



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**IDENTIFICACIÓN DE UNA MALATO  
DESHIDROGENASA DE CISTICERCOS DE  
*Taenia solium*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**JOSÉ RODRIGO ROMERO DÍAZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO  
2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**Director General**  
**Dirección General de Administración Escolar**  
**Presente**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Identificación de una malato deshidrogenasa de cisticercos de Taenia solium**

realizado por **Romero Díaz José Rodrigo** con número de cuenta **0-9531662-6** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Guillermo Salgado Maldonado

Propietario M. en C. Gabriela Nava Balderas

Propietario Dr. Agustín Plancarte Crespo

Tutor

Suplente M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán

Suplente M. en C. Lilian Gabriela Valencia Turcotte

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 08 de febrero de 2011

EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/CZS/cigs

## **DEDICATORIAS**

**A mis padres Antonia Catalina y Pascual José por la vida, su cariño, ayuda y comprensión.**

**A mis hermanos, Fernando y Marco Antonio, por su compañía, ayuda y sinceridad.**

**A mis abuelitos, Elena, José, Eladio, Catalina, Margarito y Tere, por sus enseñanzas y su cariño incondicional.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Agustín Plancarte Crespo por su ayuda y asesoría, pero sobre todo por la confianza que me otorgó para realizar esta Tesis.**

**A la M. en C. Gabriela Nava Balderas, por el tiempo, asesoría, consejos y amistad, además de los ánimos que me brindó durante la realización de este trabajo.**

**A mi familia, a toda ella, abuelitos, tíos, primos y sobrinos, por todo el apoyo que me han brindado y por todos los momentos que hemos pasado juntos.**

**A mis amigos, a todos y cada uno de ellos, por alentarme a mejorar y por que su compañía ha hecho mucho más agradable el tiempo que he estado aquí.**

**A la UNAM por las oportunidades de desarrollo que me ha ofrecido.**

**Trabajo financiado por PAPIIT (IN200510-3).**

## ABREVIATURAS

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Difosfato de adenosina
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
CoA	Coenzima A
EDTA	Etilen diamina tetra-acético de sodio
FAD	Dinucleótido de flavina-adenina (oxidado)
FADH <sub>2</sub>	Dinucleótido de flavina-adenina (reducido)
FRD	Fumarato reductasa
g	Gravedad (es)
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
I <sub>50</sub>	Concentración de inhibidor en la que la actividad residual disminuye un 50%
Da	Daltons
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
LDH	Lactato deshidrogenasa
MDH	Malato deshidrogenasa
MDHc	Malato deshidrogenasa citosólica
MDHm	Malato deshidrogenasa mitocondrial
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (oxidado)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (reducido)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidado)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)
NC	Neurocisticercosis
PBS	Amortiguador de fosfatos
PC	Piruvato carboxilasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinas
pH	Potencial de Hidrógeno
Pi	Fosfato inorgánico
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
SNC	Sistema nervioso central
U	Unidades enzimáticas
V <sub>o</sub>	Velocidad inicial
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima

## INDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Historia.....	2
1.2. Clasificación taxonómica de <i>Taenia solium</i> .....	3
1.3. Ciclo de vida y morfología.....	3
1.4. Teniosis y Cisticercosis.....	8
1.5. Metabolismo.....	11
1.6. Proteínas: enzimas.....	14
1.7. Malato deshidrogenasa (MDH).....	15
1.8. Metabolismo y generación de energía en parásitos.....	19
1.9. Gluconeogénesis.....	23
1.10. Mitocondria.....	25
2. Justificación.....	27
2.1. Objetivo.....	27
2.2. Objetivos particulares.....	27
3. Materiales y métodos.....	28
3.1. Obtención de cisticercos.....	28
3.2. Purificación de proteínas mitocondriales de cisticercos de <i>Taenia solium</i> .....	29
3.2.1. Homogenización de cisticercos.....	29
3.2.2. Obtención de la fracción mitocondrial.....	29
3.2.3. Fraccionamiento y solubilización de las proteínas de las membranas mitocondriales.....	31
3.3. Cromatografía y obtención de la muestra de ensayo (fracción MDHm).....	32
3.3.1. Preparación de la resina QAE-Sefarosa y de la columna cromatográfica.....	32
3.3.2. Cromatografía del sobrenadante Sn4.....	33
3.3.3. Electroforesis en geles de acrilamida y tinciones.....	33

3.4. Determinación de la actividad enzimática de la malato deshidrogenasa mitocondrial (MDHm).....	35
3.5. Cálculo de la actividad específica.....	36
3.6. Determinación de la actividad catalítica de la MDHm en función de la temperatura.....	37
3.7. Determinación del pH óptimo de reacción.....	37
3.8. Determinación de la estabilidad de la actividad catalítica de la MDHm en función del pH.....	38
3.9. Determinación de las constantes catalíticas de la MDHm.....	39
3.10. Inhibición de la actividad catalítica de la MDHm.....	40
3.11. Tipo de inhibición del piruvato de sodio sobre la MDHm y constantes inhibitorias (K <sub>i</sub> ).....	41
3.12. Análisis de péptidos.....	43
4. Resultados.....	44
4.1. Purificación de la fracción mitocondrial.....	44
4.2. Cromatografías de la fracción soluble de la mitocondria (Sn <sup>4+</sup> ) en QAE- Sefarosa.....	46
4.3. Análisis en geles de acrilamida (SDS-PAGE).....	50
4.4. Efecto de la temperatura en la actividad catalítica de la MDHm.....	51
4.5. pH óptimo de reacción para la MDHm.....	52
4.6. Efecto del pH en la estabilidad catalítica de la MDHm.....	53
4.7. Constantes catalíticas de la MDHm.....	54
4.8. Estudios de inhibición (I <sub>50</sub> , Tipo de inhibición y K <sub>i</sub> ).....	62
5. Discusión.....	68
6. Conclusiones.....	75
7. Bibliografía.....	76



## RESUMEN.

Se demostró la actividad de la enzima malato deshidrogenasa mitocondrial (EC 1.1.1.37), L-(+) malato:NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa (MDHm) en cisticercos de *Taenia solium*, un cestodo parásito del hombre y del cerdo de importancia médica y económica en países subdesarrollados. Dentro de la mitocondria, la MDHm oxida tanto al malato como reduce al oxaloacetato en presencia de NAD<sup>+</sup>/NADH+H respectivamente. Esta enzima forma parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) y está involucrada en el transporte de electrones a través de la lanzadera malato-aspartato. La MDHm se obtuvo de cisticercos alojados en los músculos de cerdos, se solubilizó y purificó parcialmente a través de centrifugación diferencial, sonicado de mitocondrias y ultracentrifugación. El sobrenadante obtenido de esta forma se cromatografió en una columna de aminoetil quaternaria QAE-Sefarosa.

La MDHm tiene una actividad específica de 567 U mg<sup>-1</sup>, un pI= 8.69 y un pH óptimo para reducir al oxaloacetato de 7 y es estable entre pH 5 - 6.5. Esta enzima fue activa en el rango de temperatura de 5 a 45°C en la reducción del oxaloacetato. Los valores de las Km<sub>s</sub> aparentes para malato, oxaloacetato, NAD<sup>+</sup> y NADH fueron de 0.309, 0.034, 0.092 y 0.01 mM respectivamente. En el mismo orden, sus Vmax aparentes resultaron ser 153, 657, 160, 518 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> lo cual sugiere que se favorece la reducción del oxaloacetato sobre la oxidación del malato. La MDHm fue inhibida por arsenito I<sub>50</sub> 52 y 340 mM y piruvato I<sub>50</sub> 114 y 156 mM en la reducción del oxaloacetato y oxidación del malato respectivamente. El enriquecido de mitocondrias presentó una actividad específica para la MDHm de 25 U mg<sup>-1</sup>. Al fraccionar este extracto por sonicación o solubilizar con Tritón X-100 la actividad enzimática aumentó 18 y 24 veces respectivamente. Los péptidos VVIIPAGVPR, LFGVTTLDIR, IQNAGTEVVNAK, FANSLHAK fueron revelados para la MDHm por espectroscopia de masas y coincidieron en el orden de 96-105, 167-177, 231-242 y 260-269 para la secuencia de aminoácidos reportada para la MDHm de *Echinococcus granulosus*.

La información que generó este estudio podría ser útil para entender la importancia de esta enzima en la producción de energía del parásito y establecer diferencias con la de sus huéspedes con fines profilácticos.

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1. Historia

Probablemente la relación entre humanos y *Taenia solium* se haya iniciado en la época en la que el hombre dejó de ser un nómada dedicándose principalmente al cultivo y a la domesticación de animales, entre ellos el cerdo. Sin embargo, los primeros reportes que se tienen sobre el conocimiento de los cestodos en las personas datan de las culturas griega y egipcia. No obstante, que en esta última se tratara de *Taenia saginata* y no de *T. solium* debido a que los egipcios no consumían carne de cerdo (1). Un ejemplo de estos documentos es el papiro de Eber de alrededor del año 2000 A.C. (2). Estos organismos recibieron nombres muy distintos dependiendo del lugar y la cultura en la que fueron descritos, así los griegos Hipócrates, Aristóteles y Teofrasto los llamaron gusanos planos, los romanos Celsus, Plinio el Viejo y Galeno los denominaron “*lumbricus latus*” (gusano ancho) y al principio de la era cristiana autores árabes como Serapio, que consideraban a cada proglótido un gusano diferente los llamaron cucurbitines (1). Fue Tyson en el año de 1683 quien descubrió y describió la cabeza de *T. solium* terminando con un período de más de 2000 años en los que estas eran confundidas con *T. saginata* y *Diphyllobotrium latum* (3).

En el año de 1853 Van Beneden demostró el desarrollo de los cisticercos en cerdos cuando después de haber alimentado a un cerdo con huevos de *T. solium*, encontró durante la necropsia numerosos cisticercos en los músculos del mismo (4).

Pero fue Kuchenmeister quien, en el año de 1855 señaló que las tenias se desarrollan a partir de los cisticercos, además en el año de 1856 comprueba y establece el ciclo biológico del parásito. Para lograr esto, alimentó con cisticercos extraídos de carne de cerdo a algunos convictos condenados a muerte, posteriormente durante la autopsia a los mismos descubrió en sus intestinos las formas adultas o tenias del parásito (5, 6).

En 1933 Yoshino describió con gran detalle morfológico el desarrollo de los cisticercos en cerdos. Inicialmente se auto-infectó ingiriendo cisticercos para tener suficientes proglótidos y dárselos a comer a diversos cerdos. Posteriormente, fue sacrificando a los puercos a diferentes tiempos y estudiando histológicamente el

crecimiento de los parásitos en los tejidos de su huésped. De esta forma completó el transcurso de las formas oncosferales hasta las de cisticercos de 190 días de crecimiento. Esto lo realizo durante el curso de su propia teniosis, que duró 2 años, posteriormente informo que durante este tiempo expulsaba de 1 a 5 proglótidos diariamente (7, 8).

## 1.2. Clasificación taxonómica de *T. solium*

Subreino:	<i>Metazoarios</i>
Phylum:	<i>Plathelminthos</i>
Clase:	<i>Cestoidea</i>
Subclase:	<i>Cestoda</i>
Orden:	<i>Ciclophylidea</i>
Familia:	<i>Taeniidae</i>
Género:	<i>Taenia</i>
Especie:	<i>Taenia solium</i> (9)

## 1.3. Ciclo de vida y morfología

*Taenia solium* es un gusano plano, parásito obligado, monoico, sin aparato digestivo ni circulatorio. Es un cestodo con un ciclo de vida en dos etapas, cada una con un huésped diferente, solo pasando por los dos huéspedes y una etapa de vida libre puede completar su ciclo de vida. Los huéspedes de este parásito son el hombre, que alberga la fase adulta (solitaria, tenia) y el cerdo, que es el huésped de la forma larvaria (metacestodo, cisticerco). Sin embargo, también en los tejidos del hombre se pueden desarrollar los cisticercos sin ninguna justificación biológica al no tener la posibilidad estos cisticercos de continuar a la etapa de adulto.

Es exclusivamente en el intestino delgado (yeyuno) de los humanos, donde este parásito se establece en su forma adulta (solitaria), la mayoría de las veces aunque no es una regla, solo se encuentra un gusano en cada huésped, de ahí el nombre común de

solitaria. En su forma larvaria se establece principalmente en el músculo de los cerdos, aunque también se ha encontrado que se puede desarrollar en varios mamíferos incluyendo al ser humano (10,11, 12 y 13).

El proceso de infección de la forma adulta en los humanos comienza, cuando una persona ingiere carne infectada con cisticercos, entonces el cisticerco ingerido es activado por las enzimas digestivas y el jugo biliar, provocando la evaginación del escólex. Este, está constituido por cuatro ventosas y un rostelo que presenta una doble corona de ganchos, el escólex se adhiere a la pared del intestino con las ventosas y la corona de ganchos empezando el desarrollo de la fase adulta.

La forma adulta de la *T. solium* está constituida por un escólex o cabeza seguida del cuello, a partir del cual se producen los proglótidos o segmentos (14). El escólex tiene el tamaño de una cabeza de alfiler y el resto del gusano presenta la apariencia de un listón o de un tallarín (15). Las ventosas y el rostelo son estructuras de fijación que permiten al gusano adherirse a la pared del intestino y además absorber los nutrientes que necesita.

La forma adulta de *T. solium* mide entre 1.5 y 5 m de longitud; el escólex posee cuatro ventosas y un rostelo coronado por dos hileras de ganchos cuyo número puede variar entre 22 y 32, y su tamaño entre 159 y 173  $\mu\text{m}$  (16). Sin embargo, también se ha descrito que la doble corona de ganchos está compuesta por 11 a 14 ganchos largos (0.13-0.16 mm) en su corona interna, y que la corona externa tiene igual número de ganchos pero más pequeños (0.1-0.12 mm) (17).

Al proceso por el cual la tenia crece se le conoce como estrobilación y al conjunto de proglótidos se le conoce como estróbilo. Es a partir de la región distal del cuello donde se empieza la formación de los proglótidos, estos son segmentos independientes pero unidos entre sí. Los proglótidos más alejados al escólex son los proglótidos grávidos, mientras que los que se encuentran cerca del escólex son los inmaduros (todavía no tienen desarrollados sus órganos sexuales), los de en medio son los maduros, los cuales ya tienen completamente desarrollados los órganos sexuales. Los proglótidos inmaduros son de tamaño variable, mientras que los proglótidos maduros incluyendo los grávidos generalmente miden de 7 a 12 mm de largo por 5 a 6 mm de ancho, cada proglótido maduro puede considerarse como una unidad productora independiente, puesto que posee órganos genitales masculinos y femeninos (16). Los proglótidos terminales grávidos se

llegan a observar aproximadamente en un tiempo de 3 a 4 meses posterior a la implantación de la tenia (15, 18).

Como se dijo anteriormente, la solitaria es un organismo monoico que puede autofecundarse, cada proglótido puede contener alrededor de 50,000 huevos y un humano teniásico puede liberar de cuatro a cinco proglótidos por día con el excremento (16). Los huevos son esféricos midiendo de 20 a 40  $\mu\text{m}$  y poseen varias envolturas, la más externa es el vitelo o cápsula, constituido por células que forman un sincicio, no obstante, no es muy común encontrar huevos en la materia fecal que todavía estén cubiertos por el vitelo. Le sigue el embrioforo, que es una estructura relativamente rígida que protege al embrión mientras el huevo está en el ambiente exterior (15). Este está formado por pequeños bloques proteicos unidos por un material cementante, el embrioforo es producido por una envoltura celular más profunda llamada célula embrioforal. La última envoltura, es decir la envoltura más interna es la membrana oncosferal que rodea al embrión hexacanto; la cual es impermeable a las condiciones ambientales externas, pero en contacto con la pancreatina se vuelve permeable permitiendo que el embrión expuesto se active (19).

Los cerdos adquieren la cisticercosis al ingerir materia fecal humana, contaminada con huevos de *T. solium* (12). Los huevos que pasan por el aparato digestivo del cerdo se activan con las enzimas proteolíticas y las sales biliares de este, permitiendo que el embrión hexacanto u oncosfera se active y que una vez que lleguen al intestino, atraviesen la pared intestinal del huésped para posteriormente distribuirse a través de los capilares sanguíneos o linfáticos. Se requieren de por lo menos 10 semanas posteriores a la ingesta de los huevos para que estos se conviertan en cisticercos en los tejidos del huésped intermediario y/o humano (16).

La forma larvaria de la *T. solium* o cisticerco está constituida por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido (de 0.5 a 2 cm de diámetro mayor), con un pequeño escólex invaginado (20). La membrana que separa al metacestodo del huésped es un tegumento citoplásmico y sincicial continuo en toda la parte externa de la pared vesicular. En ella se presentan prolongaciones digitiformes llamadas microtricas o microvilli que son las que permiten la absorción de diversas moléculas como los nutrientes (21). Debido a que los cestodos carecen de tracto digestivo, estos obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos

a través de la superficie tegumental ayudándose para ello de las proyecciones digitiformes designadas como microtricas (16).

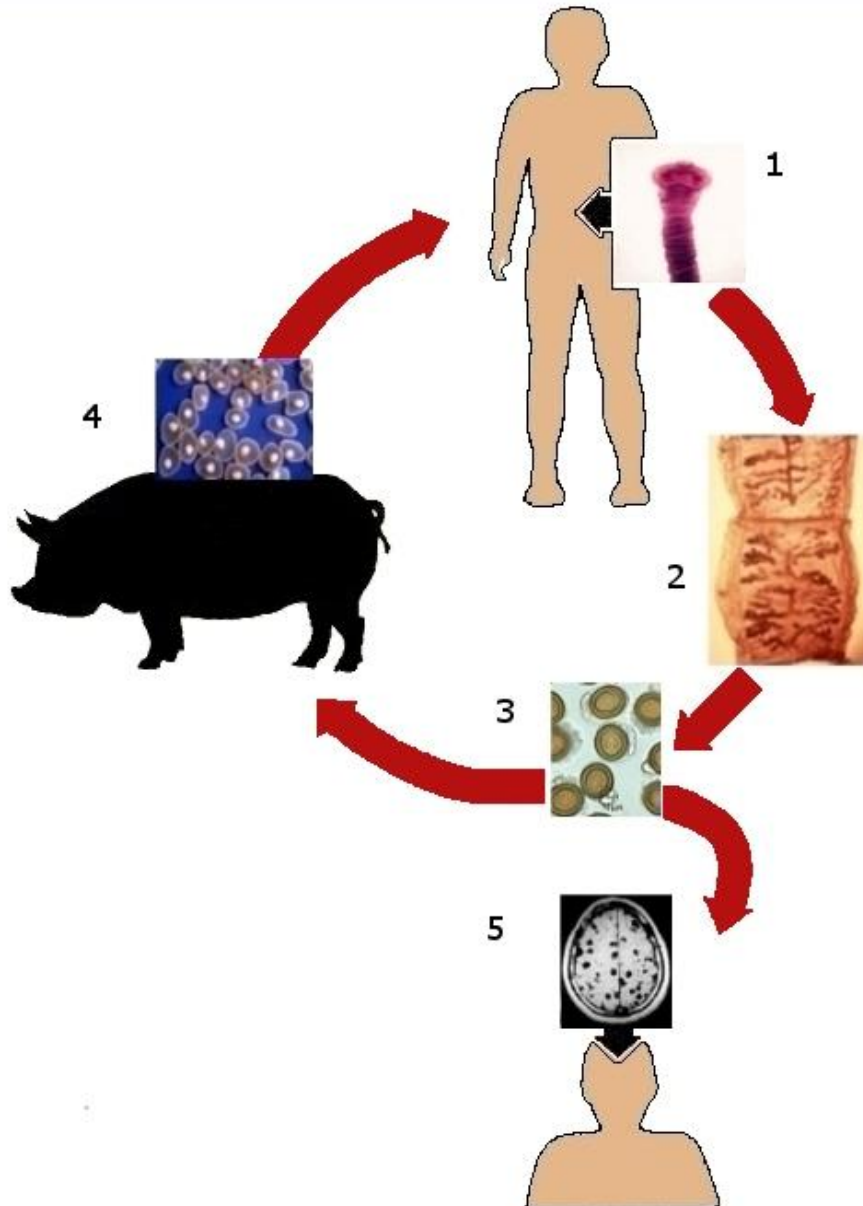
Los metacestodos de *T. solium* por su aspecto macroscópico se distinguen en: vesiculares, coloidales y caseosos o calcificados (22).

- Vesiculares. Infectivos, tamaño de 0.4 a 0.6 X 0.8 1.18 cm. Se separan fácilmente del tejido muscular y en su interior se distingue bien el líquido transparente y un punto blanco que es el escólex armado.
- Coloidales. Tiene una cápsula más gruesa y un líquido más espeso y turbio. Están más adheridos al tejido del huésped y de allí son más difíciles de separar.
- Caseosos. Ya no contiene líquido en su interior y al corte aparece una masa caseosa que puede contener ganchos y, de acuerdo con el tiempo transcurrido, sales de calcio, aunque el proceso de calcificación en el cerdo es menos intenso que en los seres humanos (23).

En el cerdo los metacestodos de *T. solium* se alojan principalmente en músculo. Los músculos por los que tienen más predilección son de manera decreciente: maseteros, pterigoideos, tríceps, lengua, espaldilla, corazón, pierna, lomo, falda e intercostales (24).

Es a través de los músculos de los cerdos que este parásito encuentra a su huésped definitivo, el hombre que se infecta al ingerir carne de cerdo contaminada con cisticercos, y que no ha sido tratada adecuadamente para el consumo humano. De esta manera se completa el ciclo natural de *T. solium*, pues los cisticercos ingeridos por las personas en la carne del cerdo se transforman en la tenia (solitaria) dentro del intestino de los seres humanos.

El ciclo natural de vida de *T. solium*, así como la forma en que esta provoca la cisticercosis y neurocisticercosis (NC) en el ser humano que se describirán más detalladamente en el subtema de teniosis y cisticercosis se pueden ver de forma resumida en la figura 1, tomada y modificada de Willms K *et al.* 2006 (16).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*. El ser humano es el huésped definitivo, mientras que el cerdo es su huésped intermediario. La teniosis se produce cuando el parásito en estado adulto habita el intestino humano (1). Los proglótidos (2) producen miles de huevos (3) que son expulsados con la materia fecal del portador. El cerdo consume la materia fecal que contiene los proglótidos con los huevos, provocando la cisticercosis porcina (4). El hombre puede ser el huésped accidental de la forma larvaria al adquirir la cisticercosis (5), esto es principalmente por la falta de higiene y la convivencia con un portador del parásito adulto. El ciclo se cierra cuando el hombre ingiere carne cruda o mal cocida de los cerdos parasitados, de esta manera los cisticercos se fijan a las paredes del intestino donde maduran hasta convertirse en adultos (tomada y modificada de Willms *et al.*, 2006).**

#### 1.4. Teniosis y cisticercosis

*Taenia solium* ocasiona la enfermedad denominada teniosis cuando el parásito adulto se aloja en el intestino del ser humano. La teniosis suele ser generalmente benigna y prácticamente asintomática, presentando solo escasos síntomas como constipación, diarrea, falta de apetito y pueden darse leves dolores estomacales (25). Es debido a esto que el portador, desconociendo su enfermedad se convierte en un grave foco de infección ya que un teniásico puede expulsar en la materia fecal miles de huevos.

Los estudios relacionados con la frecuencia de la teniosis en México son escasos, algunos autores indican valores que oscilan entre 0.5 y 1.5% (26). Estos estudios se basan generalmente en la detección de huevos en materia fecal (27), aunque también se utilizan análisis de coproantígenos de tenia (28); sin embargo, no puede confirmarse que estos datos se deban exclusivamente a *T. solium*, ya que los huevos son idénticos a los de *T. saginata* y los antígenos presentan reacción cruzada entre ambas especies (15).

Otros autores indican que para la República Mexicana, las publicaciones científicas informan frecuencias de teniosis que varían entre 0.2 y 3.4 %, mientras que las estadísticas oficiales indican que de 1986 a 1990 se notificaron 13,000 casos anuales, cifra que se redujo a 8,000 casos anuales de *Taenia sp.* a partir de 1991(29).

Varios estudios han demostrado que el portador de *T. solium* intestinal en el entorno familiar o comunitario es el principal factor de riesgo para adquirir cisticercosis o NC (15, 30-34).

La cisticercosis humana puede ser una enfermedad severa, incapacitante y en ocasiones fatal (25), lo anterior depende principalmente de la ubicación y el número de parásitos en el sistema nervioso central, así como de la respuesta inmune del individuo. El ser humano no es el huésped natural de los cisticercos.

El hombre desarrolla la cisticercosis, cuando las personas por falta de higiene o por accidente llegan a ingerir huevos de tenia, lo que provoca que se desarrollen los cisticercos o metacestodos en las persona. Al ingerir los huevos estos eclosionan en el intestino liberando a las oncosferas que penetran en la mucosa intestinal desde donde, a través del sistema sanguíneo o linfático se distribuyen a los distintos lugares donde se desarrollan. En



los humanos los cisticercos se alojan principalmente en músculo esquelético, sistema nervioso, ojos, tejido graso subcutáneo y corazón (35).

Uno de los grandes peligros de esta enfermedad en los humanos es la NC, que es el resultado de que los cisticercos se alojen en el sistema nervioso central (SNC). Las manifestaciones clínicas de la NC dependerán del número de parásitos y de sus localizaciones, así como de la extensión y severidad de la respuesta inflamatoria del huésped (35). Sin embargo otros autores reportan que la NC también puede ser asintomática (18) o presentar una gran variedad de signos y síntomas, los cuales dependen de diversos factores, tanto del individuo (genéticos, respuesta inflamatoria) como del parásito (número, localización estadio y tipo) (36).

Entre los síntomas más comunes de la NC se encuentran las crisis convulsivas en un 70% de los casos; la epilepsia de aparición tardía y en el 23% de los casos existe hipertensión endocraneal, además de reportarse cefaleas, trastorno mental y demencia (15). No existen diferencias en cuanto al sexo y el grupo que aparece como el más afectado por esta parasitosis es el que va de los 15 a los 44 años (29).

En el SNC los cisticercos se pueden alojar en el espacio subaracnoideo, en los ventrículos cerebrales y en el parénquima. De estos sitios los más frecuentes en donde se localizan los cisticercos son:

- Distribución parenquimatosa

Esta localización es de mejor pronóstico que las otras por la involución más rápida de los parásitos y por las características de la reacción inflamatoria que permanece localizada y se resuelve rápidamente en caso de quistes poco numerosos.

- Líquido cefalorraquídeo

En México esta localización es la más frecuente en los pacientes adultos sintomáticos atendidos en instituciones de tercer nivel (37). El parásito se localiza principalmente a nivel de las cisternas basales. El valle silviano y en los surcos de la convexidad.

- Sistema ventricular

En el sistema ventricular la localización más frecuente es el cuarto ventrículo.

- Localización medular.

Esta localización es muy poco frecuente.

La evolución natural de los cisticercos dentro del SNC de los seres humanos sigue cuatro etapas:

- Etapa vesicular

La membrana es delgada, friable y transparente, contiene a la larva invaginada de 4 a 5 mm que yace en un líquido transparente. El tejido adyacente muestra etapas de una ligera inflamación.

- Etapa coloidal

El quiste está adherido y comúnmente rodeado de cápsula conectiva secundaria que lo engloba en el tejido donde se localiza. El contenido pierde fluidez, tiene aspecto lechoso gelatinoso en consistencia, la larva se fragmenta fácilmente, es granujienta al tacto. La membrana se encuentra hialinizada al igual que la larva.

- Etapa nodular granular

El quiste es más pequeño, la membrana no se identifica fácilmente, se haya íntimamente adherido a la cápsula colágena secundaria, el contenido totalmente granujiento impide la identificación del escólex.

- Etapa nodular calcificada

Solo se identifica un nódulo endurecido, totalmente calcificado, reducido a menos de la mitad de su tamaño original, de coloración blanquecina al corte, con cápsula conectiva que le envuelve, gliosis astrocitaria y escasa reacción inflamatoria a su alrededor (35).

En México el análisis de múltiples autopsias proporciona una frecuencia de NC cercana al 2% (38), mientras que el reporte de estudios clínicos muestra que alrededor del 10% de los enfermos que asisten a unidades de neurología tienen NC (39) y los estudios de seroprevalencia reportan que hasta el 12% de la población mexicana tiene anticuerpos anti-cisticerco (40). La encuesta nacional seroepidemiológica (ENSE) de 1987-1988 registro una seroprevalencia de cisticercosis por entidad federativa que varía de entre 0.06% y 2.97%; en el Distrito Federal la seroprevalencia fue de 2.95% (41).

La teniosis y la cisticercosis causada por *T. solium* son problemas de salud pública en algunas áreas urbanas y rurales de América Latina, Asia y África (42,43). *T. solium* es el parásito responsable de la infección de alrededor de 20 millones de personas (43), y 50 mil muertes cada año (44). Recientemente también en los países desarrollados, en los que ya se había erradicado esta enfermedad, se han presentado algunos casos, por lo que ahora es considerada como una enfermedad emergente (33, 45).

## 1.5. Metabolismo

El metabolismo es un conjunto de reacciones a través de las cuales los sistemas vivos adquieren y utilizan energía libre para realizar distintas funciones, estas reacciones se llevan a cabo dentro de los seres vivos siguiendo distintas vías y se realizan acoplando las reacciones exergónicas de oxidación de nutrientes a los procesos endergónicos necesarios para mantener el estado vital (46); es decir, que a través de la degradación y formación de distintas sustancias se proporciona energía y materiales para el desarrollo y sobrevivencia de los seres vivos, todo esto a partir de los nutrientes que los organismos encuentran en su medio ambiente.

Las reacciones a las que se hace referencia anteriormente son las reacciones enzimáticas; dentro de las vías metabólicas estas reacciones enzimáticas son consecutivas y generan productos específicos. A las sustancias reaccionantes, intermediarios o productos que se generan dentro de las vías metabólicas se les denomina metabolitos (46).

Las vías metabólicas se pueden clasificar de la siguiente manera (46):

- A) Las que participan en la degradación (catabolismo): En las vías catabólicas los metabolitos complejos se degradan exergónicamente a productos más sencillos. El metabolismo degradativo se caracteriza por su capacidad de transformar un gran número de sustancias diferentes (carbohidratos, lípidos y proteínas) en intermediarios comunes como el acetyl CoA, continuando con la oxidación de grupo acetilo a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O por la acción secuencial del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT), la cadena de transporte de electrones (e<sup>-</sup>) y la fosforilación oxidativa.

B) Las que intervienen en la biosíntesis (anabolismo): La biosíntesis es el proceso opuesto al catabolismo, en el que un número relativamente reducido de metabolitos, piruvato, acetil CoA e intermediarios del CAT, sirven de material de partida.

La energía libre que se genera en los procesos de catabolismo se conserva por síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato o por reducción de  $\text{NADP}^+$  a NADPH. EL ATP y el NADPH son las principales fuentes de energía de las vías anabólicas (46). De esta manera se da el acoplamiento de las vías, pues la energía generada y almacenada durante el catabolismo puede posteriormente ser utilizada en la biosíntesis o anabolismo.

Las vías metabólicas presentan cuatro características principales:

- 1) Son irreversibles, son muy exergónicas (con variaciones de energía libre muy negativa), confiriendo dirección a la vía. Además de que se necesitan de dos vías distintas para interconvertir metabolitos.
- 2) Cada vía metabólica tiene una primera etapa obligada. Las reacciones que la componen funcionan próximas al equilibrio, pero al principio de cada vía existe una reacción exergónica que obliga al intermediario producido a continuar a lo largo de la vía.
- 3) Todas las vías metabólicas están reguladas. El control de las vías se efectúa regulando las enzimas que catalizan la primera etapa obligada.
- 4) En células eucarióticas, las vías metabólicas se desarrollan en compartimentos subcelulares específicos (membranas, mitocondria, citosol).

La visión actual de las rutas metabólicas como la del CAT es, el de una alta organización, un complejo multienzimático en el cual las enzimas y sus sustratos son en cierto grado compartimentalizadas (47,48).

El CAT o ciclo de Krebs es una de las vías metabólicas que juega un papel central en el metabolismo energético, pero no solo se limita a eso. Es además, la vía de oxidación de la mayor parte de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos y genera numerosos precursores biosintéticos (49). Es un ciclo anfibólico (opera catabólicamente y

anabólicamente) que se lleva a cabo en el interior de las mitocondrias de las células eucarióticas.

En este ciclo intervienen ocho enzimas (49):

- 1) Citrato sintasa, cataliza la condensación entre acetil CoA y oxaloacetato para rendir citrato.
- 2) Aconitasa convierte al citrato (alcohol no oxidable) a isocitrato.
- 3) Isocitrato deshidrogenasa oxida el isocitrato a oxalosuccinato, con la reducción de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  y  $\text{CO}_2$ .
- 4)  $\alpha$ -Cetoglutarato deshidrogenasa (complejo multienzimático) descarboxila oxidativamente el  $\alpha$ -oxoglutarato a succinil coenzima A con la reducción de una segunda molécula de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  y  $\text{CO}_2$ .
- 5) Succinil CoA sintetasa convierte el succinil CoA a succinato formándose un compuesto de mayor energía, GTP, a partir de GDP más Pi.
- 6) La succinato deshidrogenasa cataliza la oxidación del enlace sencillo del centro de la molécula de succinato a doble enlace en trans, dando fumarato con la reducción del FAD a  $\text{FADH}_2$ .
- 7) La fumarasa cataliza la hidratación del doble enlace del fumarato dando lugar al malato.
- 8) La malato deshidrogenasa (MDH). regenera el oxaloacetato, oxidando el grupo alcohol secundario del malato, con la reducción de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ .

Estas enzimas producen una serie de reacciones que al final oxidan el grupo acetilo del acetil CoA a dos moléculas de  $\text{CO}_2$ , de forma que se conserva la energía libre producida, utilizándola en la síntesis de ATP, con la consiguiente formación de tres moléculas de  $\text{NADH}$ , una de  $\text{FADH}_2$  y un GTP (46).

El ciclo funciona catalíticamente como consecuencia de la regeneración del oxaloacetato. En siete reacciones secuenciales se convierte al citrato en oxaloacetato y se liberan dos  $\text{CO}_2$ . La ruta es cíclica ya que no se utilizan los intermediarios del ciclo; se produce un oxaloacetato por cada uno consumido (49).

El NADH y el FADH<sub>2</sub> son productos vitales de este ciclo. Su oxidación por el O<sub>2</sub> a través de la cadena de transporte de e<sup>-</sup> y la fosforilación oxidativa complementa la degradación del combustible metabólico para síntesis de ATP.

Las enzimas del CAT actúan como una unidad funcional que satisface la demanda metabólica de la célula. Las que controlan el flujo al parecer son, la citrato sintasa, la isocitrato deshidrogenasa y la  $\alpha$ -Cetoglutarato deshidrogenasa. Sus actividades están controladas por la disponibilidad de sustrato, la inhibición por producto, la inhibición por intermediarios del ciclo y la activación por Ca<sup>2+</sup> (46).

## 1.6. Proteínas: enzimas

Las proteínas cumplen muchas funciones biológicas, y debido a que tienen distintas posibilidades de plegamiento, que les permite formar estructuras tridimensionales muy diversas, existe una gran variedad de ellas.

Por ello es muy importante conocer la manera en que la secuencia de aminoácidos determina la conformación de las proteínas, además de conocer los factores que afectan a la estructura tridimensional (conformación→estado nativo) y ver como altera esto su función biológica (50).

Las proteínas son moléculas dinámicas cuyas funciones dependen, de modo casi invariable, de las interacciones con otras moléculas.

Existen cuatro niveles estructurales de las proteínas (49 y 50).

- 1) Estructura primaria: Secuencia de aminoácidos, es una descripción de los enlaces covalentes que unen los residuos de aminoácidos de una cadena polipeptídica.
- 2) Estructura secundaria: Se refiere a disposiciones particularmente estables de los aminoácidos debido a la presencia de fuerzas específicas (puentes de H, fuerzas de Van der Waals, Fuerzas electrostáticas), que dan lugar a patrones estructurales repetitivos como la  $\alpha$  hélice y lámina  $\beta$ .
- 3) Estructura terciaria: Muestra el aspecto del plegamiento tridimensional que la proteína ha adquirido.

- 4) Estructura cuaternaria: Describe la forma en la que las subunidades interactúan entre sí y la disposición en el espacio de estas mismas, cuando la proteína cuentan con dos o más subunidades polipeptídicas.

Las enzimas son proteínas que funcionan como catalizadores biológicos de una enorme variedad de reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en los seres vivos. De estos catalizadores naturales se puede decir que son altamente específicas, elevan en gran medida la velocidad de las reacciones, permiten que las reacciones se lleven a cabo en condiciones relativamente suaves en cuanto a temperatura, presión y pH, y finalmente son susceptibles de ser reguladas por el propio organismo.

Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas de ARN catalítico, todas las enzimas son proteínas y como estas, tienen pesos moleculares relativos que van desde unos 12,000 hasta más de 1 millón de Da (49).

La conformación nativa de las enzimas es estable dentro de ciertas condiciones: temperatura, pH, presión, no agentes desnaturizantes. El desnaturizar una proteína no significa perder su estructura primaria.

Como se dijo anteriormente la mayoría de las enzimas son proteínas y, algunas enzimas no requieren para su actividad más grupos químicos que sus residuos de aminoácidos, sin embargo otras requieren un componente químico adicional llamado cofactor que pueden ser iones inorgánicos o una molécula orgánica o metalorgánica compleja denominada coenzima; algunas enzimas requieren tanto una coenzima como uno o más iones metálicos para su actividad (49).

### **1.7. Malato deshidrogenasa (MDH)**

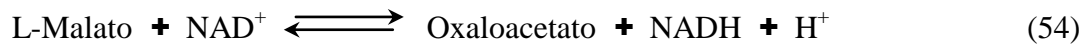
Las MDH's son enzimas que juegan un papel importante en el metabolismo aeróbico y anaeróbico. Estas enzimas forman parte del metabolismo intermediario de múltiples organismos, incluyendo los cestodos (51).

Las MDH's forman parte de la familia de las deshidrogenasas dependientes de  $\text{NAD}^+$ , es decir, son enzimas que catalizan reacciones de oxido-reducción entre nucleótidos y sustratos. Diversos ejemplos son la lactato deshidrogenasa (LDH), alcohol deshidrogenasa (ADH), la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la MDH. Existe una

homología significativa a nivel de la secuencia de aminoácidos entre las LDH's y las MDH's y esto se ve reflejado a su vez en la estructura tridimensional de las subunidades (52).

Las MDH's catalizan la interconversión de malato a oxaloacetato mediante la óxido/reducción de los dinucleótidos de la coenzima NADH (53).

Su reacción catalítica es:



y su constante de equilibrio es: 
$$\frac{[\text{Oxaloacetato } 2^-][\text{NADH}]}{[\text{Malato } 2^-][\text{NAD}^+]} = 2.78 \times 10^{-5} \text{ M} \quad (55)$$

La MDHm es una de las 8 enzimas que forman parte del CAT, siendo la última enzima de este ciclo.

Además forma parte de la regulación de dicho ciclo, pues es la única enzima del ciclo que cataliza una reacción con un equilibrio muy desfavorable (56). Esto quiere decir que fácilmente puede realizar la reacción inversa. Adicionalmente, esta enzima participa en una parte de la vía gluconeogénica. Debido a que el oxaloacetato, originado por la carboxilación del piruvato en el interior de la mitocondria no puede atravesar la membrana de esta y se transforma en malato por efecto de la MDHm. El malato, que puede cruzar la membrana mitocondrial es oxidado en el citoplasma por acción de la MDH citoplásmica en presencia de  $\text{NAD}^+$  formando oxaloacetato. Este oxaloacetato es ahora convertido en fosfoenolpiruvato (PEP) por la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK) con la posibilidad de revertir las reacciones de la vía glicolítica hacia la producción de glucosa.

Las MDH's son enzimas multiméricas compuestas por subunidades idénticas organizadas en dímeros o tetrámeros, el peso molecular de cada subunidad se encuentra entre 30 y 35 kDa (57, 58). Cada subunidad funciona independientemente de la otra durante la catálisis enzimática y se ha demostrado que los monómeros son capaces de llevar a cabo la reacción enzimática sin evidencia de cooperación entre los sitios catalíticos (53, 59). Para demostrar esto se modificaron por ingeniería genética enzimas a las que se les mutaron dos residuos importantes para la dimerización el D45 y el S226, obteniendo



los mutantes D45Y y el doble mutante D45Y/S226Y como monómeros que resultaron ser activos (60), también se logro disociar a la enzima en pH ácido o con compuestos químicos (61, 62).

Las células eucarióticas presentan dos isoformas de MDH's dependientes de  $\text{NAD}^+$ , una en la mitocondria y la otra en el citoplasma; en levaduras y en algunos tejidos vegetales se ha identificado una tercera isoforma en fracciones glioxisomales. La isoforma presente en el citosol (MDHc) está involucrada en el transporte de equivalentes de NADH en forma de malato hacia la mitocondria (lanzadera de malato/aspartato), mientras que la isoforma presente en la mitocondria (MDHm) además de su función en la otra mitad de la lanzadera de malato, es un componente del CAT. Muchos trabajos han sugerido que aparte de estas tres isoformas principales, tanto la MDHc como la MDHm podrían tener múltiples subformas. Aparentemente estas subformas no presentarían características cinéticas o estructurales distintivas y el papel fisiológico que podrían cumplir es desconocido (57).

El análisis de las secuencias de los aminoácidos de las MDH's muestra un bajo grado de similitud entre las enzimas, en algunos casos tan bajo como el 23% de similitud entre las isoformas MDHc y MDHm de ratón, llegando a disminuir al 20% entre las mismas isoformas en cerdo (63). Sin embargo la comparación de las estructuras de las MDH's muestra que estas son muy similares entre sí (53).

Existe un alto porcentaje de identidad entre las isoformas mitocondriales provenientes de distintas fuentes, mayor al 90% para las MDH mitocondriales de cerdo, rata y ratón (63). Lo que implicaría un origen común para las MDH mitocondriales diferente al de las MDH citosólicas. Además, las MDH mitocondriales se encuentran más relacionadas con las provenientes de los procariontes. Por ejemplo, la MDHm y la MDHc del cerdo son idénticas en un 19.6%, mientras que la MDH de *E. coli* y la MDHm de cerdo lo son en un 58.3% (64).

Aunque la homología entre las isoformas, citosólica y mitocondrial de las MDH es baja, los datos cristalográficos muestran que los patrones de plegamiento son semejantes, esto incluye elementos esenciales de estructura secundaria, localización de los sitios de unión a coenzimas y la posición de varios de los residuos importantes para la catálisis (65).

El sitio activo catalítico de las MDH consiste en una cavidad hidrofóbica, que contiene los espacios de unión para el sustrato y para el anillo de nicotinamida de la coenzima; una

vez formado el complejo ternario enzima-coenzima-sustrato hay un cambio conformacional de la proteína, en el cual el asa externa se cierra sobre la cavidad del sitio activo para cubrir del solvente tanto al sustrato como a los residuos catalíticamente importantes (53). Además otros residuos de importancia funcional son “presentados” en estrecha proximidad al sustrato. (66, 67, 68).

En general las MDH's son estables como dímeros, cada subunidad contiene dos dominios estructural y funcionalmente diferentes, el dominio de unión del  $\text{NAD}^+$  ocupa la mitad amino terminal de cada molécula, mientras que la otra mitad carboxi terminal contiene los aminoácidos necesarios para el sitio de unión del sustrato y la catálisis (64).

Regularmente las MDH's dependientes de  $\text{NAD}^+$  no son sujetas de regulación metabólica, con la excepción de la enzima mitocondrial (53), la cual se ha demostrado que es dependiente de control alostérico (se regula alostéricamente) en un sitio por subunidad (53, 56, 64). Altas concentraciones de malato estimulan la producción de oxaloacetato, mientras que altas concentraciones de oxaloacetato inhiben la reacción (56, 69).

El citrato es otra molécula que afecta la actividad de la MDH de muy complejas maneras, este inhibe la reducción del oxaloacetato bajo todas las condiciones, también la oxidación del malato pero solo a bajas concentraciones de malato y  $\text{NAD}^+$ . Cuando las concentraciones de malato y  $\text{NAD}^+$  son altas el citrato parece incrementar la actividad de la MDH (70). En su forma dimérica nativa la MDHm es activada por citrato en la dirección  $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$  e inhibida por citrato en la dirección  $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$ , el citrato se une a un sitio regulador distinto del sitio catalítico, y unido a este sitio reduce la unión del NADH pero no disminuye la unión del  $\text{NAD}^+$  (56).

El desfavorable equilibrio de la reacción catalizada por la enzima MDHm ( $[\text{L-malato}] / [\text{oxaloacetato}] > 10^4$ ) (49, 71) requiere de una remoción rápida del producto, oxaloacetato, antes de que la reacción inversa pueda ocurrir. Debido a esto, las interacciones entre MDHm y la citrato sintasa o aspartato transaminasa han sido propuestas como medios de un uso eficiente o de extracción del oxaloacetato producido por la MDHm (56).

La MDH mitocondrial probablemente exista como un complejo con fumarasa y citrato sintasa. El fundamento para la formación de este complejo se basa en el hecho de que el cambio de energía libre para la reacción catalizada por la MDH es desfavorable en la

dirección en la que opera el CAT (64). Bajo condiciones normales la reacción de la MDH se ve favorecida en la dirección de la formación de malato, por lo que se cree, que la formación de un complejo enzimático en el CAT llevaría a dicho ciclo en la dirección de la formación del oxaloacetato facilitando la transferencia de oxaloacetato de la MDH a la citrato sintasa (72, 73).

### **1.8. Metabolismo y generación de energía en parásitos**

El metabolismo de los helmintos es variable entre especies y dentro de ellas mismas, esta variabilidad hace que su metabolismo energético sea complejo debido a que llevan a cabo reacciones tanto en vía aeróbica como anaeróbica, lo que probablemente se deba a las circunstancias ambientales a que son sometidos durante su ciclo de vida (74, 75).

La generación de energía aeróbica se puede definir como la completa oxidación de carbohidratos y lípidos a CO<sub>2</sub> y agua. La mayor parte de la energía es generada en la mitocondria a través de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. El oxígeno actúa como el aceptor final de electrones para volver a oxidar la coenzima reducida (NADH). El proceso fermentativo o vía anaeróbica se define como aquel que produce su propio oxidante para equilibrar la producción y el consumo de la coenzima (NADH), en algunos casos (ej. reducción del fumarato) está ligado a la cadena respiratoria. Los carbohidratos son sustratos adecuados para la fermentación. Los lípidos sin embargo están muy reducidos para ser fermentados, ya que tanto la oxidación como la reducción del sustrato deben de ocurrir (76).

Los helmintos pasan por diferentes etapas en su ciclo de vida, en este, además de un huésped definitivo la mayoría de ellos necesitan un huésped intermediario para completar su complejo ciclo. Entre estas dos etapas como parásitos, existe una etapa de vida libre en la que migran de un huésped a otro (76), sin embargo, esta migración no ocurre en cestodos, pues en este grupo de organismos los huevos son dispersados por diversos agentes. Dependiendo de la etapa del ciclo de vida donde se encuentren, las variaciones en las condiciones externas fuerzan al parásito a adaptar su metabolismo energético, siendo lo más importante, las variaciones con respecto a la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. Estas variaciones ambientales los obligan a presentar una cierta flexibilidad para poder

adaptarse a las distintas condiciones ambientales que se les presentan, esto les permite estar preparados para enfrentarse a esas condiciones: en algunas etapas de su ciclo de vida funcionan de forma anaeróbica, mientras que en otras etapas prevalece un metabolismo aeróbico. Asociado a este cambio ambiental se encuentra un mecanismo de transición aeróbico/anaeróbico, en donde coexisten ambos tipos de metabolismo que ocurre cuando la forma de vida libre entra a un nuevo huésped o cuando el parásito emerge del huésped para vivir de forma libre (76).

La disponibilidad de oxígeno varía mucho en los distintos hábitats del parásito, por ejemplo, el oxígeno está ausente en los ductos biliares, en tanto que en el intestino se encuentran pequeñas cantidades de este. Sin embargo los parásitos también viven en ambientes aeróbicos como la sangre de los vertebrados y la superficie aireada del agua que es el hábitat de muchas formas de vida libre. El suministro externo de comida puede ser abundante en la sangre o en los intestinos del huésped final o ausente para la mayoría de las formas de vida libre (76).

Los parásitos adultos son dependientes de los carbohidratos que les proporciona su huésped para su metabolismo energético, siendo este del tipo fermentativo, lo que implica que el oxígeno no pueda funcionar como el principal aceptor final de electrones.

Los estados de vida libre viven de sustratos endógenos que pueden ser carbohidratos o lípidos y los últimos pueden ser utilizados debido a que predomina un metabolismo energético aeróbico (76).

Todo esto da como resultados que una de las características más sobresalientes del metabolismo energético de los helmintos, es la coexistencia de la fermentación y la respiración aeróbica, junto con la eliminación al medio de productos parcialmente reducidos tales como lactato, propionato, etanol, succinato, acetato y piruvato, así como ácidos grasos volátiles y aminoácidos (77).

Los helmintos poseen un sistema de transporte de glucosa muy activo, con transportadores que son capaces de unirse a la glucosa aún cuando esta se encuentra en muy bajas concentraciones. La glucosa luego de ser absorbida, puede ser convertida en glucógeno que es la principal molécula de reserva, o ser metabolizada por la vía glucolítica hasta PEP. De acuerdo con Barret 1981 (78) el PEP puede seguir dos vías metabólicas

alternativas en los helmintos: fermentación láctica o dismutación málica (76, 79). Estas vías pueden ser definidas de la siguiente manera:

- a) Fermentación láctica: principalmente ocurre en el estadio adulto, donde los carbohidratos son degradados vía glucólisis a lactato en un mecanismo independiente de oxígeno que da como rendimiento dos moléculas de ATP por mol de glucosa, el proceso se da cuando el PEP proveniente de la glucólisis se transforma a piruvato por la acción de la piruvato cinasa y posteriormente este es convertido a lactato mediante la enzima LDH. El lactato es finalmente excretado por el parásito.
- b) Dismutación del malato: es caracterizado por un paso de fijación de CO<sub>2</sub>, los carbohidratos son degradados al nivel de PEP vía glicólisis y dependiendo de la disponibilidad de sustratos, la enzima piruvato cinasa y la enzima PEPCK determinan la formación o de piruvato o de oxaloacetato (79). La MDHc toma al oxaloacetato y produce malato (en el citosol), el cual es introducido al interior de la mitocondria para continuar degradándose (79). El malato entra en la mitocondria por una translocasa dependiente de fosfato (78). En lugar de una oxidación seguida por una reducción (como ocurre en la producción de lactato para mantener el balance redox), en este caso el sustrato se divide en dos vías, una parte del malato es reducido a succinato, este proceso ocurre en dos pasos que revierten parte del CAT, utilizando la fumarasa para transformar el malato a fumarato y la fumarato reductasa (FRD) para transformar el fumarato a succinato y termina con la formación de propinato por el complejo de la succinato descarboxilasa. La oxidación del malato también requiere de dos pasos, primero se convierte el malato en piruvato, reacción catalizada por la enzima málica, y luego se transforma a acetato por el complejo piruvato deshidrogenasa junto con un ciclo succinato/succinil-CoA (76, 79).

En *Fasciola hepática*, la dismutación del malato permite el inicio de la síntesis de ATP bajo condiciones anaeróbicas y tiene una posición central en la respiración aeróbica (80).

La importancia relativa de estas dos vías, son los cambios que se pueden dar en los organismo dependiendo de las condiciones ambientales. La dismutación del malato es

mucho más común en helmintos; en invertebrados la enzima málica es dependiente de  $\text{NADP}^+$  (78).

Algunos helmintos excretan succinato, mientras que otros metabolizan el succinato a propionato, excretando este último. Para mantener el balance redox una molécula debe oxidarse mientras dos se reducen.

Gracias a la dismutación málica los helmintos pueden obtener una producción neta de ATP mayor que la obtenida por la fermentación homoláctica: 3.7 moles de ATP por mol de glucosa si los productos finales son acetato y succinato, o 5.4 si se produce acetato y propionato, lo que le da a esta vía una ventaja con respecto a la fermentación homoláctica que solo produce 2 ATP por mol de glucosa.

En mamíferos el rendimiento de la degradación de una molécula de glucosa es mucho mayor (36 ATP/glu), el PEP es convertido a piruvato y este a acetilCoA que luego es metabolizado en la mitocondria mediante el CAT. Este mecanismo es el utilizado por las formas libres del parásito que como carecen de fuentes de energía son, completamente dependientes de reservas endógenas adquiridas en huéspedes previos, siendo el glucógeno o la trehalosa las reservas de carbohidratos usadas por estas etapas para la sobrevivencia del parásito antes de llegar a su próximo estadio. El glucógeno y la trehalosa son degradados a piruvato por la vía clásica de Embden-Meyerhof (glucólisis) en el citoplasma. El piruvato es transportado a la matriz mitocondrial y convertido a acetil CoA, el cual también puede ser formado vía  $\beta$ -oxidación de posibles reservas lipídicas, finalmente es degradado vía CAT a  $\text{CO}_2$  y agua, usando como aceptor final al  $\text{O}_2$ . El NADH formado en este proceso es oxidado por la vía clásica de la cadena respiratoria que está unida a la producción de ATP (76).

Pocos helmintos, si existe alguno, poseen un CAT tan activo como el observado en mamíferos. Generalmente este opera a muy baja actividad y las enzimas como la citrato sintasa o la isocitrato deshidrogenasa, que son importantes para dicho ciclo, frecuentemente están ausentes o en muy poca cantidad. Por el contrario, tres enzimas están siempre presentes: la MDH, la fumarasa y la FRD, estas enzimas catalizan las reacciones que revierten parte del CAT y que están involucradas en la dismutación del malato (77).

## 1.9. Gluconeogénesis

Otra de las rutas que puede ser utilizada por los parásitos para la obtención de energía manteniendo constantes las reservas energéticas es la gluconeogénesis, la cual de manera general se puede definir como la síntesis de glucosa a partir de metabolitos no carbohidratados, esta síntesis a partir de precursores de tres o cuatro carbonos es a grandes rasgos el reverso de la glucólisis, sin embargo, varias reacciones deben de ser diferentes debido a que el equilibrio de la glucólisis es muy favorable hacia la formación de piruvato, para que se lleva a cabo la gluconeogénesis los precursores deben de convertirse primero en piruvato o entrar a la vía a través de otros intermediarios como el oxaloacetato entre otros. En los animales superiores, esta ruta es necesaria debido a que la glucosa es la única fuente de energía para órganos como el cerebro, testículos, eritrocitos, y medula renal, se lleva a cabo principalmente durante la etapa en la que no se ingieren alimentos, cuando las fuentes de glucógeno se reducen, siendo el hígado el principal órgano donde tiene lugar esta vía, además del riñón que también tiene un papel importante en la misma.

Los precursores más importantes de la gluconeogénesis son el lactato, los aminoácidos y el glicerol. En la síntesis de glucosa a partir de piruvato por la vía de la gluconeogénesis, se hidrolizan 6 moléculas de ATP, mientras que en la conversión de glucosa en piruvato, vía glucólisis, sólo se generan dos moléculas de ATP (81). Esto hace que el proceso de la gluconeogénesis sea muy costoso, pues se necesitan 4 moléculas adicionales de transferencia de grupo fosforilo para convertir un proceso energéticamente desfavorable en otro favorable.

La gluconeogénesis y la glucólisis están coordinadas de modo que una de las vías es relativamente inactiva mientras que la otra presenta una actividad elevada.

Son tres las reacciones de la gluconeogénesis que deben de ser diferentes a las de la glucólisis para que la primera pueda llevarse a cabo:

- 1) El PEP se forma a partir del piruvato vía oxaloacetato por la acción de la piruvato carboxilasa (PC) y la PEPCK.
- 2) La fructosa 6-fosfato se forma a partir de la fructosa 1,6-bisfosfato por hidrólisis del éster fosfato en el carbono 1. Esta hidrólisis está catalizada por la fructosa 1,6-bisfosfatasa.

- 3) Por hidrólisis de la glucosa 6-fosfato se forma glucosa, en una acción catalizada por la glucosa 6-fosfatasa.

La conversión de piruvato a PEP requiere la acción de dos enzimas mitocondriales. En la primera reacción el piruvato es carboxilado para formar oxaloacetato este proceso requiere de ATP y es catalizada por la PC. La segunda enzima en la conversión de piruvato a PEP es la PEPCK. La PEPCK requiere de GTP en la descarboxilación de oxaloacetato para formar PEP. Para que la gluconeogénesis prosiga, el oxaloacetato necesita ser transportado desde la mitocondria al citosol. Sin embargo, no existe un mecanismo de transporte para su transferencia directa y el oxaloacetato no se difunde libremente. El oxaloacetato mitocondrial puede llegar al citosol por tres vías, conversión en PEP (por acción de la PEPCK mitocondrial), transaminación a aspartato o reducción a malato, todos estos pueden transportarse al citosol.

En el caso de la reducción del oxaloacetato mitocondrial a malato por la acción de la enzima MDHm. Esta conversión conlleva el transporte concomitante de equivalentes de reducción al citosol en forma de NADH (46). La reducción del oxaloacetato a malato requiere de NADH, el malato resultante es transportado al citosol en donde es oxidado a oxaloacetato por la enzima citosólica MDH que requiere  $\text{NAD}^+$  y produce NADH. El NADH producido durante la oxidación citosólica del malato a oxaloacetato es utilizado durante la reacción catalizada por la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de la glucólisis. El acoplamiento de estas dos reacciones de oxidación-reducción es necesario para mantener la gluconeogénesis funcionando cuando el piruvato es la principal fuente de átomos de carbono. La conversión de OAA a malato predomina cuando el piruvato (derivado de la glucólisis o del metabolismo de los aminoácidos) es la fuente de los átomos de carbono para la gluconeogénesis.



## 1.10. Mitocondria

La mitocondria es el lugar donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo eucariótico, debido a que ahí se encuentran las enzimas del CAT, las de oxidación de ácidos grasos y las proteínas redox implicadas en el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, lo cual convierte a este organelo en la planta de energía de las células eucariotas aeróbicas.

La mitocondria es un organelo que se encuentra dentro de las células, posee su propia membrana así como también su propio ADN que es diferente al ADN celular. Estos orgánulos citoplásmicos varían de tamaño y forma, pero con frecuencia, son elipsoides con dimensiones de alrededor de 1 por 2  $\mu\text{m}$ , una célula eucariótica contiene regularmente alrededor de 2000 mitocondrias que ocupan, aproximadamente, una quinta parte del volumen celular total (46).

Las mitocondrias poseen dos membranas, estas membranas son diferentes en composición química, permeabilidad y contenido enzimático; la externa es lisa y permeable (o libremente permeable a la mayoría de los solutos), mientras que la interna es impermeable (aunque contiene sistemas de transporte específicos para el fosfato, el ADP, el ATP, los ácidos dicarboxílicos, ciertos aminoácidos y el  $\text{Ca}^{2+}$  y presenta numerosas invaginaciones que permiten que la superficie interna de la membrana sea muy grande, además estas invaginaciones (pliegues) forman las crestas en donde ocurren las reacciones del transporte electrónico y la fosforilación oxidativa (cuyas enzimas están embebidas en la membrana interna mitocondrial) que producen el ATP. Esta última encierra a la matriz mitocondrial, la cual es muy rica en proteínas, y es en donde se llevan a cabo las reacciones del CAT (49).

Los solutos que necesitan atravesar la membrana interna pueden ser transportados en contra de los gradientes de concentración si se acoplan a un gradiente de  $\text{H}^+$  rico en energía generado por el transporte electrónico. La membrana interna contiene componentes de los sistemas de lanzadera que pueden transferir electrones desde el NADH del citosol a la cadena de transporte electrónico mitocondrial o desde el NADH mitocondrial al citosol. Las velocidades de la glucólisis en el citoplasma y de la respiración en la mitocondria se hallan integradas por la concentración de ATP, ADP y fosfato en el citosol y la mitocondria (49). Los electrones del NADH se importan a la mitocondria mediante uno

de los sistemas de lanzadera, como la glicerofosfato o la lanzadera malato-aspartato. Estos electrones pasan a través de cuatro complejos proteicos, la cadena de transporte electrónica, con la síntesis de ATP. Los complejos I, III y IV participan en la oxidación del NADH, produciendo 3ATPs/NADH, mientras que la oxidación del FADH<sub>2</sub>, en la que participan los complejos II, III y IV producen solo 2ATPs/FADH<sub>2</sub>.

La membrana mitocondrial es impermeable al oxaloacetato, ya que carece de transportador para este compuesto, necesitando una serie de reacciones, tanto para generar la mayor parte del NADPH necesarios para la síntesis de ácidos grasos, como por la generación del malato que si puede entrar en la mitocondria.

La mitocondria contiene ADN y ARN único y los sistemas para la expresión de estas moléculas, dichos sistemas solo sintetizan alrededor de un décimo de su masa proteica. La mayor parte de las proteínas mitocondriales es codificada por los genes nucleares, trasladadas en los polisomas citoplásmicos y de alguna manera (tomado y traducido funcionalmente) por el organelo (82).

Pasos para la incorporación de las proteínas sintetizadas citoplásmicamente dentro de la mitocondria:

- 1) Síntesis del polipéptido (usualmente como un precursor grande).
- 2) Reconocimiento y unión del precursor a la superficie mitocondrial.
- 3) Translocación del precursor a través o dentro de una o varias membranas mitocondriales dependiendo de la localización final de la proteína.
- 4) Escisión y/o otras modificaciones covalentes (procesamiento) de la cadena polipéptida a la proteína madura.
- 5) Ensamblaje de las subunidades a la holoenzima funcional, lo que en algunos casos involucra la asociación con subunidades de origen mitocondrial.

Se han publicado evidencias que demuestran que algunas proteínas son “atadas” y tomadas por la mitocondria postraducción indicando que la mitocondria adquiere las proteínas a través de un importe postraduccional (83).

## **2. JUSTIFICACIÓN.**

Debido a la importancia médica y económica de *T. solium*, y a la escasa información que se tiene sobre el estudio de sus enzimas metabólicas, el estudiar a la MDHm de cisticercos de este cestodo contribuirá al conocimiento del metabolismo energético de este parásito y ayudará en la búsqueda de moléculas con fines profilácticos.

### **2.1. Objetivo General**

Identificar por procedimientos cinéticos a la MDHm de cisticercos de *T. solium*.

### **2.2 Objetivos particulares**

- Enriquecer la fracción mitocondrial de cisticercos de *T. solium*.
- Identificar por diferentes métodos a la MDHm de cisticercos de *T. solium*.
- Determinar las constantes catalíticas de la MDHm de cisticercos de *T. solium*.
- Determinar el efecto de la Temperatura sobre la actividad catalítica de la MDHm de cisticercos de *T. solium*.
- Determinar el efecto del pH sobre la actividad catalítica de la MDHm de cisticercos de *T. solium*.
- Determinar el efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad catalítica de la MDHm de cisticercos de *T. solium*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para llevar a cabo este proyecto se desarrolló una metodología que a grandes rasgos es la siguiente:

- 1) Primero se procedió a coleccionar los cisticercos.
- 2) Posteriormente se purificó la fracción soluble de las mitocondrias de los cisticercos.
- 3) Una vez obtenida esta fracción, la misma se corrió en una columna de QAE-Sefarosa para obtener la fracción enriquecida de la MDHm.
- 4) Para determinar la pureza de la fracción MDHm se elaboraron diferentes geles de acrilamida.
- 5) Una vez que se estableció que la fracción MDHm se había purificado suficientemente, se procedió a determinar su actividad catalítica en función de la temperatura y el pH.
- 6) Posteriormente se determinaron las constantes catalíticas ( $V_{max}$  y  $K_m$ ) de la MDHm.
- 7) Finalmente, se realizaron estudios de inhibición de la actividad catalítica de la MDHm para obtener los valores de  $I_{50}$ , tipo de inhibición y  $K_i$ .
- 8) Además de lo anterior, también se llevaron a cabo análisis de péptidos por espectrometría de masas de la MDHm purificada en los geles de acrilamida.

Esta metodología se describe con mayor detalle en los siguientes apartados:

#### 3.1. Obtención de cisticercos

Los cisticercos se obtuvieron de músculo esquelético de cerdos sacrificados de distinta edad, sexo y origen infectados de forma natural con *T. solium*. Los cisticercos se extrajeron de forma completa y sin tejido del huésped, posteriormente fueron lavados con PBS pH 7.2, secados en papel filtro y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

## **3.2. Purificación de proteínas mitocondriales de cisticercos de *T. solium***

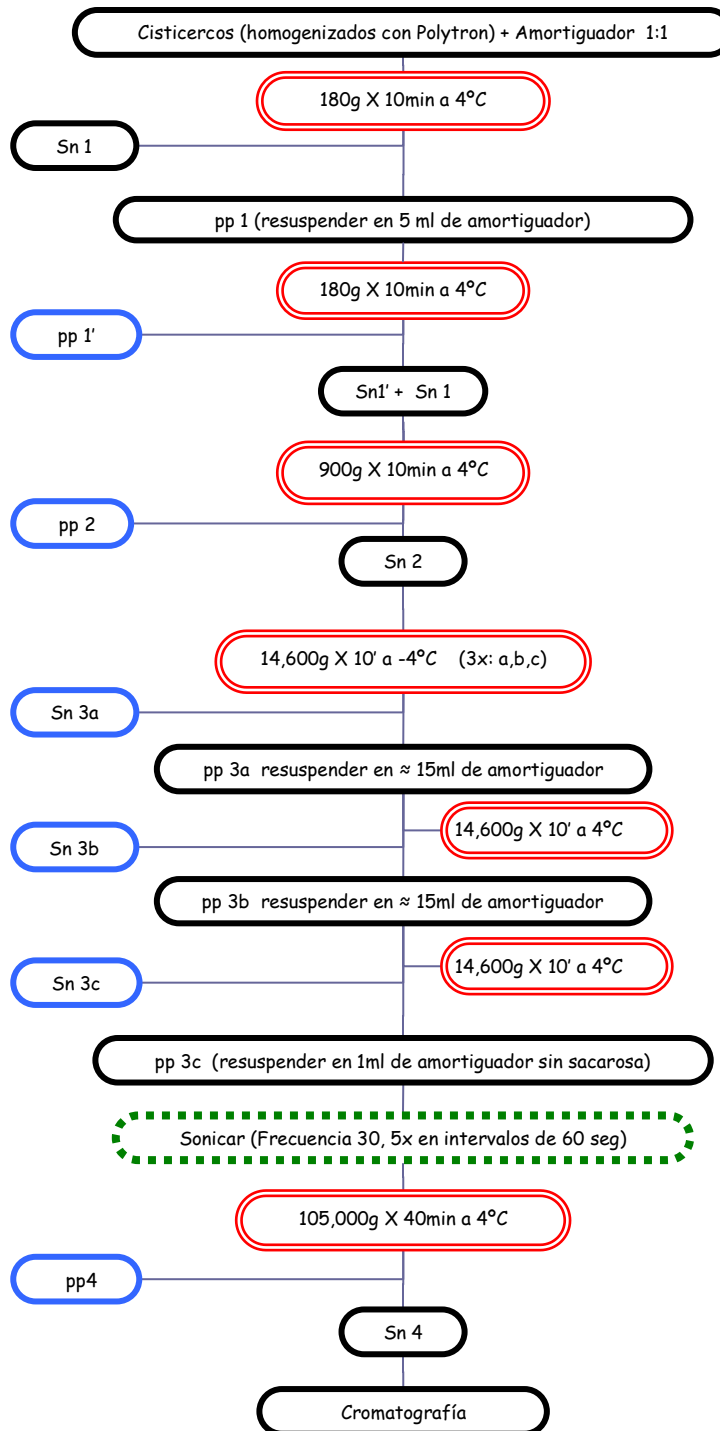
### **3.2.1. Homogenización de los cisticercos**

Se mezclaron veinticinco gramos de cisticercos en una relación 1gr:1ml con 100 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7) amortiguador de fosfatos con 0.24 M de sacarosa, 5 mM de etilen diamina tetra-acético de sodio (EDTA) y 84 µM de fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF).

La mezcla se homogenizó con un polytron (Brinkmann Instruments) a 1500 rpm a 4°C, realizando ciclos de un minuto de homogenado por otro de descanso hasta obtener una solución homogénea.

### **3.2.2. Obtención de la fracción mitocondrial**

La fracción mitocondrial se obtuvo siguiendo la técnica de del Arenal *et al*, 1998 (84) con algunas modificaciones (Fig. 2). Brevemente, el homogenizado de cisticercos se centrifugó por 10 minutos a 180g a 4 °C. El sobrenadante (sn1) se recuperó y el precipitado (pp1) se resuspendió en 5 ml de amortiguador de fosfatos y se volvió a centrifugar como se mencionó anteriormente. El precipitado resultante (pp1') se desechó y el sobrenadante (sn1') se recuperó y mezcló con el sobrenadante (sn1). Esta mezcla de sobrenadantes se centrifugó por 10 minutos a 900g a 4 °C. El precipitado resultante (pp2) se desechó y el sobrenadante (sn2) se recuperó y centrifugó por 10 minutos a 14,600g a 4 °C. El sobrenadante (sn3a) se desechó y el precipitado (pp3a) se resuspendió en 15 ml de amortiguador de fosfatos y se lavó con amortiguador de fosfatos dos veces mas repitiendo la última condición de centrifugación. Al final de los lavados, se obtuvo el precipitado pp3c que se resuspendió en 8ml de amortiguador de fosfatos y se dividió en cuatro alícuotas, A, B, C y D. Cada alícuota recibió un tratamiento diferente, en el siguiente subcapítulo se describe cada uno de ellos.



**Figura 2. Diagrama del proceso de centrifugación y ultracentrifugación diferencial que se uso para obtener la fracción mitocondrial de cisticercos de *T. solium*.**

### **3.2.3. Fraccionamiento y solubilización de las proteínas de las membranas mitocondriales**

Para determinar cuál era el mejor método para obtener la fracción soluble de las mitocondrias, se emplearon dos técnicas: ruptura mecánica (sonicado) y el uso del detergente Tritón X-100 para solubilizar las membranas mitocondriales, utilizando las alícuotas A, B, C y D de la fracción pp3c (Fig. 3).

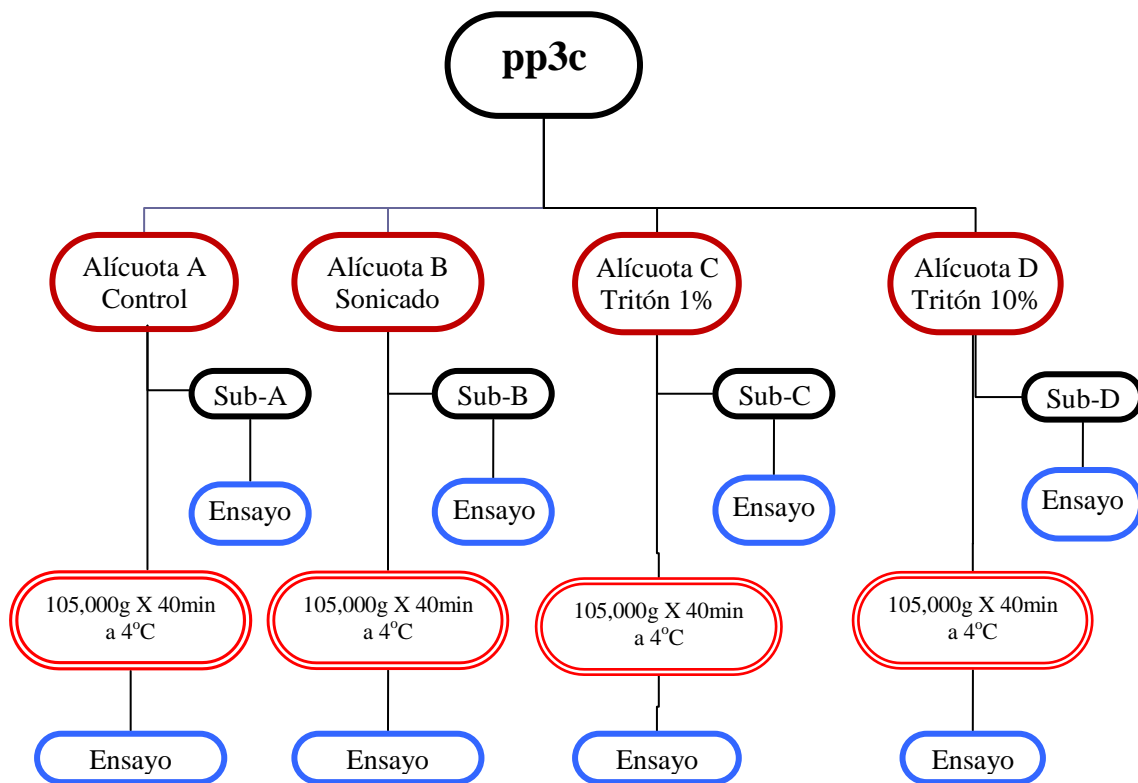
A las alícuotas C y D se les agregó solución amortiguadora con una concentración final de Tritón X-100 del 1 y 10% respectivamente.

La alícuota A no recibió ningún tratamiento, por lo que se consideró como control y la alícuota B se sonicó a 30 Hz, cinco veces en intervalos de 60 seg sonicado-descanso, a una temperatura de 4°C.

De cada una de las alícuotas tratadas y control, se apartó una sub-alícuota de 200 µl que se etiquetaron como sub A, sub B, sub C y sub D. El resto se ultracentrifugó durante 40 minutos a 105,000g a 4 °C.

Tanto a las alícuotas ultracentrifugadas como a las sub-alícuotas se les calculó su actividad específica en el sentido de la reducción del oxaloacetato siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5.

Al sobrenadante de la ultracentrifugación de la alícuota B se le denominó como Sn4 en la figura 2. Este sobrenadante (Sn4), contiene la fracción soluble de las mitocondrias, y se empleó para los estudios cromatográficos y de análisis por geles de poliacrilamida descritos más adelante.



**Figura 3. Diagrama del proceso para determinar el mejor método de solubilización de membranas mitocondriales.**

### 3.3. Cromatografía y obtención de la muestra de ensayo (fracción MDHm)

#### 3.3.1. Preparación de la resina QAE-Sefarosa y de la columna cromatográfica

En una columna de vidrio (Pharmacia Biotech) de 20 x 2 cm se empaquetaron 25 ml de QAE-Sefarosa (Amersham), posteriormente se lavó; primeramente se lavó con 50 ml de una solución de PBS (0.01M fosfato de sodio y 1 M NaCl) a pH=7.2, posteriormente se lavó con 50 ml de PBS (0.01M fosfato de sodio y 0.15M NaCl) a pH=7.2.

Una vez empacada y lavada, la resina se activó con 100 ml de 100 mM de tris-HCl (pH=8). Posteriormente se equilibró la resina con 100 ml del mismo amortiguador pero a una concentración de 10 mM (pH=8).



### **3.3.2. Cromatografía del sobrenadante Sn4**

Se dializaron exhaustivamente 2.3 ml del Sn4 obtenido de cisticercos (Fig. 2) en 10 mM de tris-HCL (pH=8), posteriormente, esta fracción se cromatografió en una columna de QAE-Sefarosa con las características descritas anteriormente, como se menciona a continuación:

El Sn4 se pasó por la columna de QAE-Sefarosa con un flujo de 19.2ml/hora utilizando como eluyente un amortiguador de 10 mM de tris-HCl, pH=8). Se continuó el lavado de la resina/columna pasando suficiente cantidad del eluyente. En un colector Biologic Biofrac Fraction Collector (BIO-RAD) se colectaron 117 fracciones totales de 0.8 ml a las cuáles se les hizo la lectura a 280 nm con un espectrofotómetro Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech) en celdas de cuarzo. La absorbancia a 280 nm indicó la presencia de proteínas en las fracciones colectadas (excluidas). Cuando el valor de absorbancia a 280 nm fue igual a cero se pasaron 40 ml de un gradiente de 0.4 gr de NaCl en 10 mM de tris-HCl, pH=8, colectando las fracciones correspondientes (eluídas).

A la mayoría de las fracciones colectadas se les determinó su actividad enzimática para la MDH en el sentido de la reducción del oxaloacetato (ver apartado 3.4). Las fracciones que resultaron con actividad enzimática se concentraron en un sistema de filtración Amicon, utilizando nitrógeno con presión negativa.

Al conjunto de fracciones excluidas con actividad enzimática (MDHm NADH) se le denominó como fracción MDHm y fue la que se empleó para los estudios cinéticos y de análisis por geles de poliacrilamida.

### **3.3.3. Electroforesis en geles de acrilamida y tinciones**

Las fracciones excluidas y eluídas de la cromatografía de QAE-Sefarosa se analizaron (visualizaron y separaron) utilizando la técnica SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15%. Se determinó el peso molecular de las bandas proteicas de las diferentes fracciones utilizando como controles marcadores de peso molecular (Amersham Biosciences 17-0446-01). Para teñir los geles se utilizaron dos técnicas de tinción, con azul de Coomassie y con nitrato de plata como se describe a continuación:

### Tinción con azul de Coomassie.

Al terminar la electroforesis la tinción con Azul de Coomassie se realizó por la inmersión del gel durante media hora en una solución de 1.25 gr de azul de Coomassie en 454 ml de metanol al 50% y 46 ml de ácido acético al 7%. Posteriormente, el gel se lavó con una solución de ácido acético al 10% en agua destilada; se realizaron varios cambios de esta solución hasta que se obtuvo solo la imagen de las bandas proteicas con un fondo transparente.

### Tinción con nitrato de plata.

- 1) Se colocó el gel en un recipiente y se agregaron 50 ml de solución fijadora.
- 2) Se agitó lentamente por 30 min.
- 3) Se hicieron tres lavados con agua MQ de 5 min cada uno.
- 4) Se retiró el agua, se agregó metanol al 50%\* y se agitó lentamente durante 30 min.
- 5) Se lavó con una solución de formaldehído al 0.1%\* durante 20 min en agitación.
- 6) Se hicieron dos lavados con agua MQ de 20 min cada uno.
- 7) Se colocó el gel en solución teñidora y se agitó lentamente de 15 a 20 min.
- 8) Se retiró la solución teñidora y se hicieron tres lavados rápidos con agua MQ.
- 9) Se lavó el gel con agua MQ durante 15 min en agitación.
- 10) Se eliminó el agua y se agregó la solución reveladora esperando el tiempo necesario hasta que apareció un bandeo que indicó la presencia de proteínas.
- 11) Una vez que se obtuvo el bandeo deseado se agregó la solución de paro por 5 min en agitación constante.
- 12) Finalmente se desechó la solución de paro y se agregó la solución de conservación.

### Soluciones usadas en la tinción con nitrato de plata:

a) Solución fijadora	Etanol	40 ml
	Ac. acético	10 ml
	Agua MQ aforar	100 ml
b) Solución teñidora	Hidróxido de sodio al 5.29%	1 ml
	Hidróxido de amonio	1 ml
	Nitrato de plata	400 mg
	Agua MQ aforar	100 ml

c) Solución reveladora	Concentrado de citratos**	100 $\mu$ l
	Formaldehído	25 $\mu$ l
	Agua MQ	50 ml
d) Solución de paro	Metanol	112.5 ml
	Ac. acético glacial	25 ml
	Agua MQ aforar	250 ml
e) Solución de conservación	Glicerol al 87%	11.5 ml
	Etanol	75 ml
	Agua MQ aforar	250 ml

\* Soluciones elaboradas con agua MQ.

\*\* Concentrado de citratos: 2.5 gr de citrato de sodio monohidratado, disueltos en 100 ml de agua MQ.

### **3.4. Determinación de la actividad enzimática de la malato deshidrogenasa mitocondrial (MDHm)**

La actividad enzimática de la MDHm se determinó al disminuir o aumentar la absorbancia del NADH, al ser reducido el oxaloacetato u oxidado el malato respectivamente, es decir que, se analizaron ambos sentidos de la actividad catalítica de la enzima. Para esto se utilizó un espectrofotómetro Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Biosciences), los ensayos se realizaron en celdas de cuarzo midiendo la absorbancia a 340 nm como se describe a continuación:

La reducción del oxaloacetato se observó al disminuir la absorbancia del NADH a 340 nm como se describe en Agüero *et al*, 1995 (51).

Para realizar este ensayo se utilizaron las siguientes soluciones:

- Amortiguador tris-HCL 50 mM (pH=8)
- 0.21 de mM  $\beta$ -NADH (Sigma N-8129 pm=709)
- 0.2 mM de ácido oxaloacético (Sigma O-4126 pm=132)

La oxidación del L-malato se apreció al aumentar la absorbancia del NADH a 340 nm como se describe en Yoon *et al*, 1988 (85).

Para este ensayo se utilizaron las siguientes soluciones:

- Amortiguador de glicina-NaOH 45 mM (pH=9.6)
- 3 mM de L-malato (Sigma M-1000 pm=34)
- 0.52 mM de NAD<sup>+</sup> (Sigma 7004 pm=663)

Para ambas pruebas el procedimiento fue:

En un mililitro del amortiguador deseado, que fue el volumen de reacción, se adicionaron los sustratos. La reacción se inició al incluir a la enzima. Se dejó desarrollar la catálisis por un minuto registrando los cambios de absorbancia en función del tiempo. Estos datos se analizaron posteriormente con el programa Origin Pro (Scientific Graphing and Analysis Software) de Origin ® 7SR2 Origin Lab Corporation. De esta manera se obtuvieron los datos de velocidad inicial o cambio de absorbancia en el tiempo, con lo que posteriormente se pudo calcular la actividad específica de la enzima.

### 3.5. Cálculo de la actividad específica

Con los ensayos de velocidad de reacción catalizados por la enzima se construyeron gráficas del cambio de absorbancia en función del tiempo ( $\Delta \text{ abs/t}$ ). De estas gráficas se obtuvo el valor de la pendiente y por medio de la fórmula 1 (ver más adelante) se obtuvo el valor de la densidad óptica por mililitro o volumen de reacción. Ahora, el resultado obtenido de la fórmula 1 se dividió entre la concentración de la MDHm en mg/ml, empleada en el ensayo para obtener el cambio de absorbancia  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (ver fórmula 2).

$$m \times \frac{1 \text{ ml}}{\text{vol muestra}} = \Delta \text{ ABS/ml o D.O./ml}$$

Donde m= pendiente (Fórmula 1)

$$\frac{\text{D.O./ml}}{\text{Enzima mg/ml}} = \text{D.O. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \quad \text{Cambio de absorbancia (Fórmula 2)}$$

Con el valor del cambio de absorbancia  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  (fórmula 2) se calculó la actividad específica de la enzima. Para ello, se dividió este valor entre el coeficiente de extinción de la enzima  $\epsilon = 6.22$  dando como resultado  $\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  (ver fórmula 3). Finalmente, este dato se transformó a  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de sustrato transformado.

$$\frac{D.O. \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}}{6.22} = \text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \quad \text{Actividad específica} \quad (\text{Fórmula 3})$$

### 3.6. Determinación de la actividad catalítica de la MDHm en función de la temperatura

Para determinar la estabilidad de la MDHm en función de la temperatura, diversas alícuotas de la MDHm con una concentración de 0.16 mg /ml se incubaron durante 5 min en un rango de temperaturas de 5 a 65°C a intervalos de 5°C (13 temperaturas diferentes). Inmediatamente después, se evaluó su actividad específica en el ensayo de la reducción del oxaloacetato a temperatura ambiente, como se describió anteriormente.

### 3.7. Determinación del pH óptimo de reacción

El pH óptimo de reacción de la MDHm se determinó utilizando una mezcla de amortiguadores con 50 mM de cada una de las siguientes sales: citrato de sodio-ácido cítrico, fosfato de sodio y trishidroximetilaminometano que formaron el amortiguador de ensayo. Para realizar el ensayo enzimático a un determinado pH, primeramente se ajustó el pH deseado al amortiguador de ensayo; posteriormente se adicionaron los sustratos. La reacción se inició al agregar 1.6  $\mu\text{g}$  de la MDHm en un mililitro de volumen total de ensayo. Inmediatamente después se registró el cambio de absorbancia a 340 nm durante un minuto.

Los amortiguadores de ensayo se ajustaron en un rango de pH's de 4.0 a 12 con intervalos de 0.5 de pH.

### 3.8. Determinación de la estabilidad de la actividad catalítica de la MDHm en función del pH

Se evaluó la estabilidad de la MDHm a diferentes pH's dializando durante 20 h diversas alícuotas de la enzima, cada una con 40  $\mu$ l de la muestra MDHm NADH, en diferentes amortiguadores. Los amortiguadores que se emplearon cubrieron un rango de pH's de 4 a 12 tabla (1).

Al finalizar la diálisis se evaluó, para cada alícuota dializada, su actividad enzimática en el sentido de la reducción del oxaloacetato. En un ml final de ensayo se agregó amortiguador de ensayo convencional (pH=8) mas sustratos. La reacción se inició al agregar 10  $\mu$ l de la MDHm. Los valores del cambio de absorbancia a 340 nm durante un minuto se determinaron y analizaron como se mencionó anteriormente.

**Tabla 1. Amortiguadores y pH's a los cuales se ajustaron para determinar el pH óptimo de reacción y la estabilidad al pH.**

<b>Amortiguador</b>	<b>pH</b>
50 mM Citrato de sodio	
50 mM Ácido cítrico	4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0
50 mM Fosfato de sodio monobásico	
50 mM Fosfato de sodio dibásico	6.5, 7.0, 7.5, 8.0
50 mM Tris - HCL	8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0

### 3.9. Determinación de las constantes catalíticas de la MDHm

Para determinar las constantes catalíticas de la enzima para sus co-sustratos y sustratos se realizaron diversos ensayos de la velocidad inicial catalizados por la enzima y evaluados espectrofotométricamente a 340 nm. Para el sentido de la reducción del oxaloacetato y determinación de la  $K_{m(\text{oxaloacetato})}$  y  $V_{\text{max}(\text{oxaloacetato})}$ , se mantuvo fija la concentración de la MDHm (3  $\mu\text{g}$ ) y a saturación la del NADH (0.21 mM), mientras que la concentración del oxaloacetato se varió en un intervalo de 0.005 a 0.5 mM (Tabla 2). Para determinar las constantes catalíticas correspondientes para el NADH, se realizaron ensayos similares a los anteriores variando la concentración del NADH en un intervalo de 0.005 a 0.5 mM, y manteniendo a saturación la del oxaloacetato (0.2 mM), (Tabla 2). Para obtener los datos correspondientes al sentido de la oxidación del malato y determinación de la  $K_{m(\text{malato})}$  y  $V_{\text{max}(\text{malato})}$ , se mantuvo fija la concentración de la MDHm (1.6  $\mu\text{g}$ ) y a saturación la del  $\text{NAD}^+$  (0.52 mM), mientras que la concentración del malato se varió en un intervalo de 0.05 a 6 mM (Tabla 3). Para determinar las constantes catalíticas correspondientes para el  $\text{NAD}^+$ , se realizaron ensayos similares a los anteriores variando la concentración del  $\text{NAD}^+$  en un intervalo de 0.0065 a 1.3 mM, manteniendo a saturación la del malato (3 mM) (Tabla 3).

**Tabla 2. Concentraciones de oxaloacetato y NADH empleadas para determinar el valor de  $K_m$  y  $V_{\text{max}}$  de la MDHm para estos reactivos.\***

<b>NADH mM</b>	<b>Oxaloacetato mM</b>
0.005	0.005
0.0075	0.0075
0.01	0.01
0.025	0.025
0.05	0.05
0.075	0.075
0.1	0.1
0.2	0.2
0.3	0.3
0.5	0.5

\* Cuando el NADH fue la sustancia variable el oxaloacetato se mantuvo constante a 0.2 mM, mientras que cuando el oxaloacetato fue el que se varió, el NADH permaneció constante a 0.21 mM.

**Tabla 3. Concentraciones de malato y NAD<sup>+</sup> empleadas para determinar el valor de Km y Vmax de la MDHm para estos reactivos.\***

<b>NAD<sup>+</sup> mM</b>	<b>Malato mM</b>
0.0065	0.05
0.013	0.125
0.026	0.25
0.052	0.5
0.104	0.75
0.26	1.05
0.52	1.5
0.78	3
1.04	4.5
1.3	6

**\*Cuando el NAD<sup>+</sup> fue la sustancia variable el malato se mantuvo constante a 3 mM, mientras que, cuando el malato fue el que se varió, el NAD<sup>+</sup> permaneció constante a 0.52 mM.**

Los datos obtenidos en estos ensayos se analizaron con el programa Origin Pro (Scientific Graphing and Analysis Software) de Origin ® 7SR2 Origin Lab Corporation, para calcular las Km's y Vmax de la enzima para estos sustratos.

### **3.10. Inhibición de la actividad catalítica de la MDHm**

Los estudios de inhibición se desarrollaron para determinar los valores de I<sub>50</sub> de diversos compuestos por el procedimiento descrito por Tahir y Mannervik (86). La I<sub>50</sub> se define como la concentración de inhibidor necesaria para producir el 50% de inhibición en el ensayo enzimático estándar.

Las sustancias inhibitoras que se utilizaron fueron el piruvato de sodio y el arsenito de sodio. La cantidad de cada inhibidor evaluada se describe en la Tabla 4.



Se utilizaron concentraciones variables de inhibidores diluidos en el amortiguador de ensayo (Tabla 4). El inhibidor se adicionó al amortiguador de ensayo y posteriormente se agregó una alícuota de NADH (0.21 mM) ó NAD<sup>+</sup> (0.52 mM). La mezcla se dejó equilibrar por unos segundos y se inició la reacción al agregar MDHm (1.32 µg). El volumen final de la reacción fue de 1 ml. El cambio de absorbancia se registró a 340 nm durante 90 segundos. Estos ensayos se realizaron para la reducción del oxaloacetato y para la oxidación del malato.

El grupo de datos correspondientes para cada inhibidor se graficó como el % de la actividad residual frente al logaritmo de la concentración del inhibidor. El valor de la I<sub>50</sub> se determinó al interpolar del punto de la gráfica que definió el 50% de actividad específica al de la concentración del inhibidor.

**Tabla 4. Concentraciones de sustratos e inhibidores para obtener la I<sub>50</sub> del Arsenito y el Piruvato.**

Sustratos constantes*		Concentraciones de los inhibidores	
Reducción del oxaloacetato		Arsenito mM	Piruvato mM
Oxaloacetato	NADH	2.5	4
0.2 mM	0.21 mM	5	10
		10	20
		25	40
		50	80
Oxidación del malato			
Malato	NAD <sup>+</sup>	100	100
3 mM	0.52 mM	250	150
		500	200

\*Las concentraciones de los sustratos fueron constantes para los dos ensayos (reducción del oxaloacetato y oxidación del malato).

### 3.11. Tipo de inhibición del piruvato de sodio sobre la MDHm y constantes inhibitorias (K<sub>i</sub>)

El tipo de inhibición que el piruvato de sodio efectuó sobre la MDHm en la reacción de reducción del oxaloacetato fue estudiado por medio de sistemas de inhibición simple (86). El procedimiento para llevarlos a cabo consistió en obtener los datos de las velocidades iniciales de la catálisis de la enzima influida por las sustancias inhibitorias.

Para evaluar la acción inhibitoria del piruvato de sodio en la reducción del oxaloacetato se emplearon las concentraciones de NADH descritas en la tabla 5, el oxaloacetato se mantuvo constante (0.2 mM) al igual que el piruvato (138 mM). Después de cinco minutos de incubación de los reactivos en el amortiguador de ensayo se inició la reacción enzimática al añadir la MDHm, el volumen de la reacción fue de 1 ml. El registro espectrofotométrico del ensayo a 340 nm se realizó durante un minuto y medio. El conjunto de datos generados de esta forma sirvió para construir una recta en un sistema de Lineweaver-Burk, donde se graficó el inverso de la velocidad inicial frente al inverso de la concentración de oxaloacetato, linealizando los valores que representan la velocidad de la MDHm para la concentración de 138 mM del piruvato. Se construyó otra recta de este tipo en ausencia de inhibidor para utilizarla como control.

El comportamiento de las rectas, por el patrón de intersección tanto en el eje de las ordenadas ( $1/V_0$ ) como en el de las abscisas ( $1/[NADH]$ ), definió el tipo de inhibición. El valor de la constante inhibitoria ( $K_i$ ) para el piruvato se calculó al re-graficar los valores de los interceptos en el eje de las ordenadas, originados de la primera grafica de Lineweaver-Burk frente a la concentración del inhibidor.

**Tabla 5. Concentración de sustratos e inhibidor, para obtener el tipo de inhibición del piruvato en el ensayo de reducción del oxaloacetato.**

Reactivos constantes		NADH mM
		0.001
<b>Sustrato</b>		0.0025
Oxaloacetato	0.2 mM	0.005
		0.0075
		0.01
<b>Inhibidor ≈60 %</b>		0.025
Piruvato *	138 mM	0.05
		0.075

**\*Se hace una serie sin inhibidor como control**

### 3.12. Análisis de péptidos

Para el análisis de péptidos, se corrieron en un gel de acrilamida dos muestras:

- A) 30  $\mu$ l de la fracción excluída con 30  $\mu$ g de MDHm determinada con el ensayo de reducción del oxaloacetato se concentró a 10  $\mu$ l con un filtro minicon (Millipore) para aplicarse al gel.
- B) 50  $\mu$ l de la fracción eluída con 2  $\mu$ g de MDHm determinada con el ensayo de oxidación del malato se concentró a 12  $\mu$ l con un filtro minicon (Millipore) para aplicarse al gel.

El gel de acrilamida al 15% se cargó con las MDHs excluída y eluída y se corrió a 105 volts y 3 mAmp durante 3 horas y 15 minutos.

La fracción MDHm excluída de la cromatografía de QAE-Sefarosa mostró una banda de  $\sim$  35 kDa. Debido a que las subunidades de las MDH's pesan aproximadamente este valor se decidió analizar esta banda en cuanto a su composición de péptidos. Estas bandas fueron analizadas por espectrometría de masas, trabajo que realizó el Dr. Mendoza en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

## 4. RESULTADOS.

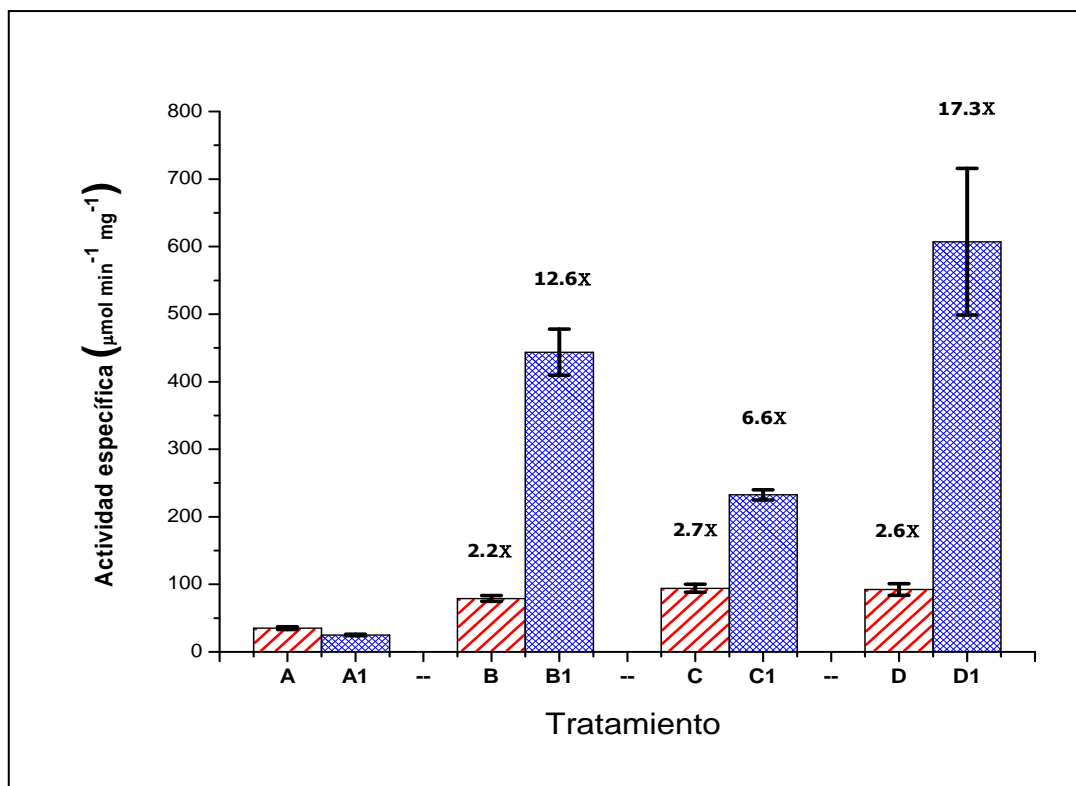
Los resultados obtenidos en los experimentos y posteriores análisis descritos anteriormente, se presentan en este capítulo, siguiendo la metodología general descrita en el apartado 3 (materiales y métodos).

### 4.1. Purificación de la fracción mitocondrial

De los tejidos del cisticerco de *T. solium* sometidos a un proceso de centrifugación diferencial se obtuvo una concentración de 3.4 mg/ml de proteína total obtenida en la fracción mitocondrial llamada pp3c la cual se resuspendió en amortiguador de fosfatos (Fig. 2).

Los procedimientos para fraccionar y solubilizar las membranas mitocondriales indicaron que es un requisito llevarlos a cabo para liberar a la MDHm de la matriz mitocondrial. Se detectó una actividad enzimática para la MDHm muy baja ( $35 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) en la fracción mitocondrial que no se trató con detergentes o sonicación (A, Fig. 4) al igual que en el sobrenadante (A1, Fig. 4) después de ultracentrifugarla ( $25 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). En la misma fracción (pp3c) después de haberla sonificado (B, Fig. 4), se observó un incremento de 2.2 veces de la actividad enzimática. Posteriormente esta fracción (pp3c) sonicada se ultracentrifugó, y en el sobrenadante (B1, Fig. 4) se obtuvo un aumento de 12.6 veces de la actividad catalítica con respecto al control (A, Fig. 4). De igual forma, el tratamiento del pp3c con el detergente Tritón X-100 permitió la liberación de la MDHm de esta fracción. Ya que los sobrenadantes de las fracciones del pp3c que fueron tratados con Tritón X-100 al 1 y 10 % y ultracentrifugados, se incrementó la actividad 6.6 (C1, Fig. 4) y 17.3 veces (D1, Fig. 4) respectivamente.

Los datos de actividad enzimática en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  del control y de los tratamientos que se usaron para fraccionar ó solubilizar las membranas mitocondriales se encuentran resumidos en la tabla 6.



**Figura 4.** Actividad específica de la MDHm de la fracción pp3c (fracción mitocondrial), ultracentrifugada o no, bajo dos tratamientos para solubilizar las proteínas mitocondriales (sonicación o tritón). A) pp3c sin tratamiento, A1) sobrenadante de ultracentrifugado de (A), B) pp3c sonicado, B1) sobrenadante del ultracentrifugado de (B), C) pp3c solubilizado con tritón al 1%, C1) sobrenadante del ultracentrifugado de (C), D) pp3c solubilizado con tritón al 10%, D1) sobrenadante del ultracentrifugado de (D). Los números sobre las columnas corresponden al número de veces que se incrementó la actividad con respecto al control (A).

**Tabla 6.** Actividad enzimática (µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) de los tratamientos probados para fraccionar ó solubilizar las membranas mitocondriales.\*

Tratamiento	pp3c (serie X )	Sn de la ultracentrifugación del pp3c (serie X1 )
Control (A)	35.086	25.111
Sonicado (B)	78.967	443.729
Tritón 1% (C)	94.129	232.500
Tritón 10% (D)	92.469	607.181

\*Los datos corresponden a la gráfica de la figura 4.

## 4.2. Cromatografías de la fracción soluble de la mitocondria (Sn4) en QAE-Sefarosa

El pasar la muestra Sn4 (fracción soluble de la mitocondria) por una cromatografía de QAE-Sefarosa, resultó en fraccionamiento de proteínas con carga positiva (fracción excluída Figs. 5 y 6) y de proteínas cargadas negativamente (fracción eluída Fig. 7). La velocidad inicial para la enzima MDHm en las fracciones excluída y eluída fue de  $72.8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$  (Fig. 5) y  $3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$  (Fig.7a), respectivamente.

La actividad enzimática que se detectó en las fracciones excluídas fue determinada con el ensayo de reducción del oxaloacetato utilizando al NADH como sustrato, lo que nos indica la presencia de una MDH (EC 1.1.1.37) en estas fracciones.

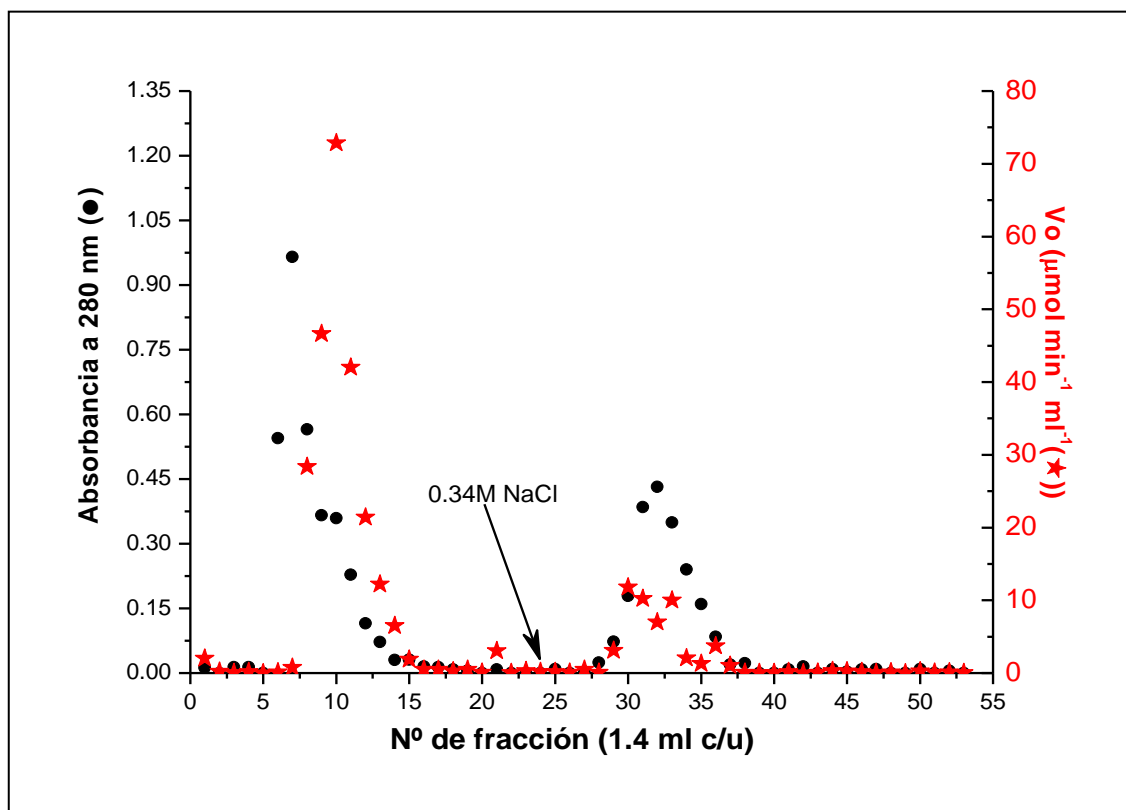
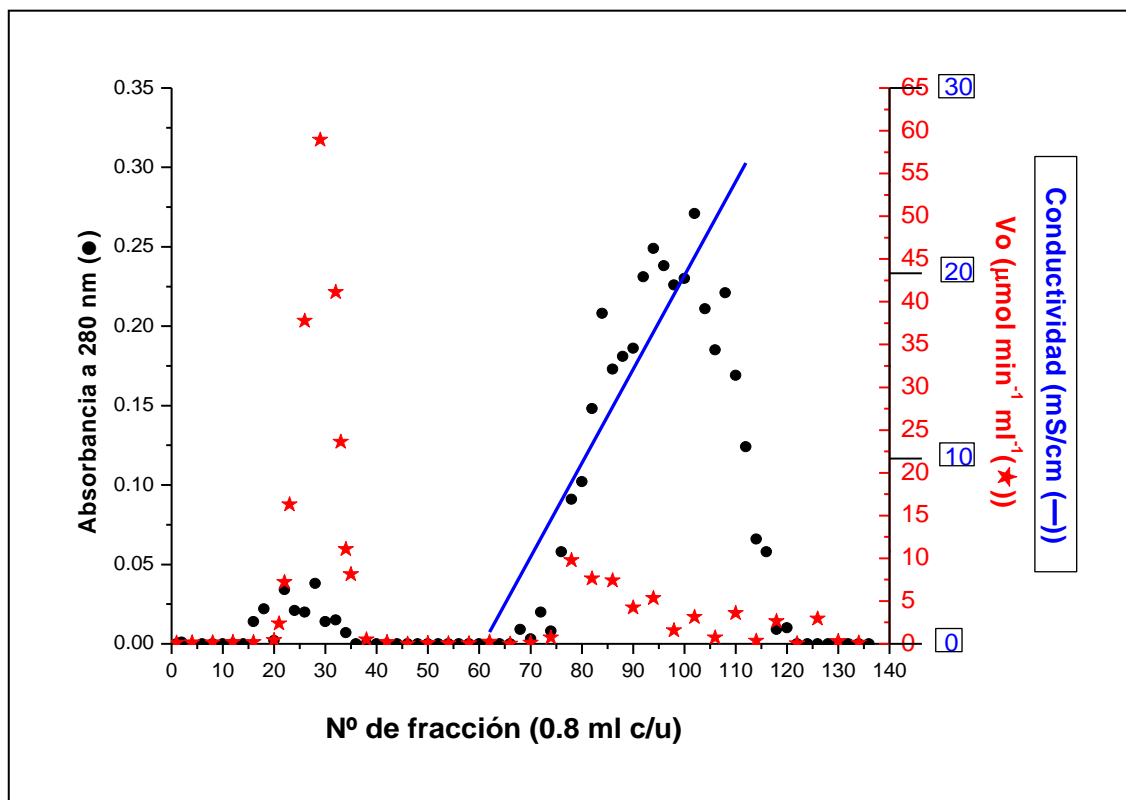


Figura 5. Cromatografía de la fracción soluble de la mitocondria Sn4 de cisticercos de *T. solium* realizada en QAE-Sefarosa. Se muestra la presencia de dos isoformas de MDHm diferenciadas por su carga eléctrica. El ensayo utilizado para determinar la Vo de la MDHm fue, el de reducción del oxaloacetato.



**Figura 6. Cromatografía de la fracción soluble de la mitocondria Sn4 de cisticercos de *T. solium* realizada en QAE-Sefarosa. El ensayo utilizado para determinar la  $V_o$  de la MDHm fue, el de reducción del oxaloacetato usando al NADH como sustrato.**

Adicionalmente, en la fracción eluída de la columna QAE-Sefarosa se detectó actividad para otra enzima MDHm (MDH EC.1.1.1.40), también conocida como enzima málica. Esta actividad se detectó utilizando el ensayo de oxidación del L-malato con  $NADP^+$  como sustrato (Fig. 7).

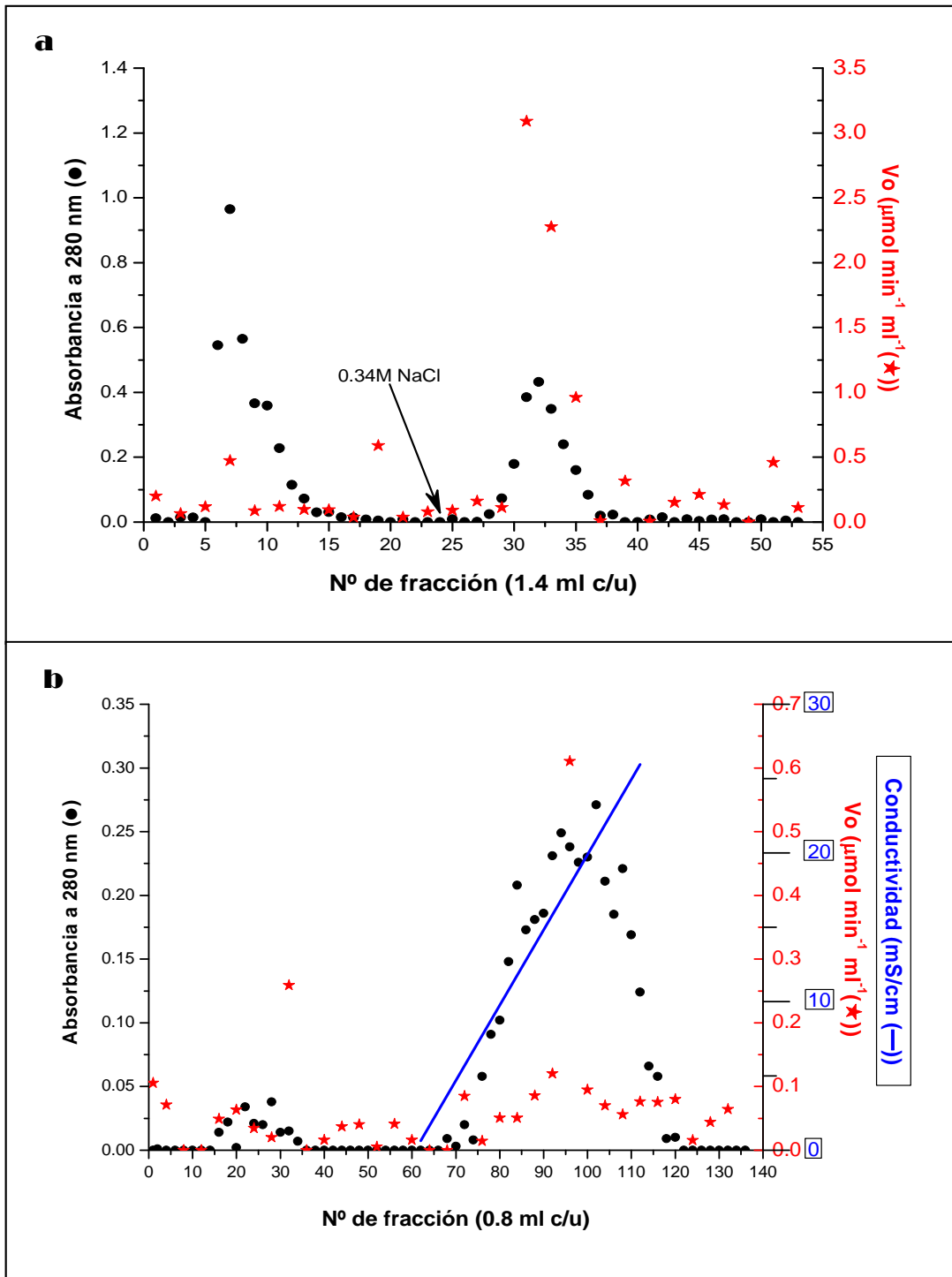
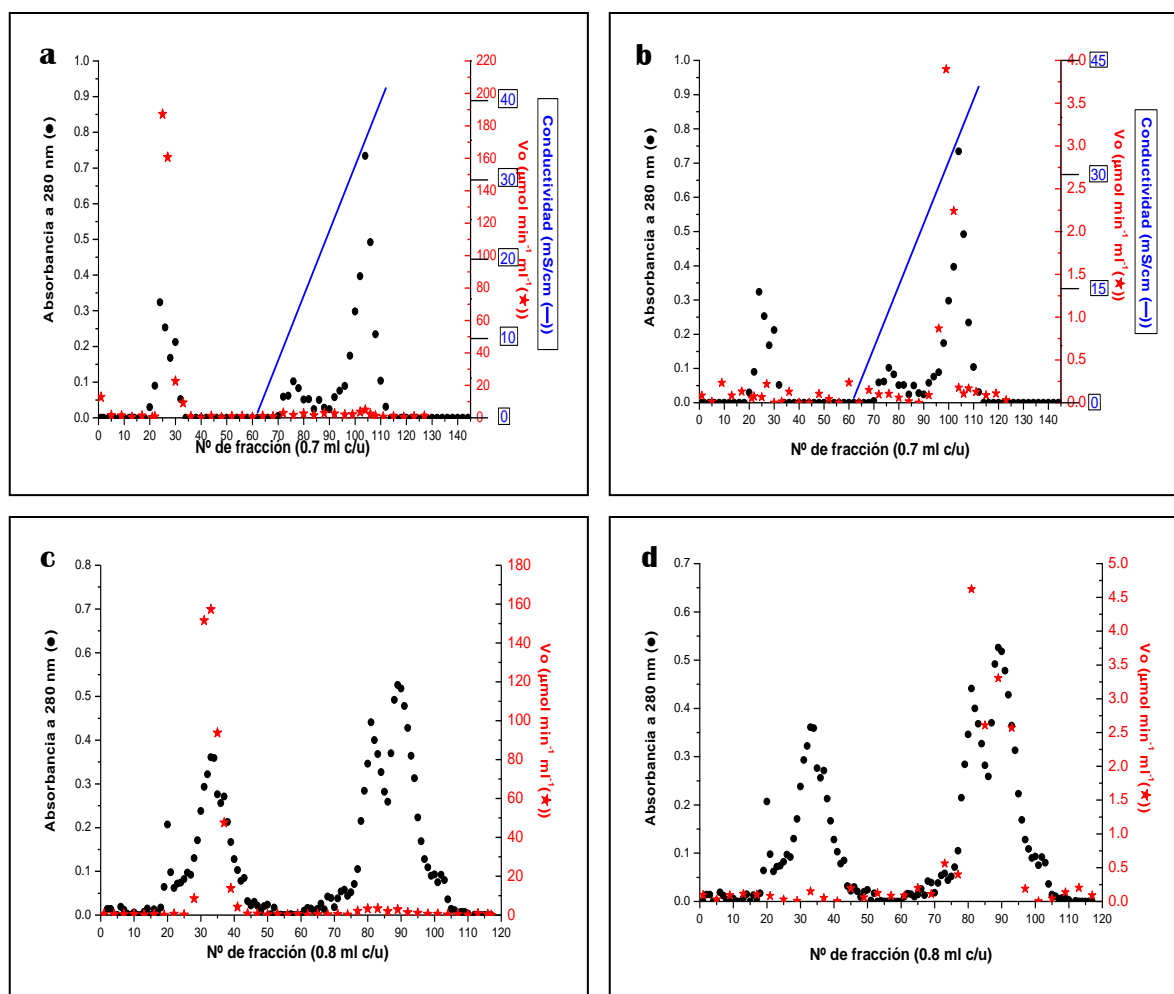


Figura 7. Cromatografías de la fracción soluble de la mitocondria Sn4 de cisticercos de *T. solium* realizadas en QAE-Sefarosa. El ensayo utilizado para determinar la  $V_o$  de la MDHm fue, el de oxidación del L-malato, usando al  $NADP^+$  como sustrato. Puede verse que tanto la conductividad, como la presencia de proteína son idénticas a las gráficas anteriores **a**) fig. 5 y **b**) fig. 6; sin embargo a diferencia de éstas, los valores más altos de  $V_o$  se encuentran en las fracciones eluidas.



Los anteriores patrones cromatográficos fueron consistentes con siete replicas realizadas en este trabajo, de las cuales se muestran otros dos ejemplos en la figura 8.

En estos ejemplos las gráficas 8a y 8b pertenecen a una misma cromatografía, pero nos indican los valores de  $V_o$  para diferentes ensayos enzimáticos, reducción del oxaloacetato (8a) y oxidación del malato (8b). De la misma manera las gráficas 8c y 8d son de una misma cromatografía, con diferentes ensayos de actividad enzimática, reducción del oxaloacetato (8c) y oxidación del malato (8d).

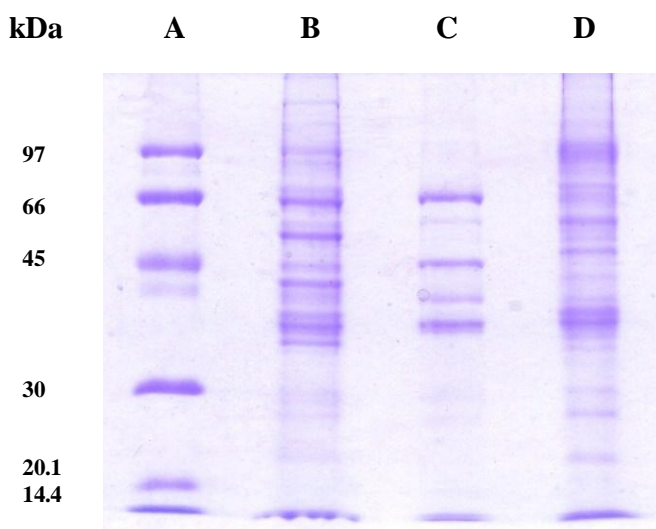


**Figura 8. Distintas cromatografías de la fracción soluble de la mitocondria Sn4 de cisticercos de *T. solium* realizadas en QAE-Sefarosa, en las que se utilizaron los ensayos de reducción del oxaloacetato usando como sustrato al NADH (a, c) y oxidación del L-malato con el  $\text{NADP}^+$  como sustrato (b, d).**

### 4.3. Análisis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

Las fracciones obtenidas de la cromatografía en la columna de QAE-Sefarosa, así como la fracción soluble de la mitocondria (Sn4) se analizaron en diferentes geles de acrilamida con la técnica SDS-PAGE, los resultados de estos análisis fueron consistentes con los de la figura 9. En esta figura se observa un gel de acrilamida al 15% con tinción de azul de coomassie, en el que además de los marcadores de peso molecular (carril A), se corrieron tres muestras más: la fracción soluble de la mitocondria Sn4 (carril B), la fracción excluída MDHm NADH (carril C) y la fracción eluída MDHm NADP<sup>+</sup> (carril D). En todos los carriles se puede observar un enriquecimiento en la zona de ~35 kDa que corresponde con el peso molecular de los monómeros de la MDH.

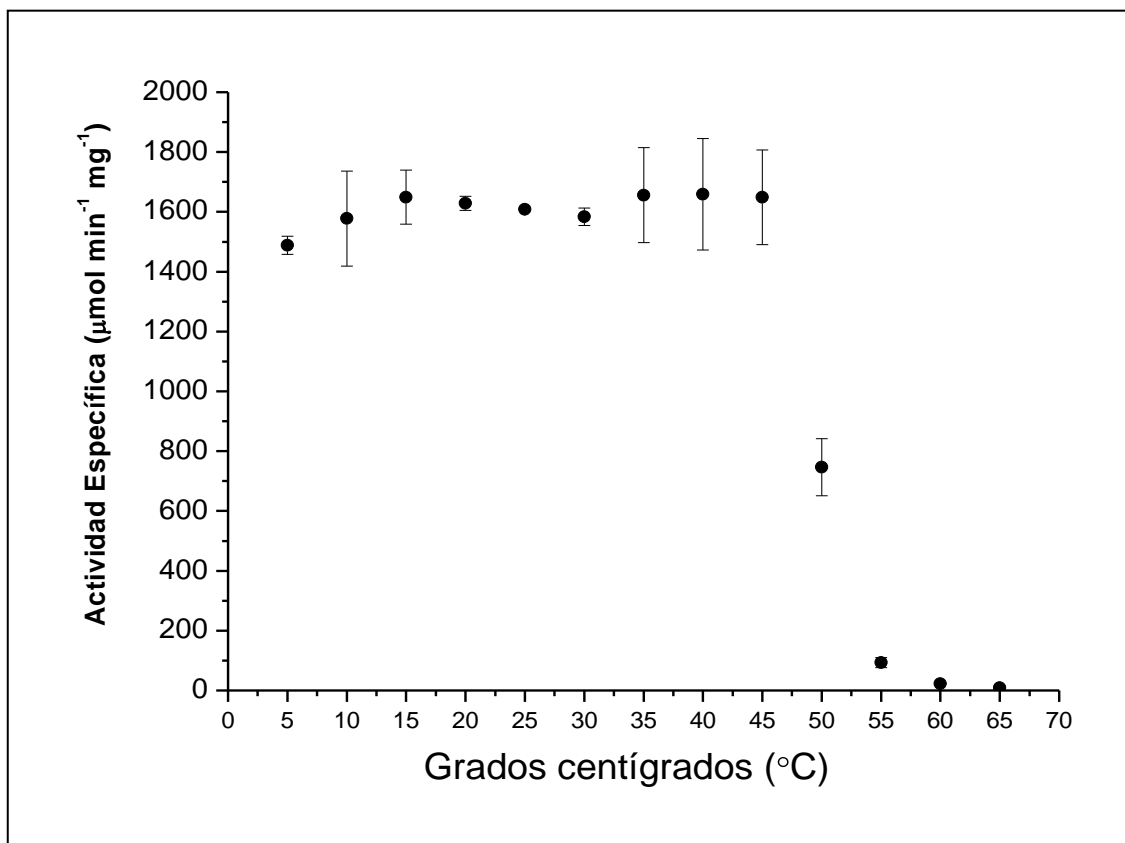
Las bandas de ~35 kDa de la fracción excluída de la MDHm fueron analizadas por espectrometría de masas, resultando que los péptidos: VVIIPAGVPR, LFGVTTLDIR, IQNAGTEVVNAK y FANSLHAMK fueron revelados para la MDHm y coincidieron en el orden de 96-105, 167-177, 231-242 y 260-269 para la secuencia de aminoácidos reportada para la MDHm de *Echinococcus granulosus*.



**Figura 9. SDS-PAGE de la fracción soluble de la mitocondria (Sn4) y fracciones obtenidas de la columna QAE-Sefarosa. Carril A. Marcadores de peso molecular, Carril B. Fracción soluble de la mitocondria (Sn4), Carril C. Fracción excluída MDHm NADH y Carril D. Fracción eluída MDHm NADP<sup>+</sup>. Se utilizó la acrilamida 15% y tinción con azul de coomassie.**

#### 4.4. Efecto de la temperatura en la actividad catalítica de la MDHm

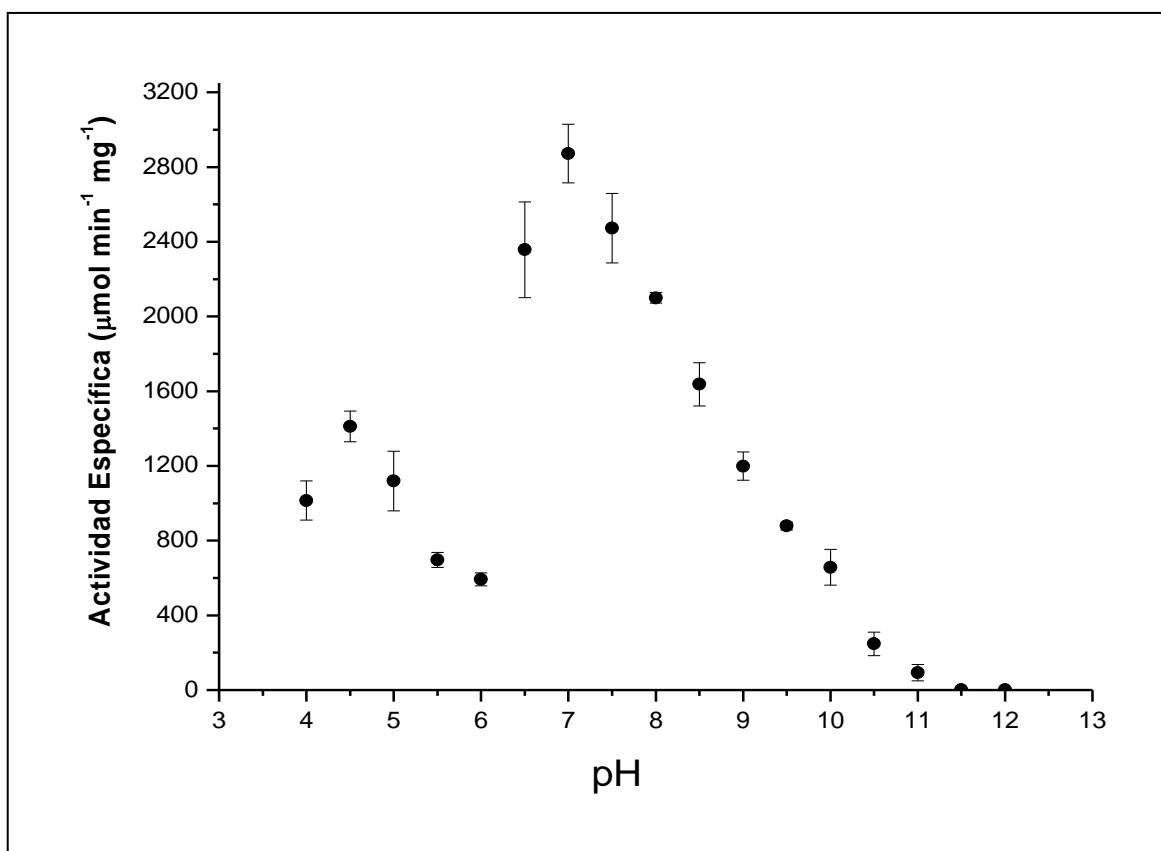
En la gráfica de la figura 10 se puede observar el efecto de la temperatura sobre la actividad específica de la MDHm de cisticercos de *T. solium*. En la misma se aprecia que el rango óptimo de temperatura para la reacción de la MDHm usando oxaloacetato como sustrato, fue entre 5 y 45 °C, siendo a los 40 °C donde presenta su actividad específica más alta (Tabla 7). Es a partir de los 50 °C cuando disminuye su actividad. La actividad específica de la MDHm es cero cuando la temperatura es de 65 °C o superior.



**Figura 10.** Efecto de la Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) sobre la Actividad Específica ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) de la MDHm de cisticercos de *T. solium*, en el ensayo de reducción del oxaloacetato. La MDHm mostró actividad en el intervalo entre 5 a 45  $^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5. pH óptimo de reacción para la MDHm

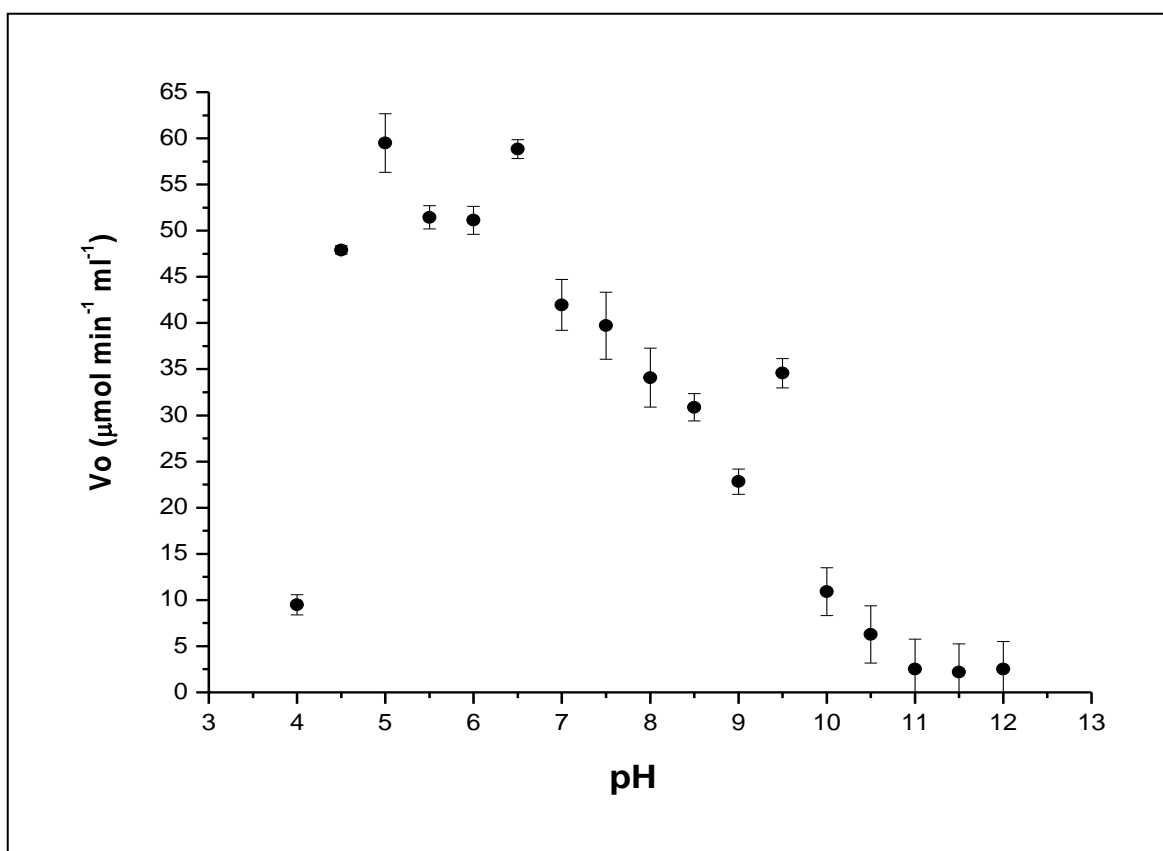
En la figura 11 puede observarse el efecto del pH en la actividad enzimática de la MDHm de cisticercos de *T. solium*. En esta gráfica el pH óptimo para la reacción catalítica fue de 7 (Tabla7), en la reacción de reducción del oxaloacetato, a partir de este punto la actividad específica de la enzima decrece si se aumenta o disminuye el pH.



**Figura 11.** Actividad Específica de la MDHm ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) de cisticercos de *T. solium* con el ensayo de reducción del oxaloacetato. El pH óptimo para la reacción catalítica es de 7, y decrece a ambos lados a partir de este punto.

#### 4.6. Efecto del pH en la estabilidad catalítica de la MDHm

En la figura 12 se observa la estabilidad de la actividad catalítica de la MDHm de cisticercos de *T. solium* en función del pH al cual estuvo sometida durante 20 horas. La gráfica muestra que la actividad de la MDHm del parásito fue estable en el intervalo entre pH 5 - 6.5, que son los pH's en los que en los que la enzima logra conservar sus grupos ionizables en una forma apropiada para mantener la conformación de su sitio activo, a partir de estos valores la actividad empieza a decrecer debido a la desnaturalización de la MDHm. El pH óptimo de estabilidad de la MDHm fue a pH=5 (Tabla 7).



**Figura 12.** Efecto del pH sobre la estabilidad de la MDHm de cisticercos de *T. solium*, midiendo la actividad enzimática ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ) en el ensayo de reducción del oxaloacetato.

En la tabla 7 pueden observarse las características principales de la MDHm de cisticercos de *T. solium*.

**Tabla 7. Valores óptimos de reacción de la MDHm de cisticercos *T. solium*, con respecto al pH y la temperatura, para el ensayo de reducción del oxaloacetato.**

	Intervalo	Valor óptimo
pH reacción	7	7
pH estabilidad	5 - 6.5	5
Temperatura °C	5 - 45	40

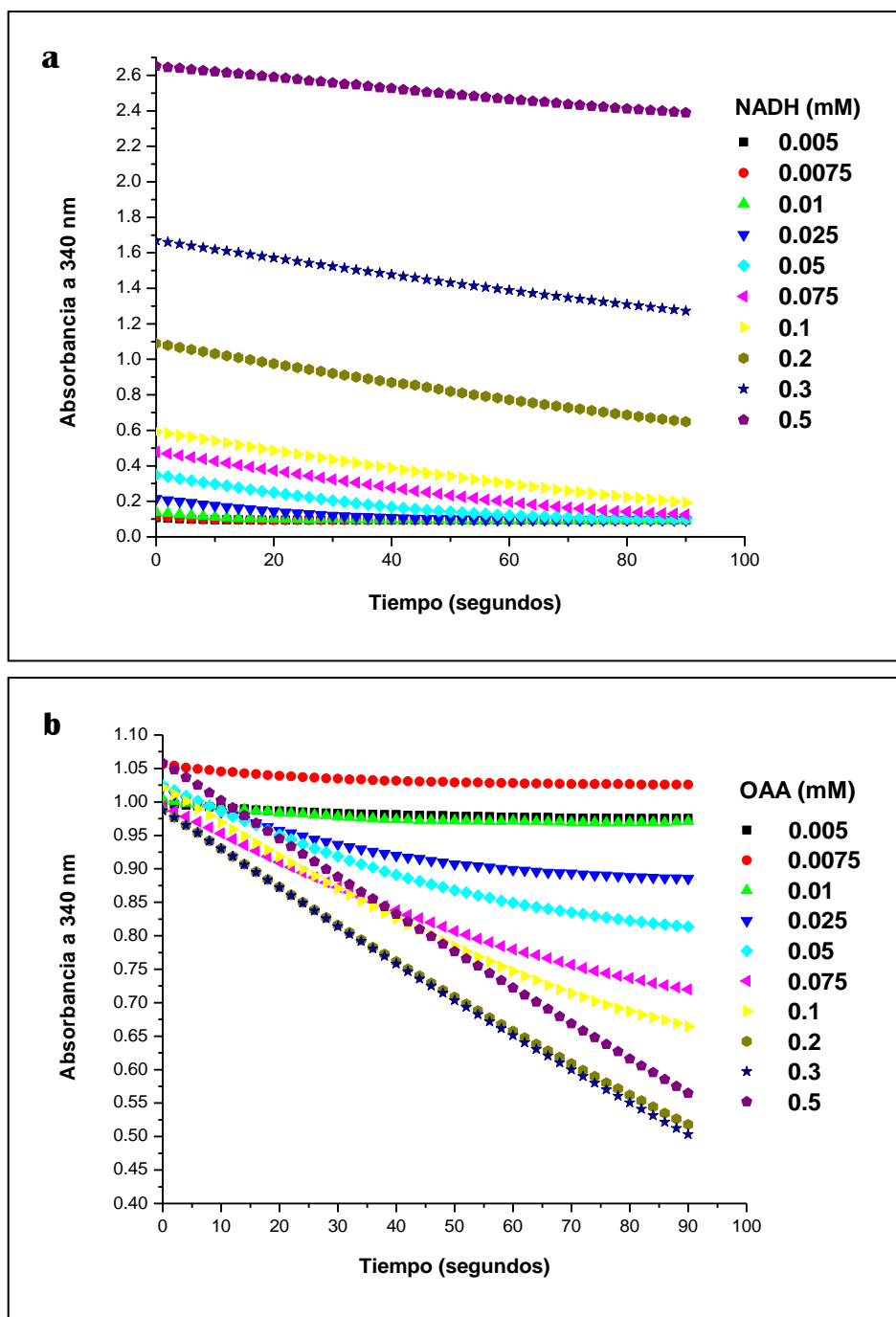
#### 4.7. Constantes catalíticas de la MDHm

La (Fig. 13a) presenta los resultados de la evaluación del cambio de absorbancia por unidad de tiempo de las reacciones enzimáticas de la MDHm en el sentido de la reducción del oxaloacetato, utilizando diversas concentraciones de NADH (0.005, 0.0075, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.5 mM) y a concentración saturante de oxaloacetato (0.2 mM). En esta figura se observa que las pendientes de las rectas aumentaron conforme se incrementó la concentración de NADH hasta no mostrar cambios a niveles de saturación del nucleótido. De manera similar, la figura 13b, muestra los resultados de las reacciones enzimáticas de la MDHm con diversas concentraciones del oxaloacetato (0.005, 0.0075, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.5 mM) y la del NADH a saturación (0.21 mM). Podemos observar en ambas gráficas un comportamiento semejante.

Para determinar las constantes catalíticas de la MDHm en el sentido de la oxidación del malato, se evaluó el cambio de absorbancia por unidad de tiempo utilizando diversas concentraciones de NAD<sup>+</sup> (0.0065, 0.013, 0.026, 0.052, 0.104, 0.26, 0.52, 0.78, 1.04 y 1.3 mM) y una saturante de malato, 3 mM (Fig 14a). La figura 14b, ilustra los resultados de las reacciones enzimáticas de la MDHm con diversas concentraciones de malato (0.05, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.05, 1.5, 3, 4.5 y 6 mM) y la del NAD<sup>+</sup> a saturación (0.52 mM).

Se utilizaron los datos de la figura 13a y b para obtener las gráficas de la figura 15. En esta figura se graficó la actividad específica vs la concentración del sustrato (gráficas de Michaelis-Menten) para el oxaloacetato (Fig. 15a) y para el NADH (Fig. 15b). Ambas gráficas mostraron una hipérbola rectangular con límites de V<sub>max</sub> y K<sub>m</sub> aparentes (Tabla 8). De la misma manera, los datos del cambio de absorbancia en función del tiempo (Fig. 14) se usaron para construir gráficas de Actividad Específica vs concentración del sustrato

para el malato figura 16a y para el  $\text{NAD}^+$  figura 16 b, ambas gráficas se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten indicando la  $V_{\text{max}}$  y  $K_m$  aparentes de los sustratos (Tabla 8).



**Figura 13.** Gráficas del cambio de absorbancia ( $\lambda$  340 nm) por unidad de tiempo (segundos) de la reducción del oxaloacetato por la MDHm. **(a)** diferentes concentraciones de NADH a concentración saturante de oxaloacetato, **(b)** diferentes concentraciones de oxaloacetato con el NADH a concentración saturante.

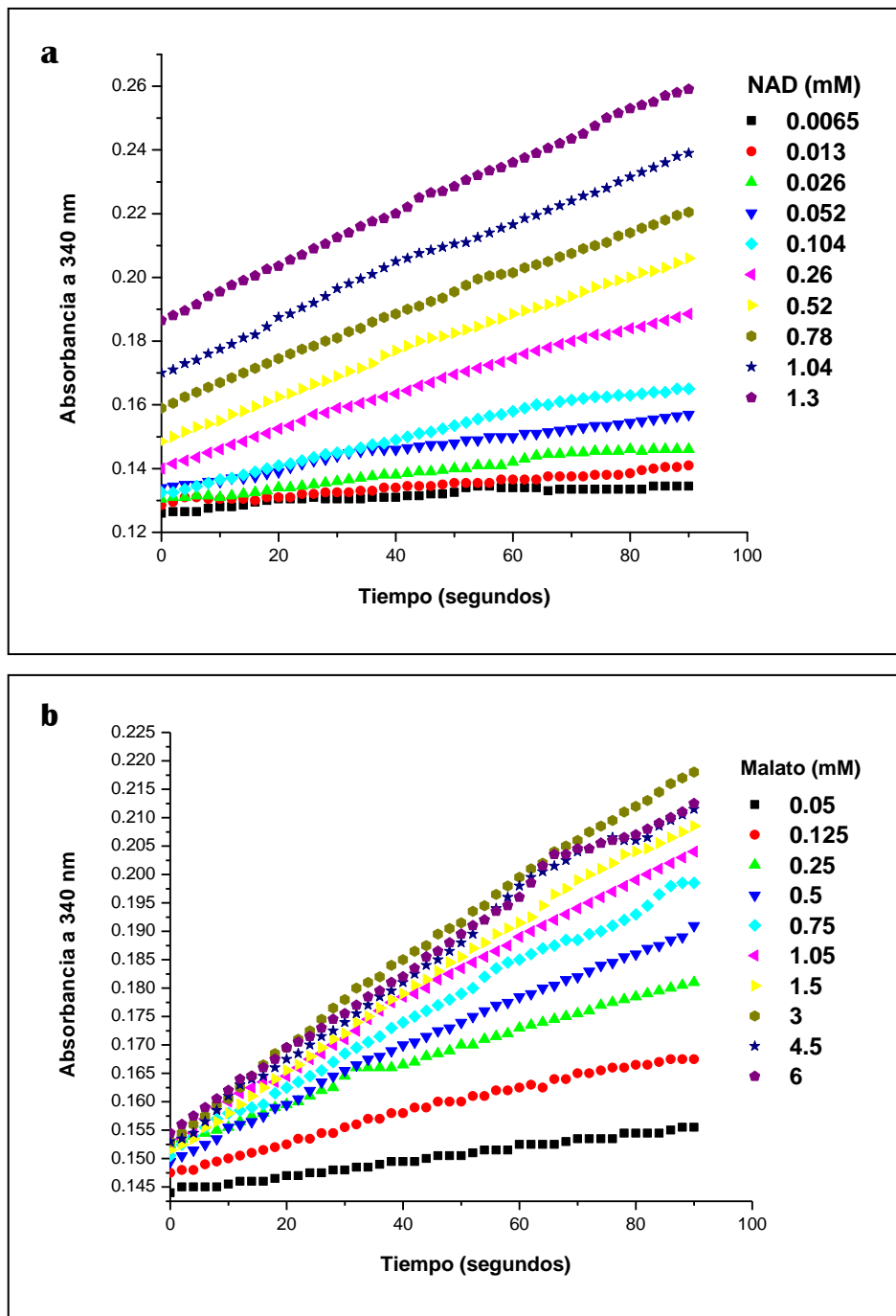


Figura 14. Gráficas del cambio de absorbancia ( $\lambda$  340 nm) por unidad de tiempo de la oxidación del malato por la MDHm. (a) diferentes concentraciones de  $\text{NAD}^+$  a concentración saturante de malato. (b) diferentes concentraciones de malato con concentración de  $\text{NAD}^+$  saturante.



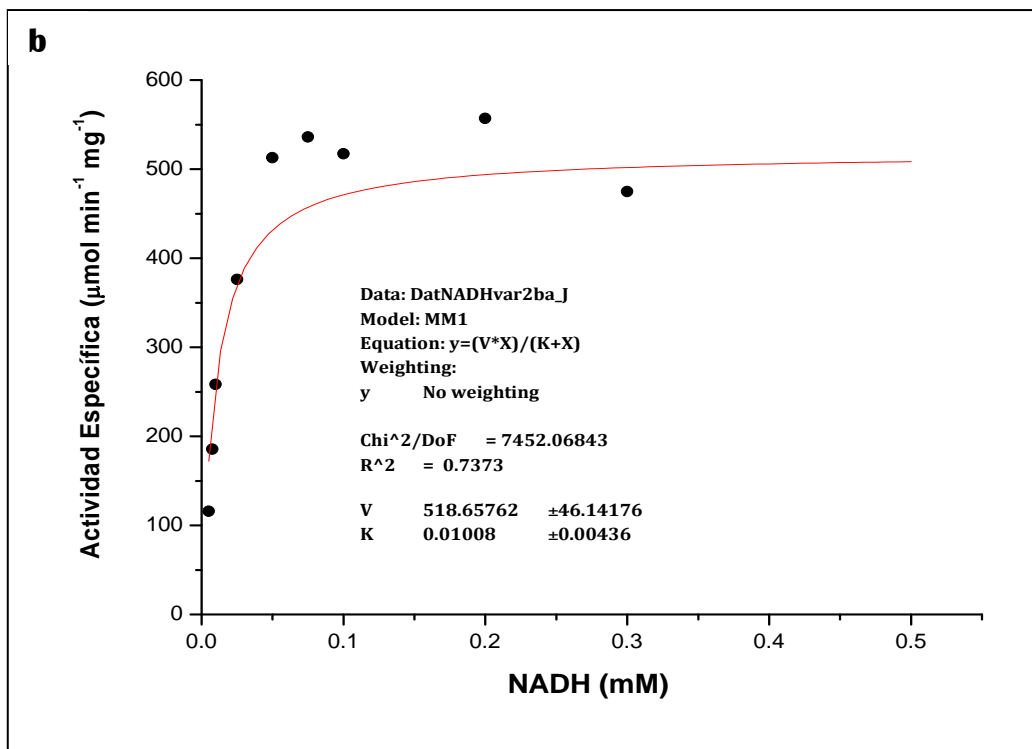
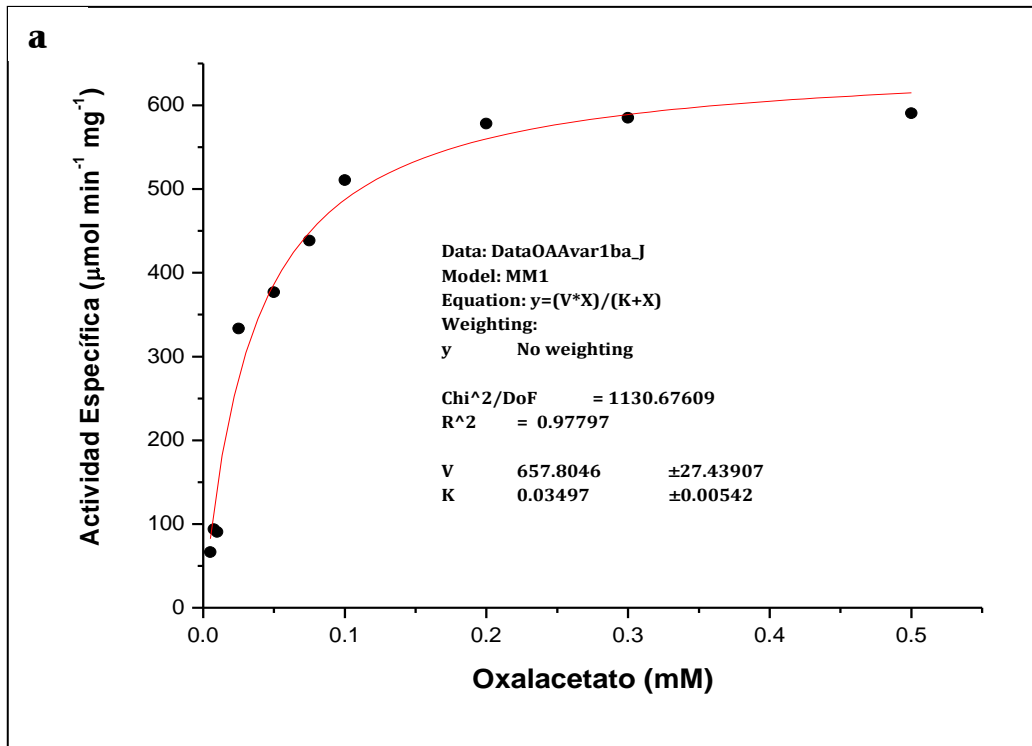


Figura 15. Gráficas de Michaelis-Menten, mostrando los parámetros cinéticos aparentes de  $V_{max}$  y  $K_m$  para (a) oxaloacetato y (b) NADH de la MDHm de cisticercos de *T. solium*.

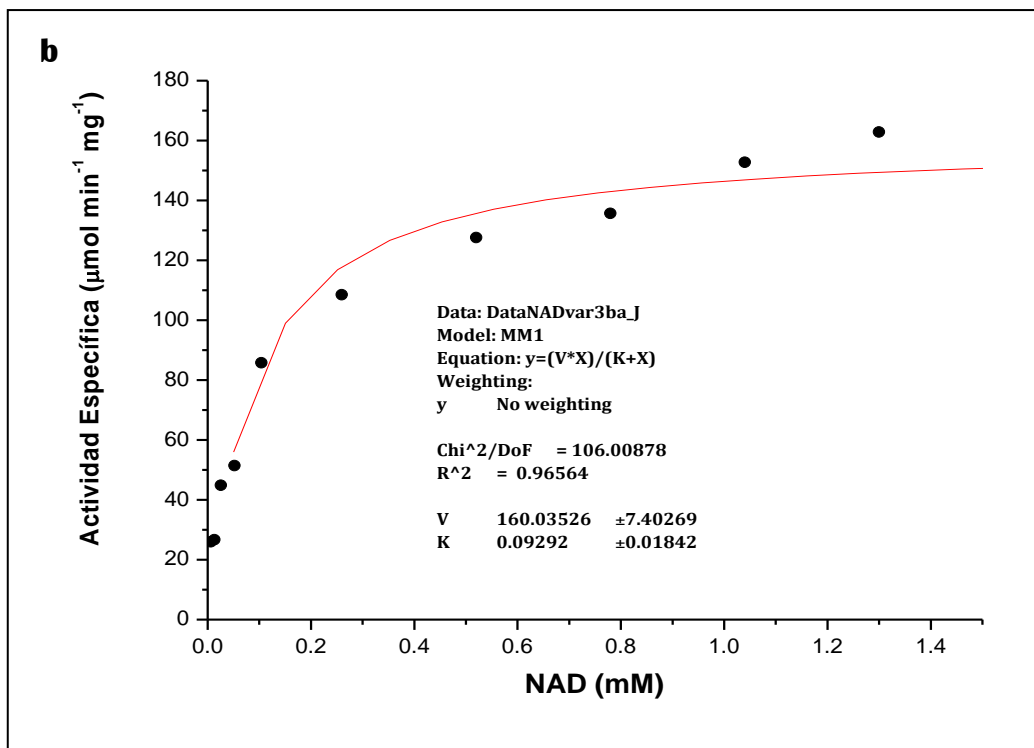
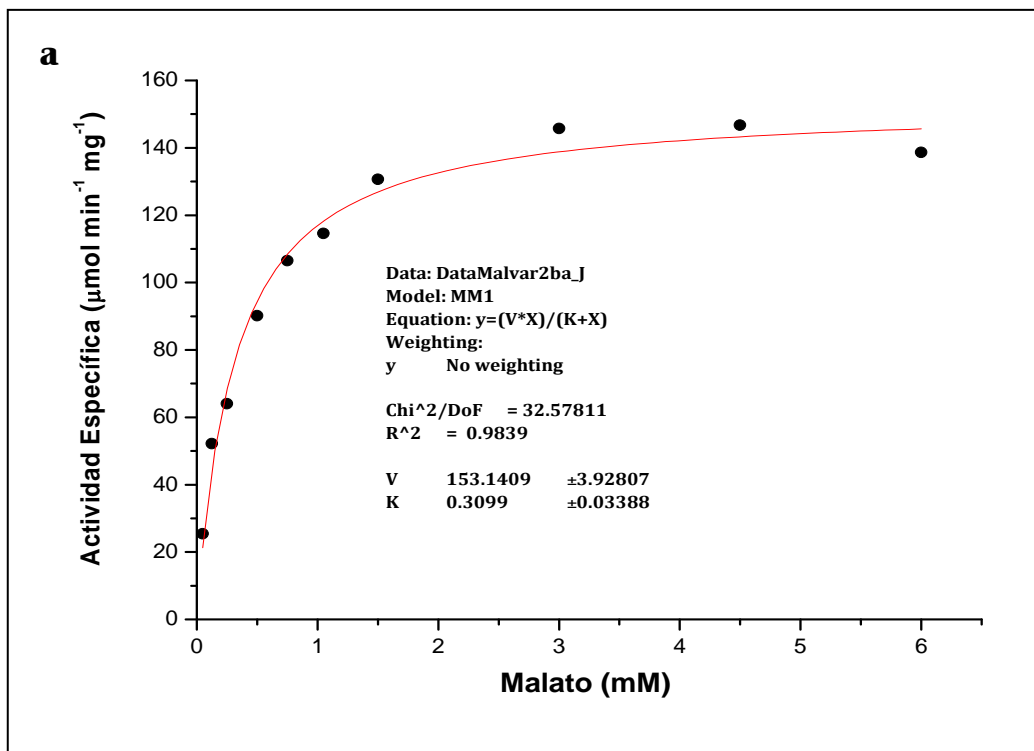


Figura 16. Gráficas de Michaelis-Menten, indicando los parámetros cinéticos aparentes de  $V_{\text{max}}$  y  $K_m$  para (a) malato y (b)  $\text{NAD}^+$  de la MDHm de cisticercos de *T. solium*.

Los datos fueron analizados con el programa Origin Tabla 8.

**Tabla 8. Valores de Km y Vmax aparentes para la MDHm de cisticercos de *T. solium*, usando los ensayos de reducción del oxaloacetato y oxidación del malato.**

<b>Sustratos</b>		<b>Km (mM)</b>	<b>V<sub>max</sub> (μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Reducción del Oxaloacetato</b>			
Oxaloacetato	(NADH a 0.21 mM)	0.034 ± 0.005	657.80 ± 27.4
NADH	(Oxaloacetato a 0.2 mM)	0.010 ± 0.004	518.65 ± 46.1
<b>Oxidación del L-Malato</b>			
L-Malato	(NAD <sup>+</sup> a 0.52 mM)	0.309 ± 0.03	153.14 ± 3.92
NAD <sup>+</sup>	(L-Malato a 3 mM)	0.092 ± 0.01	160.03 ± 7.40

Para determinar con mayor precisión las constantes catalíticas de la enzima se transformaron las gráficas de Michaelis-Menten (Figs. 15 y 16) en gráficas de Lineweaver-Burk o doble recíproca. La figura 17a muestra la gráfica de la doble recíproca para el oxaloacetato en distintas concentraciones frente a una concentración saturante de NADH. La gráfica 17b muestra la doble recíproca para el NADH en distintas concentraciones frente a una concentración saturante de oxaloacetato. Con estas gráficas, (17a y b) se obtuvieron los valores cinéticos aparentes de los distintos sustratos; a partir del intercepto de la recta en el eje de las ordenadas (1/Actividad específica) se obtiene un valor, cuyo valor inverso es la  $V_{max (aparente)} = 724 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para el oxaloacetato y  $581 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para el NADH. Mientras que el intercepto de la misma recta pero en el eje de las abscisas (1/[sustrato]) permite calcular con el mismo método un valor para la  $K_{m(aparente)} = 0.0521 \text{ mM}$  para el oxaloacetato y  $0.0174 \text{ mM}$  para el NADH. La figura 18 muestra las gráficas de doble recíproca para el ensayo de oxidación del malato, y describe los valores en función de las concentraciones variables de malato (gráfica 18a) y NAD<sup>+</sup> (gráfica 18b), usando NAD<sup>+</sup> y malato a concentraciones saturantes respectivamente.

El intercepto de las rectas de las gráficas de la figura 18 (a y b) nos indican los valores cinéticos aparentes en el eje de las abscisas para el valor de la Km, y en el eje de las ordenadas para la correspondiente Vmax. Así el valor inverso en el eje de las ordenadas resultó  $V_{max (aparente)} = 141 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para el malato y  $104 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para el NAD<sup>+</sup> y, de la misma manera, el valor inverso en el eje de las abscisas resultó en  $K_{m(aparente)} = 0.23 \text{ mM}$  para el malato y  $0.024 \text{ mM}$  para el NAD<sup>+</sup>.

Los datos de las constantes catalíticas aparentes de la MDHm de *T. solium* para los sustratos utilizados en los ensayos de reducción del oxaloacetato y oxidación del malato, descritos anteriormente pueden verse de una manera resumida en la tabla 9.

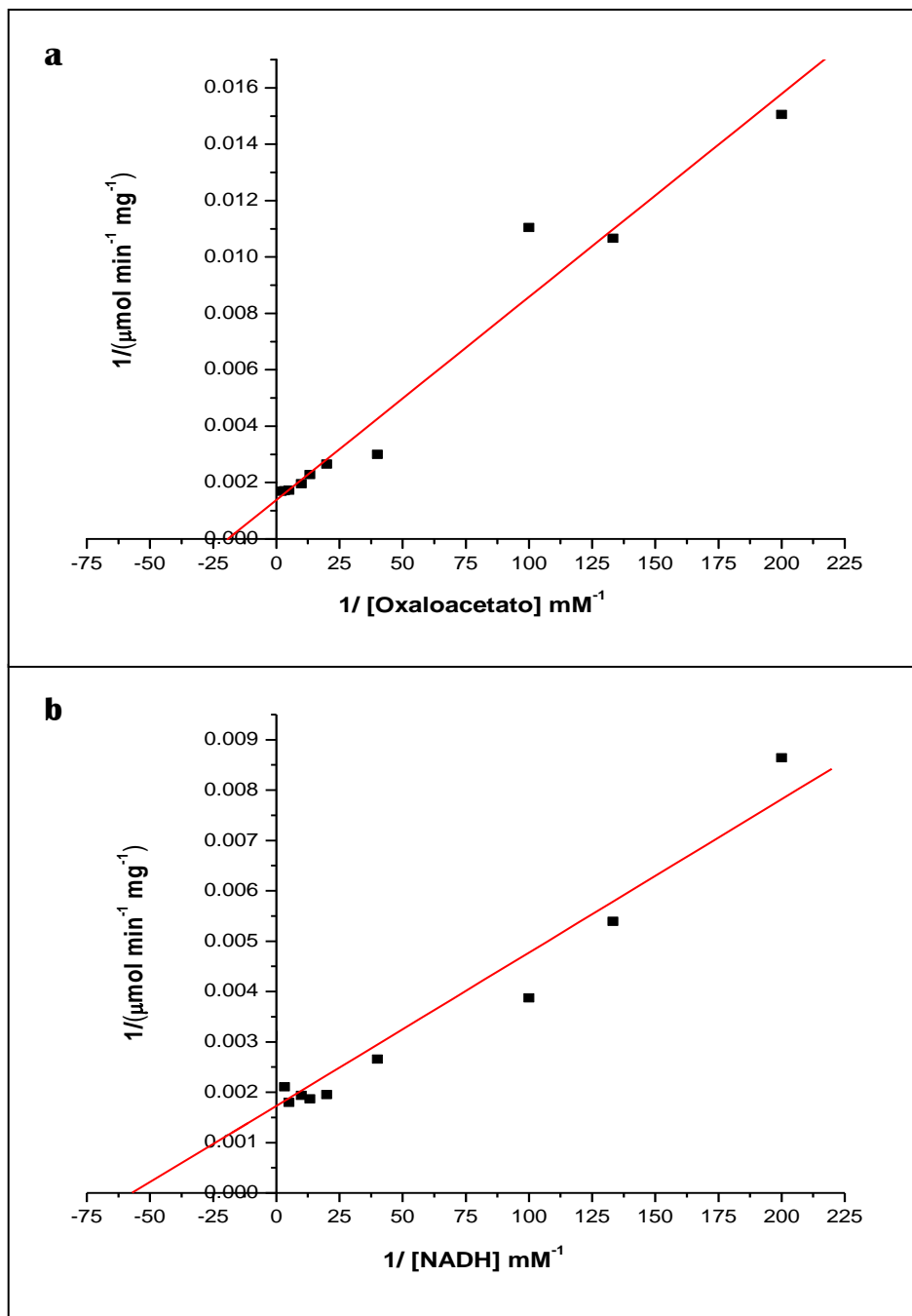


Figura 17. Gráficas de doble recíproca Lineweaver-Burk elaboradas para determinar los valores cinéticos aparentes ( $V_{\text{max}}$  y  $K_m$ ) del oxaloacetato gráfica (a) y del NADH gráfica (b).

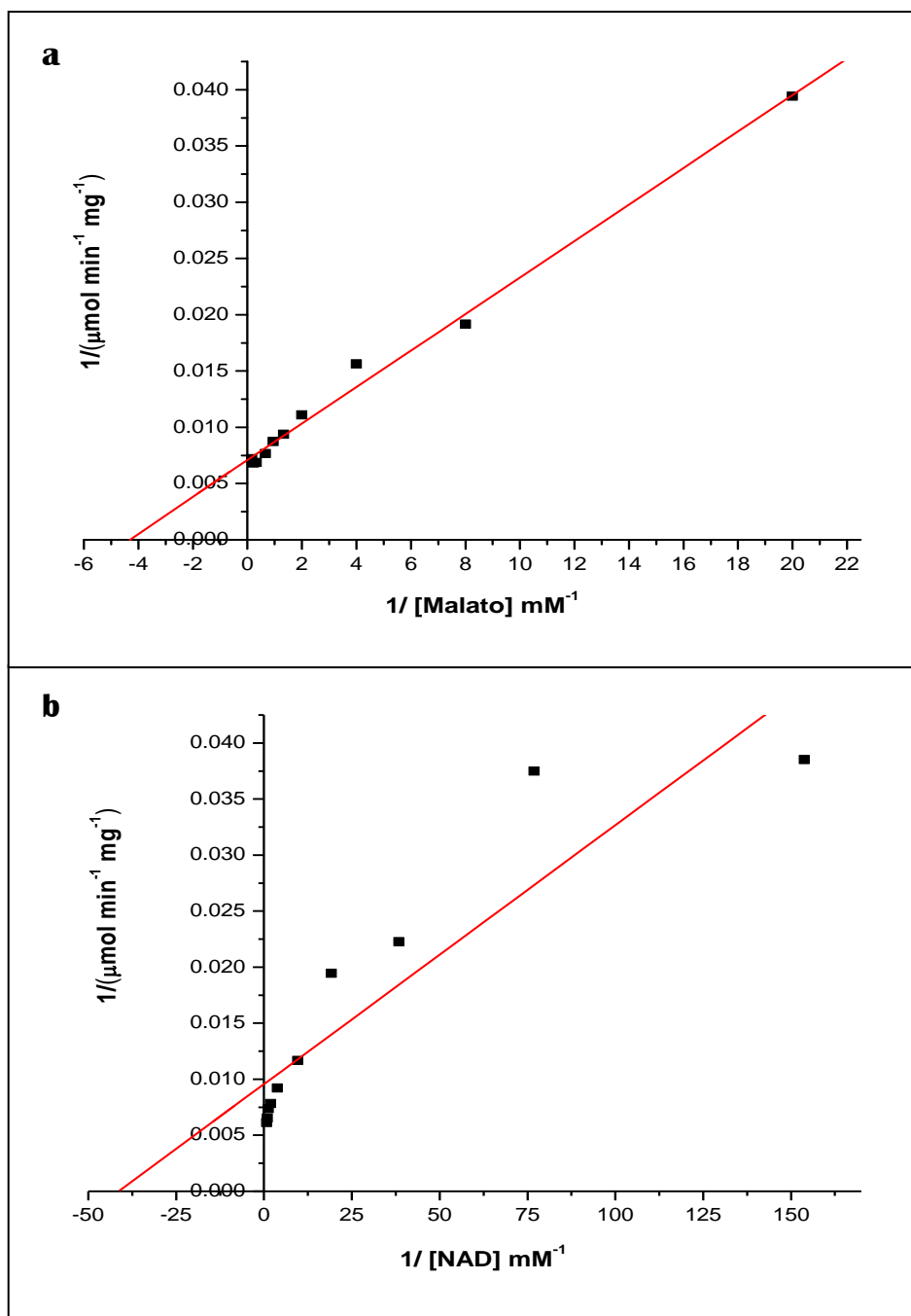


Figura 18. Gráficas de doble recíproca Lineweaver-Burk elaboradas para determinar los valores cinéticos aparentes ( $V_{\text{max}}$  y  $K_m$ ) del malato gráfica (a) y del NAD<sup>+</sup> gráfica (b).

**Tabla 9. Valores de Km y Vmax aparentes calculados a partir de gráficas de doble recíproca (Lineweaver-Burk) para la MDHm de cisticercos de *T. solium*, usando los ensayos de reducción del oxaloacetato y oxidación del malato**

<b>Sustratos</b>		<b>Km (mM)</b>	<b>V<sub>max</sub> (μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Reducción del Oxaloacetato</b>			
Oxaloacetato	(NADH a 0.21 mM)	0.0521	724.637
NADH	(Oxaloacetato a 0.2 mM)	0.0174	581.395
<b>Oxidación del L-Malato</b>			
L-Malato	(NAD <sup>+</sup> a 0.52 mM)	0.232	141.242
NAD <sup>+</sup>	(L-Malato a 3 mM)	0.024	104.821

#### **4.8. Estudios de inhibición (I<sub>50</sub>, Tipo de inhibición y Ki)**

El porcentaje de actividad residual de la MDHm a diferentes concentraciones del inhibidor se presenta en la figura 19 para la reducción del oxaloacetato y en la figura 20 para la oxidación del malato. Estas gráficas muestran el valor de la I<sub>50</sub> para el arsenito y el piruvato. El porcentaje de la actividad residual enzimática se calculó al comparar el 100% de la actividad de la enzima sin presencia de inhibidor frente a la resultante por la adición de los inhibidores, piruvato o arsenito.

Estas gráficas se calcularon con el programa Origin Pro, a partir de los datos de V<sub>o</sub> que se obtuvieron con los ensayos enzimáticos en los que, se fijó la concentración de los sustratos a saturación, mientras que la concentración del inhibidor se fue aumentando de forma creciente hasta que la enzima perdió su actividad. Los resultados de estas gráficas pueden verse resumidos en la tabla 10.

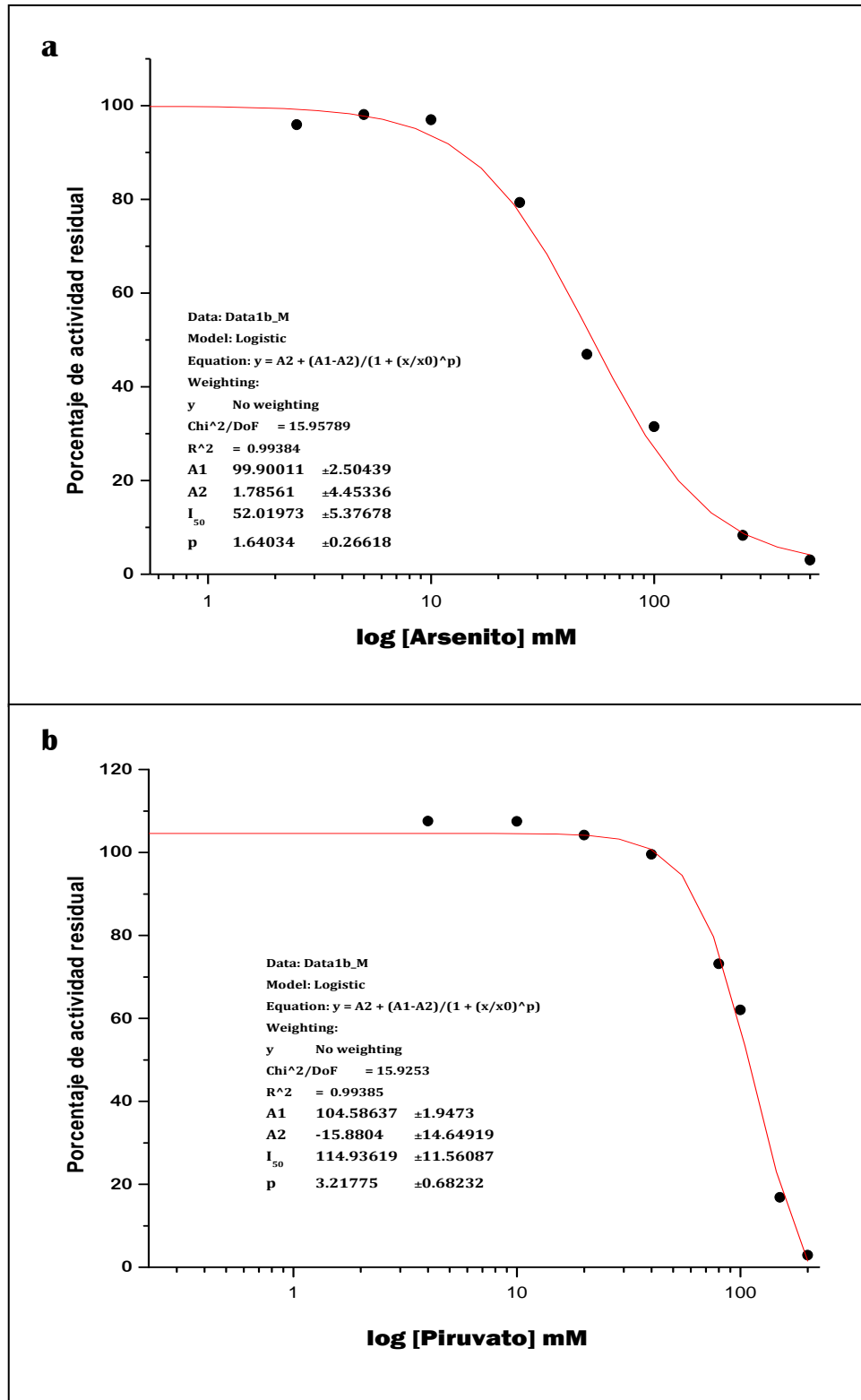


Figura 19. Porcentaje de actividad residual de la MDHm de cisticercos de *T. solium* empleada para calcular la I<sub>50</sub> del(a) arsenito y (b) piruvato en el ensayo de reducción del oxaloacetato.

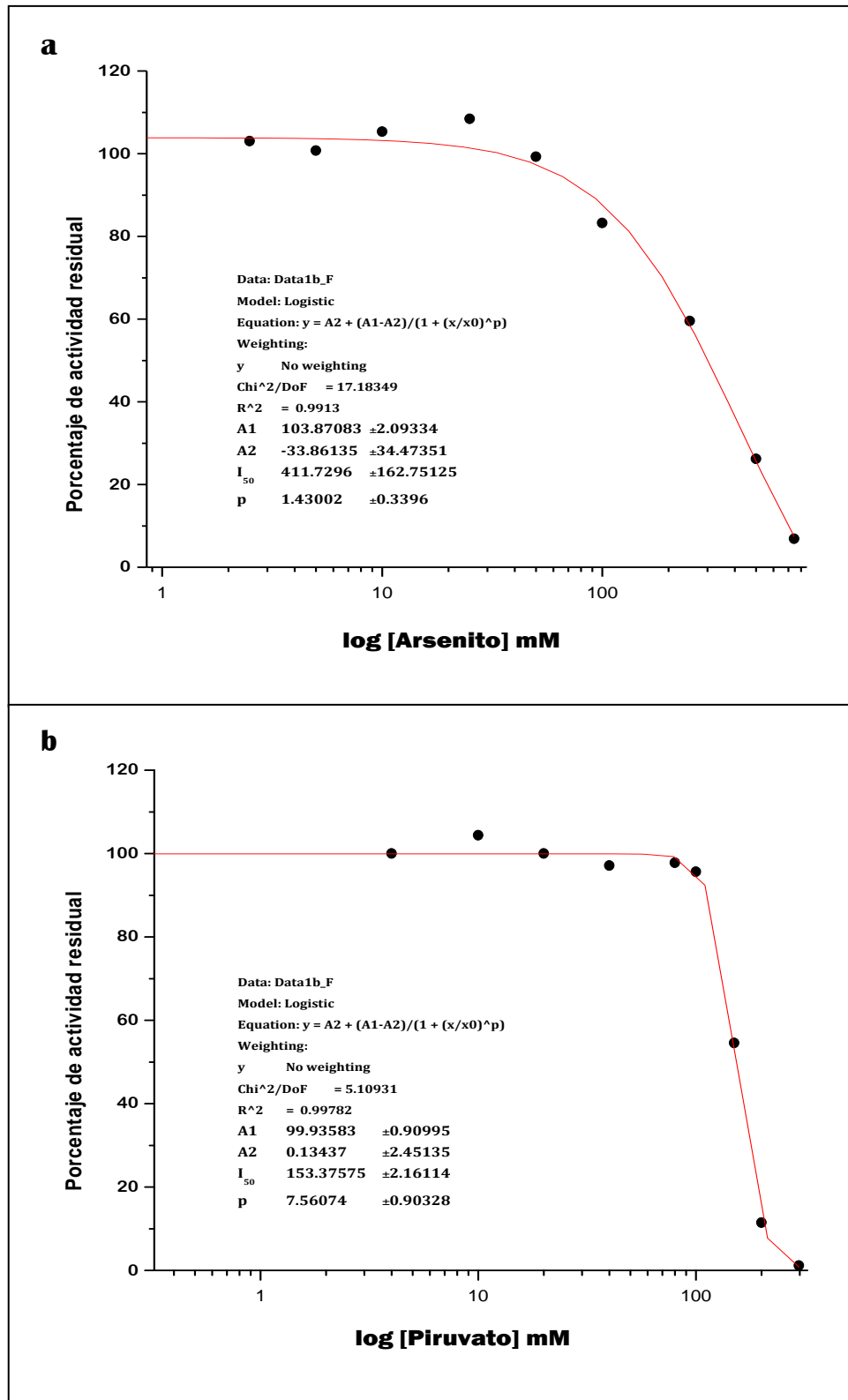


Figura 20. Porcentaje de actividad residual de la MDHm de cisticercos de *T. solium* empleada para calcular la I<sub>50</sub> del(a) arsenito y (b) piruvato en el ensayo de oxidación del malato.



**Tabla 10.  $I_{50}$  del arsenito y el piruvato calculados a partir de las gráficas de porcentaje de actividad residual que se muestran en las figuras 19 y 20.**

Ensayo*	Arsenito mM	Piruvato mM
Reducción del oxaloacetato	52.019	114.936
Oxidación del malato	411.729	153.375

**\*En estos ensayos, la concentración de los sustratos se mantuvo constante, variando sólo la concentración del inhibidor.**

El tipo de inhibición se calculó realizando varias series de ensayos en las que se dejó fija tanto la concentración de la enzima como la del oxaloacetato, pero se modificó de forma creciente la concentración del NADH, de estos ensayos se realizaron dos series, una se realizó con el inhibidor (Piruvato) a una concentración fija de este y otra, en la que no se adicionó inhibidor, se uso como control.

En la figura 21 puede verse el efecto del piruvato sobre la actividad de la MDHm de cisticercos de *T. solium* con en el ensayo de reducción del oxaloacetato. En dicha figura la gráfica (a) se elaboró para determinar el tipo de inhibición, mientras que la gráfica (b) se construyó para calcular la constante de de inhibición ( $K_i$ ) de cada uno de los inhibidores.

Los resultados de las series de ensayos elaboradas y de los cálculos para obtener las gráficas de la figura 21 se encuentran resumidos en la tabla 11.

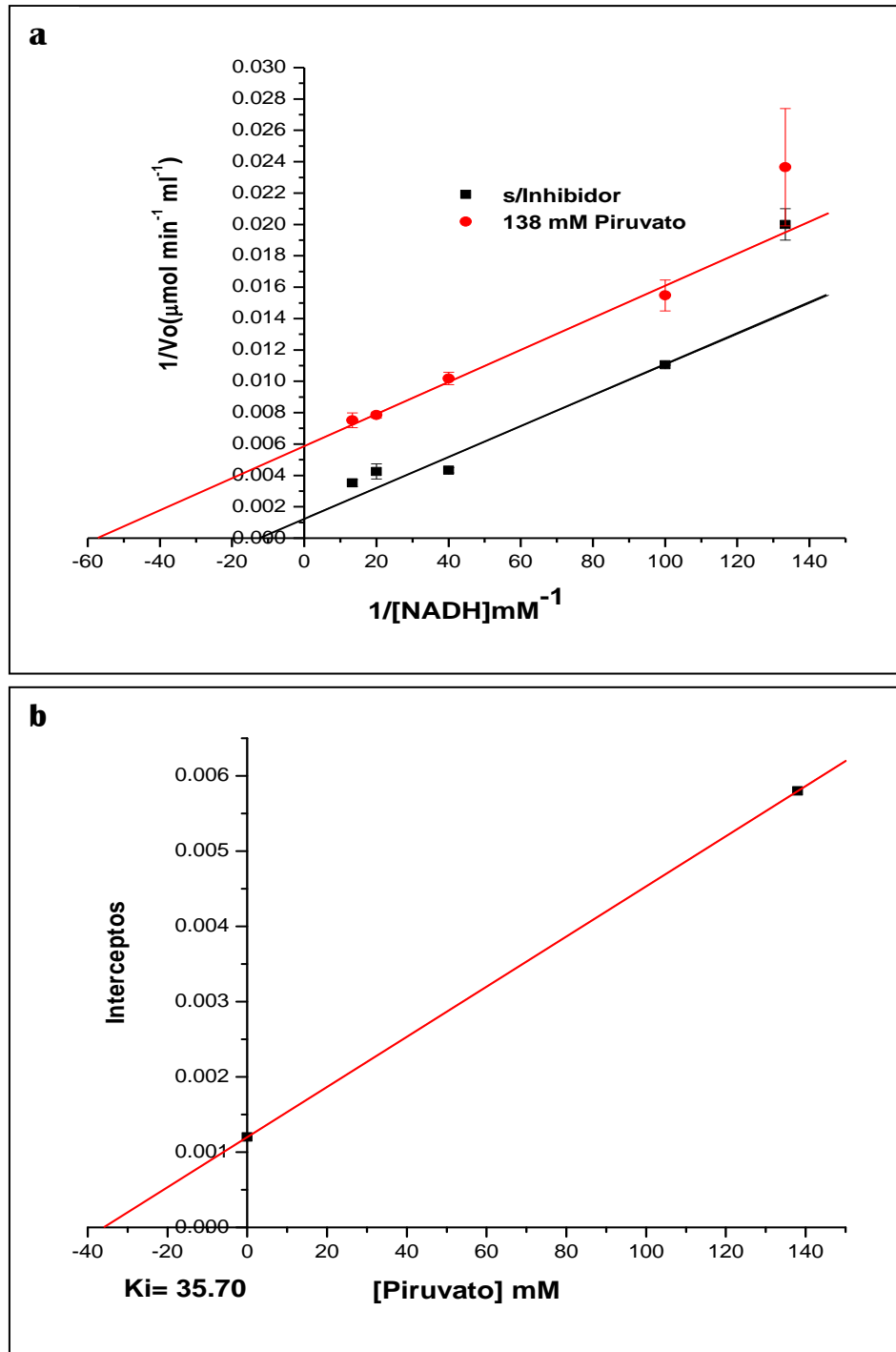


Figura 21. Tipo de inhibición (a) y constante de inhibición (b) del piruvato sobre la actividad de la MDHm de cisticercos de *T. solium*. La gráfica a es de doble inverso con el inverso de la  $V_o$  y el inverso de la concentración creciente de NADH en el ensayo de reducción del oxaloacetato.

**Tabla 11. Tipo de inhibición y constante de inhibición (Ki) que el piruvato ejerce sobre la actividad de la MDHm de cisticercos de *T. solium*.\***

Ensayo*	Tipo de inhibición	Ki (mM)
Reducción del oxaloacetato	Acompetitivo	35.70

**\*Estos datos se obtuvieron a partir de las gráficas de la figura 21.**

## 5. DISCUSIÓN

El cestodo *T. solium* es un parásito que tiene su ciclo de vida en el cerdo y en el hombre. La neurocisticercosis es la enfermedad originada por la presencia de los cisticercos de este parásito en el sistema nervioso central del hombre, siendo la parasitosis más severa del sistema nervioso central.

En este trabajo se logró identificar por primera vez, a una malato deshidrogenasa mitocondrial (EC 1.1.1.37) en los cisticercos de *T. solium*, una enzima que es de gran importancia, debido a que está involucrada en varios procesos del metabolismo intermediario, como el CAT, la gluconeogénesis, la dismutación del malato y la lanzadera malato-aspartato. Obtener información sobre el metabolismo energético de *T. solium*, así como conocer a la MDHm de los cisticercos de *T. solium* nos ayudará en la búsqueda de moléculas que potencialmente puedan servir como blancos profilácticos contra este parásito.

El metabolismo de los carbohidratos, ha sido uno de los temas más estudiados en los helmintos. Su importancia estriba en ser los carbohidratos su principal fuente de energía, sin embargo, casi no existen estudios relacionados con este tópico en *T. solium*.

Por ejemplo, la oxidación del malato (ácido málico), compuesto orgánico presente en los organismos con un papel importante en diversas vías metabólicas, se cataliza por dos diferentes tipos de enzimas dependientes de nucleótidos de piridina. En un caso el principal producto es oxaloacetato (Enzima EC 1.1.1.37), mientras que en el otro es piruvato y CO<sub>2</sub> además de poder descarboxilar al oxaloacetato (Enzima EC 1.1.1.40). Tanto las deshidrogenasas (enzimas de la clase malato-oxaloacetato que utilizan NAD<sup>+</sup>) como las deshidrogenasas descarboxilantes ó málicas (enzimas de la clase malato-piruvato que utilizan NADP) están presentes en la mayoría de los organismos y en prácticamente todas las células eucariontes en al menos dos formas dependiendo de su ubicación celular, las mitocondriales (MDHm) y las solubles o citoplásmicas (MDHc).

La enzima MDHm (EC 1.1.1.37) es una de las enzimas del metabolismo de los carbohidratos de importancia potencial como blanco contra *T. solium*. La MDHm es una isoforma soluble de la matriz mitocondrial dentro de la familia de las MDH's, y es importante tanto en el CAT como en la gluconeogénesis. El CAT es empleado por los

helminthos principalmente en estadios de vida libre durante la transición entre huéspedes, así como en tejidos aeróbicos como el cerebro. Por otro lado, la gluconeogénesis es importante para estos organismos para mantener constante sus reservas energéticas (87) así como en los cestodos para originar sus principales productos metabólicos finales como los ácidos succínico, acético y láctico tanto en condiciones normales como de carencia de alimento (75). Esta enzima es importante también en la transferencia de equivalentes reductores del citosol al interior de la mitocondria. Estos equivalentes reductores se originan por la MDHc cuando reduce al oxaloacetato a malato y oxida al NADH en el citoplasma. Los equivalentes reductores, que fueron parte del NADH citoplásmico, ahora situados en la molécula de malato, ingresan con ella al interior de la mitocondria por medio de la lanzadera de malato-aspartato. Así, el papel de la MDHm en el interior de la mitocondria es oxidar al malato que ingresa del citoplasma, y al mismo tiempo reducir al NAD<sup>+</sup> situado dentro de la mitocondria. De esta manera el par de electrones y un par de protones del NADH citoplásmico han sido transferidos a la matriz mitocondrial y utilizados en la formación de NADH + H<sup>+</sup>. Ahora dos electrones y dos protones del NADH mitocondrial pueden ser cedidos al Complejo I de la cadena transportadora de electrones donde proporcionaría la fuerza protomotriz necesaria para la síntesis de 3 moléculas de ATP en el Complejo V. Esto se puede afirmar, debido a que se ha demostrado la presencia de las proteínas necesarias para la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de *T. solium* (88).

En el presente trabajo, la MDHm de los cisticercos de *T. solium* se obtuvo a través de un proceso de enriquecimiento de la fracción mitocondrial, fraccionamiento de las membranas mitocondriales y una cromatografía de intercambio aniónico.

La combinación de sonicar y ultracentrifugar las mitocondrias resultó en una fracción soluble con una actividad para la MDHm incrementada 5.6 veces en comparación con sonicar sin ultracentrifugarlas y 17.6 veces mas activa en comparación con el control ultracentrifugado. Para el caso de la fracción con Tritón al 10% ultracentrifugado, esta presentó un incremento de 24.1 veces en su actividad con respecto al control ultracentrifugado (ver Fig. 4 y Tabla 6). No obstante que el tratamiento de las mitocondrias con Tritón X-100 al 10 % y ultracentrifugación produjo un mayor rendimiento de la enzima que cualquier otro tratamiento, esta fracción no fue la que se empleó para continuar

con la purificación. Esto se debió a la conveniencia de evitar el detergente en los estudios analíticos de la enzima en geles de poliacrilamida. El Tritón X-100 distorsiona las bandas proteicas en el gel haciendo difícil su ubicación.

El conjunto de datos sobre el fraccionamiento y la solubilización de las membranas mitocondriales sugieren la presencia de una MDHm en la fracción soluble de la matriz mitocondrial de los cisticercos de *T. solium*.

La cromatografía de intercambio aniónico permitió obtener la fracción con actividad para MDHm dependiente de  $\text{NAD}^+$  separada de la MDHm dependiente de  $\text{NADP}^+$ . Esto se debió a que la MDHm dependiente de  $\text{NAD}^+$  no se unió a la resina, que es un fuerte intercambiador aniónico y por lo tanto demostrando que la MDHm dependiente de  $\text{NAD}^+$  es una enzima catiónica.

Por otra parte, en la fracción eluída se encontró actividad enzimática para el ensayo de oxidación del malato que usa al  $\text{NADP}^+$  como sustrato, este ensayo nos indica la presencia de la enzima málica (EC.1.1.1.40) en la fracción mitocondrial de cisticercos de *T. solium*. Adicionalmente nos muestra que esta enzima esta cargada negativamente, debido a que se unió a la resina.

El análisis por geles de poliacrilamida de la MDHm excluida de la cromatografía de QAE-Sefarosa mostró una banda de ~35 kDa. Esta información fue congruente con el peso molecular aproximado de las subunidades para las malatos deshidrogenasas. Adicionalmente, la información que se obtuvo del análisis de péptidos que se realizó por espectroscopia de masas a la banda de ~35 kDa indicó las siguientes secuencias VVIIPAGVPR, LFGVTTLDIR, IQNAGTEVVNAK, FANSLHMK en un orden de 96-105, 167-177, 231-242 y 260-269 respectivamente en la estructura primaria de la MDHm de *T. solium*. Estos péptidos resultaron ser homólogos a los reportados para la MDHm de *Echinococcus granulosus* (89). Por lo tanto, la enzima con la que se trabajo en este proyecto es una MDHm. Siendo además una de las pocas malato deshidrogenasas mitocondriales reportadas para los cestodos.

Las constantes catalíticas aparentes de la MDHm de *T. solium* están resumidas en la tabla 8 y la comparación con los datos reportados para la MDH citosólica del mismo parásito (90) nos indica que estas dos enzimas son diferentes. En la reducción del oxaloacetato los valores de las  $K_m$ 's aparentes de la MDHm son para el oxaloacetato 34

$\mu\text{M}$  y para el NADH  $10 \mu\text{M}$ , mientras que para la enzima citosólica sus  $K_m$ 's aparentes son  $2.4$  y  $48 \mu\text{M}$  respectivamente; en el ensayo de oxidación del malato las  $K_m$ 's aparentes de la enzima citosólica son más bajas que los de la mitocondrial,  $215 \mu\text{M}$  para el malato y  $50 \mu\text{M}$  para el  $\text{NAD}^+$  contra  $309$  y  $92 \mu\text{M}$  respectivamente. En ambas enzimas se puede ver que los valores de  $K_m$  son más altos en el sentido de la oxidación del malato con respecto a la reducción del oxaloacetato.

En el caso de los valores de  $V_{\text{max}}$  aparentes la MDHm en el sentido de la reducción del oxaloacetato presenta  $657 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para el oxaloacetato y  $518 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para el NADH, valores más bajos que los de la enzima citosólica que son  $1740$  y  $1714 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  respectivamente; en el sentido de la oxidación del malato los valores para la enzima citosólica son de  $87 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para el malato y  $104 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para el  $\text{NAD}^+$ , valores más bajos que los de la MDHm  $153$  y  $160$  respectivamente (ver Tabla 9).

Lo anterior nos indica que la actividad de la MDHm de cisticercos de *T. solium* va en dirección a la producción de malato, más que en sentido inverso (producción de oxaloacetato), al igual que la enzima citosólica. Esto puede verse debido a que en este sentido de la reacción, la  $K_m$  es de menor valor que en el sentido de la reducción del oxaloacetato y por lo tanto, con una menor cantidad de sustrato genera más producto (malato) del que generaría en el sentido contrario usando al malato como sustrato. Otro dato que corrobora este punto es el hecho de que en este mismo sentido de la reacción (reducción del oxaloacetato) la  $V_{\text{max}}$  de los diferentes sustratos es más grande que su contraparte en el sentido inverso (oxidación del malato), indicándonos que la producción de malato es más elevada que la generación de oxaloacetato.

Las anteriores observaciones nos sugerirían que la MDHm probablemente no esté involucrada en el CAT, pues se esperaría que una enzima involucrada en este ciclo tuviera una tendencia hacia la producción de oxaloacetato. Una alternativa en relación a la función de MDHm sería que esta se encontrara involucrada en el proceso de gluconeogénesis en el cual el piruvato de la matriz mitocondrial es carboxilado por la PC y posteriormente esta misma enzima le conjuga acetyl-CoA, esto permite transformar al piruvato en oxaloacetato, como este no puede cruzar la membrana interna de la mitocondria para salir al citoplasma donde continua el proceso de gluconeogénesis, el oxaloacetato es reducido a malato por la acción de una MDHm. De esta manera el piruvato transformado en malato puede salir al

citoplasma donde es oxidado a oxaloacetato por la MDHc. Posteriormente, por la acción de la PEPCK el malato es transformado en PEP, a partir de este punto el PEP puede iniciar la serie de reacciones inversas de la glucólisis hasta formar glucosa.

La reducción del oxaloacetato a malato requiere de NADH, que se acumulará en la mitocondria cuando la carga energética aumenta, lo que le permite a la célula llevar a cabo el proceso de gluconeogénesis que es costoso en ATP. Por otro lado el NADH producido durante la oxidación citosólica del malato a oxaloacetato puede utilizarse en la reacción catalizada por la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de la glucólisis. El acoplamiento de estas reacciones de oxidación-reducción es necesario para mantener la gluconeogénesis funcionando cuando el piruvato es la principal fuente de átomos de carbono, por lo que la conversión de OAA a malato predomina cuando el piruvato es la fuente de los átomos de carbono para la gluconeogénesis.

En cuanto a la dismutación del malato, se ha visto que la MDH tiene una gran importancia en la generación de malato a partir de oxaloacetato para producir fumarato y posteriormente succinato en *Fasciola hepática* (80), lo que haría a la MDHm de cisticercos de *T. solium* una enzima importante en este proceso; sin embargo, debemos de tomar en cuenta que de acuerdo a Bryant 1986 (91), el fumarato que se obtiene en la dismutación del malato es producido por la enzima fumarasa. En esta misma fuente también se indica que la enzima que convierte al malato en piruvato dentro de la mitocondria es la enzima málica (EC.1.1.1.40), la cual pudo identificarse a través de ensayos catalíticos en la fracción soluble de la mitocondria de los cisticercos de *T. solium* en este mismo trabajo.

Con respecto a las condiciones óptimas para el funcionamiento de la MDHm de cisticercos de *T. solium*, los resultados tanto de temperatura como de pH son parecidos a los reportadas para distintas MDHs incluyendo la citosólica de cisticercos de *T. solium*.

Para el caso del pH los parámetros evaluados en la MDHm de cisticercos de *T. solium* fueron el pH óptimo de reacción y estabilidad de la enzima al pH. El pH óptimo de reacción para el ensayo de reducción del oxaloacetato fue de 7, y a partir de este valor la actividad de la MDHm decrece tanto si aumenta como si disminuye el pH. En cuanto a la estabilidad de la MDHm en función del pH, lo que se midió a través de la actividad específica de la enzima en el ensayo de reducción del oxaloacetato; se encontró que la enzima es estable en el intervalo de pH 5 - 6.5, indicándonos que en este intervalo de pH la



enzima logra conservar sus grupos ionizables en una forma que mantiene la conformación de su sitio activo.

Con respecto a la estabilidad de la enzima al pH, este dato es el único en el que se ve una cierta diferencia entre las dos enzimas (citosólica y mitocondrial), pues en el caso de la enzima mitocondrial esta es estable a un pH más ácido (5-6.5) que en el caso de la enzima citosólica (6.8-8.5).

En el caso de la temperatura, el valor óptimo para la reacción en el ensayo de reducción del oxaloacetato es de 40 °C; esta temperatura concuerda con la temperatura promedio de los cerdos que es de alrededor de 39.5 °C, a pesar de esto no se puede hablar de una gran especificidad entre las diferentes especies debido a que la enzima puede actuar en un amplio rango de temperaturas (5-45 °C) sin que su efectividad se vea disminuida de forma importante.

En cuanto a la inhibición de esta enzima, los datos de  $I_{50}$  del piruvato y el arsenito (Tabla 10) nos indican que, en el caso del arsenito de sodio el valor de  $I_{50}$  fue inferior en la MDHm con respecto a la enzima citosólica (90) 52 mM contra 65.5 mM respectivamente en el ensayo de reducción del oxaloacetato; mientras que para el ensayo de oxidación del malato, la  $I_{50}$  del arsenito fue superior para la MDHm con respecto a la isoforma citosólica con valores 411 y 307 mM respectivamente. A pesar de las diferencias, las dos enzimas presentan una mayor tolerancia a la inhibición por arsenito de sodio en el sentido de la oxidación del malato; debido, a que los valores de  $I_{50}$  para este inhibidor muestran un incremento de 4.7 veces para la enzima citosólica y 7.9 veces para la MDHm con respecto a los valores de  $I_{50}$  del arsenito de sodio en el ensayo de reducción del oxaloacetato, lo que hace a la producción de malato más sensible a la inhibición por arsenito de sodio.

Con respecto al tipo de inhibición en el caso del piruvato con el ensayo de reducción del oxaloacetato se pudo determinar que este presenta una inhibición del tipo acompetitivo, y un  $K_i$  de 35.7 mM sin embargo, es necesario hacer más pruebas y repeticiones para poder determinar claramente el tipo de inhibición que el piruvato y otros inhibidores ejercen sobre la MDHm de cisticercos de *T. solium*.

En resumen, en este trabajo se identificó a una malato deshidrogenasa mitocondrial (MDHm EC 1.1.1.37) de cisticercos de *T. solium*, por medio de una purificación y caracterización parcial. Por su ubicación celular, sus características cinéticas y estudios de

péptidos esta enzima es diferente de la MDHc MDHc hallada en los cisticercos del mismo cestodo (90).. Su preferencia por reducir oxaloacetato en lugar de oxidar malato y ubicación celular sugiere que participa en los procesos de gluconeogénesis. Esta función estaría de acuerdo con las imágenes de microscopía electrónica de cisticercos que muestran múltiples vacuolas glucogénicas en sus tejidos (92).

Para conocer mejor el metabolismo gluconeogénico desarrollado por los cisticercos de *T. solium*, es necesario llevar a cabo más estudios donde se purifique a suficiencia y se estudien más características de la enzima que se describió en este trabajo (MDHm EC 1.1.1.37).

## 6. CONCLUSIONES.

- En este trabajo se identificó a una malato deshidrogenasa mitocondrial (MDHm EC 1.1.1.37) de cisticercos de *T. solium*, por medio de una purificación y caracterización parcial.
- La MDHm de los cisticercos de *T. solium* se obtuvo a través de un proceso de enriquecimiento de la fracción mitocondrial, fraccionamiento de las membranas mitocondriales y una cromatografía de intercambio aniónico.
- La cromatografía de intercambio aniónico permitió obtener la fracción con actividad para MDHm dependiente de  $\text{NAD}^+$  (catiónica) separada de la MDHm dependiente de  $\text{NADP}^+$  (aniónica).
- Los datos sobre el fraccionamiento de las membranas mitocondriales sugieren la presencia de la MDHm en la fracción soluble de la matriz mitocondrial de los cisticercos de *T. solium*.
- Por su ubicación celular, sus características cinéticas y estudios de péptidos esta enzima es diferente de la MDHc de los cisticercos del mismo parásito.
- Su preferencia por reducir oxaloacetato en lugar de oxidar malato y ubicación celular sugiere que podría participar en los procesos de gluconeogénesis.
- Esta función estaría de acuerdo con las imágenes de microscopía electrónica de cisticercos que muestran múltiples vacuolas glucogénicas en sus tejidos.
- Profundizar en su purificación y caracterización permitirá conocer más sobre los mecanismos gluconeogénicos desarrollados por *T. solium*.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Grove D I. 1990. A history of human helminthology. CAB Intl. Oxon, UX. 355-383.
- 2) Wadia N H, Singh G. 2002. *Taenia solium*: A Historical Note. In: G Singh, S Prabhakar (eds). *Taenia Solium Cysticercosis: From Basic to Clinical Science*. CABI Publishing. 157-168.
- 3) Tyson E. 1683. *Lumbricus latus*, or a discourse read before the Royal Society, of the jointed worm, wherein a great many mistakes of former writers concerning it, are remarked; its natural history from more exact observations is attempted; and the whole urged, as a difficulty against the doctrine of univocal generation. *Philosoph Trans Royal Soc.* 13: 113-144.
- 4) Van Beneden P J. 1854. Note sur de experiences relatives au developement des cysticerques. *Ann Sci Nat.* 1:104.
- 5) Kuchenmeister F. 1855. Offenes Sendschreiben an die k.k. Gesellschaft der Aertze zu Wien. Experimenteller Nachweis, dass *Cysticercus cellulosae* innerhalb des menschlichen Darmkanales sich in *Taenia solium* umwandelt. *Wiener medizinische Wochen-schrift*, 5:1-4. Translated in: Kean B H, Mot J E, Rusell A J. *Trop Med Parasitol. Classic Invest.* Cornell Univ. Press. Ithaca 1978: 677.
- 6) Gómez Alanís A. 1994. Dos casos de cisticercosis cutáneo – muscular en el hombre. *An Inst Invest Cientif.* 1(1): 79-93.
- 7) Yoshino K. 1934. On the evacuation of eggs from detached gravid proglottids of *Taenia solium* and on structure of its eggs. *Taiwan Igakkai Zasshi.* 33: 47-58.
- 8) Yoshino K. 1934. On the subjective symptoms caused buy the parasitism of *Taenia solium* and its developemente in man. *Taiwan Igakkai Zasshi.* 33: 183-194.
- 9) Cheng, T. 1986. *General Parasitology*. Harcourt Brace Haranovich, Publishers. New York.
- 10) Craig F. 1970. *Clinical Parasitology*. Philadelphia. Lea & Febiger. 529-535.
- 11) Pearse V, Pearse J, Bochshaum M, Buschsham R. 1987. *Living invertebrates*. California USA. Blackwell Scientific Publ. The Boxwood Press. 242-246.
- 12) Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette J P, Larralde C, Madrazo I, Velazquez V, Willms K. 1987. Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y el control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Fondo de cultura económica. México. pp-116.

- 13) Abdussalam, M. 1975. El problema de la Teniasis – Cisticercosis. VII Reunión interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis. Organización Panamericana de la Salud. Publicación científica No. 295: 117-129.
- 14) Smyth J D. 1969. The Physiology of Cestodes. Oliver and Boyd. Edimburgo. pp-279.
- 15) Flisser A, Madrazo I, Delgado H. 1997. Cisticercosis Humana. Editorial El Manual Moderno. México.
- 16) Willms K, Vargas-Parada L, Laclette J P. 2006. Biología del parásito. En C Larralde, A S de Aluja (coords). Cisticercosis guía para los profesionales de la salud. Fondo de cultura económica. México. 19-40.
- 17) Yoshino K. 1933. Studies in post embryonal development of *Taenia solium*. Parte III. J Med Ass Formosa. 32: 166-169.
- 18) Acha P N, Szyfres B. 1986. Teniasis y cisticercosis. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación científica No. 503. Organización Panamericana de la salud. 763-774.
- 19) Laclette J P, Ornelas Y, Merchant M T, Willms K. 1982. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. In: A Flisser, K Willms, J P Laclette, C Larralde, C Ridaura, F Beltrán (eds). Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. New York: Academic Press. 375-387.
- 20) Slais J. 1970. The morphology and Pathogenicity of the Bladder Worms of *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus bovis*. Academia. Praga. pp-144.
- 21) Ramírez – Bon E, Merchant M T, González del Pliego M, Cañedo L. 1982. Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of *Taenia solium*. In: A Flisser, K Willms, J P Laclette, C Larralde, C Ridaura, F Beltrán (eds). Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. New York: Academic Press. 261-279.
- 22) Escobar A. 1983. The Pathology of Neuro-cysticercosis. In: E Palacios, J Rodríguez-Carvajal y J M Traveras (comps): Cysticercosis of the Nervous System. Charles C Thomas. Springfield. 27-54.
- 23) de Aluja A S. 2006. La cisticercosis porcina en México. En Larralde C y de Aluja A S (coords): Cisticercosis guía para los profesionales de la salud. Fondo de cultura económica. México. 104-132.
- 24) Vargas M G, Saldierna U, navarro F R, Acevedo H A, Flisser A y de Aluja A S. 1986. Localización del cisticerco de la *Taenia solium* en diferentes regiones musculares del cerdo y su importancia para la inspección sanitaria. Veterinaria México. 17: 275-280.
- 25) Reyes M A. 2000. Purificación parcial de Glutation Peroxidasa (GSH-Px) de cisticercos de *Taenia solium*. Tesis QFB. FES Zaragoza. UNAM. México. pp-118.

- 26) López-Cepeda L, Proaño J, Ambrosio J, Ávila-Ramírez G, Flisser A. 2001. Estudio de individuos con teniosis y su asociación con enfermos con neurocisticercosis. Rev Fac Med UNAM. 44 (4): 164-167.
- 27) Tay J, Salazar P M, Haro I, Bucio M I. 1976. Frecuencia de las helmintiasis intestinales en México. Rev Invest Salud Públ 36: 241-280.
- 28) Sarti E, Schantz P M, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillán R, Flisser A. 2000. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. Transact Royal Soc Trop Med Hyg. 94: 85-89.
- 29) Sarti E. 1997. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. Salud Pública Mex. 39 (3). 225-231.
- 30) Sánchez-Serrano A P, Ambrosio J, Ávila G, Aguilar L, Montiel E, Torres M, Flisser A. 2002. Frecuencia de teniosis y cisticercosis en expendedores de alimentos. Rev Fac Med UNAM. 45(2): 60-63
- 31) Sarti E, Schantz P M, Lara-Aguilera R, Gómez-Dantés H, Flisser A. 1988. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. Trop Med Parasitol. 39: 194-198.
- 32) Sarti E, Flisser A, Schantz P M, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P S, Bronfman M, Wijeyaratne P. 1997. Development and evaluation of health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 56: 127-32.
- 33) Schantz P, Moore A, Muñoz J, Hartman B, Shaefer J, Aron A, Persaud D, Sarti E, Gracos A, Flisser A. 1992. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish Community in New York City. New England J Med. 327: 692-695.
- 34) García-García M L, Torres M, Correa D, Flisser A, Sosa-Lechuga A, Velasco O, Meza-Lucas A, Plancarte A, Avila G, Tapia R, Aguilar L, Mandujano A, Alcántara I, Morales Z, Salcedo A, Manon M L, Valdespino J L. 2000. Prevalence and risk of cysticercosis and taeniasis in an urban population of soldiers and their relatives. Am J Trop Med Hyg. 61: 386-389.
- 35) Fleury A, Escobar A, Chavarría A, Carrillo-Meza R, Sciutto E. 2006. Cisticercosis en el ser humano. En: C Larralde, A S de Aluja (coords). Cisticercosis guía para los profesionales de la salud. Fondo de cultura económica. México. 41-86.
- 36) Sotelo J. 1996. Clínica y diagnóstico de la cisticercosis humana. Organización Panamericana de la Salud. 122-124.
- 37) Fleury A, Desein A, Preux P M, Dumas M, Tapia G, Larralde C, Sciutto E. 2004. Symptomatic human neurocysticercosis. Age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. J Neurol. 251: 830-837.

- 38) Schenone H, Villaroel F, Rojas A, Ramírez R. 1982. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. In: A Flisser, K Willms, J P Lacleste, C Larralde, C Ridaura, F Beltrán (eds). Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press, New York. 25-38.
- 39) Velasco Suarez M, Bravo Becherelle M A, Quirasco F. 1982. Human cysticercosis: medical-social implications and economic impact. In: A Flisser, K Willms, J P Lacleste, C Larralde, C Ridaura, F Beltrán (eds). Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press, New York. 47-51.
- 40) Díaz S, Candil R, Uribe M, Willms K. 1990. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 84: 563-566
- 41) Larralde C, Padilla A, Hemández M, Govezensky T, Sciutto E, Gutiérrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Sepúlveda J. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Salud Pública Mex. 31: 197-210.
- 42) Antoniuk S. 1999. Epidemiología de la neurocisticercosis. Rev. Neurol. 29 (4): 331-334.
- 43) Bern C, Garcia H H, Evans C, Gonzalez A E, Verastegui M, Tsang V C, Gilman R H. 1999. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. Clin Infect Dis. 29: 1203–1209.
- 44) Mafojane N A, Appleton C C, Krecek R C, Michaelis L M, Willingham A L. 2003. The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern Africa. Acta Trop 87: 25–33.
- 45) White C A. 1997. Neurocysticercosis. A major cause of neurological disease world wide. Clin Infect Dis. 24. 101-115.
- 46) Voet D, Voet J G. 1992. Bioquímica. Omega. Barcelona. pp-1315.
- 47) Srere P A. 1980. The infrastructure of the mitochondrial matrix. Trends Biochem Sci. 5(5): 120-121.
- 48) Bryce C F, Williams D C, John R A, Fasella P. 1976. The anomalous kinetics of coupled aspartate aminotransferase and malate dehydrogenase. Evidence for compartmentation of oxaloacetate. Biochem J. 153(3): 571-7.
- 49) Lehninger A L. 1980. Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y la función. Ediciones Omega. Barcelona. pp-1117.
- 50) Campos G O. 2001. Efectos de la atmosfera iónica en la estabilidad cinética de la quimopapaína. Tesis Maestría. UAM Iztapalapa. México. pp-57.

- 51) Agüero F, Repetto Y, Hellman U, Cazzulo J J. 1995. Purification and partial characterization of the cytosolic malate dehydrogenase from protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem Parasitol.* 72: 247-251.
- 52) Branden C, Tooze J. 1991. Enzymes that bind Nucleotides. In: C Branden, J Tooze (eds). *Introduction to protein structure*. Garland Publishing. New York. 141-59.
- 53) Goward C R, Nicholls D J. 1994. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science.* 3: 1883-1888.
- 54) Fukumoto S. 1985. Pyruvate kinase isozymes and phosphoenolpyruvate carboxykinase during development of *Spirometra erinacei*. *Yonago Acta Medica.* 28(3): 89-105
- 55) Williamson D H, Lund P, Krebs H A. 1967. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J.* 103(2): 514-27.
- 56) Mullinax T R, Mock J N, McEvily A J, Harrison J H. 1982. Regulation of Mitochondrial Malate Dehydrogenase Evidence for an Allosteric citrate-binding site. *J Biol Chem.* 257: 13233-13239.
- 57) Banaszak L J, Bradshaw R A. 1975. Malate dehydrogenases. En: *The enzymes*. Vol XI. Boyer P (ed). *The enzymes 3rd ed*. New York: Academic Press. 369-396.
- 58) Sundaram T K, Wright I P, Wilkinson A E. 1980. Malate dehydrogenase from thermophilic and mesophilic bacteria. Molecular size, subunit structure, amino acid composition, immunochemical homology, and catalytic activity. *Biochemistry.* 19: 2017-2022.
- 59) McEvily A J, Mullinax T R, Dulin D R, Harrison J H. 1985. Regulation of mitochondrial malate dehydrogenase: Kinetic modulation independent of subunit interaction. *Arch Biochem Biophys.* 238: 229-236
- 60) Breiter D H, Resnik E, Banaszak L J. 1994. Engineering the quaternary structure of an enzyme: construction and analysis of a monomeric form of malate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Protein Science.* 3: 2023-2032.
- 61) Chen J, Smith D L. 2001. Amide hydrogen exchange shows that malate dehydrogenase is a folded monomer at pH5. *Protein science.* 10: 1079-83.
- 62) Hodges C T, Wiggins J C, Harrison J H. 1977. Investigation of the relation of the pH-dependent dissociation of malate dehydrogenase to modification of the enzyme by N-Ethylmaleimide. *J Biol Chem.* 252: 6038-41.
- 63) McAlister-Hernn L. 1988. Evolutionary relationships among the malate dehydrogenases. *Trends Biochem. Sci.* 13: 178-81.



- 64) Minárik P, Tomášková N, Kollárová M, Antalík M. 2002. Malate Dehydrogenases - Structure and Function. *Gen. Physiol. Biophys.* 21: 257-265.
- 65) Birktoft J J, Rhodes G, Banaszak L J. 1989. Refined crystal structure of cytoplasmic malate dehydrogenase at 2.5Å resolution. *Biochem.* 28: 6065-89.
- 66) Clarke A R, Wigley D B, Chia W N, Barstow D, Atkinson T, Holbrook J J. 1986. Site-directed mutagenesis reveals role of mobile arginine residue in lactate dehydrogenase catalysis. *Nature.* 324: 699-702.
- 67) Grau U M, Trommer W E, Rossmann M G. 1981. Structure of the active ternary complex of pig heart lactate dehydrogenase with S-lac-NAD at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol.* 151: 289-307.
- 68) Wigley D B, Gamblin S J, Turkenburg J P, Dodson E J, Piontek K, Muirhead H, Holbrook J J. 1992. Structure of a ternary complex of an allosteric lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 2.5Å resolution. *J Mol Biol.* 223: 317-335.
- 69) Fahien L A, Kmiotek E H, MacDonald M J, Fibich B, Milka M. 1988. Regulation of malate dehydrogenase activity by glutamate, citrate,  $\alpha$ -ketoglutarate, and multienzyme interaction. *J. Biol. Chem.* 263: 10687-10697
- 70) Gelpí J L, Dordal A, Montserrat J, Mazo A, Cortés A. 1992. Kinetic studies of the regulation of mitochondrial malate dehydrogenase by citrate. *Biochem. J.* 283: 289-297.
- 71) Newsholme E A, Start, C. 1973. *Regulation in Metabolism.* John Wiley. New York. pp-349.
- 72) Beeckmans S, Kanarek L. 1981. Demonstration of physical interactions between consecutive enzymes of the citric acid cycle and of the aspartate-malate shuttle. *Eur. J. Biochem.* 117: 527-535.
- 73) Robinson J B Jr, Inman L, Sumegi B, Srere P A. 1987. Further characterization of the Krebs tricarboxylic acid cycle metabolin. *J. Biol. Chem.* 262: 1786-1790.
- 74) Barrett J. 1984. The anaerobic end-products of helminths. *Parasitol.* 88: 179 – 98.
- 75) Bryant C. 1978. The regulation of respiratory metabolism in parasitic helminths. *Adv Parasitol.* 16: 311 – 331.
- 76) Tielens A G M. 1994. Energy generation in parasitic helminthes. *Parasitol Today.* 10(9): 346 – 352.
- 77) Bryant C. 1993. Organic acid excretion by helminths. *Parasitol Today.* 9: 58-60.

- 78) Tejada P, Sánchez-Moreno M, Monteoliva M, Gómez-Banqueri H. 1987. Inhibition of malate dehydrogenase enzymes by benzimidazole anthelmintics. *Vet Parasitol.* 24(3-4): 269-74.
- 79) Smyth J D, McManus D P. 1989. *The physiology and biochemistry of cestodes.* Cambridge University Press. Great Britain. pp-401.
- 80) Lwin T, Probert A J. 1975. Effect of Certain Fasciolicides on Malate Dehydrogenase Activity of *Fasciola hepatica*: a Possible Biochemical Mode of Action of Hexachlorophene and Oxyclozanide. *Pestic. Sci.* 6: 121-128.
- 81) Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L. 2008. *Bioquímica.* Reverté. Barcelona.
- 82) Schatz G, Mason T L. 1974. The biosynthesis of mitochondrial proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 51-87.
- 83) Hay R, Bohni P, Gasser S. 1984. How mitochondria import proteins. *Biochim Biophys Acta.* 779(1): 65-87.
- 84) del Arenal I P, Bonilla A C, Moreno-Sánchez R, Escamilla J E. 1998. A method for the isolation of tegument syncytium mitochondria from *Taenia crassiceps* cysticerci and partial characterization of their aerobic metabolism. *J Parasitol.* 84(3):461-8
- 85) Yoon H, Anderson B M. 1988. Kinetic studies of *Haemophilus influenzae* malate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* 955(1):10-8.
- 86) Tahir M K, Mannervik B. 1986. Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of Glutathione Transferase. *J Biol Chem.* 261: 1048-1051.
- 87) Brand T, Churchwell F, Eckert J. 1968. Aerobic and anaerobic metabolism of larval and adult *Taenia taeniaeformis*. *Exp Parasitol.* 23: 309-318.
- 88) Nakao M, Sako Y, Ito A. 2003. The mitochondrial genome of the tapeworm *Taenia solium*: a finding of the abbreviated stop codon U. *J. Parasitol.* 89(3): 633-635.
- 89) Agüero F, Noé G, Hellman U, Repetto Y, Zaha A, Cazzulo JJ. 2004. Purification, cloning, and expression of the mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) from protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol.* 137(2): 207-14.
- 90) Plancarte A, Nava G, Mendoza-Hernández G. 2009. Purification, properties, and kinetic studies of cytoplasmic malate dehydrogenase from *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol Res.* 105(1): 175-83.
- 91) Bryant C, Flockhart H A. 1986. Biochemical strain variation in parasitic helminths. *Adv Parasitol.* 25: 275-319.

92) Nava G. 2007. Caracterización de la actividad de Glutathion S-Transferasa microsomal en cisticercos de *Taenia solium*. Tesis Maestría. Facultad de Medicina. UNAM. México. pp-95.