

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
SAN LUIS POTOSI**

Facultad de Ciencias Químicas

**INVESTIGACION DE ANTIENZIMAS EN HOMOGENADO
DE CISTICERCO**

T E S I S P R O F E S I O N A L

**HECTOR HERNANDEZ
CABRERA**

**SAN LUIS POTOSI, S. L. P.
1985**

T
RC136
.7
H4
C.1



1080075633

AUTONOMA DI

ISOTOP

...

...

...

...

...

...

1982

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

Facultad de Ciencias Químicas

INVESTIGACION DE ANTIENZIMAS EN HOMOGENADO
DE CISTICERCO

T E S I S P R O F E S I O N A L

HECTOR HERNANDEZ
CABRERA

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.
1985

T
R2136
7
H4



A TI SEÑOR:

Te doy gracias
por lo bueno y
lo malo de la vida
que me hace sentir
tu infinito amor.

AGRADEZCO ATENTAMENTE:

AL PROF. Q.B.P. EDMUNDO TELLEZ-GIRON S.,
JEFE DEL LABORATORIO DE BIOQUIMICA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA U.A.S.L.P. --
POR LA ASESORIA QUE ME BRINDO PARA LA --
ELABORACION DE ESTE TRABAJO Y A LA PROFA.
Q.F.B. MARTHA CELIA RAMOS LUCIO, POR SUS
SABIOS CONSEJOS.

AGRADEZCO AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE
BIOQUIMICA POR SU COLABORACION.

A MI PADRE:

J. ISABEL HERNANDEZ SANCHEZ

POR SU ESFUERZO

POR SUS CONSEJOS

POR SU AMOR

A MI MADRE:

MA. DE JESUS CABRERA DE HERNANDEZ

POR SUS CUIDADOS

POR SU CARIÑO

POR SU TERNURA

A MIS HERMANOS:

MA. ROCIO

JUAN PABLO

MA. DE JESUS

ALMA ROSA

JOSE LUIS

QUE ESTO SEA UN ESTIMULO
PARA ALCANZAR SU META ---
PERSONAL

A MIS SOBRINOS:

CESAR ABEL

ALAN EMANUEL

A MIS ABUELOS:

MA. TOBIAS

ANASTACIO

SATURNINA

A TI CATY

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí
A la Facultad de Ciencias Químicas
A los maestros
A los compañeros y amigos

- C O N T E N I D O -

| | Pag. |
|---|------|
| Introducción. ----- | 1 |
| Objetivo. ----- | 3 |
| Antecedentes. ----- | 4 |
| Material y Métodos. ----- | 5 |
| Material biológico. | |
| Métodos de actividad enzimática. | |
| Métodos de actividad antienzimática. | |
| Métodos de caracterización del inhibidor péptico. | |
| Resultados. ----- | 14 |
| Discusión y Conclusiones. ----- | 21 |
| Resumen. ----- | 24 |
| Bibliografía. ----- | 25 |

- I N D I C E D E R E S U L T A D O S -

- T A B L A S -

| | Pag. |
|---|------|
| Investigación de Antipepsina Porcina. ----- | 14 |
| Investigación de Antitripsina Porcina. ----- | 15 |
| Investigación de Antiamilasa Salival Humana. ----- | 16 |
| Actividad Anti enzimática del Filtrado Libre de Proteínas. - | 17 |
| Actividad Anti enzimática de las Globulinas del Homogenado. | 18 |
| Determinación del Peso Molecular por Cromatografía en Columna. ----- | 19 |
| Corrimiento Electroforético. ----- | 20 |

- GRAFICAS -

| | Pag. |
|---|------|
| Determinación del Peso Molecular por Cromatografía en Columna. ----- | 19 |

- DIBUJOS -

| | Pag. |
|------------------------------------|------|
| Corrimiento Electroforético. ----- | 20 |

principal de su muerte, (Biagi, 1971). (10)

La infección en el hombre se lleva a cabo mediante el fecalismo y la autoinfección, la cual puede ser externa, debido a la falta de higiene del individuo o interna por movimientos antiperistálticos del intestino, en los pacientes con Teniasis.(2)

En el ser humano se han reportado casos que varían desde 1 a 1234 cisticercos (Villaseñor, 1942) (10), pero la importancia no estriba en el número de parásitos encontrados en el huésped sino en el lugar que se ubican, pues el daño lo causan principalmente cuando se sitúan en ojo o en sistema nervioso central (S.N.C.).

En el órgano visual el cisticercos se encuentra desprovisto de cápsula desarrollándose en el humor vítreo y en la cámara anterior del ojo. Las molestias varían desde las ocasionadas por la proyección de las sombras de la larva en la retina hasta la pérdida total del sentido visual.

Dentro del S.N.C. dependiendo de su lugar de localización, su sintomatología va desde una cefalea moderada a la muerte, pasando por alteraciones de la conducta, parestias transitorias, hidrocefaleas por obstrucción intraventricular, desequilibrio mental, meningitis encefalitis, ambliopía y epilepsia, (Bickerstoff, 1955).(4)

- O B J E T I V O -

Los estudios realizados para la Cisticercosis y su agente casual, el cisticerco, han sido encaminados principalmente a los problemas de epidemiología, serología y en menor cantidad, al área biológica del parásito. En consecuencia se considera importante conocer los aspectos fisiológicos y bioquímicos del parásito, que podrán ser base para resolver el problema que representa esta enfermedad.

Por lo anterior expresado, esta tesis se propone investigar si en un homogenado de Cysticercus cellulosae se encuentran antienzimas para la Pepsina, Tripsina porcinas y la respectiva a la Amilasa salival humana. De encontrarse el o los inhibidores enzimáticos se procederá a su caracterización.

- A N T E C E D E N T E S -

Los primeros datos que se tienen de un estudio de inhibidores enzimáticos se remonta al año de 1903, cuando Weillan descubrió que había parásitos que entre sus componentes naturales de excreción, contenían sustancias que inhibían selectivamente a las enzimas digestivas del huésped a las que llamó antienzimas. (14).

En el año de 1963, Rhodes demuestra que los Ascaris lumbricoides contenían antienzimas principalmente las respectivas a Tripsina, Quimotripsina y en menor cantidad contra Pepsina, Amilasa y Lipasa. También se han reportado que estas, no solo se encuentran en la superficie externa del parásito, sino que también en su parte interna, como son: intestino, los ovarios, el útero y el fluido perientérico. (14)

Años más tarde en 1967, Pudles separa y purifica los inhibidores de la Tripsina y Quimotripsina de éste nemátodo. (14)

Von-Brand en 1973 concluye, que hay antienzimas en todos los nemátodos y céstodos, aunque se han reportado parásitos carentes de ellas, como son el caso del Nippostrongylus brasiliensis (Symons y Fairbairn, 1963) y el Moilliformis dubius (Ruff en 1973). (14)

- M A T E R I A L Y M E T O D O S -

MATERIAL BIOLÓGICO.-

Homogenado de Cysticercus cellulosae.- Se trabajó con un homogenado de Cysticercus cellulosae, obtenidos de los cerdos parasitados, sacrificados en el Rastro Municipal de esta Capital, fué estandarizado a una concentración final de proteínas de 0.5g por cada 100 ml de solución fisiológica.

Pepsina Porcina.- Se utilizó una solución de Pepsina - porcina al 0.5%, con una actividad de 1200-2000 U/mg de proteína (Sigma P-7000).

Tripsina Porcina.- Se utilizó una solución de Tripsina porcina al 0.5% con una actividad de 980 U/mg de proteína (Sigma T-8128).

Amilasa Salival Humana.- Se utilizó Amilasa salival humana, con una actividad medida y estandarizada a 790-780 U/mg de almidón. Fué obtenida siempre del mismo donador.

Hemoglobina I.- Se utilizó hemoglobina bovina (Sigma H-2625), preparada al 2% en ác. clorhídrico al 0.06 N.(7)

Hemoglobina II.- Se usó hemoglobina bovina (Sigma H-2625), preparada al 2% con urea e hidroxido de sodio 1 N a un pH de 7.5. (7)

Almidón.- Se usó almidón (Merk) a una concentración de 75 mg de almidón y 250 mg de cloruro de sodio (Merk) por decili-

de solución.(13)

Reactivo de Folín-Ciocalteu.- Se usó el reactivo de --
Folín-Ciocalteu (Sigma) diluido 1:3. (7)

Sephadex G-100.- Se utilizó Sephadex G-100 (Farmacia,
G-100-45), equilibrado con un amortiguador de fosfatos 0.1 M a un
pH de 7.3.(11)

Hemoglobina III.- Se utilizó hemoglobina bovina (Sigma
H-2526) a una concentración de 2 mg/ml sacarosa al 10%. Su peso -
molecular (P.M.) es de 64 000. (11)

Mioglobina.- Se usó mioglobina de corazón de caballo -
Sigma M-1882) a una concentración de 2 mg/ml sacarosa al 10%. Su
P.M. de 18 800. (11)

Albumina Bovina.- Se usó albumina bovina al 22% (ORBI)
a una concentración de 2 mg/ml sacarosa al 10%. Su P.M. de 66 000
(11)

Azul Dextram.- Se utilizó azul dextram (Sigma D-5751) a
una concentración de 2 mg/ml sacarosa al 10%. El P.M. es de ----
2'000 000. (11)

METODOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.-

Determinación de la Actividad Para la Pepsina.

Método de Anson y Mirsky. (7)

Fundamento.-

La digestión de proteínas de peso molecular elevado por Pepsina en un tiempo determinado, detectándose por la reacción de Folín-Ciocalteu, que es la reducción del reactivo fenólico (sales líticas del ác. fosfomolibdotungstínico) en medio alcalino por la tirosina y triptofano de las proteínas dando así un color azul, - que es proporcional a la concentración de proteínas.

Desarrollo.-

Se puso a cada tubo de ensaye 2.5 ml de Hemoglobina I, se incubó por 5 min a 37°C. Se le agregó 0.5 ml de la solución de Pepsina a cada uno de los tubos, incubando otra vez, a la misma temperatura por igual tiempo. Después se le agregó 5 ml de ác. tricloroacético (TCA) al 4% agitar bien y filtrarlo (papel filtro Whatman 42).

Se tomó 3 ml de cada uno de los filtrados y se colocaron en igual número de matraces de 50 ml, previamente marcados. - Se les puso 20 ml de agua, 1 ml de NaOH 3.85 N y del reactivo de Folín-Ciocalteu 1 ml diluido previamente 1:3. Se reposaron 5 min y se leyeron a 460 nm (Photometer Leitz).

Determinación de la Actividad Para la Tripsina.

Método de Anson y Mirsky. (7)

Fundamento.-

La capacidad de la Tripsina en desdoblar péptidos de ba

jo P.M., para determinarlos después por la reacción de Folín----
Ciocalteu.

Desarrollo.-

Este procedimiento para determinar la actividad de la Tripsina es igual que para la Pepsina (Ver técnica). Excepto en que aquí se utilizó el sustrato de Hemoglobina II y después de añadir el TCA al 4% se dejó reposar durante 30 min antes de filtrar.

Determinación de la Actividad Para la Amilasa.

Método de Caraway Modificado. (15)

Fundamento.-

La Amilasa degrada el almidón, formando dextrinas reductoras y azúcares de bajo P.M.. En el método se compara la coloración azul que desarrolla el problema, con el que desarrolla el blanco por la adición del iodo. Como la disminución del Índice de Extinción es proporcional a la cantidad de sustrato degradado, es posible calcular la actividad amilásica.

Desarrollo.-

Se colocaron en matraces marcados blanco y problema, 2.5 ml de sustrato de almidón. Se incubaron a 37°C por 5 min, después se pipeteó exactamente 0.1 ml de cada solución (blanco y problema) en su respectivo matraz. Se mezcló bien y se puso en un baño de agua a 37°C por 7 min 30 seg exactamente.

Inmediatamente después se agregó 5 ml del reactivo de iodo 0.01 N, a los matraces incubados. Se diluyeron a 50 ml con agua destilada, se mezclaron bien por inversión y agitando.

Se leyó inmediatamente su densidad óptica a 660 nm. Se ájusto el aparato (Spectrophotometer Perkins-Elmer 35) a 0 de -- absorbancia con agua.

METODOS DE INVESTIGACION ANTIENZIMATICA (INHIBIDORES).-

Se colocaron en una caja de Petrí los cisticercos obtenidos de la carne de cerdo, que contenía una solución fisiológica, después se lavaron con cuidado de no reventarlos y se volvieron a resuspender en una solución igual. Se homogenizaron durante 15 min (Homogenizador Virtis-12525). Se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min y se estandarizó se concentración final a 0.5 g de proteínas por 100 ml de solución fisiológica; por el método Folin-Ciocalteu. Se colocaron en alicuotas de 5 ml las que fueron congeladas a -20°C y se sacaron según se utilizaron.

Se incubó el homogenado de cisticerco con las soluciones de Pepsina, Tripsina porcinas y Amilasa salival humana por separado a una temperatura de 37°C por 30 min. Se corrieron controles para las mezclas positivo (enzima y sustrato) y negativos (homogenado y sustrato; agua y sustrato). Estos controles se diluyeron previamente 1:1 con agua para compensar las cantidades en la mezcla problema.

Después de la incubación se determinó la actividad residual de cada enzima, según los métodos ya descritos, por duplicado y cada experimento se repitió 5 veces.

METODOS PARA LA CARACTERIZACION DEL INHIBIDOR PEPTICO.

Precipitación con Ac. Tricloroacetico al 10%. (7)

Se precipitaron las proteínas por separado de 10 ml de homogenado de cisticerco y de 10 ml de albumina al 0.5%, con 5 ml de TCA al 10%, se dejaron reposar 5 min y se filtraron (papel filtro Whatman 42), los filtrados fueron llamados filtrado A y filtrado B respectivamente y a los cuales se les determinó su actividad antienzimática, para demostrar (en caso de presentarla) -- por comparación, si era debido a la presencia de la antipepsina_ o por el exeso de TCA.

Precipitación con Sulfato de Amonio. (7)

A 10 ml del homogenado de cisticerco se le agregó, gota a gota mientras se agitaba 5 ml de sulfato de amonio saturado a un pH de 7.5, que tiene la propiedad de separar las globulinas precipitandolas, se agitó durante 3 horas en refrigeración. Después se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min, el precipitado se redisolvió en una solución salina isotónica a un tercio de su volumen original. Se dializó contra una solución al 0.85% de NaCl, - durante 2 días, cambiando la solución de diálisis cada 12 horas_ (mañana y noche), checando la presencia de sulfatos con cloruro de bario 0.1 N. Utilizando el dializado en vez del homogenado, - se le determinó la actividad antienzimática (Ver técnica).

Determinación del Peso Molecular por Cromatografía en Columna (11)

El Sephadex G-100 fué hidratado con buffer de fosfatos 0.1 M a pH de 7.3. Se colocó en una columna para cromatografía de 0.5 por 20 cm de acuerdo al instructivo de Pharmacia. Se puso por encima del disco de papel las muestras, con una concentración de 2 mg/ml sacarosa al 10% que fueron las siguientes: hemoglobina III, P.M. 64 000; mioglobina, P.M. 18 000; albumina bovina, P.M. 66 000; azul dextran, P.M. 2'000 000 y la muestra de globulina de P.M. desconocido.

Se recolectaron las muestras en fracciones de 0.5 ml y se diluyeron con 2.5 ml de agua, leyendose su absorción (Spectrophotometer UV-Visible; Varian AMS-80) a 660 nm para establecer el V_0 (volumen vacío) para el azul dextran, luego a 410 nm para las proteínas heme y a 280 nm para la albúmina bovina y la solución problema.

Fuó establecido el V_e (volumen de elución) para cada proteína y se graficaron en papel semilogarítmico (1 ciclo x 70 divisiones) contra el peso molecular.

Corrimiento Electroforético (6)

Se corrió en una tira de cellogel a 200-250 volts por 60 min (Thomas Electrophoresis Cabinet. Model 20). Se tiñó con el colorante de Ponceu (sal disódica de á. p. sulfobencen-azo 6 sulfobencen-azo B naftol 3,6, disulfónico) por 5 min, lavar 4 ó 5 veces o dejar reposar toda la noche en á. acético al 5%. Deshidratar con metanol concentrado por 1 min, meterla a la solu---

ción transparentizadora (metanol al 85%, con ác. acético y 1 ml-
de glicerol) por 3 min, colocarla en una laminilla de vidrio y -
ponerla en la estufa hasta que se trasparente (15 min a 60°C ---
aprox.).

- R E S U L T A D O S -

INVESTIGACION DE ANTIPEPSINA PORCINA

La Pepsina fué inhibida en un 98.61% en su actividad por -- el homogenado de *Cysticercus cellulosae*, lo cual demostró que -- hay algún componente en la solución problema (homogenado) que impide la actividad de la Pepsina.

T A B L A No. I

| | MEZCLAS | Tubo | % | | | | | \bar{x} |
|---|----------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| A | PEPSINA + AGUA | 1 | 0.380 | 0.340 | 0.368 | 0.375 | 0.330 | 0.362 |
| | | 1' | 0.400 | 0.360 | 0.368 | 0.370 | 0.350 | |
| B | PEPSINA + HOMOGENADO | 2 | 0.080 | 0.075 | 0.052 | 0.080 | 0.070 | 0.065 |
| | | 2' | 0.070 | 0.060 | 0.040 | 0.070 | 0.072 | |
| C | HOMOGENADO + AGUA | 3 | 0.072 | 0.070 | 0.045 | 0.055 | 0.070 | 0.060 |
| | | 3' | 0.070 | 0.060 | 0.055 | 0.070 | 0.060 | |
| D | AGUA | 4 | 0.025 | 0.025 | 0.030 | 0.020 | 0.030 | 0.025 |
| | | 4' | 0.025 | 0.030 | 0.025 | 0.025 | 0.030 | |

$$\begin{aligned} \% \text{ de Inhibición} &= 100 - \left[\frac{\bar{x}_b - \bar{x}_c}{\bar{x}_a} \times 100 \right] \\ &= 100 - \left[\frac{0.065 - 0.060}{0.362} \times 100 \right] \end{aligned}$$

$$\% \text{ de Inhibición} = \underline{\underline{98.61\%}}$$

INVESTIGACION DE ANTITRIPSINA PORCINA

En lo que respecta a la Tripsina Porcina, el porcentaje de inhibición fué de un 19.42%, por lo que se reporta como no significativo. Este resultado se obtuvo al investigar la acción de la antienzima correspondiente en el homogenado de cisticerco.

T A B L A No. II

| | MEZCLAS | Exp Tubo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{x} |
|---|-----------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| A | TRIPSINA + AGUA | 1 | 0.330 | 0.300 | 0.300 | 0.340 | 0.300 | 0.314 |
| | | 1' | 0.335 | 0.295 | 0.305 | 0.330 | 0.305 | |
| B | TRIPSINA + HOMOGENADO | 2 | 0.340 | 0.300 | 0.330 | 0.340 | 0.315 | 0.330 |
| | | 2' | 0.340 | 0.300 | 0.345 | 0.350 | 0.320 | |
| C | HOMOGENADO + AGUA | 3 | 0.075 | 0.080 | 0.080 | 0.085 | 0.080 | 0.077 |
| | | 3' | 0.070 | 0.085 | 0.070 | 0.075 | 0.070 | |
| D | AGUA | 4 | 0.035 | 0.045 | 0.050 | 0.055 | 0.050 | 0.049 |
| | | 4' | 0.03 | 0.052 | 0.050 | 0.050 | 0.055 | |

$$\begin{aligned} \% \text{ de Inhibición} &= 100 - \left[\frac{\bar{x}_B - \bar{x}_C}{\bar{x}_A} \times 100 \right] \\ &= 100 - \left[\frac{0.330 - 0.077}{0.314} \times 100 \right] \end{aligned}$$

$$\underline{\% \text{ de Inhibición} = 19.42\%}$$

INVESTIGACION DE ANTIAMILASA SALIVAL HUMANA

El resultado para una antienzima de la amilasa salival humana fué de 3.21% de inhibición, lo que demostró la ausencia de un bloqueador enzimático para esta enzima en el homogenado de -cisticerco.

T A B L A No. III

| | MEZCLAS | Tubo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{x} |
|---|----------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| A | AMILASA + AGUA | 1 | 0.010 | 0.025 | 0.010 | 0.020 | 0.024 | 0.017 |
| | | 1' | 0.010 | 0.025 | 0.010 | 0.025 | 0.017 | |
| B | AMILASA + HOMOGENADO | 2 | 0.025 | 0.030 | 0.020 | 0.020 | 0.018 | 0.023 |
| | | 2' | 0.025 | 0.035 | 0.020 | 0.019 | 0.020 | |
| C | HOMOGENADO + AGUA | 3 | 0.750 | 0.600 | 0.680 | 0.700 | 0.900 | 0.716 |
| | | 3' | 0.750 | 0.610 | 0.600 | 0.700 | 0.870 | |
| D | AGUA | 4 | 0.800 | 0.680 | 0.700 | 0.750 | 0.850 | 0.755 |
| | | 4' | 0.800 | 0.670 | 0.700 | 0.750 | 0.850 | |

$$\begin{aligned} \% \text{ de Inhibición} &= \frac{\bar{x}_b}{\bar{x}_c} \times 100 \\ &= \frac{0.023}{0.716} \times 100 \end{aligned}$$

$$\underline{\% \text{ de Inhibición} = 3.21\%}$$

ACTIVIDAD ANTIENZIMÁTICA DEL FILTRADO LIBRE
DE PROTEÍNAS

La actividad antienzimática del filtrado libre de proteínas obtenido con el ácido tricloroacético fué de 70.57% y el control de albúmina dió una lectura de 67.52%; al hacer la comparación entre los porcentajes de inhibición se deduce evidentemente que el bloqueo parcial de la enzima, fué producto de un exceso de TCA y no a la presencia de un inhibidor péptico en el filtrado problema.

T A B L A No. IV

| | MEZCLAS | Exp Tubo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{x} |
|---|-------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| A | PEPSINA + AGUA | 1 | 0.380 | 0.300 | 0.340 | 0.345 | 0.330 | 0.339 |
| | | 1' | 0.390 | 0.300 | 0.350 | 0.340 | 0.320 | |
| B | PEPSINA + FILT. A | 2 | 0.120 | 0.150 | 0.160 | 0.135 | 0.150 | 0.143 |
| | | 2' | 0.120 | 0.140 | 0.170 | 0.140 | 0.145 | |
| C | PEPSINA + FILT. B | 3 | 0.150 | 0.165 | 0.180 | 0.145 | 0.160 | 0.154 |
| | | 3' | 0.125 | 0.165 | 0.160 | 0.150 | 0.156 | |
| D | FILT. A + AGUA | 4 | 0.050 | 0.035 | 0.040 | 0.040 | 0.045 | 0.043 |
| | | 4' | 0.045 | 0.040 | 0.045 | 0.045 | 0.040 | |
| E | AGUA | 5 | 0.040 | 0.045 | 0.040 | 0.040 | 0.045 | 0.040 |
| | | 5' | 0.035 | 0.040 | 0.040 | 0.035 | 0.040 | |

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 - \left[\frac{\bar{x}_p - \bar{x}_B}{\bar{x}_A} \times 100 \right]$$

$$= 100 - \left[\frac{0.143 - 0.043}{0.339} \times 100 \right]$$

% de Inhibición_B = 70.57%

$$= 100 - \left[\frac{0.154 - 0.043}{0.339} \times 100 \right]$$

% de Inhibición_C = 67.25%

ACTIVIDAD ANTIENZIMATICA DE LAS GLOBULINAS DEL HOMOGENADO

Las globulinas separadas con sulfato de amonio del homogenado de cisticerco, inhibieron un 98.57% la actividad de la pepsina porcina y por lo que se concluye, que la anti enzima se encuentra dentro del grupo de las globulinas.

T A B L A No. V

| | MEZCLAS | Exp Tubo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{x} |
|---|----------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| A | PEPSINA + AGUA | 1 | 0.390 | 0.330 | 0.350 | 0.360 | 0.345 | 0.351 |
| | | 1' | 0.380 | 0.320 | 0.345 | 0.350 | 0.340 | |
| B | PEPSINA + GLOBULINAS | 2 | 0.080 | 0.085 | 0.075 | 0.085 | 0.070 | 0.080 |
| | | 2' | 0.080 | 0.080 | 0.080 | 0.090 | 0.075 | |
| C | GLOBULINAS + AGUA | 3 | 0.070 | 0.075 | 0.075 | 0.080 | 0.075 | 0.075 |
| | | 3' | 0.070 | 0.080 | 0.085 | 0.070 | 0.075 | |
| D | AGUA | 4 | 0.055 | 0.050 | 0.055 | 0.040 | 0.045 | 0.045 |
| | | 4' | 0.050 | 0.040 | 0.055 | 0.045 | 0.055 | |

$$\begin{aligned} \% \text{ de Inhibición} &= 100 - \left[\frac{x_B - x_C}{\bar{x}_A} \times 100 \right] \\ &= 100 - \left[\frac{0.080 - 0.075}{0.351} \times 100 \right] \end{aligned}$$

$$\underline{\% \text{ de Inhibición} = 98.57\%}$$

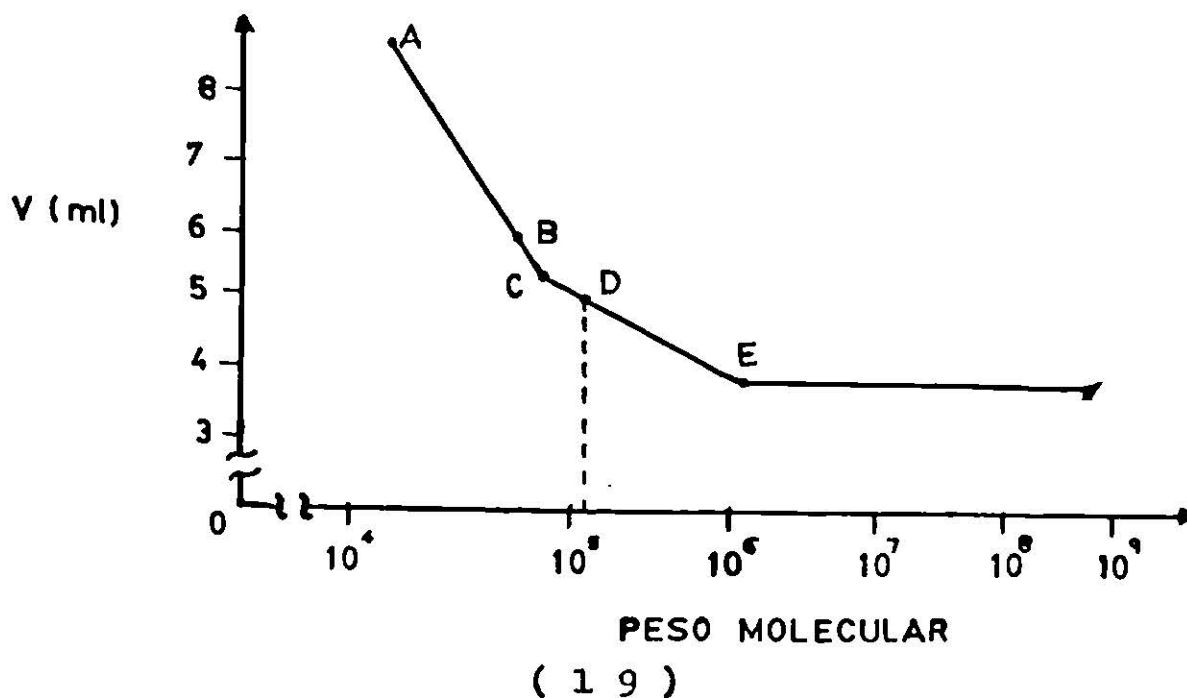
DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

El cálculo del peso molecular por cromatografía en columna para la globulina inhibidora es de aproximadamente 145 000.

T A B L A No. VI

| PTO | SUBSTANCIA | PESO MOLECULAR | FRACCION | V_0 (ml) | V_m (ml) |
|-----|--------------|----------------|----------|------------|------------|
| A | Minglobina | 18 000 | 17 | — | 8.5 |
| B | Hemoglobina | 64 000 | 12 | — | 6.0 |
| C | Album. Bov. | 66 000 | 11 | — | 5.5 |
| D | Problema | (?) | 10 | — | 5.0 |
| E | Azul Dextran | 2 000 000 | 8 | 4.0 | — |

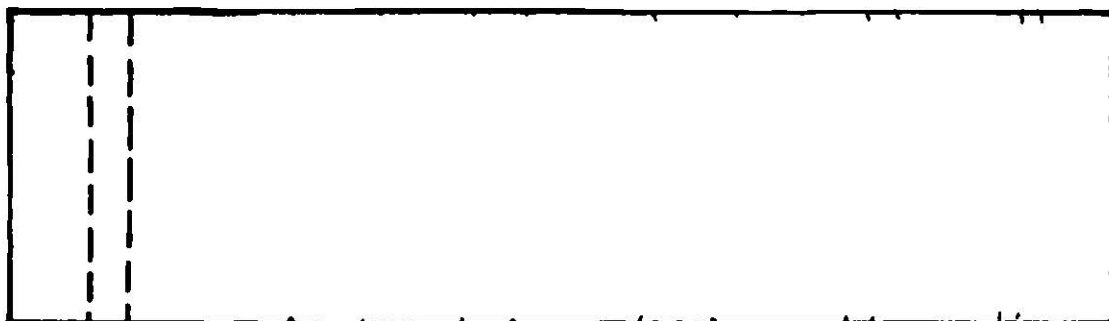
G R A F I C A No. I



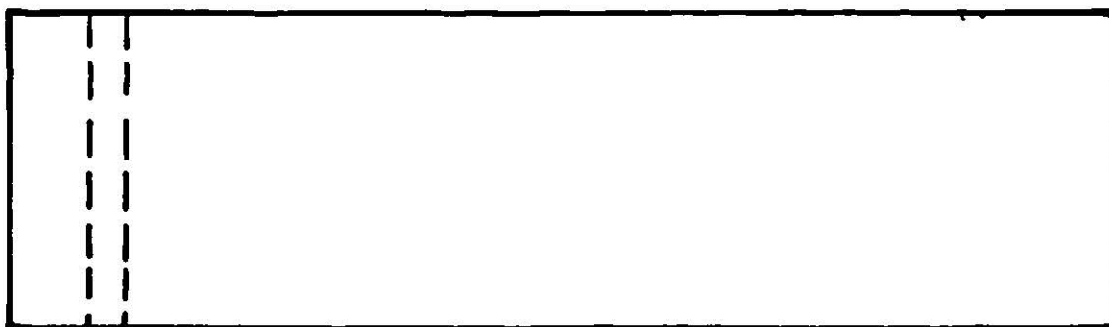
(1 9)

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO

El corrimiento electroforético de la globulina problema --
reveló una franja en la fracción de las Gamma-globulinas.



Muestra Albumina Alfa₁ Alfa₂ Beta Gamma
SUERO CONTROL



Muestra Gamma
GLOBULINA PROBLEMA

como lo habían propuesto los anteriores investigadores, sino que constaba de cuatro fracciones, que inhibían un 44% de la actividad total de la enzima respectiva, por lo que sería interesante investigar si la anti enzima del C. cellulosa se compone de --- fracciones, de ser así cuantas son y su cantidad de aminoácidos ya que en la Antipepsina del A. lumbricoides, la suma de las cuatro fracciones da un total de un total de 739 a. a.. (1)

Pero lo más importante y de lo cual no se encontró reporte alguno, es del mecanismo que utiliza este inhibidor para impedir la acción de la enzima.

Las anti enzimas que se han descubierto en los diferentes parásitos y microorganismos, se han encontrado en las paredes externas de sus diferentes órganos u organelas y en sus fluidos -- naturales. Y se puede deducir que las anti enzimas son semejantes de un parásito a otro, así como lo son los anticuerpos del hombre a los de los animales superiores, y por lo que se plantea la hipótesis de que sí al igual que éstos tienen los anticuerpos -- desde su expresión genotípica, los parásitos consecuentemente -- sus anti enzimas.

La anti enzima se localizó en el fluido tisular del C. cellulosa por lo que se puede deducir que se encuentra en constante excreción y fija en la pared exterior de la cápsula, es por eso que se podría plantear:

10.- Una posible explicación al porqué el cisticerco no se daña por los ataques enzimáticos del huésped mientras el parásito se encuentra vivo, es que la cápsula del cisticerco se encuentra formada por polipéptidos de peso molecular elevado, de tal manera que las únicas enzimas capaces de digerirla son las pro--

téolíticas (Pepsina) y no otro tipo de enzimas (Amilasa salival) por esto la función defensiva del parásito ha sido crear antienzimas protéolíticas contra el huésped, fijando en su pared externa para impedir cualquier acción lítica en la membrana capsular.

2o.- Una ventaja es una posible aplicación de este hallazgo, para ayuda diagnóstica mediante la Gammagrafía, que sería específica y ayudaría a la localización exacta del parásito dentro del huésped, lo que traería como consecuencia, disminuir el costo de dicha localización, que en la actualidad se lleva mediante la Tomografía Axial Computarizada, que tiene como desventaja no ser - específica.

- R E S U M E N -

Se investigaron en el presente trabajo las antienzimas para la Pepsina, Tripsina porcinas y la Amilasa salival humana - en un homogenado de *Cysticercus cellulosae*, encontrandose sólo - el inhibidor respectivo a la Pepsina porcina, el cual es específico y se encuentra localizado en el líquido tisular del parásito.

Su origen químico es protéico, pertenece a las globulinas, su peso molecular aproximado es de 145 000 y electroforéticamente corre dentro de la fracción de las Gamma-globulinas. Actúa en medio neutro y ácido, es inhibido por el ácido tricloacético.

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

- 1.- Abu-Erreish, E.M. y Peanasky, R.J. Pepsin Inhibitors -- From Ascaris lumbricoides. J. Biol. Chem. 249(5). March, 10. pp. 1558-1565; 1974.
- 2.- Biagi, F. Enfermedades Parasitarias. Ed. Prensa Medica Mexicana, S.A., 2a. Edición., pp. 203-211, 1982.
- 3.- Collier, H.B. (1941), Can. J. Res. 19B, pp. 91-98.
- 4.- Craig-Faust. Parasitología Clínica. Ed. Salvat. pp. 531, 532.
- 5.- Escamilla, L. El Cerdo, Su Cría y Explotación. Ed. C.E. C.S.A. pp. 273 y 274.
- 6.- Gelman Instrumen Company. Rapid Electrophoresis. Manual No. 70176-B. March, 1966.
- 7.- Hank, Bernard, Summerson. Physiological Chemistry. Ed. - Mc.Griw-Hill. pp. 197, 389, 390.
- 8.- Hernández, S. Investigación de la Cisticercosis Porcina en el Estado de San Luis Potosí, México. Bol. Of. San. Pan. 61, (5), 1966.
- 9.- Lapage, G. Parasitología Veterinaria. Ed. C.E.C.S.A. -- 1971. pp. 290-294.
- 10.- Mateo, Biagi, Marquez Kretschmer y Schnaas. Mesas Re--

dondas Academicas. Gac. Med. Mex. 103:3. Marzo, 1972. pp. 225--249.

11.- Rendina, G. Experimental Methods in Moder Biochemis--
try. Ed. W.B. sunders Company. pp. 47, 90, 156, 178 y 179. 1971

12.- Rola, F.H. y Pudles, J. Arch, Biochem, Biophys, 113._
pp. 132-142.

13.- Todd-Stanford. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio.
Ed. Salvat. pp. 580 y 899.

14.- Von-Brand, T. Biochemistry and Physiology of Endopa--
rastes. Ed. Elservier/North Holland. pp.55 y 56.

15.- Wendall, T. Caraway. Ph. D. J. C. Path 32-97 (1959)._
Sigma de México, S.A.

March



bu