

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

167

FACULTAD DE CIENCIAS

MITOCONDRIAS DEL CARCASS DEL CISTICERCO DE Taenia crassiceps: OBTENCION Y CARACTERIZACION DE SU METABOLISMO ENERGETICO.

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 :
MELCHOR ROA HUERTA



DIRECTOR DE TESIS: DRA. VERENE PATRICIA DEL ARENAL MENA



L.A



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.



DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Mitocondrias del carcass del cisticerco de Taenia crassiceps:
Obtención y caracterización de su metabolismo energético.

realizado por : Melchor Roa Huerta.

con número de cuenta 9554241-8 , quién cubrió los créditos de la carrera de **BIOLOGIA.**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. I. Patricia del Arenal Mena.

Propietario Dr. Juan Luis Rendón Gómez.

Propietario Dr. Oscar Flores Herrera.

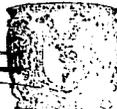
Suplente Dra. Laura Vargas Parada.

Suplente M. en C. Luis García Prieto.

Consejo Departamental de Biología.

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

1.0

CONTENIDO

1 Resumen	1
2 Abreviaturas	2
3. Introducción	3
Mitocondrias: Relación estructura-función	4
Heterogeneidad mitocondrial y respiratoria en helmintos	5
Metabolismo energético en helmintos	6
Fumarato reductasa vs succinato deshidrogenasa	11
Generalidades de citocromos	13
4. Organismo de estudio	15
5. Antecedentes	20
Heterogeneidad mitocondrial en <i>Taenia crassiceps</i>	20
Metabolismo energético de <i>T. crassiceps</i>	23
6. Hipótesis	24
7. Objetivos	24
8. Metodología	25
9. Resultados	29
10. Discusión	42
11. Conclusiones	45
12. Perspectivas	46
13. Bibliografía	47

L.C

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. I. Patricia del Arenal Mena, en el laboratorio 8 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El trabajo se llevó a cabo dentro del proyecto DGAPA – UNAM IN 212600.

1. D

RESUMEN

Se ha demostrado la existencia de diferente metabolismo energético en mitocondrias de algunos helmintos parásitos. El metabolismo aerobio o anaerobio obedece al estadio en que se encuentre el parásito y se ve reflejado en la estructura mitocondrial la cual depende en gran medida del tipo celular, la localización y la disponibilidad de los sustratos a metabolizar como el oxígeno. El cestodo *Taenia crassiceps* en el estadio de cisticerco es un parásito de roedores, mientras que la forma adulta habita en el intestino de cánidos. Los estudios histológicos y bioquímicos han mostrado que el cisticerco tiene una gran cantidad de mitocondrias y presenta un metabolismo energético activo; así mismo, se han identificado las enzimas y complejos proteicos necesarios para llevar a cabo tanto la vía metabólica aerobia como la anaerobia. Por otra parte, en micrografías electrónicas de cortes del cisticerco se observa que el tegumento y el parénquima o carcass poseen diferentes tipos mitocondriales, que sugieren por su morfología la existencia de diferente metabolismo. En el presente trabajo se obtuvieron las mitocondrias del tegumento y dos poblaciones de mitocondrias del parénquima, se realizó la caracterización parcial de la actividad de enzimas marcadoras del metabolismo aerobio y anaerobio, tales como succinato deshidrogenasa y fumarato reductasa; se determinó la concentración de diferentes tipos de citocromos.

Los resultados muestran una ligera diferencia en la actividad específica de la succinato deshidrogenasa entre las mitocondrias del tegumento y las del parénquima, por otro lado no existe una diferencia significativa en la actividad de esta enzima entre las poblaciones mitocondriales del parénquima. Además, la concentración de citocromo b es ligeramente mayor en las mitocondrias del parénquima que en el tegumento, lo que es indicativo de la presencia de metabolismo anaerobio. Ambos tipos mitocondriales presentan las enzimas para llevar a cabo tanto metabolismo aerobio y anaerobio, sin embargo, hay una diferencia en la actividad aerobia entre estos dos tipos de mitocondrias debido a su localización por lo que poseen diferente disposición al oxígeno.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

ADP	Adenosina difosfato
AM	Amortiguador mitocondrial
ATP	Adenosin trifosfato
CR	Control respiratorio (Edo. 3/Edo. 4)
DCPIP	2-6-Diclorofenolindofenol
FAD	Flavina adenina dinucleotido oxidado
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotido reducido
FEPC	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa
FR	Fumarato reductasa
MP	Mitocondrias del parénquima
MFD	Mitocondrias de la fracción densa del parénquima
MFL	Mitocondrias de la fracción ligera del parénquima
MHR	Mitocondrias de hígado de rata
MT	Mitocondrias del tegumento
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
PBS	Amortiguador fosfato - salina
PMS	Metasulfato de fenazina
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
SDH	Succinato deshidrogenasa

INTRODUCCIÓN

Los helmintos parasitan a 4500 millones de habitantes en el mundo y están agrupados en las clases Trematoda y Cestoda, así como en el phylum Nematoda. Estos organismos, aunque presentan estadios de vida libre a lo largo de su desarrollo, se han adaptado a la vida parasitaria; en particular los céstodos son los más especializados en este tipo de relación y son exclusivamente parásitos del intestino de vertebrados en su fase adulta (Cheng, 1986).

Los estudios parasitológicos sobre los helmintos se han orientado hacia distintos aspectos: taxonomía, ecología, evolución e inmunología, sin embargo, en las últimas dos décadas, la bioquímica del metabolismo ha adquirido una gran importancia para la comprensión de la relación huésped-parásito. La investigación sobre los procesos metabólicos y bioenergéticos de los helmintos parásitos se ha enfocado en encontrar diferencias metabólicas entre el huésped y el parásito, a fin de emplearlas como blancos terapéuticos para desarrollar nuevos fármacos.

Los helmintos presentan ciclos de vida complejos en los que alternan estadios de vida libre y estadios parasitarios, por lo que a lo largo de su vida se encuentra en diferentes ambientes a los cuales tienen que adaptarse modificando su metabolismo energético para asegurar su sobrevivencia. Los resultados de algunas investigaciones muestran que estos organismos han explotado una amplia variedad de sistemas metabólicos en su adaptación a hábitats peculiares tanto fuera como dentro del huésped. Se conoce bien que helmintos parásitos como *Ascaris suum*, *Hymenolepis diminuta* y *Schistosoma mansoni*, presentan un alto potencial de cambio metabólico que asegura las transiciones del estadio de huevo a larva y de larva a adulto; éstos son claros ejemplos de alternancia del proceso metabólico aerobio-anaerobio (Bryant, 1993 y Tielens, 1998).

Entre los factores que promueven y afectan dichos cambios en el sistema metabólico de los helmintos se encuentran el pH, la temperatura, la humedad, los nutrientes, presión parcial de CO₂ y principalmente la del oxígeno (Tielens, 2002). Este último en particular lo obtienen por difusión a través de la cutícula o tegumento (Tielens, 1994), ya que no poseen un sistema circulatorio, ni se han identificado proteínas transportadoras de oxígeno. La difusión del gas genera un gradiente en el cual los tejidos externos se encuentran en un medio más oxigenado, lo que favorece la actividad aerobia, mientras que los tejidos internos se encuentran en un medio menos oxigenado o microaerófilico, limitando dicha actividad (del Arenal, *et al.*, 1998).

Mitocondrias: relación estructura-función

Las mitocondrias desempeñan un papel central en los fenómenos energéticos de la célula, están encargadas de procesos como la extracción de energía de los sustratos químicos, la β oxidación, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. El número y localización intracelular de las mitocondrias varía según la naturaleza de la célula, por ejemplo, en una célula hepática existen entre 500 y 1000 mitocondrias distribuidas homogéneamente; en células musculares existe un mayor número y se encuentran asociadas a los filamentos contráctiles reflejando los elevados requerimientos de energía; finalmente un arreglo característico y número fijo de 16 mitocondrias se observa en el cuello de las células espermáticas (Alberts, *et al.*, 1994).

Palade (1953), Green (1958) y Green y Oda. (1961) y Herold (1965), observaron variaciones en el tamaño, la forma y la organización de las crestas de las mitocondrias y concluyeron que hay diferencias en la fisiología y bioquímica de estos organelos de un tipo celular a otro y que la composición y organización de las crestas son la clave de las funciones del organelo. Palade (1953) y Lehninger (1965) propusieron que el ensamble de complejos enzimáticos el cual media el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, están íntimamente asociadas con la estructura de la membrana interna, ya que permite el acomodo de dichos complejos, el flujo de electrones y el funcionamiento de la ATPsintasa, de esta forma la arquitectura de las crestas permite que se efectúen las interacciones sucesivas de la cadena respiratoria, mientras que la abundancia de las mismas incrementa la superficie disponible para realizar las distintas reacciones, por lo que a mayor número de crestas, mayor actividad mitocondrial.

Ha sido factible observar diferencias en la actividad respiratoria de las mitocondrias dependiendo de su localización, cantidad y disposición en un tejido u organismo (Alberts, *et al.*, 1994; Smith y Peters, 1980), así como de los requerimientos celulares y la disponibilidad de oxígeno (Lehninger, 1971; Tielens, 1994; Green, 1958; Takamiya, *et al.*, 1993; Komuniecki, *et al.*, 1993 y Ross y Tielens, 1994). Por otra parte se ha observado que las mitocondrias, dependiendo de la concentración de los sustratos pueden modificar su estado bioquímico. Además, se ha demostrado que una prolongada permanencia de la mitocondria en un ambiente aerobio o anaerobio resulta en adaptaciones a niveles enzimáticos (Tielens, *et al.*, 1991; Lloyd y Barret, 1986).

Heterogeneidad mitocondrial y respiratoria en helmintos

Se han identificado poblaciones heterogéneas de mitocondrias, así como diferentes tipos de metabolismo en diferentes tejidos de un mismo helminto (Kita, *et al.*, 1988; Bryant y Behm, 1989; Horemans, *et al.*, 1991; del Arenal, *et al.*, 1998). En el caso de los céstodos, el estudio inició con los trabajos de Read (1952) quien utilizando mitocondrias de *H. diminuta*, observó que en las larvas no hay reducción de fumarato, mientras que en adultos no encontró actividad de la citocromo oxidasa. Threadgold (1968) cuantificó en este mismo céstodo la actividad de la peroxidasa y determinó que esta asociada con las mitocondrias de la superficie del sincicio, pero no con las mitocondrias musculares; además demostró por vez primera la especialización dentro de poblaciones mitocondriales de diferentes tejidos del céstodo.

Rybicka (1967) al estudiar huevos embrionados de *H. diminuta* encontró actividades altas de la succinato deshidrogenasa, la NADH oxidasa y la citocromo oxidasa, además demostró que al final del desarrollo embrional las dos primeras actividades disminuyen mientras que la actividad de citocromo c oxidasa desaparece. El grupo de Arme (1983) demostró que los huevos de *H. diminuta* tienen diferente metabolismo que los adultos y que éste cambia con el tiempo, posteriormente Fioravanti (1998) mostró que el cisticerco se encuentra en un estado de transición.

En el trematodo adulto *Fasciola hepatica* se observó que la actividad aerobia disminuye a medida que aumenta el radio del cuerpo del organismo. (Tielens, 1984). Fry y Beesley (1985) usaron diaminobenzidina para localizar la actividad de citocromo oxidasa en *Ascaridia galli* y sugirieron que existe un gradiente en el helminto con una pérdida de citocromo oxidasa y un aumento en el metabolismo anaerobio a medida que aumenta su radio corporal.

Harnisch (1933), demostró que el estadio adulto de *Triaenophorus nodulosus* puede tomar oxígeno *in vitro* y que la cantidad del oxígeno consumido depende de la presión parcial del gas. Posteriormente, Moczón (1980) demostró que este céstodo es principalmente un anaerobio y que la actividad de citocromo oxidasa es baja, la cual está restringida a las partes externas del cuerpo, con base a lo anterior, concluyó que la enzima sólo opera en las mitocondrias tegumentales y en una delgada capa del parénquima subtegumental, ya que no fue posible detectarla en los tejidos más internos.

En *A. suum* se ha demostrado que los huevos y las larvas presentan importantes actividades aerobias, mientras que el adulto solo lleva a cabo actividades anaerobias (Takamiya, *et al.*, 1993).

Las diferencias entre las mitocondrias de diversas especies y más aún entre los distintos tejidos en el mismo organismo, reflejan, en la mayoría de los casos, la importancia relativa de las rutas metabólicas contenidas dentro de la mitocondria en una célula dada u organismo.

Metabolismo energético en helmintos

El metabolismo energético en los helmintos varía dependiendo de la presión parcial de oxígeno en el hábitat. En general los helmintos parásitos viven en el intestino de los vertebrados donde la disposición de este gas es baja, tales ambientes se denominan microaerófilos, sin embargo, son capaces de utilizar el oxígeno cuando éste se encuentra presente, lo anterior muestra la capacidad de estos organismos de modificar su metabolismo por un metabolismo aerobio o anaerobio según las condiciones del medio (Bryant, 1993). Un ejemplo es el nematodo *A. suum* que se ha empleado como modelo para el estudio de los cambios en el metabolismo energético durante los diferentes estadios de su ciclo biológico (huevo, larva y adulto). Las mitocondrias de estos estadios han sido muy estudiadas y están bien caracterizadas (Saz, 1981; Kita, 1992). En este sentido se ha demostrado que las mitocondrias de músculo del adulto presenta diferencias en la constitución de los complejos respiratorios en comparación con las mitocondrias obtenidas del huevo o del estadio de larva (larva 2, larva del segundo estadio que se encuentra en el huevo infectivo o maduro) (Takamiya, *et al.*, 1993).

Es importante señalar que en la mayoría de los organismos eucariontes, el metabolismo aerobio tiene mayor importancia debido a que es 18 veces más eficiente que el anaerobio (Figura 1); sin embargo, el metabolismo anaerobio en el caso de los helmintos es más eficiente ya que producen más ATP por la vía de dismutación del malato. (Figura 2).

Para los organismos aerobios, el proceso de la respiración emplea al oxígeno como el aceptor final de los electrones. En el caso de los anaerobios, este proceso depende de otras moléculas según el tipo de organismo y del ambiente donde se localice. Una de las principales moléculas que es utilizada por organismos anaerobios y facultativos como bacterias y helmintos parásitos es el fumarato, el cual funciona como el aceptor final de electrones, siendo posteriormente reducido a succinato que se excreta al medio junto con otros ácidos (Bryant, 1993).

En el metabolismo anaerobio tanto de bacterias y helmintos, la enzima fumarato reductasa (FR) desempeña un papel crucial, catalizando la reacción que permitirá posteriormente la generación de ATP. La misma reacción sucede en sentido contrario en la respiración aerobia y es catalizada por la enzima succinato deshidrogenasa (SDH). La actividad de ambas enzimas se utiliza como marcador de cada tipo de metabolismo.

Metabolismo anaerobio

El estadio parásito de los helmintos es principalmente anaerobio y excreta productos como succinato y otros ácidos volátiles como resultado de la degradación parcial de la glucosa, la cual es obtenida del huésped y funciona como su mayor fuente de energía (Von Brant, 1979 y 1983). Este metabolismo se presenta cuando el parásito se encuentra en el intestino del huésped donde la disponibilidad de oxígeno es muy limitada ($P_{O_2} = 0-5.0$ mm Hg).

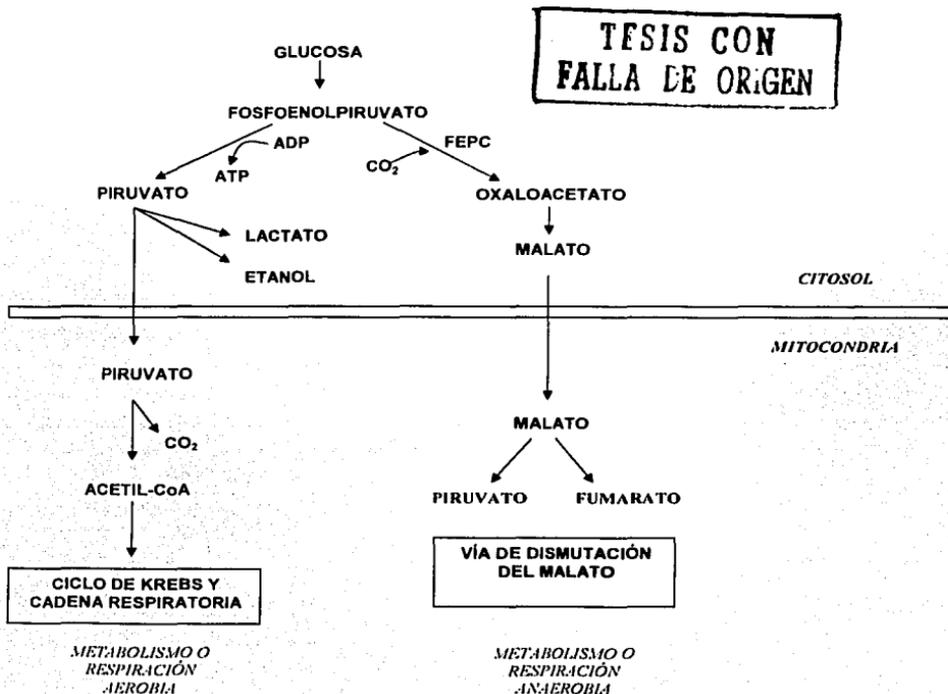


Figura 1. Esquema general del metabolismo aerobio y anaerobio en helmintos parásitos. FEPC = fosfoenolpiruvato carboxinasa (Modificado de Omura, 2001).

La enzima FR y la rodoquinona son los componentes clave de la cadena respiratoria anaerobia, ninguno de los cuales esta presente en la cadena respiratoria aerobia de mamíferos. En general durante el catabolismo la glucosa se degrada por fermentación simple a lactato o etanol, pero en los helmintos parásitos se ha demostrado que en medios microaerófilicos o con alta concentración de CO_2 la actividad de la enzima piruvato cinasa es muy baja (Tyler, 1992; Bryant, 1993) y el fosfoenolpiruvato (FEP) producido por la glucólisis es convertido a oxaloacetato por la enzima fosfoenolpiruvato carboxinasas, siendo entonces reducido a malato por la malato deshidrogenasa citoplásmica. Posteriormente, el malato es transportado a la matriz mitocondrial donde sirve como el sustrato principal que sigue simultáneamente dos rutas metabólicas, proceso conocido como dismutación del malato (Figura 2). Una ruta es oxidativa y la otra reductora: en la primera participa la enzima málica que produce piruvato, éste se oxida para producir acetil-CoA que es a su vez precursor del acetato; en esta vía se generan dos NADH; en la segunda ruta el malato se reduce a fumarato y luego a succinato, siendo catalizada esta reacción por la enzima FR que utiliza el NADH generado en la vía oxidativa (Kita, 1988). Dentro de la mitocondria, se forman succinato, acetato, 2 metilvalerato y 2-metil butirato como productos finales del metabolismo del malato los cuales son excretados al medio (Figura 2).

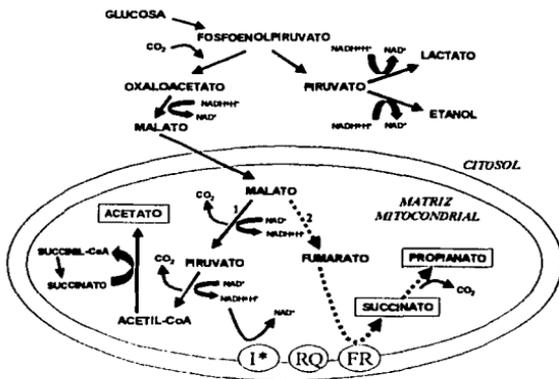


Figura 2. Dismutación del malato. En esta vía el fosfoenolpiruvato (FEP) es reducido a malato y éste es transportado a la mitocondria donde es convertido a piruvato y fumarato por una ruta oxidativa y una reductora respectivamente. 1= enzima málica, 2= fumarasa, * complejo I.

TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fumarato reductasa

La enzima FR ha sido muy estudiada en bacterias (Kröger, *et al.*, 1992) y en helmintos como *A. suum* (Kita, *et al.*, 1988); en mamíferos no se ha reportado su presencia. La FR es una proteína membranar (solo en bacterias del género *Shewanella* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito como una enzima soluble). Esta enzima cataliza la reducción de fumarato a succinato (Figura 3) utilizando electrones provenientes del NADH, su actividad es clave para el funcionamiento anaerobio de muchos organismos que utilizan el fumarato como aceptor final de electrones tales como las bacterias, las algas verdes, los protozoarios, los helmintos parásitos y algunos organismos marinos inferiores (Van Hellemond y Tielens, 1994). En algunos casos los complejos mitocondriales respiratorios III y IV no son muy activos debido a que el oxígeno no funciona como aceptor final de electrones, por lo tanto, los electrones son transferidos del NADH al fumarato vía complejo I, rodoquinona y FR (Tielens y Van Hellemond, 1998) (Figura 2).

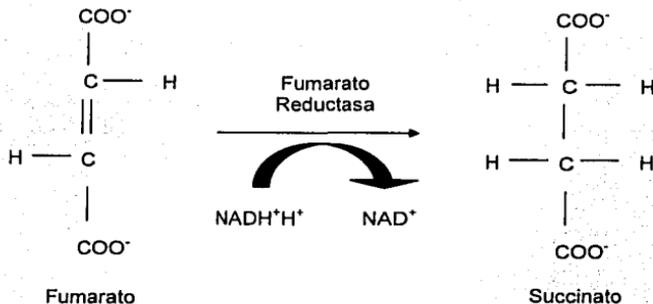


Figura. 3. Reacción de reducción del fumarato a succinato por la enzima FR.

TEEIS CON
FALLA DE ORIGEN

Metabolismo aerobio

El metabolismo aerobio se encuentra en todos los helmintos investigados; pero en general, predomina en los estadios larvarios y de vida libre, pues se encuentran en ambientes, órganos o tejidos con mayor disponibilidad de oxígeno. Este acceso al oxígeno le permite al organismo tener un metabolismo más eficiente y económico. Por esta razón, en estos estadios hay ciclo de Krebs así como la cadena de transporte de electrones acoplada a la fosforilación oxidativa para la extracción de energía de los nutrientes y glucógeno almacenado (Bryant, 1993)

En este metabolismo los electrones son transferidos del NADH y del succinato a la ubiquinona a través del complejo I y complejo II de la cadena respiratoria respectivamente y subsecuentemente son transferidos del ubiquinol al complejo III; finalmente pasan al complejo IV que es el encargado de reducir al oxígeno para formar agua.

Succinato deshidrogenasa

La enzima SDH forma el complejo II de la cadena respiratoria, es una de las nueve enzimas que llevan a cabo el ciclo de Krebs y es la única que está embebida en la membrana interna de la mitocondria. Esta enzima es una ferriflavoproteína que presenta un FAD unido covalentemente como grupo prostético, cataliza la reacción de oxidación del succinato a fumarato (isómero trans) con la concomitante reducción de FAD a FADH₂ (Figura 4); la flavina reducida es reoxidada en la cadena respiratoria por el centro hierro-azufre de la enzima y la ubiquinona. La SDH es utilizada como enzima marcadora de la actividad aerobia.

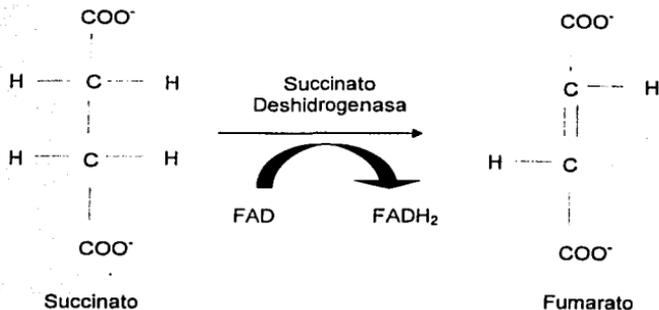


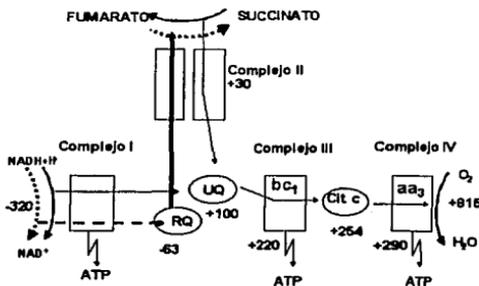
Figura. 4. Reacción de oxidación del succinato a fumarato por la SDH.

Fumarato reductasa vs succinato deshidrogenasa

En condiciones aerobias la enzima SDH cataliza la reacción en sentido contrario al que funciona la enzima FR. La SDH y FR interactúan con quinonas diferentes, mientras que la primera utiliza a la ubiquinona, la segunda utiliza a la rodoquinona (Figura 5). A pesar de que FR y SDH catalizan reacciones opuestas son proteínas muy similares, cada una esta compuesta de 4 subunidades diferentes: una subunidad A (Fp) con un FAD unido covalentemente, una subunidad B (Ip) que presenta 3 centros Fe-S, ambas subunidades constituyen la parte catalítica las cuales están ancladas a la membrana interna de la mitocondria por 2 subunidades C o cytB y D o cytB5, estos últimos tienen unidos grupos hemo tipo B como grupos prostéticos.

Los datos filogenéticos muestran que la secuencia de FR de eucariontes esta más relacionada a la SDH que a la FR de bacterias, indicando que, durante la evolución de mitocondrias anaerobias su SDH ha sido reconstruida y acoplada a una quinona diferente.

En *Escherichia coli* por ejemplo las enzimas FR y SDH son expresadas diferencialmente dependiendo de las condiciones del ambiente en el que la bacteria se encuentra, también se ha demostrado que algunos eucariotas anaerobios facultativos presentan genes que codifican para estas enzimas y su expresión se alterna dependiendo de la disposición de oxígeno (Kita, *et al.*, 1988).



TEJES CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Comparación entre la vía aerobia (línea continua) y la anaerobia (línea punteada) asociadas a la cadena de transporte de electrones. UQ=ubiquinona, RQ=rodoquinona. Los números indican el potencial redox de los componentes (millivolts).

En diferentes tipos de mitocondrias se ha determinado la actividad especifica de las enzimas FR y SDH. La relación FR/SDH de estas dos actividades indica el tipo de metabolismo que predomina (Tabla 1). Los resultados obtenidos en mitocondrias de helmintos en diferentes estadios de vida sugieren la alternancia del metabolismo dependiendo de la disposición del oxígeno (Fioravanti, *et al.*, 1998 y Kröger, *et al.*, 1992) ya que el cociente varía a través de las etapas de desarrollo.

Tabla 1. Actividad especifica de la SDH y FR en diferentes tipos mitocondriales.

Tipo mitocondrial	µmol/min/mg proteína		FR/SDH
	Succinato Deshidrogenasa	Fumarato Reductasa	
<i>A. suum</i>			
Complejo II aislado (adulto) (a)	2.04	40.8	20
Mit. de músculo (adulto) (b)	0.176	1.31	7.44
Mitocondrias de huevos (a)	0.054	0.052	0.96
Mitocondrias de Larva 2 (b)	0.292	0.05	0.22
<i>Hymenolepis diminuta</i> (6 días) (c)	0.052	0.051	0.98
<i>Hymenolepis diminuta</i> (14 días) (c)	0.029	0.082	2.82
<i>Caenorhabditis elegans</i> (d)	0.141	0.015	0.11
Corazón de bovino(a)	0.135	0.004	0.03

(a) Kita, *et al.*, 1998

(b) Saruta, *et al.*, 1995

(c) Fioravanti, *et al.*, 1998

(d) Takamiya, *et al.*, 1999

Larva 2 = larva de 2do. estadio

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

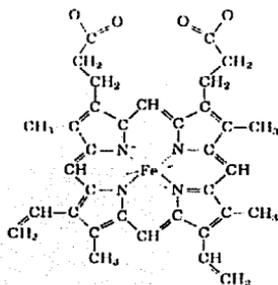
En el complejo II aislado y en mitocondrias de diferentes estadios de *A. suum* se observa que hay actividad de FR y SDH, pero que la relación FR/SDH disminuye a medida que el organismo tiene mayor accesibilidad al oxígeno, esto lo lleva a cabo modificando la actividad de las enzimas o las proporciones de ambas proteínas. En *H. diminuta* el aumento en esta relación en cisticercos inmaduros (6 días) y maduros (14 días) sugiere una preparación del céstodo para transitar del medio ambiente a una condición parásita en el escarabajo intermediario.

Un cociente bajo se presenta en mitocondrias de corazón de bovino, lo cual indica que el metabolismo aerobio es el preferido. En el caso de *C. elegans*, la actividad de SDH es comparable con la de corazón de bovino, pero la actividad reportada de FR y la presencia de rodoquinona sugiere la posibilidad de que este helminto puede sobrevivir en ambientes microaerófilicos.

Generalidades de los citocromos

Los citocromos están formados por un grupo prostético hemo unido a una apoproteína. El hemo esta formado por cuatro anillos pirrólicos unidos por enlaces vinilo, lo que constituye la molécula plana de protoporfirina. En el centro de la molécula se encuentra un átomo de ion hierro, el cual oscila entre la forma reducida (Fe^{2+}) y la oxidada (Fe^{3+}). Las cuatro posiciones ecuatoriales de coordinación del hierro estan ocupadas por los nitrógenos pirrólicos, mientras que las posiciones 5 y 6 están ocupadas con nitrógeno y/o azufre de histidinas o metioninas de la apoproteína (Lehninger, 1971).

En la citocromo oxidasa (aa_3) la sexta posición de coordinación es ocupada por el O_2 ; esta misma posición es ocupada por ligandos de campo fuerte como CO , NO_2 , los cuales son isoésteres del O_2 , y por lo tanto compiten con el oxígeno por la forma ferrosa de la enzima (Jones y Poole, 1985; Poole, 1988). Los grupos unidos a las posiciones C-1, C-3, C-6 y C-7 del anillo porfirínico son invariables en todos los citocromos, mientras que las posiciones C-2, C-4, C-5 y C-8 pueden tener diferentes sustituyentes; estas sustituciones son las responsables de las diferentes propiedades de absorberencia y del potencial redox de los citocromos (Poole 1983; Jones y Poole 1985) (Figura 6). Con base en estas sustituciones se clasifican los citocromos en los diferentes tipos. Los máximos de absorción de los citocromos pueden ser analizados registrando espectros diferenciales (estado reducido menos el oxidado), donde se encuentran tres regiones o bandas de absorción en la zona visible del espectro: la banda α entre 550 y 640 nm, la banda β entre 520 y 530 nm y la banda γ o soret entre 410 y 540 nm.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Estructura molecular del grupo hemo tipo a.

Citocromos en los helmintos

La cadena de transporte de electrones de los estadíos larvarios de helmintos es similar a la de mitocondrias de mamíferos pues cuenta con los citocromos **b**, **c** y **aa₃**; sin embargo, en el caso del estadio adulto, algunos citocromos están ausentes, (**aa₃** en *A. suum* por ejemplo) o la concentración de citocromos esta modificada (Takamiya, *et al.*, 1993).

Es importante señalar que las enzimas FR y SDH tienen unidos citocromos tipo **b** como grupos prostéticos, además la concentración de estos grupos esta aumentada en las mitocondrias en condiciones de anaerobiosis. De acuerdo con lo anterior se puede obtener una relación de citocromos **b/aa₃**, como indicativo de la relación anaerobio – aerobio. En diferentes tipos de mitocondrias se ha determinado la concentración de citocromos (Tabla 2) y se ha observado que la relación de citocromos **b/aa₃**, es mayor en tipos mitocondriales con metabolismo anaerobio y que una relación menor refiere a un metabolismo con actividad aerobia predominante.

Tabla 2. Concentración de citocromos y la relación **b/aa₃** en diferentes tipos mitocondriales.

Tipo mitocondrial	nmol/mg proteína			
	b	c	aa₃	b/aa₃
<i>A. suum</i> adulto (a)	0.19	0.036	n.d	
<i>A. suum</i> Larva 2 (a)	0.44	0.37	0.15	2.9
<i>Caenorhabditis elegans</i> (b)	0.477	0.371	0.194	2.4
Corazón de bovino(a)	0.32	0.47	0.68	0.47
Hígado de rata(c)	0.10	0.11	0.20	0.5

(a) Takamiya, *et al.*, 1993

(b) Takamiya, *et al.*, 1999

(c) Tyler, 1992

L2= larva de 2do.estadio.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

En las mitocondrias de la larva 2 de *A. suum* se ha determinado la presencia del citocromo **aa₃**, pero en las del adulto no se ha identificado. Por otra parte, la concentración de este citocromo en mitocondrias de corazón de bovino e hígado de rata es aproximadamente el doble de la concentración del citocromo **b** y la relación entre ambos es un reflejo del metabolismo aerobio en mamíferos. En *C. elegans* esta relación no parecer aplicarse ya que es aerobio, sin embargo, la tendencia anaerobia es evidenciada por la presencia de rodoquinona y un significativo nivel de FR.

ORGANISMO DE ESTUDIO

El avance en el campo inmunológico en la cisticercosis humana causada por *Taenia solium* ha sido en gran parte gracias a la disponibilidad del modelo de cisticercosis murina de *T. crassiceps*; sin embargo, se conoce poco a cerca del metabolismo energético de ambas especies. Considerando los antecedentes arriba mencionados se decidió utilizar el cisticerco de *T. crassiceps* debido al sencillo empleo de este organismo y a la posibilidad de extrapolar los fenómenos a *T. solium*.

El cisticerco de *T. crassiceps* fue descrito por Rudolphi en 1819. La ubicación taxonómica según Schmidt (1986) es la siguiente:

Reino: Animalia
Phylum: Platyhelminthes
Clase: Cestoda
Orden: Cyclophyllidea
Familia: Taeniidae
Genero: Taenia
Especie: *Taenia crassiceps*

El adulto de *T. crassiceps* presenta las características generales de los cestodos: escólex, cuello y estróbilo (Figura 7). El escólex (que también se presenta en el cisticerco maduro) es semejante al de *T. solium*, con cuatro ventosas y dos coronas de ganchos rostellares que varían en número y son de tamaño irregular, lo cual es diagnóstico de la especie (Figura 8).



Figura 7. Céstodo adulto de *T. crassiceps* y las principales estructuras.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 8. Micrografía electrónica de barrido. Estructura del escólex del cisticerco maduro de *T. crassiceps*.

La estructura macroscópica del cisticerco de *T. crassiceps* es muy parecida a la de *T. solium*; el tamaño varía de 0.5 a 7 mm, es una vesícula oval con membrana traslúcida blanquecina llena de líquido vesicular (Figura 9).

El ciclo de vida es indirecto, el cisticerco requiere de un hospedero intermediario como roedores o topos y un hospedero definitivo como el zorro rojo, el lobo ó el coyote (Figura 10). El cisticerco en una infección natural se desarrolla en forma subcutánea, en la cavidad peritoneal y pleural, y menos frecuentemente en la cavidad abdominal del roedor.



Figura 9. Cisticercos inmaduros de *T. crassiceps*. Microscopía óptica 10X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

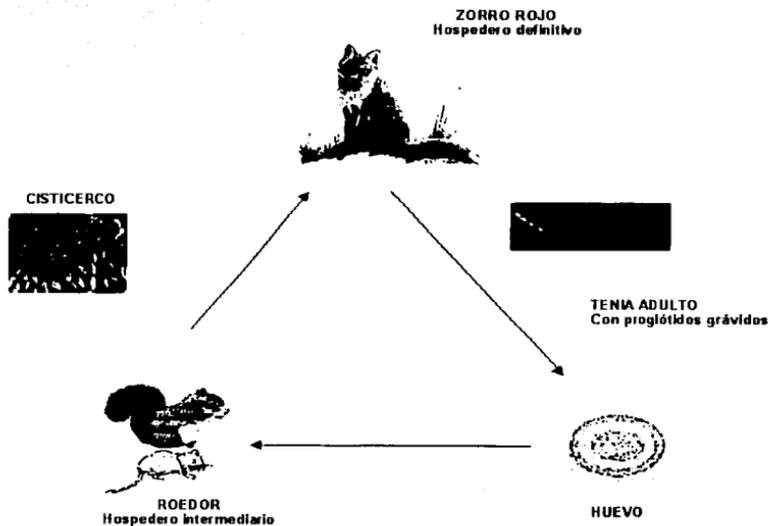


Figura 10. Ciclo de vida del cestodo *T. crassiceps*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La reproducción asexual del cisticerco por gemación múltiple hace muy atractivo al cisticerco de *T. crassiceps* como modelo experimental, ya que permite infectar vía intraperitoneal ratones con unos 20 parásitos y recuperar cientos de cisticercos en 4 meses (Figura 11).



Figura 11. Ratón hembra de 6 meses de infección con cisticercos de *T. crassiceps* por vía intraperitoneal. Los cisticercos se reproducen asexualmente en la cavidad peritoneal.

En la figura 12 se muestran diferentes formas del cisticerco. Se observan cisticercos con gemas exógenas en el polo opuesto al escólex (b y c); su progenitor es alargado y diferenciado; aunque es muy variable, si las gemas alcanzan alrededor de 2 mm de longitud se desprenden y forman nuevos individuos, la mayoría de éstas presentan una muesca o poro de evaginación que da origen al escólex (Freeman, 1962).

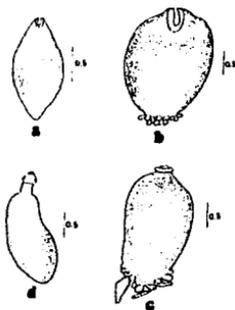


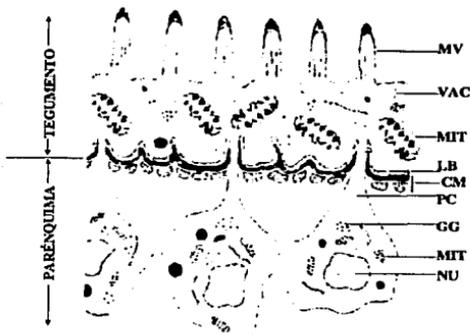
Figura 12. Formas de desarrollo del cisticerco de *T. crassiceps*. a; cisticerco joven, b y c; cisticerco con gemas exógenas y d; cisticerco maduro. Escala en mm.

Infección en humanos

Aunque no es frecuente la infección en humanos, se han reportado casos de personas infectadas por cisticercos de *T. crassiceps* en las que ha causado principalmente cisticercosis muscular y ocular. Estos pacientes se han caracterizado por estar inmunocomprometidos, por lo que la cisticercosis aparece como enfermedad oportunista (Freeman, *et al.*, 1973; Francois, *et al.*, 1998).

ANTECEDENTES

Al igual que en el estadio adulto, la estructura de los cestodos en el estadio de cisticerco consiste de una membrana externa que forma microvellocidades o microtrícas, las cuales aumentan decenas de veces el área de absorción y limitan al tegumento conformado por un sincicio anucleado; por debajo del tegumento separado por una membrana basal se encuentra el parénquima celular, en esta región se pueden observar células parenquimales, fibras musculares y de colágena, así como gránulos de glucógeno entre otras estructuras (Figura 13).



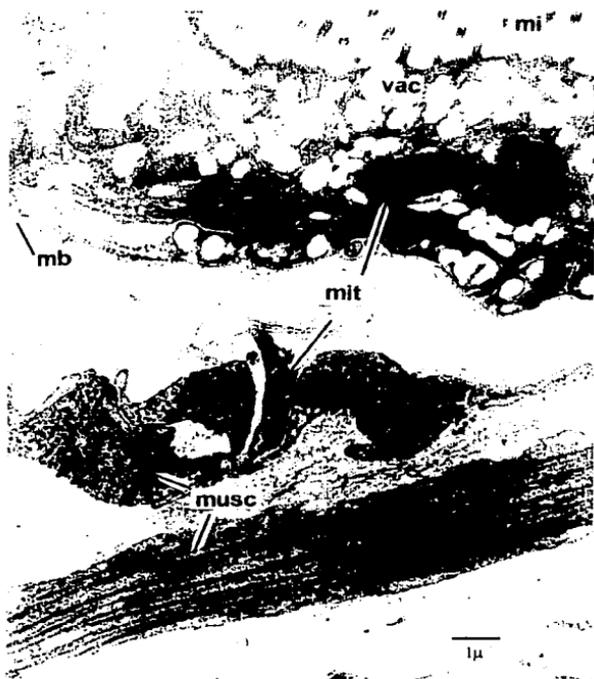
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 13. Ultraestructura general de los cestodos. **MV**: microvellocidades, **VAC**: vacuolas, **MIT**: mitocondrias, **LB**: lámina o membrana basal, **CM**: células musculares, **PC**: puente citoplásmico, **GG**: gránulos de glucógeno, **NU**= núcleo.

Heterogeneidad morfológica de mitocondrias en *T. crassiceps*

Por medio de las micrografías electrónicas de transmisión de cortes del cisticerco, se ha observado la presencia de mitocondrias de diversos tamaños y diferente arreglo de sus crestas (Figura 14). El tegumento del cisticerco presenta mitocondrias confinadas a la superficie, las cuales son de gran tamaño comparadas con las de mamífero, y presentan abundantes crestas

con un arreglo concéntrico (Figura 15 A). Por otra parte, el parénquima presenta una población de mitocondrias más heterogénea en tamaño, entre las que existen algunas muy pequeñas con crestas tubulares (Figura 15 B y C) (del Arenal, *et al.*, 1998).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 14. Micrografía de transmisión de un corte del cisticerco de *T. crassiceps*. T= tegumento, P= parénquima, mi= microtrícas, vac= vacuola, mit= mitocondria, mb= membrana basal, musc=células musculares.



Figura 15 A. Micrografía electrónica de transmisión de un corte del cisticerco de *T. crassiceps*. Las mitocondrias del tegumento son mayores a una micra y presentan abundantes crestas concéntricas.



Figura 15 B. Micrografía electrónica de transmisión de una célula del parénquima. Las células presentan claramente mitocondrias de diferente tamaño.

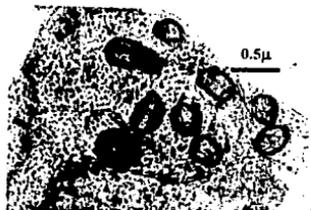


Figura 15 C. Micrografía electrónica de transmisión de una célula del parénquima. Las mitocondrias pequeñas presentan crestas tubulares.

Metabolismo de *T. crassiceps*

En el cisticerco de *T. crassiceps* se ha demostrado la presencia de enzimas del metabolismo anaerobio en el cual el succinato es el producto final de la actividad de la enzima FR (del Arenal, *et al.*, 1998), sin embargo, también se ha evaluado la actividad de citocromo c oxidasa y la actividad de SDH, así como la existencia de citocromos b, c y aa₃ (Zenka, 1986 y 1987) lo que hace suponer que el proceso aerobio está involucrado de manera importante en la adquisición de energía de este parásito .

Con base en los estudios mencionados sobre helmintos, así como los antecedentes arriba descritos se propuso obtener información sobre el metabolismo energético del cisticerco de *T. crassiceps*, para lo cual se estableció la siguiente premisa:

Debido a la falta de sistemas respiratorio y circulatorio en el cisticerco de *T. crassiceps* el oxígeno difunde hacia el interior formando un gradiente de su concentración, lo cual podría estar repercutiendo en el metabolismo energético de los diferentes tipos de mitocondrias que lo constituyen.

HIPÓTESIS

La localización y morfología de las mitocondrias del cisticerco de *T. crassiceps* está en relación con el metabolismo que llevan a cabo, por lo que es probable que en el tejido interno se encuentren mitocondrias preferentemente anaerobias, mientras que el tejido periférico contenga mitocondrias aerobias.

OBJETIVOS

GENERAL:

Definir si la localización tisular de las mitocondrias del cisticerco de *T. crassiceps* está relacionada con la morfología mitocondrial y el tipo de metabolismo energético que presentan.

PARTICULARES:

- a). Establecer una metodología para la purificación de las diferentes poblaciones de mitocondrias del cisticerco de *T. crassiceps*.
- b). Comparar la morfología de las diferentes poblaciones de mitocondrias.
- c). Comparar la actividad y composición de enzimas y complejos proteicos de la cadena de transporte de electrones de las diferentes poblaciones mitocondriales.

METODOLOGÍA

Cultivo y obtención de cisticercos

Los cisticercos de *T. crassiceps* (cepa HYG), se cultivaron en ratones hembras de la cepa Balb/c. Se inocularon 20 cisticercos jóvenes por vía intraperitoneal en cada ratón. Después de 4 a 6 meses los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, los cisticercos se recuperaron de la cavidad peritoneal, y se colocaron en solución PBS (KH_2PO_4 10 mM, NaCl 150 mM) pH 7.4 a 4° C. Con el fin de trabajar solo cisticercos jóvenes (Figura 12a) se eliminaron los cisticercos calcificados.

Extracción de mitocondrias

Mitocondrias del Tegumento. Para la obtención de las mitocondrias del tegumento del cisticerco, se siguió el método descrito por del Arenal y col. (1998), el cual consta de los siguientes pasos: los cisticercos se combinaron con un volumen de solución amortiguadora mitocondrial (AM), (hepes 10 mM, sacarosa 250 mM, EGTA 2.0 mM, PMSF 86 μM , y saponina 0.2%) pH 7.4 a 4° C, se incubaron durante 4 minutos en rotación constante a 120 rpm, posteriormente se agitó suavemente en vórtex por 20 segundos, se centrifugaron a 14600 x g durante 20 minutos a 4° C, el sobrenadante se eliminó y el precipitado se resuspendió en solución AM sin saponina, después se centrifugó a 180 x g durante 20 minutos por 2 veces. El precipitado es el parénquima y se procesa para la obtención de las mitocondrias de éste. Los sobrenadantes recuperados (180 x g) se juntaron y se centrifugaron a 14600 x g durante 10 minutos a 4° C. Después de dos lavados el precipitado mitocondrial se resuspendió en 1.5 ml de AM, esta fracción corresponde a las mitocondrias del tegumento.

Mitocondrias del parénquima. La obtención de las mitocondrias del parénquima se realizó de acuerdo al siguiente método: el parénquima se resuspendió en AM sin saponina, y se rompió mecánicamente con un potter, el homogenizado se centrifugó a 800 x g por 20 min (2 veces) a 4° C. El precipitado se desechó, se juntaron los sobrenadantes, y se centrifugó a 14500 x g durante 10 minutos. Después de dos lavados el precipitado mitocondrial se resuspendió en 3 ml de solución AM sin saponina.

Con el fin de obtener diferentes poblaciones mitocondriales del parénquima se aplicaron dos metodologías: gradientes discontinuos de sacarosa y centrifugación diferencial. En la primera, el precipitado mitocondrial del parénquima se aplicó sobre gradientes discontinuos de sacarosa a concentraciones de 30, 45, 50, y 60% ó 35, 45, 55 y 65% en hepes 10 mM y EGTA 5 mM,

albúmina 0.1%, $MgCl_2$ 1 mM, posteriormente se centrifugaron a 65000 x g por 1 hora a 4° C. Después de la centrifugación se recuperaron cuidadosamente las bandas o fracciones mitocondriales con pipeta pasteur. Posteriormente cada fracción se lavó 3 veces con AM sin saponina.

En el segundo método, al precipitado mitocondrial se añadieron cristales de DNAasa y alfa-amilasa a una concentración de 15 μg por ml; la mezcla se incubó en agitación suave a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 17000 x g durante 20 minutos a 4° C; el sobrenadante se desechó y el precipitado conteniendo las mitocondrias se resuspendió en solución AM sin saponina, tomando una alícuota como muestra de mitocondrias totales. Después se centrifugó a 1200 x g durante 10 min a 4° C y se recuperó la fracción mitocondrial densa, posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 14500 x g durante 10 minutos a 4° C para obtener la fracción mitocondrial ligera. Ambas fracciones se lavaron tres veces con AM sin saponina.

Con el fin de tener valores control de las metodologías que se aplicarían se obtuvieron mitocondrias de hígado de rata siguiendo el método de Moreno-Sánchez (1985).

Microscopía electrónica de transmisión

Ultraestructura del cisticerco. Se hicieron cortes del cisticerco de *T. crassiceps* para observar su estructura general con microscopía electrónica y determinar parámetros morfológicos.

Las mitocondrias se fijaron de la siguiente manera: se colocaron 200 μl de muestra fresca en 1 ml de glutaraldehído al 2.5%, se agitó suavemente y se incubaron durante 2 horas a 4° C, después se centrifugó a 10000 x g por 1 minuto a 4° C y se eliminó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió suavemente en amortiguador de fosfatos 200 mM a pH 7.4. Después se fijaron en tetraóxido de osmio al 2% (p/v) durante dos horas, posteriormente se embebieron en Epon y se cortaron en criotomo. Los cortes se tiñeron con acetato de uranio al 2% (p/v), pH 4.8 y en citrato de plomo (Reynolds, 1963). Las muestras se observaron en microscopio electrónico de transmisión.

Control respiratorio

Este parámetro se determinó por el método polarográfico utilizando muestras mitocondriales frescas. La respiración mitocondrial se evaluó en un monitor de oxígeno (Yellow Spring Instruments modelo 5300) con un electrodo tipo Clark.

El control respiratorio se determinó incubando las mitocondrias en la cámara del oxímetro con el amortiguador de control respiratorio (Hepes 10 mM, $MgCl_2$ 1mM, Albúmina 0.1%, KH_2PO_4 5

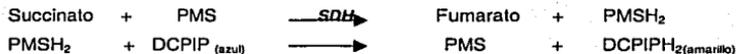
mM, Sacarosa 250 mM y EGTA 2 mM) pH 7.4. Después de obtener la lectura basal, se adicionó succinato a 15 mM final y se registró el consumo de oxígeno en el estado 4; después de 3 minutos se agregó ADP a 90 μ M final y se registró el estado 3.

El control respiratorio se calculó al dividir el consumo de oxígeno en el estado 3 entre el oxígeno consumido en el estado 4 (Edo 3/Edo4). A partir de los trazos de oxidación del sustrato, se obtuvo el cociente de la velocidad respiratoria en presencia de 90 μ M de ADP y la velocidad de la respiración endógena en ausencia de ADP.

Ensayos enzimáticos

Las actividades enzimáticas se realizaron a 25 °C usando un espectrofotómetro Beckman DU70. En todos los casos el volumen de la mezcla de reacción fue de 1ml:

SUCCINATO DESHIDROGENASA: La actividad de la SDH (E.C.1.3.99.1) se determinó a 600 nm siguiendo la reducción del DCPIP ($\epsilon = 21\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El medio de reacción consistió de 50 mM de KH_2PO_4 (pH 7.6), succinato 20 mM, KCN 100 μ M y 0.2 a 0.5 mg de muestra mitocondrial. Se registró la reducción basal y la reacción enzimática se inició con la adición de PMS 33 mM y DCPIP 2.4 mM como aceptores de electrones (Arrigoni y Singer, 1962).



FUMARATO REDUCTASA: Se estandarizó el método de Boveris y col (1986) para cuantificar la actividad de la FR, la cual se determinó a 550 nm, siguiendo la oxidación de metil-viológeno ($\epsilon = 6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) previamente reducido con ditionita en condición anaerobia. El medio de reacción consistió de 100 mM de KH_2PO_4 (pH 7.0), 10 μ M de CaCl_2 , 1 mM de MgCl_2 , 2 mM de metil-viológeno, 1.43 mM de ditionita (concentración que reduce 2 mM del metil-viológeno) (Figura 25) y 0.2 a 0.5 mg de muestra mitocondrial; la reacción se inició con la adición de 10 mM de fumarato.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Quantificación de la concentración de los citocromos

Para determinar la composición cualitativa y cuantitativa de los citocromos en la membrana de las mitocondrias, se realizaron los espectros diferenciales (estado reducido menos el estado oxidado) a 25° C. El medio de reacción consistió en 100mM de hepes (pH 7.5), 22% de glicerol y 2 mg de muestra mitocondrial. Se utilizó ditionita como agente reductor (unos granos); mientras que para oxidar el medio se hizo una agitación vigorosa de la mezcla de reacción. La absorción de los citocromos se determinó en un espectrofotómetro de doble rayo, (AMINCO) realizando un barrido entre las longitudes de onda 400 a 650 nm. A partir de las lecturas correspondientes a cada citocromo se calculó la concentración (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de los citocromos cuantificados en mitocondrias del cisticerco de *T. crassiceps*.

CITOCROMO	PARES (nm)	ϵ
b	560-575	22.0
c	550-540	19.0
a + a ₃	603-630	13.1

Región de absorción espectrofotométrica de los diferentes citocromos.

nm= nanómetros

ϵ = coeficiente de extinción molar ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

Determinación de proteína

La cantidad de proteína de las fracciones mitocondriales obtenidas se cuantificó por el método de Markwell utilizando albúmina sérica de bovino como proteína estándar (Markwell, *et al.*, 1978).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Estructura general del cisticerco

Con el fin de adquirir información general sobre la estructura del cisticerco y la disposición de las mitocondrias, se obtuvieron micrografías electrónicas de cortes y se determinaron algunos parámetros morfológicos y estructurales. De acuerdo con micrografías electrónicas se estableció que el tegumento tiene un grosor de $2 \pm 0.2 \mu$, el cual presenta abundantes mitocondrias de gran tamaño con respecto a las de hígado de rata.

El parénquima está conformado por células parenquimales con núcleos grandes, fibras musculares dispuestas en diferentes direcciones y fibras de colágena. Las células parenquimales presentan mitocondrias de varios tamaños, además de grandes cúmulos de glucógeno.

En la cuantificación de las mitocondrias sobre las micrografías del parénquima, se pudo estimar que el 64% fueron mitocondrias mayores o iguales a 1μ y el 36% correspondió a mitocondrias menores a 1μ . La parte interior del cisticerco es ocupado por el líquido vesicular que representa el 90% de la masa húmeda; el tegumento y el parénquima es el 10% restante (Figura 16).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 16. Micrografía electrónica de transmisión de un corte longitudinal del cisticerco de *T. crassiceps*.

Extracción de las mitocondrias

Estudios previos a este trabajo, efectuados por del Arenal y col (1998) generaron una metodología efectiva para el aislamiento de las mitocondrias del tegumento sin dañar el parénquima (Figura 17). En dicho trabajo se utilizó saponina para solubilizar la membrana plasmática del tegumento, esto permite obtener mitocondrias altamente puras del tegumento (Figura 18).

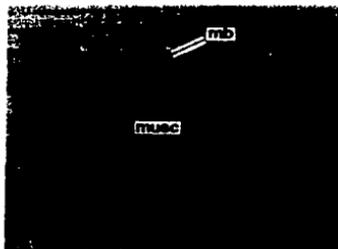
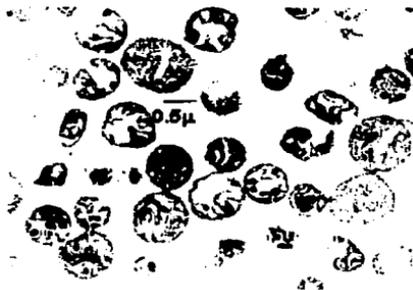


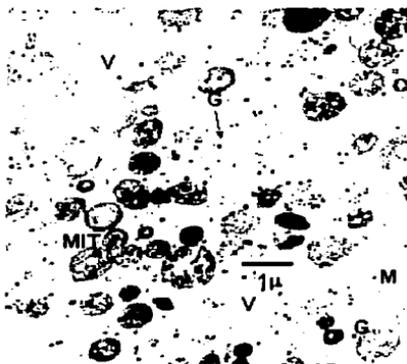
Figura 17. Micrografía electrónica del parénquima del cisticerco de *T. crassiceps* después de solubilizar la membrana plasmática con saponina para obtener solo las mitocondrias del tegumento. mb= membrana basal, musc= células musculares.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 18. Mitocondrias aisladas del tegumento del cisticerco de *T. crassiceps*

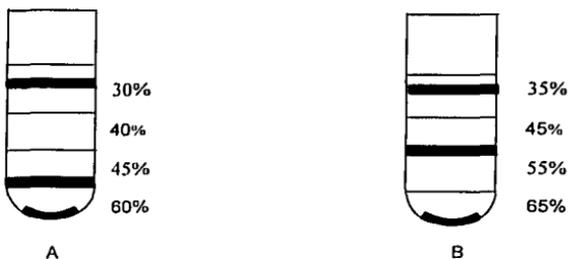
Utilizando una metodología general para intentar obtener mitocondrias del parénquima del cisticerco, se obtuvo una población heterogénea e impura, la cual presenta vacuolas de diferentes tamaños, restos de membrana y abundantes gránulos de glucógeno (Figura 19). Como se observa en la micrografía, existen mitocondrias que difieren en tamaño, así como en la forma de las crestas. De acuerdo a estas observaciones se decidió, además de obtener las mitocondrias del parénquima, intentar separarlas en poblaciones de acuerdo al tamaño o densidad. Para realizar esto se intento separarlas utilizando el sistema de gradiente discontinuo de sacarosa.



TESIS CON
FALLA LE ORIGEN

Figura 19. Mitocondrias totales del parénquima del cisticerco de *T. crassiceps*. Observe los diferentes tamaños de las mitocondrias =MIT, V=vacuolas, G= gránulos de glucógeno, M= restos de membranas.

Separación de mitocondrias por gradiente discontinuo de sacarosa: Se evaluaron diferentes gradientes discontinuos de sacarosa, en los que se modificaron las densidades, sin embargo, en todos los casos se obtuvieron tres bandas, una ligera que siempre quedó arrestada en la densidad menor (30-35%), una segunda banda de densidad media que migraba hasta densidades de 45% y una banda densa que llegaba hasta el fondo del gradiente (Figura 20).



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 20. Patrón de bandas de los gradientes de sacarosa. Los tubos A y B muestran 2 de los gradientes discontinuos utilizados. Las 3 bandas (■) en todos los fueron reproducibles, una en la densidad de 30 o 35%, una segunda banda en la base de la densidad de 45% y una tercera banda que precipitó en el tubo.

Para determinar si la separación fue efectiva, así como para evaluar la integridad estructural de las mitocondrias, se colectaron las bandas y se obtuvieron micrografías electrónicas. Las 3 fracciones mitocondriales separadas con el gradiente del tubo B se muestran en las figuras 21, 22 y 23.

En las micrografías se observó que no había una separación de mitocondrias de acuerdo a su densidad, no tenían integridad ya que se encontraban hinchadas o totalmente destruidas, y había una gran cantidad de membrana, gránulos de glucógeno y vacuolas de diferentes densidades. Cabe señalar que también se realizó una separación con gradiente de Percoll en las condiciones en que han sido separados otros tipos de mitocondrias y los resultados fueron similares (datos no mostrados).

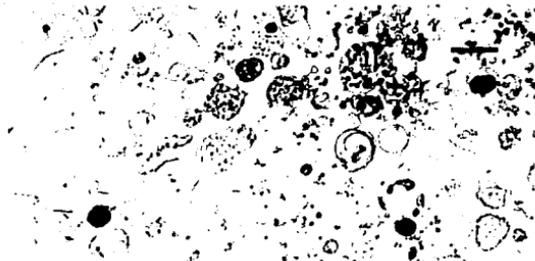


Figura 21. Micrografía electrónica de la fracción mitocondrial aislada en la densidad de 35% de sacarosa

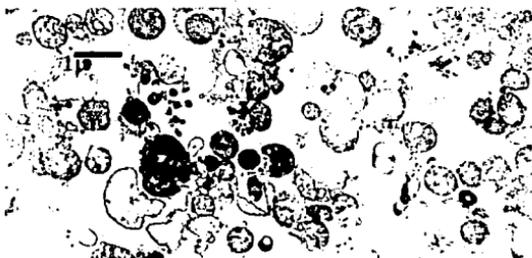


Figura 22. Micrografía electrónica de la fracción mitocondrial aislada en la densidad de 45% de sacarosa

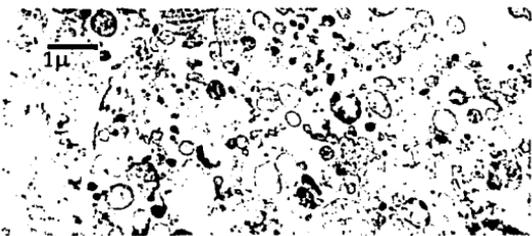


Figura 23. Micrografía electrónica de la fracción mitocondrial aislada en la densidad de 65% de sacarosa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con base en estos resultados se concluyó que el sistema de gradiente discontinuo no es un método efectivo para separar las mitocondrias del parénquima, ya que les provoca un hinchamiento y ruptura, además de que no hay una población enriquecida que pueda ser recuperada ni evaluada debido a la escasez de mitocondrias íntegras.

Separación de mitocondrias por centrifugación diferencial: Basados en los resultados mencionados arriba se intento separar las mitocondrias con un método que no les infligiera cambios abruptos de presión osmótica, por lo que se optó a separarlas por el método de centrifugación diferencial aprovechando nuevamente la diferencia en la densidad de las mitocondrias.

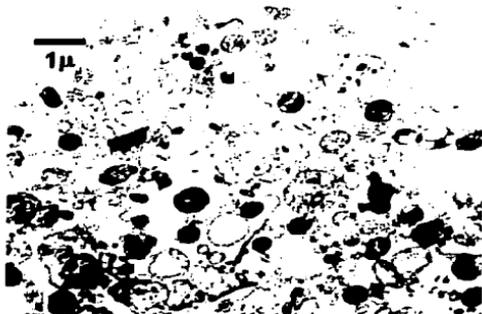
Empleando la centrifugación diferencial para separar al menos dos poblaciones de mitocondriales se decidió centrifugar a baja velocidad para precipitar las mitocondrias grandes y densas y a alta velocidad para precipitar las mitocondrias pequeñas y ligeras. Los primeros resultados mostraron una población mitocondrias íntegras; sin embargo las fracciones presentaron abundantes núcleos y cúmulos de glucógeno que proporcionaban una viscosidad aparente que no permitía una separación efectiva; debido a esto se utilizó α amilasa y DNAasa con lo cual se mejoró la separación. De esta forma se obtuvieron dos tipos de fracciones mitocondriales del parénquima que fueron nombradas de acuerdo a su densidad relativa, como mitocondrias de la fracción densa (MFD) y mitocondrias de la fracción ligera (MFL).

Para evaluar la integridad y la eficacia de separación de las fracciones mitocondriales se colectaron ambas fracciones y se obtuvieron micrografías electrónicas de transmisión (Figuras 24 y 25).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 24. Micrografía electrónica de la fracción mitocondrial densa (MFD) del parénquima del cisticerco de *T. crassiceps* obtenida por centrifugación diferencial (1200 x g).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 25. Micrografía electrónica de la fracción mitocondrial ligera (MFL) del parénquima del cisticerco de *T. crassiceps* obtenida por centrifugación diferencial (14700 x g).

Morfología de las fracciones mitocondriales aisladas

De acuerdo con las imágenes de microscopía de transmisión, las MFD son una población enriquecida con mitocondrias principalmente grandes y con buena integridad estructural, aunque aún había una pequeña contaminación de vacuolas, restos membranales y gránulos de glucógeno. En general las mitocondrias presentan abundantes crestas con un arreglo concéntrico. Por otro lado, las MFL no son una población enriquecidas, sin embargo hay una abundancia relativa de mitocondrias pequeñas las cuales están integras; es importante mencionar que la contaminación en esta fracción es alta, con mitocondrias hinchadas, cúmulos de glucógeno, pequeñas vacuolas y gran cantidad de restos membranales.

Considerando los resultados de las metodologías de gradientes discontinuos y centrifugación diferencial, se decidió trabajar solo con las fracciones mitocondriales aisladas por el segundo método.

En micrografías de las fracciones mitocondriales aisladas se observa una morfología similar a las mitocondrias observadas en los cortes transversales del cisticerco, por lo que no hubo modificación estructural aparente después del proceso de aislamiento. Las mitocondrias del tegumento (MT) miden $1.6 \pm 0.2 \mu$ y presentan abundantes crestas con una disposición concéntrica (Figuras 14 A). La población total de mitocondrias del parénquima presenta diversos tamaños que varían de 0.3μ , a 1.2μ ; los contaminantes más comunes son membrana celular y vesículas de glucógeno (Figura 16). La fracción densa contiene las mitocondrias grandes del parénquima (MFD), con un diámetro promedio de $1.2 \pm 0.2 \mu$ las cuales presentan crestas

abundantes y concéntricas semejantes a las del tegumento, (Figuras 26 A, B, C y tabla 4). En la fracción ligera se encuentran las mitocondrias pequeñas principalmente (MFL), con un diámetro de $0.5 \pm 0.2 \mu$ las cuales tienen pocas crestas y de forma tubular (Figuras 26 D, E y tabla 4).

Del 100% del total de mitocondrias cuantificadas en cortes del cisticerco corresponde un 70% a las mitocondrias grandes y un 30% a mitocondrias pequeñas. En la fracción total de mitocondrias del parénquima los valores para mitocondrias grandes y pequeñas son 64 y 36% respectivamente, en las fracciones mitocondriales aisladas los porcentajes son de 75% y 25% respectivamente. Esto muestra que hay pérdida mínima en la fracción ligera. Sin embargo, las poblaciones de mitocondrias aisladas son relativamente homogéneas y presentan integridad estructural.

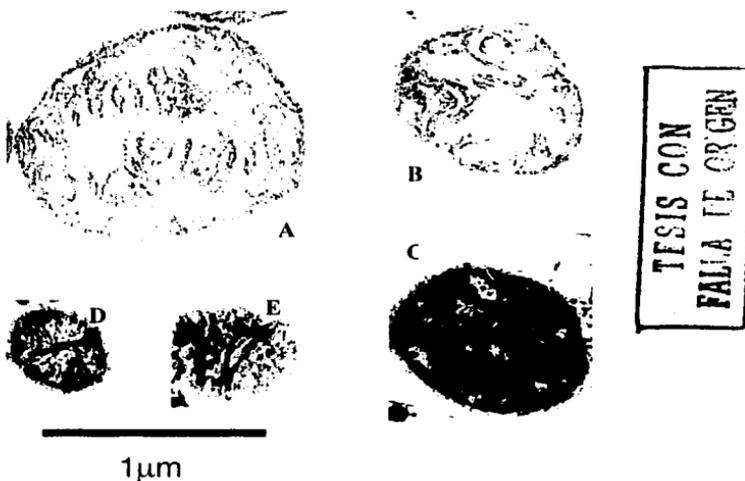


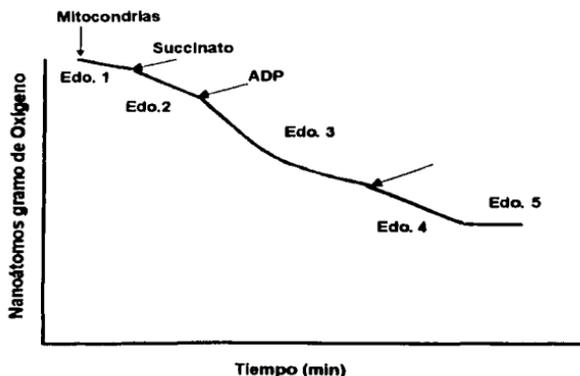
Figura 26. Tipos mitocondriales aislados: A; Mitocondria del tegumento, B y C; Mitocondrias de la fracción densa del parénquima, observe las crestas concéntricas, D y E; Mitocondrias de la fracción ligera del parénquima, observe las crestas tubulares (Las figuras presentan la misma escala).

Tabla 4. Características morfológicas de las mitocondrias del cisticerco de *T. crassiceps*.

Población Mitocondrial	Forma	Tamaño (micras)	Conformación de las crestas	Contaminantes
Mitocondrias del Tegumento	Redonda y ovalada	1.8 ± 0.3	Concéntrica	—
Mitocondrias Fracción Densa (MFD)	Redonda y ovalada	1.2 ± 0.2	Concéntrica	Membrana y gránulos de glucógeno
Mitocondrias Fracción Ligera (MFL)	Redonda	0.5 ± 0.3	Concéntrica y tubular	Membrana y gránulos de glucógeno

Control respiratorio

Se evaluó el control respiratorio (CR) de las mitocondrias del tegumento, del parénquima, MFD y MFL (separadas por centrifugación diferencial) así como de las mitocondrias de hígado de rata para determinar la integridad funcional (Figura 28).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

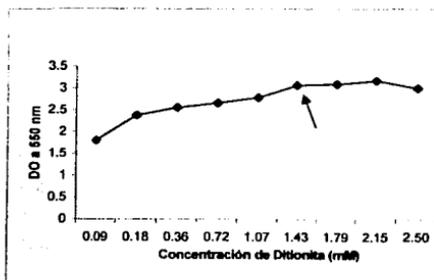
Figura 27. Curva típica del consumo de oxígeno y estados respiratorios para determinar el CR en las mitocondrias aisladas.

El CR en las fracciones mitocondriales del cisticerco es de 1.2 a 1.3, lo que representa un valor bajo en comparación con 4.37 obtenido en las mitocondrias de hígado de rata (4.0 a 6.0 reportado por Graham y col 1994). Sin embargo, los valores son semejantes a los reportados (del Arenal, *et al.*, 1998) en los que se mostró la integridad de las mitocondrias midiendo el potencial de membrana (tabla 5).

	nanoátomogramo de oxígeno consumido/min/mg proteína				
	MT	MP	MFD	MFL	MHR
Estado 4	63.68	27.32	15.36	13.90	23.7
Estado 3	87.96	33.68	20.48	17.0	104
CR	1.38	1.23	1.33	1.22	4.37

Tabla 5. Actividad respiratoria de las fracciones mitocondriales del cisticerco de *T. crassiceps* en ausencia (Edo 4) y presencia (Edo 3) de ADP 45 μ M. MT=mitocondrias del tegumento, MP= mitocondrias totales del parénquima, MFD= mitocondrias de la fracción densa, MFL= mitocondrias de la fracción ligera, MHR= mitocondrias de hígado de rata.

Estandarización del ensayo enzimático de FR: Se estandarizó el ensayo para cuantificar la actividad de la FR; para esto se determinó la concentración de ditionita (hidrosulfito de sodio) que reduce 2 mM de metil-viológeno en condiciones anaerobias (la cubeta con medio de reacción y muestra mitocondrial se cubre con parafilm después de evacuar el oxígeno burbujeando con N₂) (Boveris 1986) (Figura 29)



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 28. Reducción de metil-viológeno 2mM con ditionita. La reducción se midió a 550 nm. La flecha indica la concentración de ditionita utilizada en los ensayos (1.43mM).

Actividad específica de SDH y FR

Con el resultado de la reducción del metil-viológeno, se procedió a determinar la actividad enzimática de FR como enzima marcadora de la actividad anaerobia y posteriormente la actividad de SDH como enzima marcadora de la actividad aerobia. Los resultados de las actividades específicas de ambas enzimas se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Comparación de las actividades específicas y cociente FR/SDH de las fracciones mitocondriales aisladas.

Tipo de Mitocondria	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)		
	Succinato Deshidrogenasa	Fumarato Reductasa	FR/SDH
<i>T. crassiceps</i>			
Mitocondrias totales(a)	0.051	0.005	0.09
Mit. Tegumento(b)	0.267 \pm 0.045	1.060 \pm 0.084	3.97
Mit. Parénquima(b)	0.176 \pm 0.023	0.949 \pm 0.108	5.71
Mit. Fracción Densa (MFD) (b)	0.152 \pm 0.020	0.495 \pm 0.167	3.25
Mit. Fracción Ligera (MFL) (b)	0.321 \pm 0.165	0.485 \pm 0.048	1.5
Hígado de rata(b)	0.107 \pm 0.009	0.00626 \pm 0.001	0.058
Hígado de rata(c)	0.154	.007	0.04

(a) Zenka, 1987

(b) este trabajo

(c) Kita, *et al.*, 1998

Las actividades enzimáticas muestran que hay una mayor actividad de SDH en las mitocondrias de tegumento comparadas con las mitocondrias del parénquima y que la actividad de FR es igual en ambos tipos mitocondriales.

Por otro lado la alta actividad de SDH en las MFL puede ser causa de la abundancia de esta enzima, pero es más probable que sea el resultado de la concentración de restos de membrana que aumenta la actividad específica de la fracción. Sin embargo este punto no es claro ya que la actividad de FR permanece similar a la de la fracción densa.

El cociente FR/SDH indica que tipo de metabolismo puede ser más activo, así en las mitocondrias de hígado de rata la actividad de FR es despreciable por lo tanto predomina un metabolismo aerobio. En el caso de las mitocondrias del cisticercos se observa que el metabolismo preferido es anaerobio.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Actividad total porcentual de SDH y FR

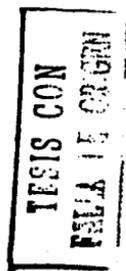
De acuerdo con la cantidad de proteína total recuperada en cada fracción mitocondrial, se obtuvieron los valores porcentuales siguientes: del total de la proteína obtenida de las fracciones mitocondriales, el 16.43% de la proteína correspondió a las mitocondrias del tegumento (MT) y el 83.55% restante a las mitocondrias del parénquima. De este porcentaje, el 64.33% correspondió a las MFD y el 19.22% a las MFL. Del 83.55% ajustado a 100%, el 77% de proteína correspondió a las MFD, y el 23% restante a las MFL. Con estos datos se determinaron las actividades totales porcentuales de las fracciones mitocondriales aisladas. Tabla 7.

Tabla 7. Actividad total porcentual de SDH y FR en las fracciones mitocondriales aisladas.

Tipo de mitocondria	% Act. Total SDH	% Act. Total FR	FR/ SDH
<i>T. crassiceps</i>			
-Mit. Tegumento	23±4	17.4±4	0.76
-Mit. Parénquima	77±3	82.6±4	1.07
*MFD	56.6 ±2.3	77.3± 7.8	1.37
*MFL	43.32± 7.11	22.6± 2.2	.052

- Valores normalizados a un 100% de proteína del cisticerco.

* Valores normalizados a un 100% de proteína del parénquima.



De acuerdo con la actividad porcentual total obtenida, la actividad aerobia del tegumento es menor que la del parénquima; sin embargo no deja de ser alta comparando las dimensiones de ambos tejidos. El tegumento parece proporcionar la mitad de los complejos enzimáticos para llevar a cabo un metabolismo en ausencia de oxígeno. Por otro lado, las dos poblaciones de mitocondrias del parénquima tienen una aportación semejante al metabolismo aerobio; sin embargo, las MFD aportan más al metabolismo anaerobio del parénquima con un 77%.

Con estos datos determinamos que no hay una diferencia clara entre las actividades de las MFD y las MFL, por lo tanto se decidió continuar el estudio solo con las mitocondrias del tegumento y las mitocondrias totales del parénquima.

Concentración de citocromos

Continuando con la caracterización de las mitocondrias del cisticerco, se determinó la concentración de los citocromos b, c y aa₃ en las poblaciones de mitocondrias del tegumento y del parénquima así como de las mitocondrias de hígado de rata como control de experimentación. Estudios anteriores (del Arenal, *et al.*, 1998 y Zenka, 1986) cuantificaron la concentración de los citocromos en mitocondrias del cisticerco, los resultados se muestran en la (Tabla 8).

Tabla 8. Cuantificación de citocromos de las fracciones mitocondriales
nmol/mg proteína

Mitocondrias	B	c	aa ₃	b/aa ₃
<i>T. crassiceps</i>				
(a) Mitocondrias totales	0.13	0.083	0.085	1.5
(b) Mit. Tegumento	0.260	0.125	0.058	4.48
(c) Mit. Tegumento	0.235±0.02	0.114±0.03	0.123±0.05	1.9
(c) Mit. parénquima	0.359±0.03	0.230±0.04	0.156±0.04	2.3
(c) Hígado de rata	0.129±0.02	0.130±0.05	0.150±0.03	0.86
(d) Hígado de rata	0.10	0.11	0.20	0.5

La cuantificación se obtuvo de los espectros diferenciales del estado oxidado- estado reducido.

- (a) Zenka, 1986
- (b) del Arenal, 1998
- (c) este trabajo
- (d) Tyler, 1992

La concentración de los citocromos muestra que los 2 tipos mitocondriales del cisticerco de *T. crassiceps*, presentan niveles que están dentro de los rangos reportados para mitocondrias aerobias, sin embargo, hay una mayor concentración de citocromo b en mitocondrias del parénquima que aumenta el cociente b/aa₃ y sugiere un metabolismo anaerobio preferentemente, este dato se contrasta con los cocientes obtenidos en mitocondrias de hígado de rata indicando un metabolismo aerobio principalmente. Es importante señalar que los niveles de citocromos de hígado de rata calculados están dentro del rango reportado para estas mitocondrias.

TESIS CON
PALA DE ORO

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se muestran las actividades específicas de SDH, FR y la concentración de los citocromos de poblaciones de mitocondrias aisladas del cisticerco de *T. crassiceps*. En las micrografías electrónicas de cortes del cisticerco de *T. crassiceps* se observa el tegumento como un tejido que indica tener una intensa actividad metabólica y al parénquima como un tejido de almacén y estructural principalmente. El primero es un sincicio limitado al exterior por una membrana que forma microvelocidades y que cubre todo el cuerpo del parásito. La dimensión de éste tejido en comparación con el del parénquima hace suponer que tiene una exigencia metabólica mayor ya que presenta abundantes mitocondrias y vacuolas. El parénquima, además de la función de sostén, es un centro de síntesis, transporte y almacenamiento de glucógeno, el 27% del peso seco del cisticerco es glucógeno (Taylor, 1966). Las micrografías muestran que las mayores concentraciones de glucógeno están en las células parenquimales y alrededor de las células musculares. Además, se observó que principalmente en este tejido las mitocondrias varían en tamaño y forma de las crestas y aunque no hay una distribución o relación aparente entre el tamaño y localización de las mismas en este tejido, (las células parenquimales presentan mitocondrias pequeñas principalmente).

En la extracción de las mitocondrias del tegumento, el uso de saponina para solubilizar la membrana que forma las microvelocidades y que permite obtener las mitocondrias puras es un método muy conveniente para aislar mitocondrias tegumentales.

La extracción de las mitocondrias del parénquima usando el método convencional muestra una fracción muy contaminada de glucógeno y vesículas, por lo que fue necesario modificar el método para purificarlas. En micrográficas de las fracciones mitocondriales purificadas por el método de gradiente discontinuo de sacarosa se observó que no había una separación efectiva ni integridad estructural, lo que sugiere que las mitocondrias del cisticerco muestran una fragilidad notable, ya que no resisten al cambio en la densidad y presión osmótica, o probablemente las condiciones del amortiguador no fueron las adecuadas para este tipo de mitocondria, sin embargo, se ha demostrado que esto mismo ocurre con mitocondrias de hígado de rata en el que además de provocarles inchamiento, el CR es alterado debido al shock osmótico.

La centrifugación diferencial, el uso de DNAasa y α amilasa permitieron una separación de poblaciones mitocondriales, el método es más convincente ya que elimina la viscosidad que confiere en ADN libre (ruptura de núcleos) y evita cambios de densidad, pero no ayuda en la purificación, ya que no es sencillo eliminar vesículas o restos celulares que presentan la misma densidad de las mitocondrias, por lo que no fue posible obtener fracciones puras, esto se ha observado también con mitocondrias de hígado de rata. Sin embargo, este método permitió obtener al menos 2 poblaciones de mitocondrias del parénquima.

Las poblaciones mitocondriales obtenidas del cisticerco mostraron capacidad respiratoria, tales valores concuerdan con los obtenidos por del Arenal y col (1998), sin embargo es baja comparada con las mitocondrias de hígado de rata.

Por otro lado se observó que en las mitocondrias aisladas del tegumento y del parénquima que presentan altas actividades específicas de SDH y FR, hasta 1.5 veces más que en las mitocondrias de hígado de rata. La actividad específica de SDH en mitocondrias del cisticerco es comparable con la actividad de las mitocondrias de la larva 2 de *A. suum*, pero no así con la actividad de FR. Esto refleja que el cisticerco de *T. crassiceps* presenta características para llevar acabo los dos tipos de metabolismo, de tal forma que puede aprovechar el oxígeno cuando este presente, por otro lado las mitocondrias del parénquima presentan actividades muy similares a las mitocondrias del músculo del adulto de *A. suum* por lo que hace suponer que el parénquima funciona metabólicamente como un tejido muscular anaerobio.

La actividad específica de la FR en las MFD y MFL disminuye a la mitad en comparación con las mitocondrias totales del parénquima sin embargo esto no sucede con la actividad de SDH. (las MFL presentan una amplia desviación estándar). Consideramos correcta las mediciones de las actividades ya que fue corroborado comparando las actividades en mitocondrias de hígado de rata calculados y reportados.

De acuerdo con la actividad total porcentual las mitocondrias del parénquima realizan un 80% de la actividad metabólica, la cual es anaerobia principalmente y el resto de la actividad se lleva acabo en las mitocondrias del tegumento con un metabolismo aerobio preferentemente. Los valores de las actividades totales porcentuales muestran que la parte más activa es el parénquima con cerca del 70% de ambas actividades, esto es el resultado de la proporción de mitocondrias que contiene.

Entre las MFD y MFL la actividad total de SDH esta repartida en ambos tipos mitocondriales, pero para la FR el 70% de la actividad enzimático la realizan las MFD. La relación FR/SDH en las MFL muestran un resultado contradictorio a lo esperado de 0.052 que supone un metabolismo aerobio preferentemente que no concuerda con la estructura mitocondrial, sin embargo, estos datos deben evaluarse nuevamente debido a que la MFL presentan muchos restos membranales, lo que modifica las actividades específicas de las enzimas de manera importante.

Los resultados de la cuantificación de los citocromos de las mitocondrias del tegumento y del parénquima muestran niveles más comparables con los de las mitocondrias de corazón de bovino que con los de hígado de rata, el valor obtenido de la relación citocromo b / citocromo oxidasa, (b/aa₃) de las mitocondrias de hígado de rata refleja un metabolismo aerobio (0.78), los valores obtenidos de las fracciones mitocondriales de *T. crassiceps* son mayores lo que indica un mayor metabolismo anaerobio resultado de la falta de citocromo oxidasa y / o una alta

concentración de citocromo b, esto comparado con las mitocondrias de hígado de rata o corazón de bovino reportadas (Tabla 3).

La concentración de citocromos es mayor en las mitocondrias del parénquima, sin embargo la relación b/aa3 refleja que hay una mayor proporción de complejo II que esta dado por un aumento en FR o SDH, si consideramos que de acuerdo a las actividades específicas hay mayor actividad de FR, la relación refleja anaerobiosis. Considerando esto las mitocondrias del parénquima son más anaerobias y las mitocondrias del tegumento son más aerobias. Los resultados nuevamente son corroborados por los valores obtenidos en mitocondrias de hígado de rata y los valores reportados.

Las características morfológicas de los diferentes tipos de mitocondrias hacen sugerir que su actividad, tamaño y la cantidad de crestas estan en relación con las necesidades del tejido de donde provienen, la localización de las mitocondrias del tegumento y las del parénquima esta en relación con la actividad específica de SDH y la cantidad de citocromos, es decir, refleja diferencias en la fisiología y bioquímica resultado de la disposición al oxígeno.

Es importante mencionar que el mayor número de estudios se ha realizado en la fase adulta de los helmintos (*A. suum*, *H. diminuta* y *S. mansoni* principalmente) y los estudios larvarios han sido menos estudiados sin embargo se han realizado algunos trabajos en estudios larvarios de algunos helmintos (Read, 1952; Rybicka, 1967 y Fioravanti, *et al.*, 1998), en los cuales se han determinado las actividades de SDH y FRD y se ha observado que se presenta una transición energética dependiendo de la etapa larvaria y el medio en que se encuentra.

Se ha mostrado que el metabolismo puede ser aerobio - anaerobio en diverso grado y que los helmintos pueden sobrevivir en algunos casos como anaerobios facultativos (y que este trabajo sea un caso similar). Es importante mencionar que esta transición metabólica, que va de aerobio-anaerobio o viceversa y que se presenta cuando un estadio de vida libre entra o sale de un hospedero o de una condición ambiental diferente, puede ser inmediata, tomar algunas horas, o tener un periodo más prolongado incluso de días.

CONCLUSIONES

*En el cisticerco de *T. crassiceps* se presenta la heterogeneidad mitocondrial morfológica y bioquímica.

*Existen por lo menos 2 poblaciones de mitocondrias identificables: las mitocondrias del tegumento y las mitocondrias del parénquima.

*En las mitocondrias del parénquima se puede identificar 2 poblaciones, que difieren en tamaño y forma de las crestas.

*Las enzimas y complejos respiratorios operan tanto en las mitocondrias tegumentales como en las del parénquima, pero con diferente actividad específica.

*En el cisticerco de *T. crassiceps* la producción de energía es derivada en gran parte del metabolismo anaerobio.

*La actividad aerobia en el cisticerco de *T. crassiceps* es escasa y esta principalmente concentrada en las mitocondrias del tegumento.

PERSPECTIVAS

1. Optimizar el método de purificación de mitocondrias del parénquima.
2. Evaluar la actividad enzimática de otras enzimas involucradas en los diferentes metabolismos.
3. Determinar la presencia y concentración de los tipos de quinona en las mitocondrias.
4. Obtener mitocondrias del estadio adulto de *T. crassiceps* y evaluar la actividad de los sistemas energéticos aerobio y anaerobio
5. Obtener mitocondrias del cisticerco de *T. solium* evaluar la presencia de los sistemas encontrados en *T. crassiceps*.

BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. y WATSON, J. D. 1994. Molecular biology of the cell. Garland Publishing. Tercera edición. New York. 559-672.

ARME, C. y PAPPAS, W. P. 1983. Biology of the Eucestoda. Vol 2. Academic Press. London; 628 pp.

ARRIGONI, O. y SINGER, T. P. 1962. Limitations of the phenazine methosulfate assay for succinic and related dehydrogenase. Nature. 193 :1256-1258.

BOVERIS, A., HERTIG, C. y TURRENS, J. 1986. Fumarate Reductase and other mitochondrial activities in *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology, 19:163-169.

BRYANT, C. 1993. Organic acid excretion by helminths. Parasitology Today, 9:58-60.

BRYANT, C. y BEHM, C. 1989. Biochemical Adaptation in parasites. Chapman and Hall, New York; pp. 25-65.

CHENG, T.C. 1986. General Parasitology. Academic Press College Division. 2da edición, New York; pp. 35-41.

del ARENAL, P., BONILLA, A., MORENO, R. y ESCAMILLA, J. 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(3):461-468.

FIORAVANTI, C. F., WALKER, D. J. y SANDHU, P. S. 1998. Metabolic transition in the development of *Hymenolepis diminuta* (cestoda). Parasitology Research, 8.:777-782.

FRANCOIS, A. L., FAVENNEC, C., CAMBORN-MICHOT, I., GUEIT, N., BIGA, F., TRON, P. B. y HEMMET, J. 1998. *Taenia crassiceps* invasive cisticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome. American Journal of Surgical Pathology, 22:488-492.

FREEMAN, R. S. 1962. Studies on biology of *Taenia carssiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). Canadian Journal of Zoology, 40:969-990.

FREEMAN, R. S., FALLIS, A. M., SHEA, M., MARBERLE, A. L. y WALTERS, J. 1973. Intraocular *Taenia carssiceps* (Cestoda). The Parasite. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 22:493-495.

FRY, M. y BEESLEY, J. 1985. Cytochemical localization of cytochrome oxidase in tissues of parasitic nematodes. Parasitology, 90:145-156.

GRAHAM, J., FORD, T., y RICKWOOD, D. 1994. The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of iodixanol. Anales of Biochemistry, 220(2):367-73.

GREEN, D. 1958. Studies in organized enzyme systems. Harvey Lect. Ser. 52, 177-227.

GREEN, D. y ODA, T. 1961. On the unit of the mitochondrial structure and function. Journal of Biochemistry, 49; 742-748

HARNISCH, O. 1933. Untersuchungen zur Kennzeichnung des Sauerstoffverbrauchs von *Triaenophorus nodulosus* (Cest.) und *Ascaris lumbricoides* (Nemat.). Z. Vergl. Physiol., 19:310-348.

HEROLD, R. C. 1965. Development and ultrastructural changes of sarcosomas during honey-bee flight muscle development. Development Biology, 12:269-286.

HOREMANS, A. M., TIELENS, A. G. y VAN DEN BERGH, S.G. 1991. The transition from an aerobic to an anaerobic energy metabolism in transforming *Schistosoma mansoni* cercarie occurs exclusively in the head. Parasitology, 102. Pt.2:259-65.

JONES, C.W. y POOLE, R. K. 1985. The nalysis of cytochromes. En Methods in Microbiology. Vol. 18. Ed. G. Gottschalk, Academic Press. London, pp: 285-328.

KITA, K. 1992. Electron transfer complex of mitochondria in *Ascaris suum*. Parasitology Today, 8, 155-159.

KITA, K., TAKAMIYA, S., FURUSHIMA, R., Ma, Y., Susuki, H., Ozawa, T., y Oya, H. 1988. Electron transfer complexes of *Ascaris suum* muscle mitochondria III. Composition

and fumarate reductase activity of complex II. Biochimica and Biophysica Acta.935:130-140

KOMUNIECKI, P. R., JOHNSON, J., KAMHAWI, M. y KOMUNIECKI, R. 1993. Mitochondrial heterogeneity in the parasitic nematode *Ascaris suum*. Experimental Parasitology, 76: 424-437.

KRÖGER, A., GEISLER, V., LEMMA, E., THEIS, F. y LENGER, R. 1992. Bacterial fumarate respiration. Archives of Microbiology, 158:311-314.

LEHNINGER, A. 1965. The mitochondrion. W. A. Benjamin, New York, 263 pp.

LEHNINGER, A. 1971. Bioenergetics, 2d ed. W. A. Benjamin, New York, 235pp.

LLOYD, G. M., Barret, J. 1986. Fasciola hepatica: carbohydrate metabolism of the adult. Experimental Parasitology, 56(1):81-8.

MARKWELL, M. A., HAAS, 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. Anales of Biochemistry, 87:206-210.

MOCZÓN, T. 1980. Oxidoreductase histochemistry in the mature stage of *Trianaophorus nodulosus* (Pallas, 1781), and some remarks on the regulation of the respiratory metabolism in the ontogeny of pseudophyllidean cestodes. Acta Parasitologica Polonica, 27 fas 39, 359-366.

MORENO-SANCHEZ, R. 1985. Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free Ca²⁺ concentrations. Journal Biological Chemistry. 260.7:4028-34.

OMURA, S., MIYADERA, H., UI, H., SHIOMI, K., YAMAGUCHI, Y., MASUMA, R., NAGAMITSU, T., TAKANO, D., SUNASUKA, T., HARDER, A., KOLBL, H., NAMIKOSHI, M., MIYOSHI, H., SAKAMOTO, K. y KITA, K. 2001. An anthelmintic compound, nafuredin, shows selective inhibition of complex I in helminth mitochondria. PROCEEDINGS OF NATURAL OF AMERICAN SOCIETY. 98:60-62.

PALADE, G. E. 1953. An electron microscope study of the mitochondrial structure. Journal Histochemistry and Cytochemistry. 1:188-211.

POOLE, R. K. 1988. Bacterial cytochrome oxidases. En Bacterial Energy Transduction. Academic Press, London 231-291 pp.

POOLE, R. K. 1983. Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. Biochimica and Biophysica Acta, 726(3):205-43.

RYBICKA, K. 1967. Embryogenesis in *Hymenolepis diminuta*. IV. Distribution of succinic dehydrogenase, reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide oxido-reductase and cytochrome oxidase. Experimental Parasitology, 3:255-62.

READ, C. P. 1952. Contributions to cestode enzymology. 1. The cytochrome system and succinic dehydrogenase in *Hymenolepis diminuta*. Experimental Parasitology, 1:353-362.

REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology, 17: 208-212.

ROOS, M. H. y TIELENS, A. G. 1994. Diferential expression of two succinate deshidrogenase subunit-B genes and a transition in energy metabolism during the development of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. Molecular and Biochemical Parasitology, 66:273-281.

SARUTA, F., KURAMOCHI, T., NAKAMURA, K., TAKAMIYA, S., YU, Y., AOKI, T., SEKIMIZU, K., KOJIMA, S. Y KITA, K. 1995. Stage-specific isoforms of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) in mitochondrias from the parasitic nematode, *Ascaris suum*. Journal Biological Chemistry, 290. 2: 928-932.

SAZ, H. J. 1981. Energy metabolism of parasitic helminths: Adaptations to parasitism. Annual Reviews of Physiology, 43:323-341.

SCHMIDT, G. D. 1986. Handbook of Tapaworm Identification. CRC Press. Florida, 675 pp.

SMITH, G. D. y PETERS, T. J. 1980. Analytical subcellular fractionation of rat liver with special reference to the localization of putative plasma membrane marker enzymes. European Journal of Biochemistry, 104:305-311.

TAKAMIYA, S., KITA, K., WANG, H., WEINSTEIN, P., HIRAIISHI, A., HIROSHI, O. y TAKASHI, A. 1993. Developmental changes in the respiratory chain of *Ascaris* mitochondria. Biochimica and Biophysica Acta, 1141:65-74.

TAKAMIYA, S., MATSUI, T., TAK, H., MURAYAMA, K., MATSUDA, M. Y AOKI, T. 1999. Free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* possess in their mitochondrias an additional rholoquinone, an essential component of the eukariotic fumarate reductase system. Archives of Biochemistry and Biophysics. 371. 2:284-289.

TAYLOR, A., McCABE, M., y LONGMUIR, I. S. 1966. Studies on the metabolism of larval tapeworms (Cyclophyllidea: *Taenia crassiceps*). II. Respiration, glycogen utilization, and lactic acid production during culture in a chemically defined medium. Esperimental Parasitology. 19. 3: 269-275.

THREADGOLD, L. T., ARME, C. y READ, C. P. 1968. Ultrastructural localization of a peroxidase in the tapeworm, *Hymelopsis diminuta*. Journal of Parasitology, 54:802-807.

THREADGOLD, L. T y DUNN, J. 1983. *Taenia crassiceps*: regional variations in ultrastructure and evidence of endocytosis in the cysticercus tegument. Experimental Parasitology. 55:121-131.

TIELENS, A. G. 1994. Energy generation in parasitic helminths. Parasitology Today, 10(9):346-352.

TIELENS, A. G., VAN HELLEMOND, J. 1998. The electron transport chain in anaerobically functioning eukariotes. Biochimica et Biophysica Acta, 1365:71-78.

TIELENS, A. G., VAN DEN HEUVELI, J. M., VAN DEN BERGH, S. G. 1984. The energy metabolism of *Fasciola hepatica* during its development in the final host. Molecular and Biochemical Parasitology, 13 (3):301-307.

TIELENS, A. G., VAN DEN PAS, F. A., VAN DEN HEUVEL, J. M. y VAN DEN BERGH, S.G. 1991. The aerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* miracidia. Molecular and Biochemical Parasitology, 46:181-184.

TIELENS, A. G., ROTE, C., VAN HELLEMOND, J. J., MARTÍN, W. 2002. Mitochondria as we don't know them. Trends Biochemistry Sciences, 27 (11):564-572.

TYLER, D. 1992. The Mitochondrion in health and disease. ATP synthesis in Mitochondria. Cap. 7 399. VCH Publishers, Inc., 353-402 pp.

VAN HELLEMOND, J. y TIELENS, G. 1994. Expression and functional properties of fumarate reductase. Biochemistry Journal, 304:321-331.

VON BRANT, TH. 1979. Biochemistry and Physiology of Endoparasites. Elsevier, Amsterdam.

VON BRANT, TH 1983. Untersuchungen über den Stoffbestand einiger Cestoden und den Stoffwechsel von *Moniezia expansa*. Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 18:562-596.

ZENKA, J. 1987. Malic enzyme, malate dehydrogenase, fumarate reductase and succinate dehydrogenase in the larvae *Taenia crassiceps* (Zeder,1800). Folia Parasitologica, 34:131-136.

ZENKA, J. y PROKOPIC, J. 1986. Contribution to the knowledge of aerobic processes in *Taenia crassiceps* larvae (Zeder,1800). Folia Parasitologica, 33:331-336.