitocondriales del cisticercos de *T. crassiceps* la actividad de CcP, siempre se encontró asociada en forma paralela a la citocromo c oxidasa.
- La actividad de CcP en los cisticercos tipo I y adulto se encuentran dentro del mismo rango.
- Las mitocondrias del tegumento tienen mayor actividad de CcP que las del carcass.
- No se logró identificar CcP ni en electroforesis ni por medio de espectros diferenciales.
- La señal obtenida en un espectro diferencial en presencia de CO con pico entre 415, no puede atribuirse a CcP, ya que no se encontró una enzima CcP libre sino una actividad asociada a la citocromo c oxidasa

7. REFERENCIAS.

- Bickar D., Bonaventura J. y Bonaventura C. 1982. Cytochrome c oxidase binding of hydrogen peroxide. American Chemical Society. 21: 2661-7.
- Callahan H.L., Crouch R. K. y James E.R. 1988. Helminth Anti-oxidant Enzymes: a Protective Mechanism Against Host Oxidants?. Parasitology Today 4: 218-225.
- Campos E.G., Smith J.M., y Prichard R. K. 1995. Cytochrome c Peroxidase in *Schistosoma mansoni*: enzyme kinetics and cellular location. Comparative Biochemistry and Physiology 111: 371-377.
- Campos E.G., Hermes-Lima M., Smith J., y Prichard R. K. 1999. Characterization of *Fasciola hepatica* cytochrome c peroxidase as an enzyme with potential antioxidant activity in vitro. International Journal for Parasitology 29: 655-662.
- Cheah K. S. y Chance B. 1970. The oxidase systems of *Ascaris*-muscle mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta. 223: 55-60
- Cheng C.T. 1987. General Parasitology. Ed Orlando, Florida. Pp 827.
- Davis B.J. 1964. "Disc electrophoresis II Methods and application to human serum protein". Annales of the New York Academy. 121: 404-7.
- Del Arenal I.P., Cea Bonilla A., Sanchez-Moreno R., y Escamilla J.E. 1998. A method for the isolation of tegument syncytium mitochondria from *Taenia crassiceps* cysticerci and partial characterization of their aerobic metabolism. Journal of Parasitology. 84: 461-468.
- Ellfolk N., Ronnberg M., Aasa R., Vanngard T. y Angstrom J. 1984. Biochimica et Biophysica Acta. 791: 9-14.
- Ellfolk N., Ronnberg M., Aasa R., Andréasson L., y Vanngard T. 1983. Properties and function of the two hemes in *Pseudomonas* Cytochrome c Peroxidase. Biochimica et Biophysica Acta. 743: 23-30.
- Flisser A., Madrazo I. y Delgado H. 1997. Cisticercosis humana. Ed. El manual moderno S.A de C.V. México. pp 176.
- Freeman R.S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder,1800) Rudolphi,1810 (cestoda). Canadian Journal of Zoology. 40: 969-990.
- Gilmour R., Goodhew C., Pettigrew G., Prazeres S., Moura I., y Moura J. 1993. Spectroscopic characterization of cytochrome c peroxidase from *Paracoccus denitrificans*. Journal of Biochemistry. 294: 745-752.

Goodhew C. F., Wilson I. B. H., Hunter D. J. y Pettigrew G. W. 1990. The cellular location and specificity of bacterial cytochrome c peroxidases. Biochemical Journal. **271**: 707-12.

Hedrick J. y Smith A. 1968. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Archives of Biochemistry and Biophysics. **126**: 155-164.

Jones C.W. y Poole R.K. 1985. The analysis of cytochromes. Methods in Microbiology. **18**: 285-325.

Kita K., Hiaware S. y Takamiya S. 1997. Cytochromes in the respiratory chain of helminths mitochondria. International Journal Parasitology. **27**: 617-30.

Kusel J.P., Boveris A., y Storey B. 1973. H₂O₂ production and cytochrome c peroxidase activity in mitochondria isolated from the trypanosomatid hemoflagellate *Crithidia fasciculata*. Archives of Biochemistry and Biophysics. **158**: 799-805.

Markwell M. A., Hass S.M., Bieber L.L. y Tolbert N. E. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Analytical Biochemica. **87**: 206-210.

Mckelvey J.R y Fioravanti C.F. 1986. Localization of cytochrome c oxidase and cytochrome c peroxidase in mitochondria of *Himenolepis diminuta* (cestoda). Comparative Biochemistry and physiology. **85**: 333-335.

Orri Y. 1982. The cytochrome c peroxidase activity of cytochrome oxidase. The Journal of Biological Chemistry. **257**: 9246-48.

Paul J.M. y Barret J. 1980. Peroxide metabolism in the cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Moniezia expansa*. International Journal for Parasitology. **10**:121-124.

Puustinen A., y Wikstrom M. 1991. The heme groups of cytochrome c from *Escherichia coli*. Proceedings of the Natural Academy of Science. USA. **88**: 6122-6126

Ronnberg M., Ellfolk N. y Soinien R. 1979. Biochimica et Biophysica Acta. **578**: 392-400.

Robinson J.M. y Bogitsh B.J. 1976. Cytochemical localization of peroxidase activity in the mitochondria of *Hymenolepis diminuta*. Journal of Parasitology. **62**: 761-765.

Rubio M. E. 1997., "Estudio del metabolismo de radicales libres de *Taenia crassiceps*" Tesis de licenciatura.

Sels A. A. y Cocriamont C. 1968. Induced conversion of a protein precursor into cytochrome c peroxidase during adaptation of yeast. Biochimica et Biophysica Reserch Communication. **32**: 192-8

Scandios J.G. 1992. Molecular biology of free radical scavenging systems. Ed. Cold Spring Harbor laboratory press. New York. pp 284.

Schmidt G. D. y Roberts L.S. 1981. Foundations of parasitology Ed.The C.V. Mosby Company. 2ª. Ed., St. Louis Missouri. Pp 795.

Smyth J.D. y Mcmanus D.P. 1989. The physiology and biochemistry of cestodes. Ed.Cambridge University. New York.pp 368.

Soinien R., Ellfolk N. y Kalkkinen N. 1973. Absorption spectra of the enzyme and of its compounds with ligands. Inhibition of the enzyme by cyanide and azide. Acta Chemica Scandinavica. **27**: 35-46

Soinien R y Ellfolk N. 1973. Molecular weight of the enzyme in dodecyl sulfate-poliacrylamide the electrophoresis.,Acta Chemica Scandinavica. **27**: 1106-1107

Tetsutaro L., Makino R., Ishimura Y., e Yonetani T. 1985. Reversible acidic-alkaline transition of the carbon monoxide complex of cytochrome c peroxidase. The Journal of Biological Chemistry. **126**: 1407-1412.

Thomas P.E., Ryan D y Levin W. 1976. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome p-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry. **78**: 166-177

Von Brant T. 1973. Biochemistry of parasites. Academic press, New York.

Weston J.A. y Knowles C.J. 1973. A soluble CO-binding c-type cytochrome from the marine bacterium *Beneckeia natriegens*. Biochimica et Biophysica Acta. **305**: 11-18.

Yonetani T. 1965. Studies on cytochrome c peroxidase. The Journal of Biological Chemistry. **240**: 4509-14.

Yonetani T. y Ohnishi T. 1966. Cytochrome c peroxidase, a mitochondrial enzyme of yeast. The Journal of Biological Chemistry. **241**: 2983-4.

Yonetani T. y Ray G.S. 1966. Studies on cytochrome c peroxidase. The Journal of Biological chemistry. **241**: 700-706.

Zenka J. 1987. Malic enzyme, malate dehydrogenase, fumarate reductase and succinate dehydrogenase in the larvae de *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800). Folia Parasitologica. **33**: 331-336.