



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE DOS
ISOFORMAS DE LACTATO DESHIDROGENASA DE
CISTICERCOS DE *Taenia solium*.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
PRESENTA
MARÍA TERESA FLORES ORDAZ

Director de Tesis

Dr. Agustín Plancarte Crespo

Asesora interna

Dra. Evangelina Romero Callejas

México, D.F.

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A las personas más importantes, a los pilares de mi vida, a mis padres Ismael y Catalina, a mi hermana Alma.

Gracias a su apoyo y comprensión se cumple un sueño más en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Mi mas profundo agradecimientos al Dr. Agustín Plancarte Crespo por su asesoría y dirección en el trabajo de investigación.

A la M. en C. Gabriela Nava Balderas por su valioso apoyo técnico.

Al programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN 200510-3.

JURADO ASIGNADO

Presidente MVZ. Osvaldo Froylan Ibarra Velarde

Vocal MVZ. Irene Cruz Mendoza

Secretario BIOL. José Gerardo Perera Marín

Suplente MVZ. Evangelina Romero Callejas

Suplente QBP. Carolina Castro Martínez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Inmunobioquímica de *Taenia solium*.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

CONTENIDO

Página

Resumen	1
1. Introducción	3
Historia	3
Clasificación Taxonómica	3
Ciclo biológico	4
Morfofisiología	5
Neurocisticercosis	7
Metabolismo en helmintos	9
Enzimología	10
Cinética enzimática	17
Estudios de inhibición	20
2. Objetivos	24
3. Material y métodos	25
Purificación	25
Obtención de los cisticercos	26
Obtención del extracto crudo del metacestodo	26
Precipitación con sulfato de amonio	26
Cromatografía de intercambio aniónico Sefarosa aminoetil cuaternaria (QAE)	27
Cromatografía de Hidroxiapatita	28
Cromatografía de intercambio catiónico Carboximetil – Sefarosa (CM –Sefarosa)	29
Cromatografía de intercambio de amortiguadores (PBE 74)	30
Cromatografía de filtración (Sefacryl S - 200)	31

Determinación del peso molecular	31
Análisis electroforético por geles de poliacrilamida	32
Determinación de la concentración de proteína	32
Determinación de la actividad de LDH	32
Determinación del pH óptimo de reacción para LDH	34
Determinación de la estabilidad de la LDH en función del pH	34
Estabilidad de actividad de LDH a diferentes temperaturas	35
Obtención de las constantes catalíticas K_m y V_{max}	35
Ensayos de inhibición de la actividad catalítica de la LDH	38
4. Resultados	41
Purificación de la LDH de <i>T. solium</i>	41
Precipitación con sulfato de amonio	41
Cromatografía de intercambio aniónico Sefarosa aminoetilcuaternaria (QAE)	42
Cromatografía de Hidroxiapatita	46
Cromatografía de intercambio catiónico Carboximetil – Sefarosa (CM –Sefarosa)	51
Cromatografía de intercambio de amortiguadores (PBE 74)	54
Análisis electroforético por geles de poliacrilamida	56
Resumen de purificación de la LDH	57
Determinación del peso molecular por medio de geles de poliacrilamida	57
Cromatografía de filtración (Sefacryl S - 200)	57
Determinación del peso molecular	57
Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de las LDHs	58
Estabilidad de actividad de LDH a diferentes temperaturas	61
Determinación de las constantes catalíticas K_m y V_{max}	62

Estudios de inhibición	78
5. Discusión	87
6. Conclusiones	92
7. Abreviaturas	93
8. Referencias bibliográficas	94

RESUMEN

FLORES ORDAZ MARÍA TERESA. PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE DOS ISOFORMAS DE LACTATO DESHIDROGENASA DE CISTICERCOS DE *Taenia solium*. (Director de Tesis Dr. Agustín Plancarte Crespo. Asesora interna MVZ Evangelina Romero Callejas).

Niveles elevados de lactato deshidrogenasa (LDH: EC 1.1.1.27) se detectaron en cisticercos de *Taenia solium*. Dos principales isoenzimas (LDHTs 1 y LDHTs 2) se purificaron (la segunda parcialmente) por cromatografías sucesivas de aminoetil cuaternaria (QAE)-sefarsosa, carboximetil (CM)-sefarsosa e hidroxapatita (HTP). Ambas LDHTs presentan subunidades de de Mr 36000. LDHTs 1 presenta un $pI = 8.2$ y una actividad específica de 96 U mg^{-1} cuando reduce al piruvato.

La LDHTs 2 tiene una actividad específica de 58 U mg^{-1} un $pI = 6.51$ y un pH óptimo para reducir al piruvato de 6.5. Esta isoforma fue estable de 5 a 40° C cuando redujo al piruvato. Los valores de las K_m aparentes para piruvato, lactato, NAD y NADH fueron de 0.04, 3.14, 0.11 y $0.09 \mu\text{M}$ respectivamente. En el mismo orden, sus V_{max} aparentes resultaron ser 49.5, 16, 18.2, $72.3 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ lo cual sugiere que se favorece la reducción del piruvato sobre la oxidación del lactato. LDHTs 2 fue inhibida por p – hidroxí mercuri benzoato y tal efecto inhibitorio fue revertido por la adición de ditritiotreitol (DTT). Los péptidos LNLVQR y VIGSGTNLDTSR fueron revelados para la LDHTs 2 por espectroscopia de masas y resultaron semejantes para la LDH de *Pediculus humanus corporis*. La información obtenida en este estudio podría ser útil para

entender la producción de energía del parásito y establecer diferencias con la de sus huéspedes con fines profilácticos.

INTRODUCCIÓN

HISTORIA

A mediados del siglo XIX Kuchenmeister indicó que las tenias del cestodo *T. solium* se desarrollan a partir de sus cisticercos; esto lo demostró al darles de comer cisticercos extraídos de carne de cerdo a diversos convictos, los cuales asombrosamente presentaron tenias en sus intestinos encontradas durante su autopsia.¹ En 1853 Van Beneden señaló el desarrollo de cisticercos en cerdos cuando alimento a uno de estos con huevos de *T. solium* y se encontraron numerosos cisticercos en los músculos². Yoshino en 1933 describió con gran detalle histológico el desarrollo temprano de los cisticercos en el cerdo, y él mismo ingirió cisticercos para continuar con el curso de su propia teniosis³⁻⁵, informando que expulso diariamente de 1 a 5 proglótidos.⁶⁻⁷ La teniosis/cisticercosis probablemente llegó a México hace aproximadamente 500 años. Con los conquistadores y sus cerdos domesticados venía también sus parásitos y otros patógenos hasta entonces ausentes en el Nuevo Mundo.⁸

CLASIFICACION TAXONÓMICA

Subreino: *Metazooarios*

Phylum: *Plathelminfos*

Clase: *Cestoidea*

Subclase: *Eucestoda*

Orden: *Cyclophyllidea*

Familia: *Taeniidae*

Genero: *Taenia*

Especie: *Taenia solium*⁹

CICLO BIOLÓGICO

Taenia solium (fase adulta) parasita únicamente al ser humano y se aloja en el intestino delgado ¹⁰.

La cisticercosis es adquirida por la ingestión de los huevos de *T. solium* eliminados al medio ambiente por un portador de la forma adulta del parásito.¹¹

Una vez en el tubo digestivo del huésped los huevos se mezclan con las enzimas proteolíticas y sales biliares y de esta forma activan al embrión hexacanto contenido en el huevo.

Los embriones activados traspasan la pared intestinal llegando a capilares linfáticos y sanguíneos que los distribuyen a diferentes órganos y tejidos.

El ciclo se completa cuando una persona ingiere carne de cerdo semicruda que contiene cisticercos vivos.

El escólex del cisticerco en el intestino del huésped evagina estimulado por la secreción de la vesícula biliar y las enzimas digestivas.

Las ventosas del escólex se adhieren a la pared intestinal e inducen la protrusión de los ganchos que sujetan en la mucosa intestinal.¹²

El parásito crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia adulta productora de proglótidos grávidos, que libera.¹³

Los proglótidos grávidos, estructuras de esta fase que se describirán con detalle en el subcapítulo de morfofisiología, se desprenden (en promedio de cuatro a cinco por día) y son evacuados hacia el exterior junto con la materia fecal del huésped. La primera expulsión de proglótidos grávidos sucede de 3 a 4 meses después de la infección.¹⁴

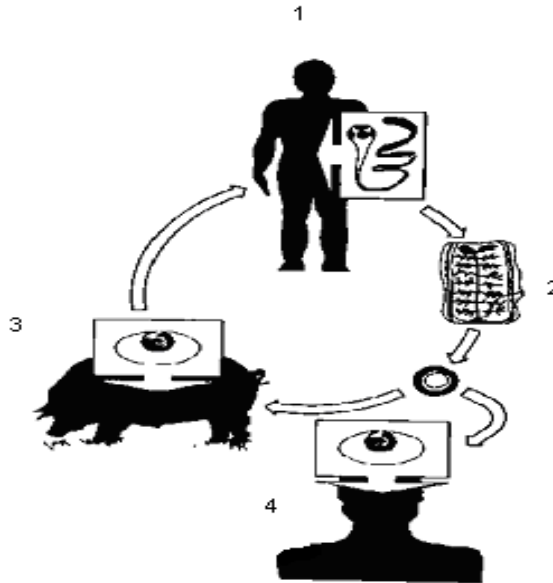


Figura 1. Ciclo biológico de *Taenia solium*¹⁵

(1) El humano es el huésped definitivo de la forma adulta de *T. solium*. (2) Cada segmento o proglótido contiene miles de huevos que son liberados al ambiente junto con las heces del portador. (3) El cerdo consume la materia fecal junto con los huevos del parásito y éstos son activados por las sales biliares y jugos gástricos. La oncosfera o embrión hexacanto, viaja vía linfática y/o sanguínea a los diferentes órganos y tejidos del cerdo y se desarrollan en metacestodos. El ciclo se cierra cuando el hombre ingiere la carne cruda o mal cocida del cerdo parasitado. (4) El hombre también puede ser hospedero accidental de la forma larvaria al ingerir los huevos de la tenia.

MORFOFISIOLOGÍA

Taenia solium es un gusano aplanado y largo, aproximadamente mide entre 1.5 m y 5 m de longitud; el escólex presenta cuatro ventosas y un rostelo coronado por dos hileras de ganchos. El número de ganchos varía entre 22 y 32 y su tamaño alrededor de 159 μm a 173 μm . El escólex en su parte inferior se adelgaza para formar un cuello, a partir del cual se forman los proglótidos.¹⁶ Al

conjunto de proglótidos unidos entre si en forma de cadena se le denomina estróbilo, los proglótidos mas cercanos al cuello son los mas jóvenes e indiferenciados. A su vez los más distantes son completamente diferenciados, grávidos y contienen un gran número de huevos.

Los proglótidos son segmentos independientes pero unidos entre si. Están recubiertos por un tegumento con microtricas en su superficie exterior, constituyendo un tejido sincitial con funciones de secreción y absorción.

Cada proglótido maduro puede considerarse como una unidad reproductora independiente, puesto que posee órganos genitales masculinos y femeninos.

Los genitales masculinos se desarrollan primero y están constituidos por un gran numero de testículos (~275 a ~ 575) que confluyen en un ducto genital que a su vez se desemboca por un costado del proglótido en el atrio genital.

Los genitales femeninos están constituidos por un ovario trilobulado situado en la base del útero en el extremo posterior del proglótido. El ovario desemboca en el atrio genital. El útero en los proglótidos grávidos muestra de siete a quince ramas laterales llenas de huevos.¹⁷

Los huevos de *T. solium* son esféricos y tienen apariencia radial cuando se observan bajo el microscopio de luz. La envoltura mas externa es el vítelo, la siguiente capa es la membrana embriofórica la cual esta formada por bloques compuestos por una proteína que es resistente a los jugos digestivos naturales y artificiales. En contraste la sustancia cementante que une a los bloques es sensible a las enzimas digestivas.¹⁸ La capa mas interna es la membrana oncosferal; esta es impermeable a las condiciones ambientales externas, sin embargo se vuelve permeable cuando se pone en contacto con la pancreatina

y permite que el embrión hexacanto se active realizando movimientos de los ganchos, permitiéndole salir de la membrana oncosferal.^{19, 11.}

El metacestodo de *T. solium* esta formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido, con un pequeño escólex invaginado. La superficie de la vesícula esta rodeada por microvellosidades limitadas por una membrana plasmática, y esta a su vez se encuentra cubierta por una capa vellosa de glucocálix. El tegumento se encuentra debajo de la membrana plasmática, contiene vesículas elipsoidales de diferentes tamaños.²⁰

NEUROCISTICERCOSIS (NC)

La neurocisticercosis humana es una enfermedad compleja cuyas manifestaciones principales dependen del número, localización, estadio y tipo de parásitos albergados en el sistema nervioso central y las meninges. En humanos puede ser una enfermedad asintomática o que dependiendo el grado de la reacción inflamatoria inducida por el parásito, presente varios signos y síntomas como: crisis convulsivas, hidrocefalia, cefalea, estado mental alterado.

El 70 % de los pacientes con esta enfermedad presentan crisis convulsivas, el 50 % de los casos causa epilepsia y un 23 % hipertensión endocraneal.²¹ En México la neurocisticercosis a llegado a ser la causa de muerte en el 13 % de las necropsias de individuos con neurocisticercosis.^{22, 23} y en hospitales neurológicos, el 11 % de los casos se debe a este padecimiento.²⁴

Uno de los fenómenos más interesantes en inmunoparasitología es la evasión de la respuesta inmune del huésped por el parásito. Estos mecanismos son

complejos. Los cisticercos son capaces de sobrevivir en el huésped humano durante varios años antes de su degeneración.²⁵

METABOLISMO

Es el conjunto de todas las transformaciones bioquímicas que ocurren en una célula y en el organismo.

El metabolismo intermediario comprende dos procesos conjugados: el catabolismo y el anabolismo. Las rutas catabólicas son las responsables de la degradación de las moléculas nutritivas de alto contenido energético y desde el punto de vista energético son exergónicas en su mayoría porque liberan energía, mientras que las rutas anabólicas, por las cuales se efectúa la biosíntesis de los componentes celulares conducen a la síntesis de nuevos productos y son endergónicas, es decir consumen la energía del sistema.²⁶

Cada ruta se halla promovida por una secuencia de enzimas específicas que catalizan reacciones consecutivas. Las rutas catabólicas y anabólicas que se inician con un nutriente determinado o que conducen a él, como la glucosa, no son exactamente inversas una de otra, sino que son química y enzimáticamente diferentes. Además se hallan reguladas independientemente y se localizan en diferentes partes de la célula. El catabolismo de las moléculas de los compuestos nutritivos va acompañado de la conservación de la energía de aquéllos en forma de energía de enlace fosfato del trifosfato de adenosina (ATP). De forma recíproca la energía química necesaria para las rutas biosintéticas es aportada por la desfosforilación del ATP. La energía química es transportada también desde las rutas catabólicas a las anabólicas en forma de coenzimas reducidas, especialmente de NADPH.²⁷

METABOLISMO EN HELMINTOS

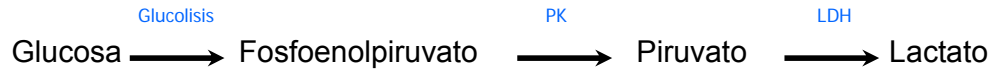
Dependiendo de la etapa del ciclo de vida del parásito éstos tienen la capacidad de funcionar aeróbica o anaeróbicamente, por lo que se adapta a diferentes ambientes. Los parásitos en estado adulto son dependientes de carbohidratos (obtenidos del hospedero) para su metabolismo, como la mayoría de los organismos, pueden oxidar los hidratos de carbono a través de la glucólisis y llevar a cabo la fosforilación resultando en la formación de ATP

En el metabolismo de helmintos se propone dos vías metabólicas alternativas para el catabolismo del fosfoenolpiruvato (PEP):

- a) La fijación del CO_2 es necesario para la formación del oxaloacetato (OAA) desde el PEP, catalizado por la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK). El OAA en el citoplasma, es reducido a malato por la enzima malato deshidrogenasa citosólica (cMDH) después atraviesa la membrana mitocondrial para ser catabolizado.
- b) El PEP es convertido a piruvato por la piruvato cinasa (PK), como en tejido de mamíferos.²⁸

DOS TIPOS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CESTODOS

A) Fermentación láctica



B) Dismutación de malato

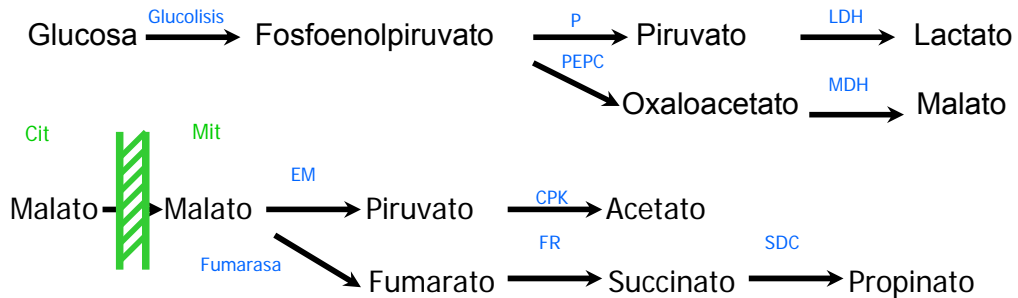


Figura 2. Tipos de metabolismo energético en cestodos. A) Fermentación láctica, B) Dismutación de malato. PK, piruvato cinasa; LDH, lactato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxicina; MDH, malato deshidrogenasa; EM, enzima málica; CPK, piruvato deshidrogenasa; FR, fumarato reductasa; SDC, succinato descarboxilasa.(Bryant and Flockhart, 1986).

ENZIMAS

Las enzimas son catalizadores biológicos que aceleran las reacciones químicas dentro de una célula o espacios extracelulares. Son proteínas con uno o más sitios definidos de adsorción a los que se adhieren el sustrato.

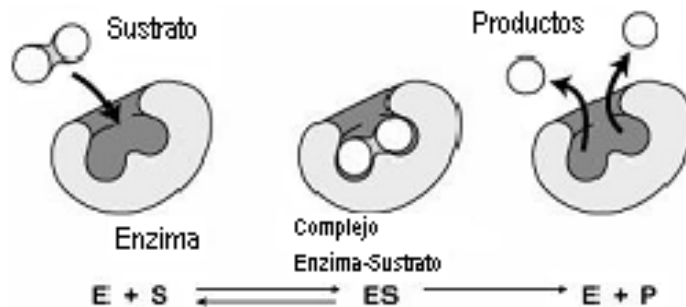


Figura 3. Esquema simple de una reacción enzimática y la ecuación de la misma para una enzima que cataliza un solo sustrato.

La manera en que funcionan las enzimas es transformando a su(s) sustrato(s) (S) en uno o varios productos (P). Generalmente es una reacción reversible, en la cual la dirección de la reacción esta dada por una constante de equilibrio.²⁹

Especificidad enzimática

La mayoría de las enzimas son específicas para sus sustratos y sus reacciones catalíticas, algunas poseen una especificidad casi absoluta respecto a un sustrato determinado, y no reconocerán a moléculas aunque estén muy relacionadas, otras con especificidad relativamente amplia reaccionan con toda una clase de moléculas con un común denominador estructural, aunque generalmente lo realizan a diferentes velocidades.

Estereoespecificidad

Las enzimas pueden generar productos que se diferencian en su estereoisomería de reactivos que difieren solo en su estereoisomería.²⁹ En el

centro activo de las enzimas capaces de formar un estereoisómero específico a partir de un precursor óptimamente inactivo. Se han observado catálisis estereoespecíficas en algunas reacciones de polimerización no biológicas. Orgel y sus colaboradores han demostrado mediante experimentos, la importancia de la especificidad óptica en la replicación de los ácidos nucleicos. Cuando se utiliza como patrón un ácido poliuridílico cuyas unidades de ribosa son de la forma D, con objeto de inducir la condensación no enzimática de las moléculas AMP ligadas a él por enlaces de hidrogeno, para formar un ácido poliadenílico, la condensación favorecida es la del estereoisómero D del AMP, con preferencia a la del L ~ estereoisómero. Por lo que una vez que se ha formado un patrón polinucleótido con monómeros óptimamente homogéneos, este dirige preferentemente, la síntesis de otra cadena polinucleótida del mismo tipo óptico, incluso si la fuente disponible a partir de la cual se produce la nueva cadena, está constituida por una mezcla de las formas D y L.

Regulación

La actividad enzimática puede ser regulada, las enzimas pueden ser activadas o inhibidas, así la cantidad de producto formado responde a las necesidades de la célula. La velocidad de reacción de cada una de las reacciones enzimáticas dependerá del pH y de las concentraciones intracelulares del sustrato(s), o del producto(s) y del cofactor, que son los elementos primarios para la regulación de la actividad enzimática.

El segundo nivel de control de las secuencias metabólicas se efectúa a través de la acción de las enzimas reguladoras. Varias enzimas reguladoras son inhibidas por el producto final de la secuencia en la que actúan. Además

algunas enzimas reguladoras son activadas o estimuladas por metabolitos específicos, a veces por sus propios sustratos. Otras enzimas pueden responder a dos o más activadores o inhibidores que o pueden ser los propios productos de las dos rutas ramificadas.

El tercer nivel ejerce la regulación metabólica a través del control genético de la velocidad de la síntesis de la enzima. Las enzimas que se hallan siempre en cantidades constantes en determinada célula recibe el nombre de enzimas constitutivos. Los que solamente se sintetizan en respuesta a la presencia de ciertos sustratos se llaman enzimas inducidos.³⁰

Sitio activo

El sustrato se adhiere al componente proteico de la enzima denominado sitio activo. Las partes del sustrato sobre las cuales actúan la enzima, uniéndose a este sitio activo, establecen un tipo de relación llave- cerradura.

La ionización ácida se produce por lo grupos carboxilo ($-COOH$), hidroxilo ($-OH$), sulfúrico ($-HSO_4$) o fosfórico ($-H_2PO_4$). En las proteínas la ionización básica se realiza en el grupo amino ($-NH_2$) y en otros grupos básicos. La ionización de una proteína depende de su punto isoeléctrico. Si el pH es superior a éste, los grupos ácidos se ionizan; si es menor, lo grupos básicos se disocian.

Cofactores

Algunas enzimas necesitan asociarse con un cofactor no proteico para mostrar la actividad enzimática.

Los cofactores comúnmente incluyen iones metálicos como el Zn^{2+} o Fe^{2+} , y moléculas orgánicas, conocidas como co-enzimas, son a menudo derivados de las vitaminas. Por ejemplo, la coenzima NAD⁺ contiene niacina, FAD contiene riboflavina, y la coenzima A contiene ácido pantoténico. El término holoenzima se refiere al complejo formado por la enzima y su cofactor. La apoenzima se refiere solo a la porción proteica de la enzima excluyendo a su cofactor. A falta del cofactor, las apoenzimas normalmente no muestran actividad biológica.³⁰

Nomenclatura

Cada enzima tiene asignado dos nombres: a) un corto que se refiere al nombre “recomendado” que sirve para el uso diario, b) el nombre sistemático que define a una enzima sin ambigüedad.

a) Nombre recomendado

El más común es el que tiene la terminación “asa” unido al nombre del sustrato de la reacción, ej. ureasa, colagenasa, etc. También incluyen la acción realizada como lactato deshidrogenasa, glutatión S-transferasa, etc.

La excepción es para esas enzimas que retienen su nombre trivial como tripsina y pepsina.

b) Nombre sistemático

Es el que está contenido en un sistema de nomenclatura desarrollado por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (UIBBM). En este sistema las enzimas están divididas en seis principales clases (ver adelante) cada una con subgrupos enumerados. Así, la terminación “asa” está unida a una descripción amplia de la reacción química catalizada, ej. D-gliceraldehido 3-fosfato: nad oxidoreductasa

Clases de enzimas

I. Oxidorreductasas

Son enzimas que catalizan las reacciones de oxido-reducción.

Los nombres para la mayoría de este grupo son: deshidrogenasas, oxidasas (el O_2 actúa como receptor), oxigenasa (el O_2 es incorporado parcialmente a la molécula), y peroxidasas (el H_2O_2 sirve como receptor).

II. Transferasas

Este grupo de enzimas cataliza la transferencia de grupos químicos en las proteínas. Las enzimas características de este grupo son: transaminasa, quinasa y transacetilasas.

III. Hidrolasas

Su principal función es la hidrólisis de enlaces de una gran variedad de compuestos por la adición del agua. Enzimas conocidas en este grupo son: la lipasa, fosfatasa, peptidasa y amidasa.

IV. Liasas

Las enzimas de este grupo catalizan la ruptura de enlaces C-C, C-S y algunos C-N, ej. Fumarasa, piruvato descarboxilasa y aldolasa.

IV. Isomerasas

Estas enzimas catalizan la racemización de isómeros ópticos o geométricos.

Este grupo se divide en:

- a) Racemosas
- b) Epimerasa
- c) Cis-trans isomerasas
- d) Ceto-isomerasas
- e) Mutasas o transferasas intramoleculares

V. Ligasas

Este conjunto de enzimas catalizan la formación de enlaces entre carbón y oxígeno, azufre, nitrógeno acoplados a la hidrólisis de enlaces de alta energía como el fosfato, ejemplo piruvato carboxilasa.

Los grupos enumerados de las clases de enzimas por la “The Enzyme Commission number (EC number)” que traducido quiere decir el número comisionado a las enzimas, es un sistema de nomenclatura para la clasificación de las enzimas basado sobre la reacciones que ellas realizan. Cada número está asociado con un nombre recomendado para una particular enzima. Es decir, el número EC especifica el tipo de reacción catalizado por una enzima y no a la especificidad de una enzima. Si diferentes enzimas catalizan la misma reacción (existentes en diferentes organismos) ellas reciben el mismo EC número, ej (EC 1.1.1.27) EC1. Se refiere a una oxido-reductasa
EC1.1. Actúa sobre los grupos donadores CH-OH
EC 1.1.1. Tiene a los NAD y NADP como aceptores
EC1.1.1.27 Se refiere a la lactato deshidrogenasa

Entonces para: EC 2. Transferasas

EC 3. Hidrolasas

EC 4. Liasas

EC 5. Isomerasas

EC 6. Ligasas

LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

La enzima L- lactato deshidrogenasa cataliza la reacción:



Markert y Moller demostraron que la LDH es una proteína tetramérica. La enzima fue purificada por Straub in 1940, Kubovitz y Ott obtuvieron los primeros cristales en 1943.

La LDH tiene dos genes estructurales importantes (que corresponden a las cadenas M y H), y existe una compleja variedad de genes de LDH que se expresan en algunos tejidos en diferentes etapas de desarrollo.

El origen de estas dos cadenas de polipéptidos depende de si el extracto proviene de un tejido aeróbico como el corazón o anaeróbico en el músculo esquelético.

Estas enzimas se distinguen por su composición química y sus propiedades cinéticas e inmunológicas. La diferencia en la composición de las isoenzimas en diversos tejidos se ha relacionado con diferentes necesidades metabólicas.

La enzima se analiza siguiendo el descenso de la absorbancia a 340nm, donde NADH es oxidado por el piruvato. La enzima LDH es específica para L – (+) lactato y NADH. La masa molecular de las subunidades de las isoenzimas de LDH es relativamente uniforme y se encontró en un rango de 34000 a 40000.³¹

CINÉTICA ENZIMÁTICA

La cinética enzimática nos proporciona información sobre las propiedades de las enzimas relacionadas con su reacción catalítica.

La cinética enzimática es una rama de la cinética química que estudia las reacciones catalizadas por las enzimas, por ejemplo la afinidad para su sustrato, la magnitud y tipo de inhibición por diversos compuestos así como establecer el mecanismo de reacción catalítico.

La velocidad inicial (v_0) de formación de productos o destrucción de sustrato por una enzima es directamente proporcional a la concentración de la enzima $[E_0]$. Si las concentraciones de sustrato S es baja, v aumenta linealmente con el S.

Pero cuando se aumenta la concentración de S esta relación comienza a no cumplirse y v aumenta menos rápidamente que S hasta que una concentración bastante alta o saturante de S, v alcanza un valor limite denominado V_{max} . como se muestra en la figura 4 a). Se expresa cuantitativamente en la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = [E_0] [S] K_{cat} / K_M + [S]$$

La concentración del sustrato a la que $v = \frac{1}{2} V_{max}$ se denomina K_M

Es útil convertir la ecuación de Michaelis-Menten en forma lineal, para analizar los datos y nos permitirá detectar desviaciones del comportamiento ideal. Como se muestra en la figura 4 b).

El método mejor conocido es la grafica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk.

$$1/v = 1/V_{max} + K_M/V_{max} [S].^{27}$$

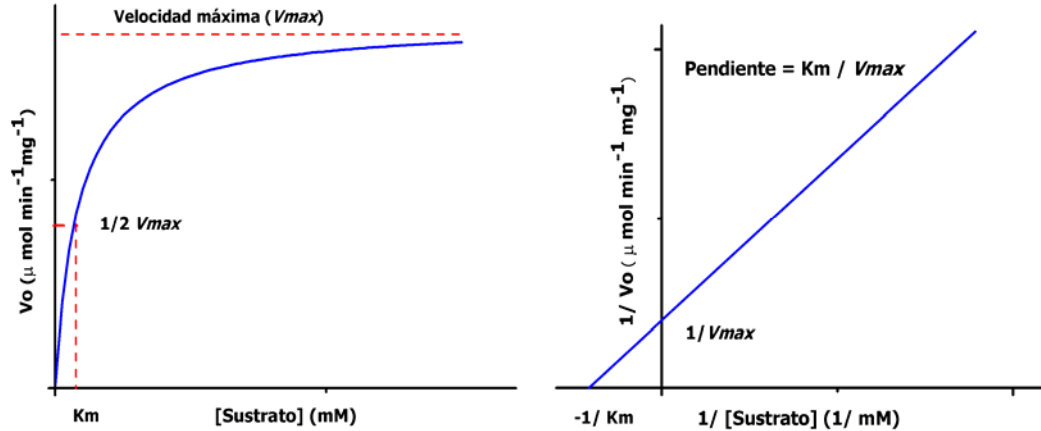


Figura 4. a) Modelo de Michaelis – Menten, efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente. b) Modelo de Lineweaver – Burk, doble recíproca.

EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las enzimas poseen un pH característico al cual su actividad es máxima; por arriba o por debajo de ese pH su actividad disminuye. La relación entre pH y la actividad de la enzima depende del comportamiento ácido-base de la enzima o sustrato. De esta forma, aunque la mayoría de las enzimas funcionan en un rango de pH de 5 a 9, principalmente por su condición proteica, existen extremos como la pepsina que funciona adecuadamente a pH 4. Adicionalmente, el pH óptimo de una enzima está relacionado a la fijación del sustrato a la enzima, la ionización del sustrato y la variación de la estructura proteica.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS.

La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa en general con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activa. La velocidad de muchas reacciones enzimáticas

se duplica aproximadamente, por cada 10 °C de aumento de la temperatura. Aunque el coeficiente de temperatura Q_{10} , varía poco de una enzima a otra según la energía de activación de la reacción catalizada.

La temperatura óptima es el resultado de dos procesos

- 1) el incremento de la velocidad de reacción con la temperatura
- 2) el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica de la enzima al sobrepasar una temperatura crítica.

Sin embargo la mayoría de las enzimas se inactivan a temperaturas entre 55 y 60 °C.³²

INHIBICIÓN

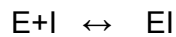
Hay una gran variedad de compuestos capaces de combinarse con algunas enzimas, aunque no todos trabajan como sustratos, por ejemplo algunos bloquean la actividad catalítica de la enzima, estos compuestos son los inhibidores. Además, la inhibición de algunas enzimas por metabolitos específicos constituye un elemento importante en la regulación del metabolismo intermediario.

Los tres tipos principales de inhibición reversible de las enzimas son: competitiva, acompetitiva y no competitiva. Estos pueden diferenciarse experimentalmente por los efectos que produce el inhibidor sobre la cinética de reacción de la enzima, la cual puede analizarse mediante la ecuación básica de velocidad propuesta por Michaelis-Menten.

Inhibición competitiva

La característica de la inhibición competitiva (figura 5), es que el inhibidor puede combinarse con la enzima libre de tal modo que compite con el sustrato

para unirse al centro activo. Un inhibidor competitivo reacciona reversiblemente con la enzima para formar un complejo enzima-inhibidor (EI).



Utilizando la ecuación de Michaelis-Menten se puede definir la constante del inhibidor K_I

$$K_I = [E] [I] / [EI]$$

El valor de la K_M aparente del sustrato será mayor que a la verdadera K_M al aumentar el valor de la intersección sobre el eje $1/ [S]$. La pendiente de la reacción no inhibida es K_M / V_{max} y la pendiente de la recta para la reacción inhibida es:

$$K_M / V_{max} (1+ [I] / K_I)$$

Un inhibidor competitivo se caracteriza por no afectar al valor de V_{max} indicativo que no interfiere con la velocidad de ruptura del complejo enzima-sustrato.

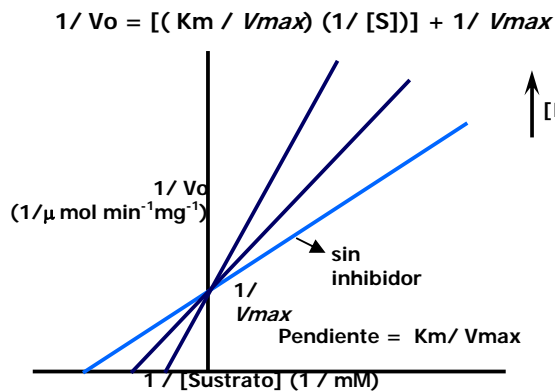
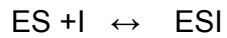


Figura 5. Tipo de inhibición competitiva. El inhibidor compite por el sitio activo del enzima, modificando la k_m pero no la V_{max} . Gráfica de doble recíproca.

Inhibición acompetitiva

Este tipo de inhibición (figura 6), el inhibidor se combina con el complejo enzima-sustrato para formar un complejo inactivo enzima-sustrato-inhibidor:



La constante del inhibidor es:

$$K_1 = [ES][I] / [ESI]$$

El grado de inhibición puede aumentar cuando la concentración del sustrato se ve aumentada. Una de las características de la inhibición acompetitiva es que las pendientes de las rectas permanecen constantes al aumentar la concentración del inhibidor, pero la V_{max} decrece así como el valor de la K_m se modifica.

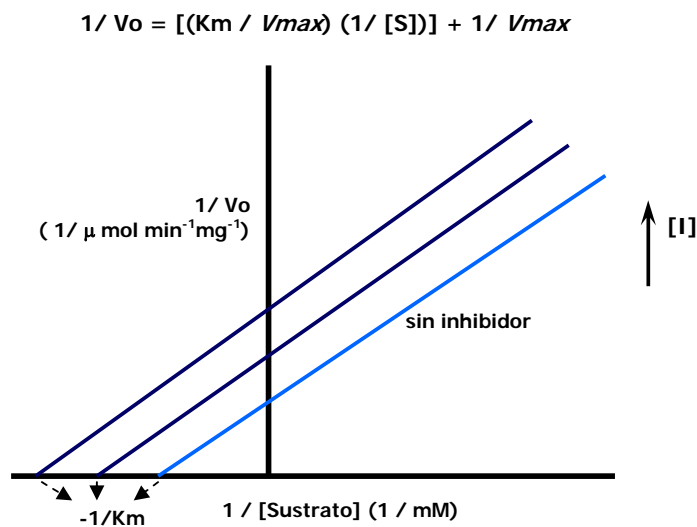


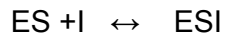
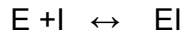
Figura 6. Tipo de inhibición acompetitivo. El inhibidor no compite por el sitio activo del enzima, se une al complejo ES y modifica tanto la K_m como la V_{max} . Gráfica de doble recíproca.

Inhibición no competitiva

Un inhibidor no competitivo (figura 7), puede combinarse con la enzima o con el complejo enzima sustrato. El inhibidor se une a un sitio en la enzima distinta al centro activo. Esto a menudo deforma a la enzima y de esta manera no se

puede ni formar ni descomponerse el complejo ES a su velocidad normal para liberar los productos de reacción. Sus efectos no se anulan al aumentar la concentración del sustrato.

El inhibidor produce dos formas inactivas:



Por lo tanto existen dos constantes del inhibidor:

$$K^{EI} = [E] [I] / [EI]$$

$$K^{ESI} = [ES] [I] / [ESI]$$

En la inhibición no competitiva la V_{max} decrece y no puede restablecerse su valor aunque la concentración del sustrato se aumente.

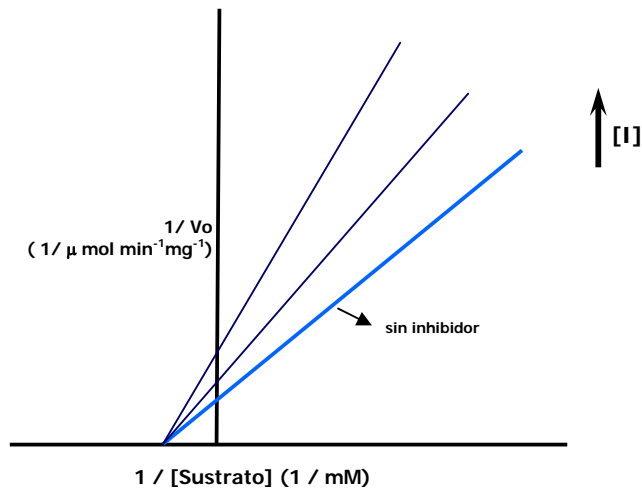


Figura 7. Tipo de inhibición no competitivo. El inhibidor se une a un sitio distinto del activo, provocando un cambio conformacional en la estructura de la enzima, evitando la formación del complejo ES, no modifica la km pero si la $Vmax$. Gráfica de doble recíproca.

OBJETIVOS

GENERALES

Purificar por procedimientos bioquímicos a las dos isoformas de lactato deshidrogenasas de los cisticercos de *T.solium*

Caracterizarlas bioquímica y cinéticamente

ESPECIFICOS

I) Determinar las características físico-químicas de las isoformas de LDHs en cisticercos de *T.solium*:

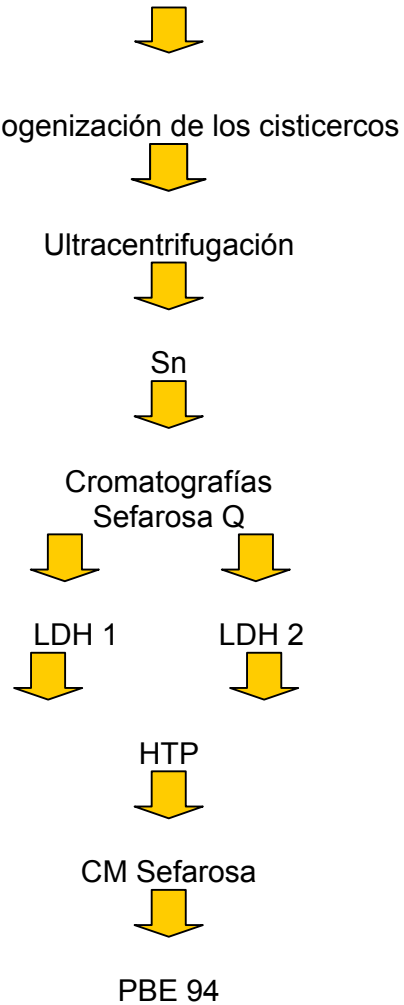
- a) El peso molecular nativo
- b) La estabilidad a la temperatura
- c) La estabilidad a diferentes pHs
- d) El pH óptimo de reacción
- e) Su punto isoeléctrico

II) Determinar las características cinéticas de las isoformas de LDHs en cisticercos de *T.solium*

- a) Constantes de Michaelis (K_m)
- b) Velocidad máxima de reacción (V_{max})
- c) Constantes inhibitorias de la reacción cinética (K_i) por diferentes inhibidores

MATERIAL Y METODOS

PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN DE LAS LDHs DE CISTICERCOS DE *Taenia solium*



Obtención de los cisticercos de *T. solium*

Decenas de gramos de cisticercos de *T. solium* se obtuvieron de cerdos de diferente origen raza, sexo, edad y peso; los cuales se infectaron naturalmente con *T. solium*.

Los cisticercos fueron extraídos por disección del músculo esquelético de los cerdos, se les eliminó los residuos de tejido del hospedero y se lavaron varias veces con amortiguador de fosfatos 0.01M NaCl 0.015 M pH 7.2 (PBS), se secaron con papel filtro y se mantuvieron en congelación (-70°C) hasta su uso.

Obtención de las fracciones de la LDH de cisticercos de *T. solium*

Extracto crudo

Cuarenta gramos de cisticercos de *T. solium* (peso húmedo) en 15 ml de Tris 0.01 M pH 8 más 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), se homogeneizaron utilizando un homogenizador de tejidos (Polytron, Brinkman Instruments) a 4 °C y con pulsos de 14000 rpm por minuto. Este proceso se repitió al menos cuatro veces alternando con descansos de un minuto hasta obtener una mezcla homogénea de los tejidos del parásito.

El homogenizado se ultracentrifugó a 105,000 g a 4 °C, por 40 min. El precipitado (pp.) se desechó y el sobrenadante (Sn 1) se recuperó y filtró a través de una membrana de Nitrocelulosa con poros de 0.22 µm (Millipore).

Precipitación con Sulfato de Amonio

Con la finalidad de disminuir el volumen, así como eliminar algunas proteínas que no fuesen LDHs de la fracción Sn1 ésta se sometió al procedimiento de “salting out”.

Este método consistió en adicionar en forma secuencial crecientes concentraciones de sulfato de amonio al Sn 1, medidas en % de sulfato de amonio en relación al volumen de la muestra. En el cuadro 1, se da un ejemplo de este procedimiento. Cada adición de sulfato de amonio a la muestra se realizó lentamente y con agitación constante a 4 °C durante 15 min. Posteriormente esta fracción se centrifugó a 8 g, por 20 min, a 4 °C. El sobrenadante al 30 % se desechó y el precipitado se resuspendió en Tris 0.01 mM pH 8. De manera similar a la descrita, se realizaron las siguientes adiciones del sulfato de amonio a la muestras hasta obtener una fracción final con sulfato de amonio al 70 %. Este precipitado al 70 % se dializó exhaustivamente con Tris 0.01 M pH 8 para eliminar el sulfato de amonio.

Cuadro 1. Precipitación con Sulfato de Amonio

	Volumen (ml)	Sulfato de Amonio (g)	Sulfato de Amonio % final
Sn 1	16.6	2.92	30
Sn 2	16.5	2.07	50
Sn 3	15.2	2.05	70

CROMATOGRAFÍA

Sefarosa aminoetil cuaternaria (QAE)

Se utilizó un sistema de cromatografía líquida, utilizando una resina de intercambio aniónico (Sefarosa QAE) de flujo rápido (Pharmacia Biotech).

Una columna cromatográfica (2.6 x 11.5 cm.) con la resina mencionada se equilibró con Tris 0.01 M pH 8. La velocidad del flujo fue de 1 ml / min. El pp. 70 % (1.8 mg / ml) se resuspendió en 18 ml, se dializó exhaustivamente contra el

amortiguador para equilibrar a la Sefarosa QAE y se paso por la resina. De manera simultánea al paso de las proteínas por la resina se colectaron fracciones de 4 ml.

Después de excluirse de la columna las proteínas que no interaccionaron con la resina se pasó por la misma un gradiente de 0 – 0.3 M de NaCl en el mismo amortiguador de equilibrio. Esto permitió obtener a las proteínas que interaccionaron con la resina o fracción eluída. La presencia de proteínas en las fracciones cromatográficas se hizo utilizando un espectrofotómetro Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech) en celdas de cuarzo tomando lecturas a 280 nm. La evaluación del gradiente salino se hizo midiendo la conductividad en las fracciones eluídas con un conductívimetro YSI 3200 (Conductivity Instrument). La medición de la actividad catalítica se realizó a 340 nm y el procedimiento se describe mas adelante.

Las fracciones con actividad catalítica se juntaron en una misma muestra y concentraron de 10 a 20 veces su volumen original en un sistema Amicon (Amicon Millipore) de presión negativa con nitrógeno gaseoso, empleando una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de corte de 3,000 kD (Amicon Millipore).

La fracción excluida con actividad catalítica se denominó LDH 1 y la equivalente en la fracción eluída LDH 2.

Hidroxiapatita (HTP)

El siguiente paso de purificación consistió en utilizar una columna (1.6 X 15 cm) de HTP Tipo 1 (BioRad). La resina se equilibró con K_2HPO_4 0.01 M pH 7.

Posteriormente, se cromatografiaron 4 ml (0.22 mg / ml) de LDH 1 previamente dializados en el amortiguador para equilibrar a la columna. El flujo de la cromatografía fue de 1 ml / min y se colectaron fracciones de 2 ml. Para obtener las proteínas adsorbidas a la HTP, inmediatamente después de excluirse las proteínas que no interaccionaron con la resina, se utilizó un gradiente de 0.01 - 0.5 M de K_2HPO_4 pH 7 en el amortiguador de equilibrio. Se realizaron lecturas, de las maneras descritas previamente, tanto para determinar la presencia de las proteínas, conductividad y actividad enzimática de las fracciones obtenidas en esta cromatografía.

Por otro lado, de la forma previamente descrita, 2.5 ml (3.5 mg / ml) de LDH 2 se cromatografiaron en la misma columna de HTP para su purificación por esta resina.

Carboximetil-sefarosa (CM-Sefarosa)

Las fracciones eluidas obtenidas de la columna de HTP que presentaron actividad enzimática para LDH 1 se juntaron y concentraron a 2.5 ml, en Amicon y se dializaron contra de fosfato de sodio 0.01M pH 6.5.

Esta fracción con 0.5 mg / ml se paso por una columna cromatográfica (1.6 X 30 cm) de CM – Sefarosa flujo rápido (intercambiador catiónico) (Amersham Pharmacia Biotech). La columna se equilibrio previamente con fosfato de sodio 0.01M pH 6.5 y se corrió a un flujo de 40 ml / h colectándose fracciones de 2 ml. Las proteínas que se adsorbieron por la resina se eluyeron con un gradiente de 0 – 0.7 mM de NaCl en el mismo amortiguador de equilibrio de la resina. Se buscaron las fracciones con proteína a 280 nm y se determino las

fracciones con actividad para la LDH 1 a 340 nm. Las fracciones siguientes después de iniciar el gradiente se realizó lectura de la conductividad.

Este mismo proceso fue utilizado para continuar con la purificación de 2 ml a 0.75mg / ml de la fracción con actividad para LDH 2.

CROMATOENFOQUE EN INTERCAMBIO DE AMORTIGUADORES

PBE 94

Para purificar la LDH 1 y LDH 2 de las fracciones obtenidas de la cromatografía HTP (LDH 1) en función de su punto isoeléctrico (pI), estas muestras se dializaron exhaustivamente en Imidazol 0.025 M pH 7.4, 4 °C y se cromatografiaron en una resina de cromatoenfoque PBE 94 (Pharmacia Biotech).

Se empacó una columna cromatográfica (1 X 9 cm) con esta resina y se equilibró inicialmente con 1 ml de Polybuffer 74 pH 4 y posteriormente se paso la muestra LDH 1 (7mg), al termino de esta se continuó pasando un amortiguador de Polybuffer 74 a una dilución 1:8 con agua desionizada pH 4.

La fracción LDH 2 (5mg) se obtuvo de una cromatografía de Sefacryl S200.

Se colectaron fracciones de 2 ml con un flujo de 6 ml / h se hizo lectura a 280 nm para determinar presencia de proteínas y después se realizó la medición de el valor del pH de cada fracción utilizando un potenciómetro (Hanna Instruments) y por último se realizaron ensayos a 340 nm para encontrar la fracciones con actividad para LDH.

Sefacryl S200

Para determinar el peso molecular nativo de la LDHT.s se utilizó una cromatografía de filtración o de exclusión molecular. En una columna cromatográfica (1 X 60 cm) se empacaron 36.6 ml de la resina Sefacryl S200 de alta (Amersham Biosciences) y se equilibraron con Tris 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2.

Inicialmente, se calibró la columna con diferentes pesos moleculares de valores conocidos (cuadro 2). Con estos datos y empleando la fórmula K_{av} , para cada proteína control su coeficiente de partición (K_{av}). Posteriormente se construyó una gráfica con los valores de los K_{avs} en la ordenada frente al logaritmo de sus correspondientes pesos moleculares en las abscisas. Se trazó una recta que pasara por el mayor número de los puntos formados en la gráfica.

Fórmula para determinar K_{va} :

$$K_{va} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

Cuadro 2. Pesos moleculares de las proteínas controles del peso molecular.

Proteína	Mg	Peso (kDa)
Gamma globulina	1.09	150,000
Albúmina sérica humana	0.5	66,000
Ovoalbúmina	10	45,000
Lactato Deshidrogenasa	-	-
Anhidrasa carbónica	0.75	30,000
Lisozima	0.75	14,000

Posteriormente 650 μ l del Sn 1 de cisticercos de *T.solium* se fraccionaron con un flujo de 4.8 ml / h colectando fracciones de 0.8 ml. Se determinó la presencia de proteína y actividad para la LDH a 280 nm y 340 nm respectivamente y con esta información se determinó su Kva. El valor del peso molecular de la LDH de *T. solium* se obtuvo al extrapolar su valor de Kav en el eje de las abscisas o de los valores de los pesos moleculares con la ayuda de la recta que se trazó en la gráfica.

Análisis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Para este fin se empleo el método de Laemlli (1970) utilizando el sistema Protean II (Bio-Rad). Se prepararon geles de poliacrilamida 15 %. Cada gel se construyó con un gel de separación aunado con un gel de concentración para correr hasta 10 diferentes muestras proteicas. Cada gel se corrió a 100 volts, 30 mAmp durante 90 min a temperatura ambiente.

Al término de la electroforesis el gel se tiño con azul de Comassie por 30 min, después se destiño del colorante con ácido acético al 10 %.

Determinación de la concentración de proteína

Se cuantificó la concentración de proteína en las diferentes etapas de la purificación de la LDHs por el Método de Lowry. Se construyó una curva patrón empleando a la albúmina sérica bovina como proteína control. Las lecturas de las muestras controles y experimentales se realizaron 600nm utilizando una celda de cuarzo y un espectrofotómetro.

Determinación de la actividad de LDH

Reducción del Piruvato

Reactivos:

Amortiguador de Fosfatos Na_2HPO_4 - $\text{K H}_2\text{PO}_4$ 60 mM, pH 7.2

Solución A) Nadh 0.01 M

Solución B) sal monosódica de piruvato 0.1 M

Reactivo de solución A y B en 1 ml de amortiguador de fosfatos cada uno

Procedimiento:

Se utiliza 1 ml por muestra de reacción

- 920 – 975 μl de amortiguador de fosfatos
- 20 μl de la solución A
- 10 μl de la solución B
- 5 – 50 μl de la enzima

Se registra el decremento de la absorbancia a 340 nm.

Oxidación de Lactato

Reactivos: Amortiguador de Tris 100 mM, pH 8.8

Solución A) L-Lactato 0.5 M

Solución B) Nad 0.1 M

Reactivo A y B en 1 ml de amortiguador de Tris cada uno

Procedimiento: Se utiliza 1 ml por muestra de reacción

- 845 – 800 μl de amortiguador de fosfatos
- 100 μl de la solución A
- 50 μl de la solución B
- 5 – 50 μl de la enzima

Se registra el incremento de la absorbancia a 340 nm.

Determinación del pH óptimo de reacción para la frLDHTs

Para la determinación del pH óptimo de reacción de las LDHs se realizaron ensayos enzimáticos en el sentido de la reacción de reducción del piruvato utilizando NADH y piruvato como sustratos en concentraciones ya descritas anteriormente y empleando diversos pHs (4 – 12) (Cuadro 3) en el amortiguador de ensayo. La concentración para LDH 1 fue de 5.6 µg / ml y para LDH 2 de 2 µg / ml.

Cuadro3. Amortiguadores y sus diferentes pHs.

pH (Rangos)	Amortiguador
4.0 - 6.0	Citrato de Sodio (50mM) – ácido cítrico (50mM)
6.5 - 8.0	fosfato de sodio (50mM)
8.5 - 12	Tris (50mM) - HCl

Determinación de la estabilidad de la frLDHTs en función del pH.

Para evaluar la estabilidad de la enzima en función del pH se utilizaron varias alícuotas de la fracción LDH 1(5.6 µg / ml) y solubles en amortiguadores con diferentes pHs (Cuadro 3).

Cada alícuota de LDH 1(5.6 µg /10 µl) o de LDH 2 (2µg / 10 µl) se incubó en un microtubo Minicon Eppendorf con 200 µl de uno de los amortiguadores con

pH específico durante 2 hrs. Después cada alícuota se concentró 20 veces su volumen inicial centrifugando en una microfuga. La enzima se recuperó en la parte superior de la membrana del microtubo Minicon para realizar los ensayos enzimáticos en el sentido de la reducción del piruvato en el amortiguador de ensayo a pH 6.5.

Estabilidad de la frLDHTs a diferentes temperaturas

La estabilidad de la LDH a diferentes temperaturas se analizó por estudios de cinética enzimática. Diversas alícuotas de la enzima parasitaria (5.6 µg c/u), se incubaron durante 10 minutos, cada una en el amortiguador de ensayo correspondiente para la reducción del piruvato, ajustados a una temperatura específica. El intervalo de temperatura empleado fue de 5 – 70 ° C (ciudad de México) y en el análisis se consideraron intervalos de 5 ° C. Después de la incubación se adicionó el sustrato correspondiente (nadh 0.2 mM y piruvato 1 mM), y se registró el cambio de absorbancia a 340 nm. Este mismo proceso se realizó con la fracción LDH 2 utilizando 2 µg en cada alícuota.

Determinación de K_m y V_{max}

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 piruvato y determinación de la K_m (piruvato) y V_{max} (piruvato), se mantuvo fija la concentración de la LDH 1 (5.6 µg) y a saturación la del NADH (0.2 mM), mientras que la concentración del piruvato se varió en un intervalo de 0.01 a 2.25 mM (cuadro 4). 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 0.01 a 0.4 mM, y manteniendo a saturación la del piruvato (1 mM), (cuadro 4). Para obtener los datos correspondientes al sentido de la oxidación del lactato y determinación de K_m (lactato) y V_{max} (lactato), se mantuvo fija la concentración de la LDH 1 (5.6 μ g) y a saturación la del nad (1 mM), mientras que la concentración del lactato se varió en un intervalo de 1 a 100 mM (cuadro 4). Para determinar las constantes catalíticas correspondientes para el NAD, se realizaron ensayos similares a los anteriores variando la concentración del nad en un intervalo de 0.005 a 10 mM, manteniendo a saturación al lactato (50 mM), (cuadro 4).

Para determinar de la K_m (piruvato) y V_{max} (piruvato) de LDH 2 se realizaron ensayos en el sentido de la reducción del piruvato y se mantuvo fija la concentración de la LDH 2 (11 μ g) y a saturación la del NADH (0.2 mM), mientras que la concentración del piruvato se varió en un intervalo de 0.025 a 3 mM (cuadro 4). 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 piruvato (1 mM), (cuadro 4). Para obtener los datos correspondientes al sentido de la oxidación del lactato y determinación de la K_m (lactato) y V_{max} (lactato), se mantuvo fija la concentración de la LDH 2 (11 μ g) y a saturación la del NAD (1 mM), mientras que la concentración del lactato se varió en un intervalo de 1 a 100 mM (cuadro 4). Para determinar las constantes catalíticas correspondientes para el nad, se realizaron ensayos similares a los

anteriores variando la concentración del nad en un intervalo de 0.005 a 20 mM, manteniendo a saturación al lactato (50 mM), (cuadro 4).

Cuadro 4. Rangos de las concentraciones de los sustratos utilizados para determinar K_m y V_{max} de LDH 1 y LDH 2.

Reducción de piruvato		Oxidación de lactato	
NADH	0.2 mM	NAD	1 mM
Piruvato	0.01 - 3 mM	Lactato	1 - 100 mM
Piruvato 1 mM		Lactato 50 mM	
NADH	0.005 – 0.5 mM	NAD	0.005 - 20 mM

Para determinar los valores de las constantes cinéticas se utilizó la ecuación de Michaelis – Menten y se construyeron graficas de Lineweaver – Burk con los valores inversos de las velocidades iniciales frente a los valores inversos de las concentraciones de los sustratos. De estas graficas la pendiente de la recta es la K_m / V_{max} el intercepto de la recta en la ordenada es la $1 / V_{max}$ y el intercepto de la recta en la abscisa es la $-1 / K_m$.

Ensayos de inhibición de la actividad catalítica de la frLDHTs

Los estudios de inhibición se desarrollaron para determinar los valores de I_{50} de p-hydroxymercuribenzoate y oxalato sobre la LDH parasitaria por el procedimiento descrito Tahir, M., K., and Mannervik, B. 1986.³³

La I_{50} se define como la concentración de inhibidor necesaria para producir el 50% de inhibición en el ensayo enzimático estándar.

Se utilizaron concentraciones variables de inhibidores diluidos en el amortiguador de ensayo (Cuadro 5). El inhibidor se adicionó al amortiguador de ensayo así como los sustratos correspondientes (descrito anteriormente); la mezcla se dejó equilibrar por unos segundos y se inició la reacción al agregar LDH, el volumen final de la reacción fue de 1 ml. El cambio de absorbancia se registró a 340 nm durante tres minutos. Estos ensayos se realizaron tanto en la reducción del piruvato como en la oxidación del lactato.

Se utilizó LDH 1 (5 μ g) y LDH 2 (55 μ g) para ser inhibidos con p – hydroxymercuribenzoate (Cuadro 5); LDH 1 (5.6 μ g) para ser inhibido con oxalato (Cuadro 6) y se utilizó un extracto crudo para ser inhibido con ácido oxámico (Cuadro 7).

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_{50} se determinó al interpolar del punto de la grafica que definió el 50% de actividad específica al de la concentración de inhibidor.

Cuadro 5. I₅₀ p-hydroxymercuribenzoate

INHIBIDOR	CONCENTRACION
p-hydroxymercuribenzoate	(mM)
Reducción de piruvato LDH1	0.01 – 3
Oxidación de lactato	0.1 – 3
Reducción de piruvato LDH2	0.005 – 2
Oxidación de lactato	0.1 - 4.5

Cuadro 6. I₅₀ Oxalato

INHIBIDOR LDH1	CONCENTRACION
Oxalato	(mM)
Reducción de piruvato	0.05 – 10
Oxidación de Lactato	0.1 - 15

Cuadro 7. I₅₀ Ácido Oxámico

INHIBIDOR ESTRACTO CRUDO	CONCENTRACION
Ácido Oxámico	(mM)
Reducción de piruvato	0.005 – 40
Oxidación de lactato	0.005 - 30

Inhibición por sustrato

Con la finalidad de evaluar el efecto inhibitorio de altas concentraciones de sustratos sobre la LDH del parásito, se realizaron ensayos de velocidad inicial en presencia de altas concentraciones de sustratos (Cuadro 8). El procedimiento realizado para este estudio fue similar al efectuado para obtener las I_{50} de p-hydroxymercuribenzoate y oxalato anteriormente descrito. En este paso se utilizó LDH 1 (5.6 μ g) para cada ensayo.

Cuadro 8. Concentración de sustratos

SUSTRATOS	CONCENTRACION (mM)
NADH (Reducción de piruvato)	0.05 – 1
Piruvato (Reducción de piruvato)	0.25 – 70
NAD (Oxidación de Lactato)	30 – 100
L-Lactato (Oxidación de Lactato)	200 – 800

Resultados

Purificación de las LDH 1 y 2 de *T. solium*

Por la secuencia los procedimientos de purificación bioquímicos a que fue sometido el Sn 1 o extracto crudo de los tejidos de los cisticercos: precipitación con sulfato de amonio, cromatografías de intercambio aniónico, de hidroxapatita, de intercambio catiónico, cromatografía de exclusión de pesos moleculares se logró purificar a homogeneidad a la LDH 1 y semipurificar a la LDH 2 de cisticercos de *T. solium*.

Precipitación con Sulfato de Amonio

La actividad de LDH en el Sn 1 se incrementó en todos los precipitados obtenidos con sulfato de amonio llegando a su máximo en el Sn 30 % y pp 70 %. Esto quiere decir que en ambas muestras existieron altas concentraciones de la enzima. Por eso se siguió la concentración al 70% de sulfato de amonio de esta sal (Cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación de diferentes porcentajes de sulfato de amonio adicionados al Sn 1 y subsecuentes precipitados de cisticercos de *T. solium*. Actividad de LDH realizada en el sentido de la reducción del piruvato.

% de precipitación con sulfato de amonio	cambio de absorbancia / min 340 nm
Sn	0.421
Pp 30%	0.2
Sn 30%	0.97
Pp 50%	1.05
Sn 50%	0.15
Pp 70 %	0.55
Sn 70%	0.002

Sefarosa QAE

Los resultados de esta cromatografía indican la presencia tanto de un grupo de proteínas que se excluyeron de la columna por presentar cargas positivas netas como aquellas con cargas negativas que se fueron eluyendo de la resina conforme se incrementó la fuerza iónica del gradiente salino. En ambas fracciones se presentó actividad de LDH, de esta forma la fracción excluida se denominó LDH 1 y la eluída LDH 2. Resultados similares se obtuvieron en diez diferentes replicas de este tipo de cromatografías (Figuras 8 – 14).

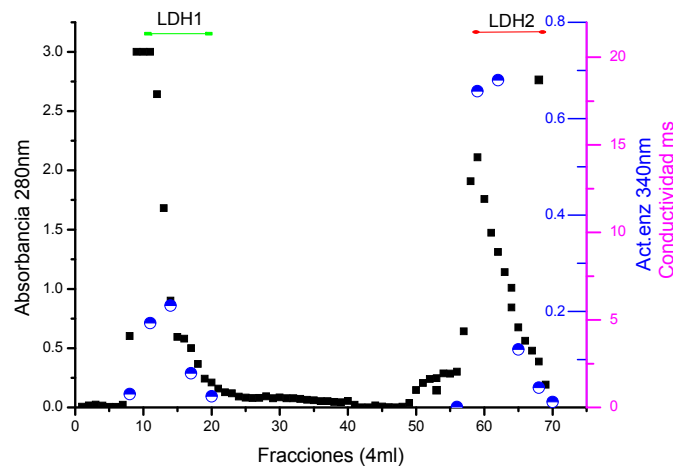


Figura 8. Cromatografía donde se utilizo 264 mg del pp al 70 % con sulfato de amonio. En una columna de Sefarosa QAE (2.6 – 9 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—) y LDH 2(—). Conductividad (—).

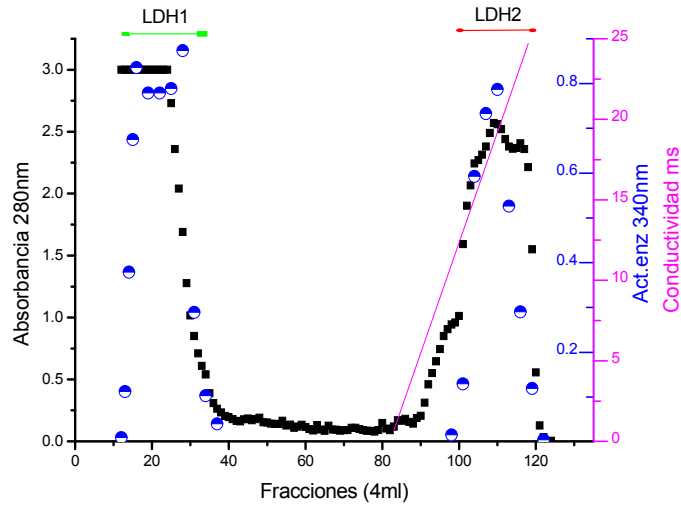


Figura 9. Cromatografía donde se utilizo 308 mg del pp al 70 % con sulfato de amonio. En una columna de Sefarosa QAE (2.6 – 13 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—) y LDH 2(—). Conductividad (—).

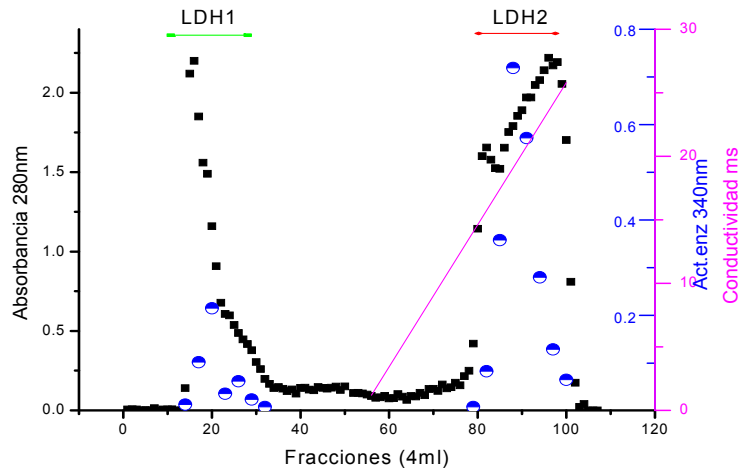


Figura 10. Cromatografía donde se utilizo 50 mg del pp al 70 % con sulfato de amonio. En una columna de Sefarosa QAE (2.6 – 19 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—) y LDH 2 (—). Conductividad (—).

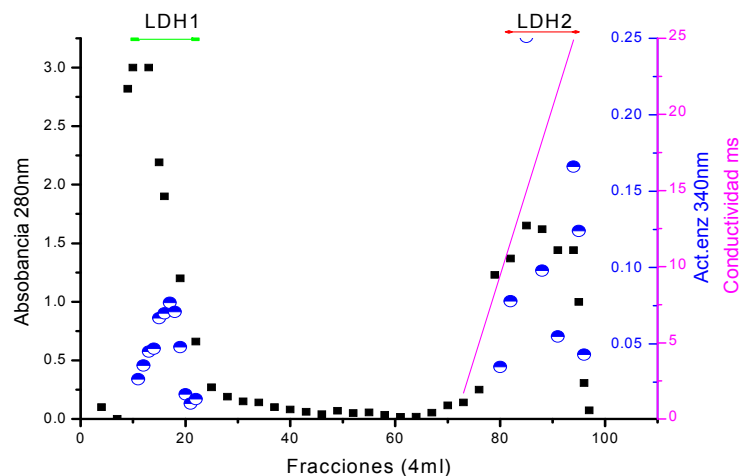


Figura 11. Cromatografía donde se utilizo 32 mg del pp al 70 % con sulfato de amonio. En una columna de Sefarosa QAE (2.6 – 9 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(→) y LDH 2(→). Conductividad (—).

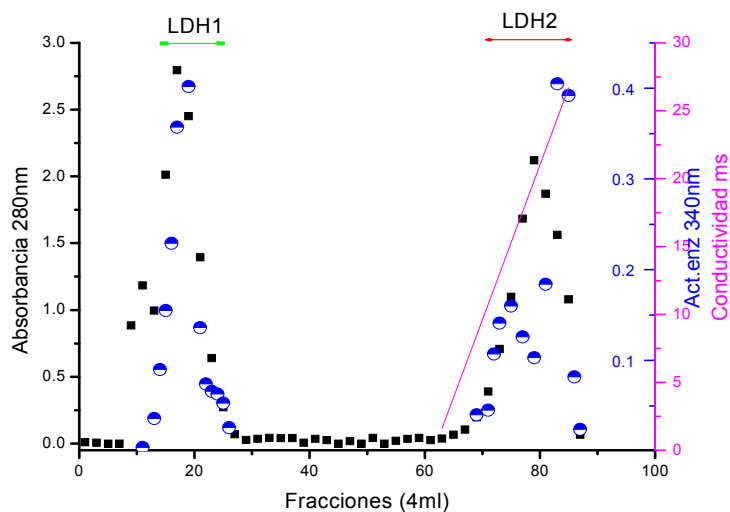


Figura 12. Cromatografía donde se utilizo 41 mg del Sn 1. En una columna de Sefarosa QAE (2.6 –9 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(→) y LDH 2(→). Conductividad (—).

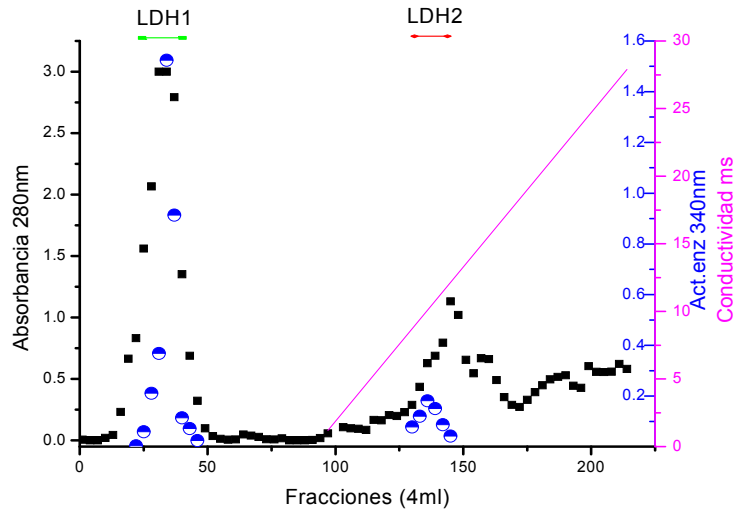


Figura 13. Cromatografía donde se utilizo 51 mg del Sn 1 al que se le adicióno DTT y EDTA (1 mM). En una columna de Sefarosa QAE (2.6 – 18 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—) y LDH 2(—). Conductividad (—).

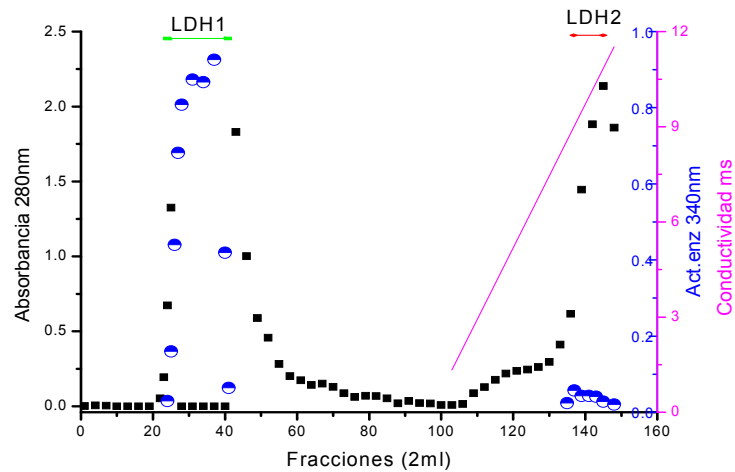


Figura 14. Cromatografía donde se utilizo 129 mg del Sn 1 al que se le adiciónó DTT y EDTA (1 mM). En una columna de Sefarosa QAE (2.6 – 22 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—) y LDH 2(—). Conductividad (—).

Al cromatografiar LDH 1, proveniente de Sefarosa QAE, en la resina de hidroxiapatita se obtuvo la actividad de LDH en las fracciones eluidas con un gradiente salino. En todas las replicas que se realizaron con esta resina se mostró el mismo comportamiento cromatográfico consistente en obtener las fracciones con actividad de LDH eluidas en un rango de 18 – 36 mS. Adicionalmente, también se encontró la eliminación de una gran cantidad de proteína en la fracción excluida (Figuras 15 – 18).

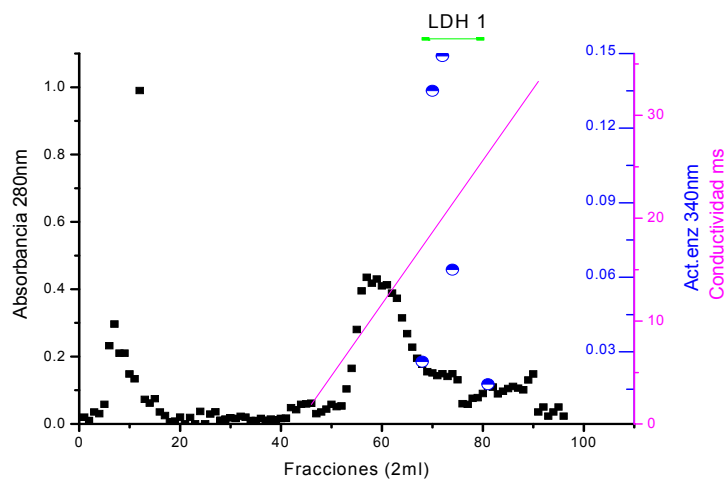


Figura 15. Cromatografía donde se utilizo 24 mg LDH 1 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de HTP (1.6 – 10 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—). Conductividad (—).

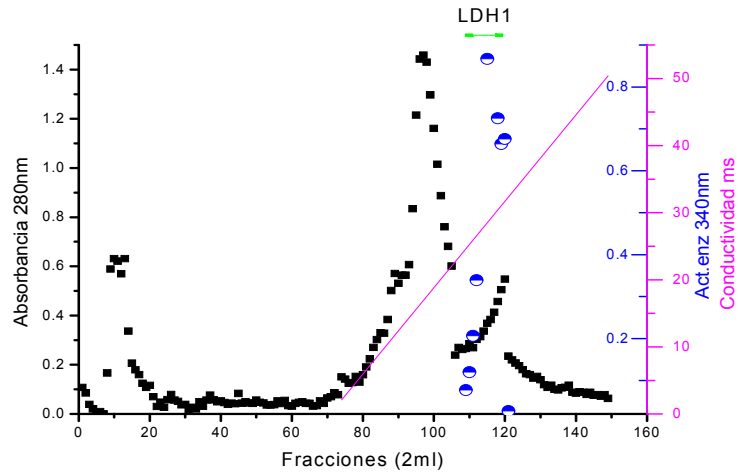


Figura 16. Cromatografía donde se utilizo 1.4 mg LDH 1 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de HTP (1.6 – 10 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—). Conductividad (—).

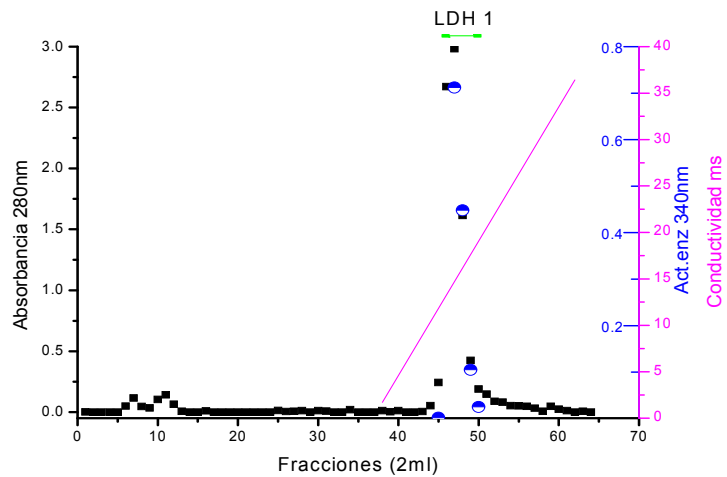


Figura 17. Cromatografía donde se utilizo 40 mg LDH 1 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de HTP (1.6 – 8 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—). Conductividad (—).

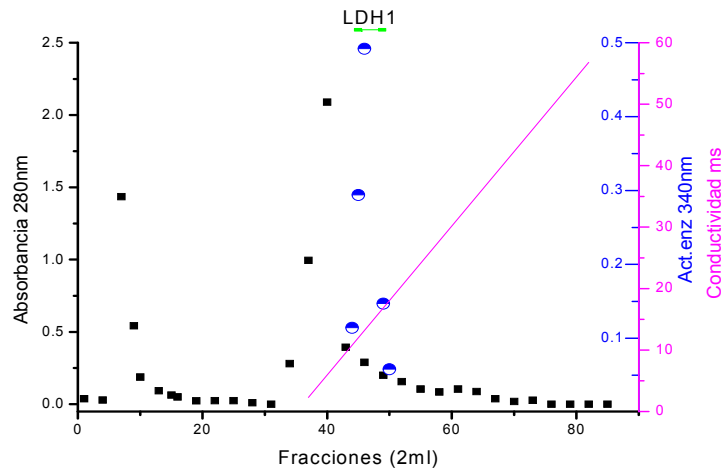


Figura 18. Cromatografía donde se utilizo 0.88 mg LDH 1 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de HTP (1.6 – 10 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—). Conductividad (—).

Cuando la LDH 2, obtenida de la columna de Sefarosa-QAE, se cromatografió en hidroxapatita se obtuvieron dos grupos de proteínas. Aquellas excluidas y sin ninguna actividad para LDH y las que presentaron actividad en las fracciones eluídas. La LDH 2 fue eluída en el rango de 4 – 31 mS (Figuras 20 - 23). También se obtuvo a la LDH 2 eluída con un pulso de fosfato de potasio de 0.3 M que correspondió a una conductividad de 50 mS (Figura 19).

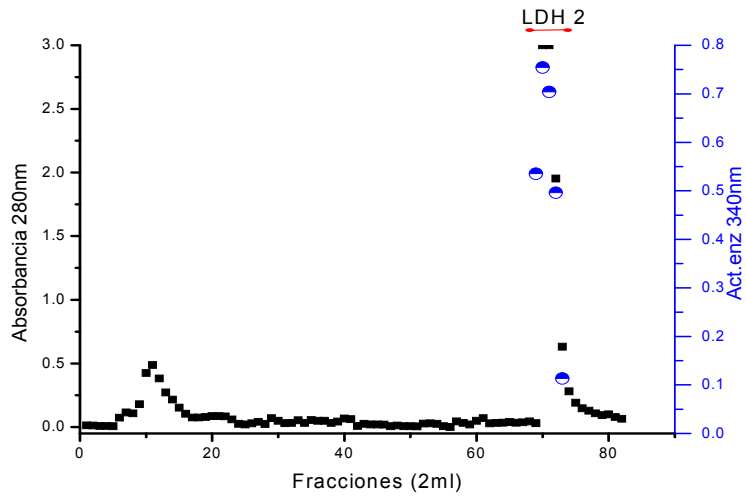


Figura 19. Cromatografía donde se utilizo 37 mg LDH 2 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de HTP (1.6 – 10 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 2(→).

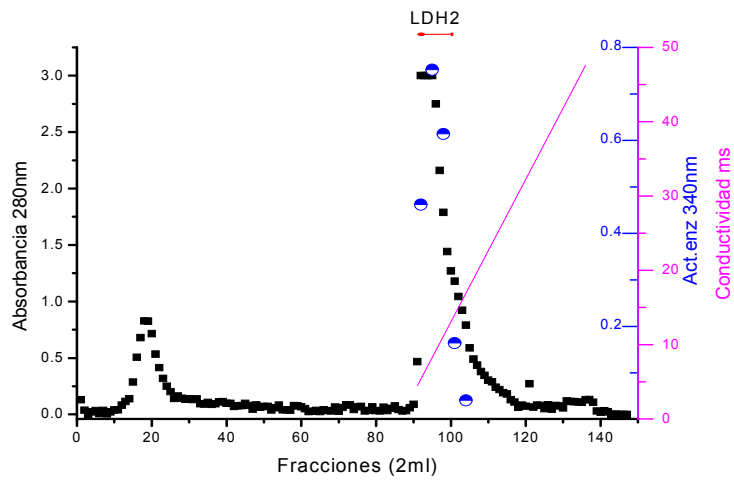


Figura 20. Cromatografía donde se utilizo 254 mg LDH 2 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de HTP (1.6 – 18 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 2 (→). Conductividad (—).

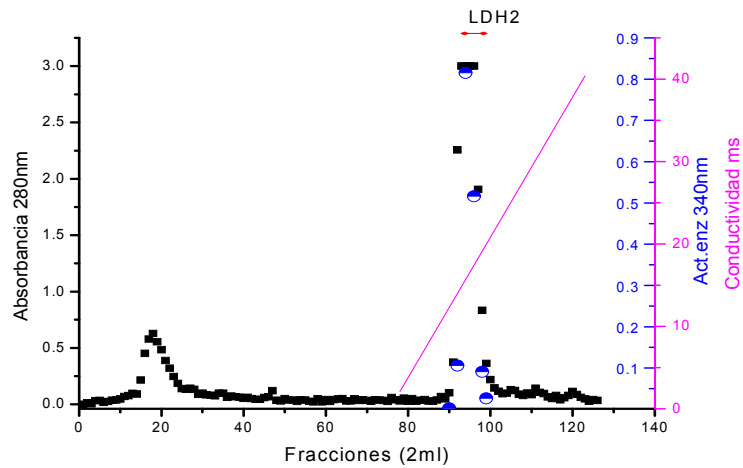


Figura 21. Cromatografía donde se utilizo 5.2 mg LDH 2 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de HTP (1.6 – 16 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 2(—). Conductividad (—).

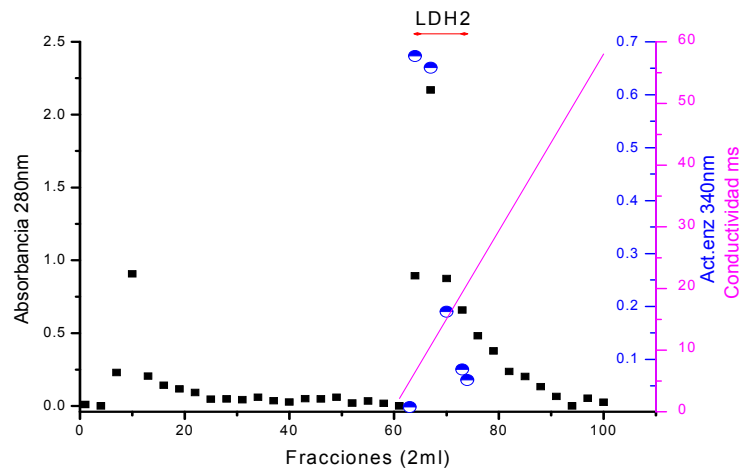


Figura 22. Cromatografía donde se utilizo 9 mg LDH 2 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de HTP (1.6 – 10 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 2(—). Conductividad (—).

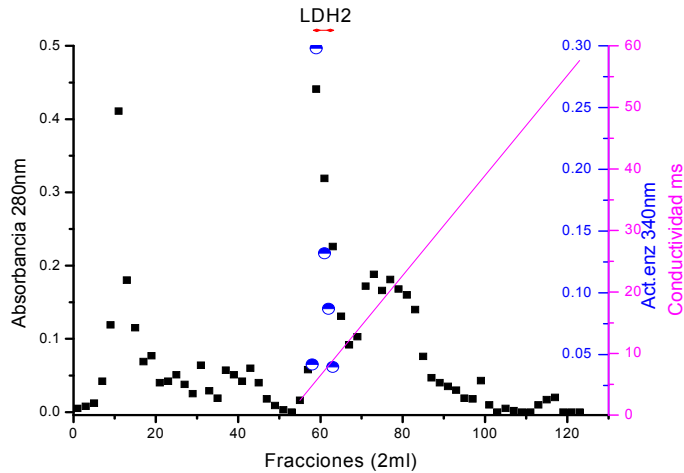


Figura 23. Cromatografía donde se utilizo 2.5 mg LDH 2 proveniente de CM-Sefarosa. En una columna de HTP (1.6 – 12 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 2(—). Conductividad (—).

Para evaluar si la resina de intercambio catiónico CM-Sefarosa mejoraba el proceso de purificación de las enzimas en comparación con la Sefarosa QAE, se cromatografiaron diversos lotes de Sn 1 de los cisticercos en la mencionada resina. La fracción con actividad para la enzima LDH 1 que se consiguió del paso anterior al pasarlo por CM Sefarosa, interactuó con la resina por lo que se obtuvo fracciones excluidas sin actividad para LDH y las proteínas que interactuaron con la resina se eluyeron con un gradiente NaCl 0 – 0.7M y las fracciones eluídas que presentaron actividad se concentraron a un volumen final de 2ml (Figuras 24 – 27).

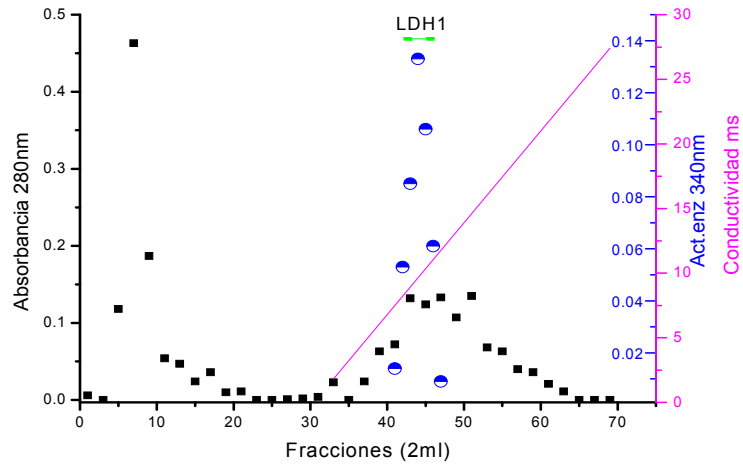


Figura 24. Cromatografía donde se utilizo 8 mg LDH 1 proveniente de HTP. En una columna de CM-Sefarosa (1.6 – 15 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—). Conductividad (—).

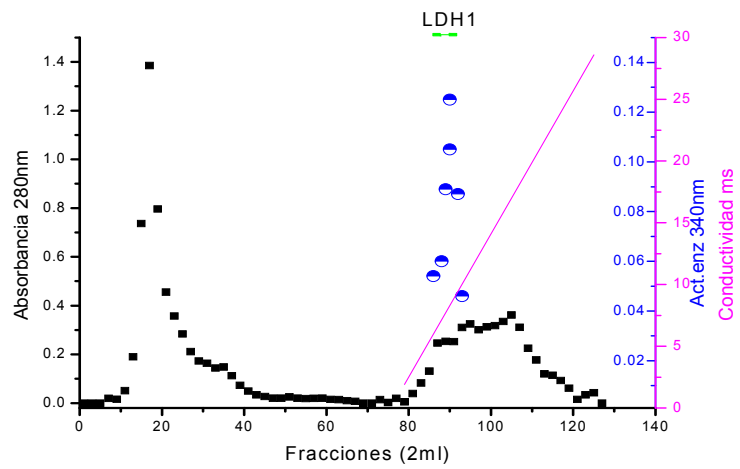


Figura 25. Cromatografía donde se utilizo 17 mg LDH 1 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de CM-Sefarosa (1.6 – 30 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—). Conductividad (—).

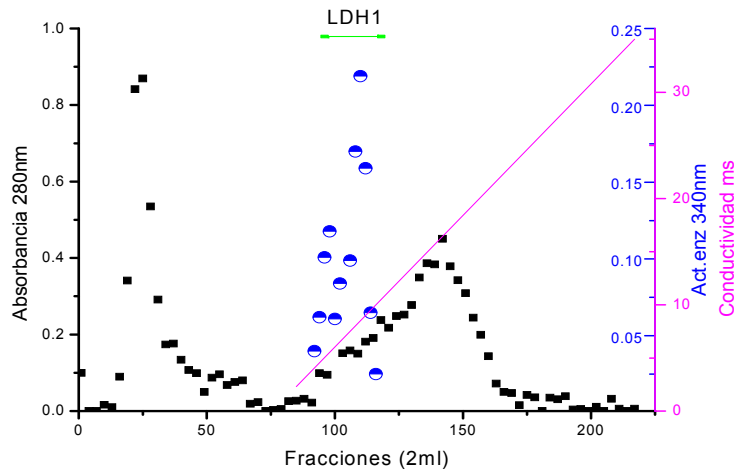


Figura 26. Cromatografía donde se utilizo 2.39 mg LDH 1 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de CM-Sefarosa (2.6 – 11 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—). Conductividad (—).

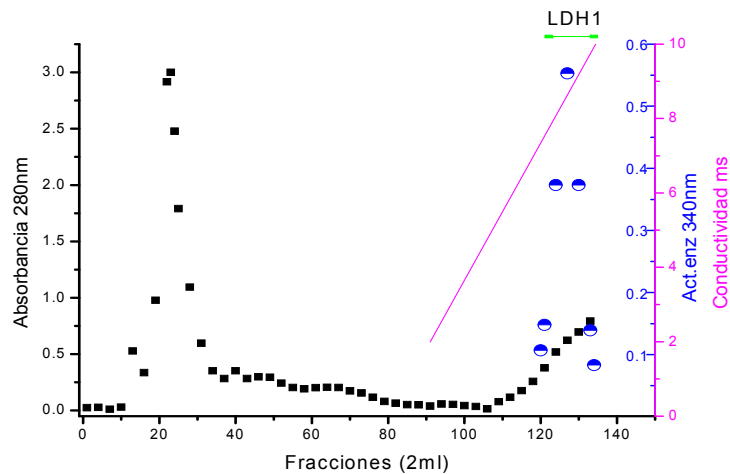


Figura 27. Cromatografía donde se utilizo 32 mg LDH 1 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de CM-Sefarosa (2.6 – 11 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1(—). Conductividad (—).

En cuanto a la fracción LDH 2 que se paso por CM Sefarosa, no interactúo con la resina y la enzima queda en las fracciones excluidas, a las que se les hizo ensayo enzimático y se concentraron a 2ml (Figura 28).

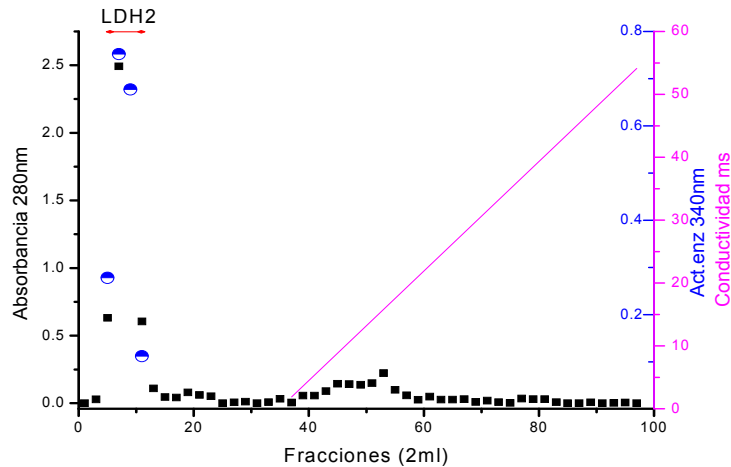


Figura 28. Cromatografía donde se utilizo 5 mg LDH 2 proveniente de Sefarosa QAE. En una columna de CM-Sefarosa (1.6 – 9 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 2(—). Conductividad (—).

Cuando se paso la muestra LDH 1 por PBE 94 la enzima interactuó con la resina, saliendo esta en las primeras fracciones obteniendo un valor del pH de 7.3 como se muestra en la figura 29. Para LDH 2 valor de pH 8 fue de mostrado en la figura 30.

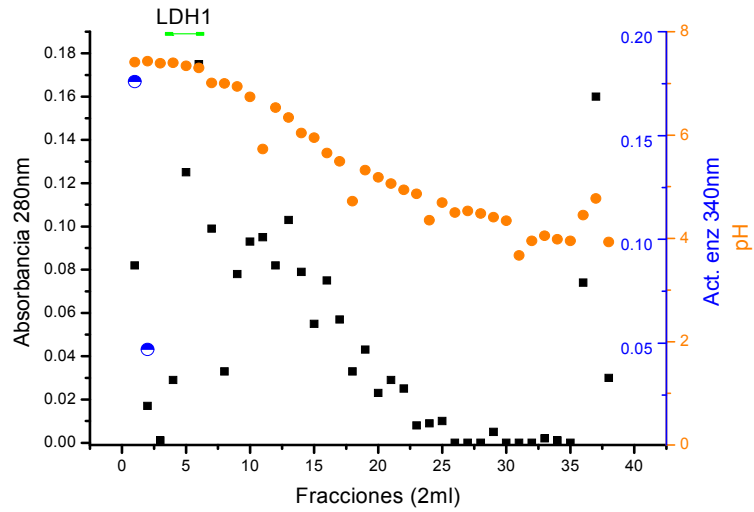


Figura 29. Cromatografía donde se utilizo 7 mg LDH 1 proveniente de CM-Sefarosa. En una columna de PBE (1.6 – 8.5 cm). Absorbancia a 280 nm (■) Actividad enzimática (●) de LDH 1 (—) y medición de pH (●).

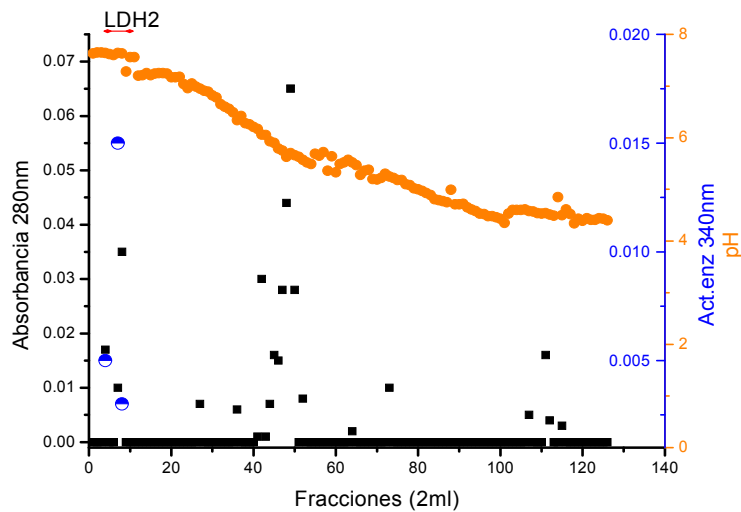


Figura 30. Cromatografía donde se utilizo 5 mg LDH 2 proveniente de Sefacryl S200 En una columna de PBE (0.9– 18 cm). Absorbancia a 280 nm (■) y la actividad enzimática (●) de LDH 2 (—) así como la medición de pH (●).

En el análisis de la electroforesis proteica se observa como se va purificando parcialmente la enzima en cada uno de los pasos de purificación como se ve en las figuras 31, 32.

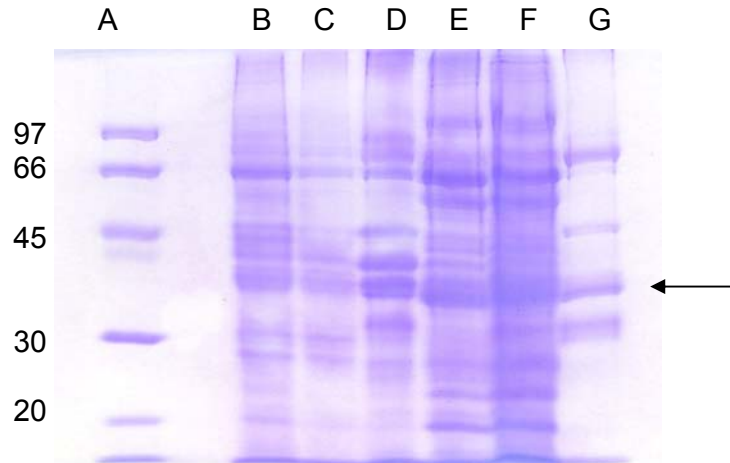


Figura 31. Análisis del proceso de purificación de las LDH 1 y LDH 2 por PAGE-SDS al 15 %. Columna (A) PM, (B) Sn, (C) pp 70%, (D) LDH 1 excluída de Sef Q, (E) LDH 2 eluída de Sef Q, (F) LDH 2 eluída de HTP, (G) LDH 1 eluída de HTP. Todas las muestras se redujeron con 1 % de β -mercaptoetanol

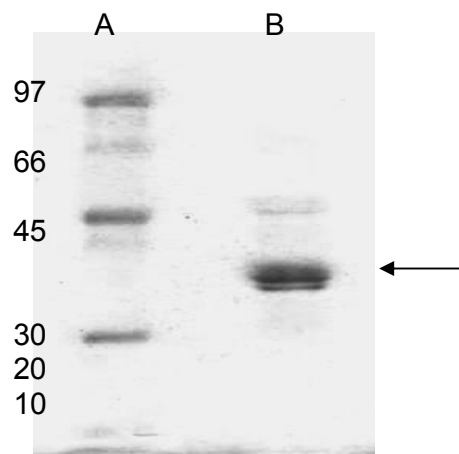


Figura 32. Análisis de la pureza de la LDH 1 por PAGE-SDS al 15 %. Columna (A) PM, (B) LDH 1. La muestra se redujo con 1 % de β -mercaptoetanol.

Cuadro 10. Resumen purificación de las dos isoformas de LDH de cisticercos de *T.solium*

Fracción	Volumen total (ml)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Actividad Total (mU)	Rendimiento (%)	Purificación
Sn	72	576	4	2304	100	1
pp 70%	16.5	528	7	528	22	1.75
Sefarosa Q LDH1	2.4	24	7	24	1	1.75
Sefarosa Q LDH2	3.4	34	10	170	7	2.5
HTP LDH1	1.4	0.7	73	51	2	18
HTP LDH2	0.36	3.96	16	63	3	4

Determinación del peso molecular nativo de la frLDHTs.

Mediante la cromatografía de filtración (Sefacryl S200) por el cual se pasaron diferentes proteínas se calculo Kav obteniendo los siguientes resultados:

Gamma Globulina $K_{av} = (16.8 - 14.4) / (36.6 - 14.4) = 0.108$

Albúmina $K_{av} = (25.6 - 14.4) / (36.6 - 14.4) = 0.5$

Ovoalbúmina $K_{av} = (29.6 - 14.4) / (36.6 - 14.4) = 0.68$

Lactato Deshidrogenasa $K_{av} = (20 - 14.4) / (36.6 - 14.4) = 0.25$

Anhidrasa Carbónica $K_{av} = (35.2 - 14.4) / (36.6 - 14.4) = 0.93$

Lisozima $K_{av} = (48 - 14.4) / (36.6 - 14.4) = 1.51$

Estos datos obtenidos de Kav se traspolaron a una grafica para determinar el peso moléculas de LDH como se muestra en la figura 34.

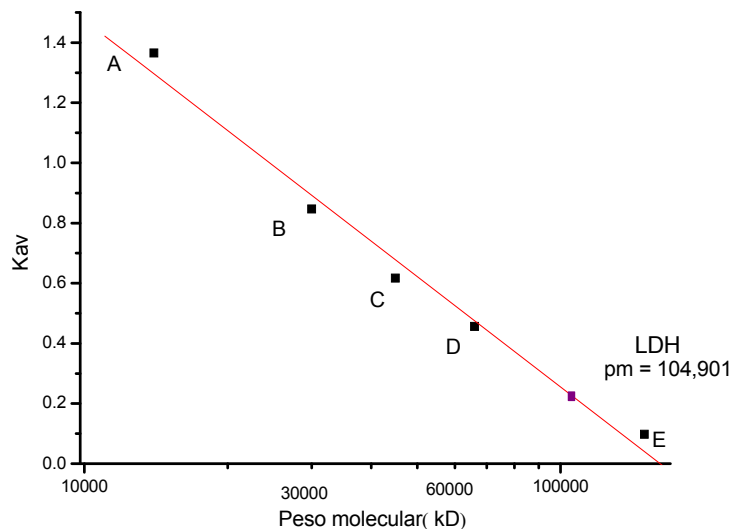


Figura 34. Relación entre los valores de Kav y sus correspondientes pesos moleculares. A) Lisozima 14,000 kDa, B) anhidrasa carbónica 30,000 kDa, C) ovoalbúmina 45,000 kDa, D) albúmina sérica humana 66,000 kDa, E) gamma globulina 150,000 kDa. Al extrapolar el valor de Kav de la fracción con actividad de LDH en el eje de las abscisas se observó que la LDH tiene un peso molecular de aproximadamente 105,000 kDa.

Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de las LDHs

Se analizaron los datos de la actividad enzimática de la LDH a diferentes pH se obtuvo como resultado un pH óptimo de 6 para LDH 1 (Figura 35) y de 6.5 para LDH 2 (Figura 36), mientras que la proteína es más estable a un pH de 6.5 para LDH 1 (Figura 37) y un pH 7 para LDH 2 (Figura 38). También se observa el decremento de la actividad enzimática hacia ambos lados donde se registró la mayor actividad enzimática. Esto en ambas LDHs

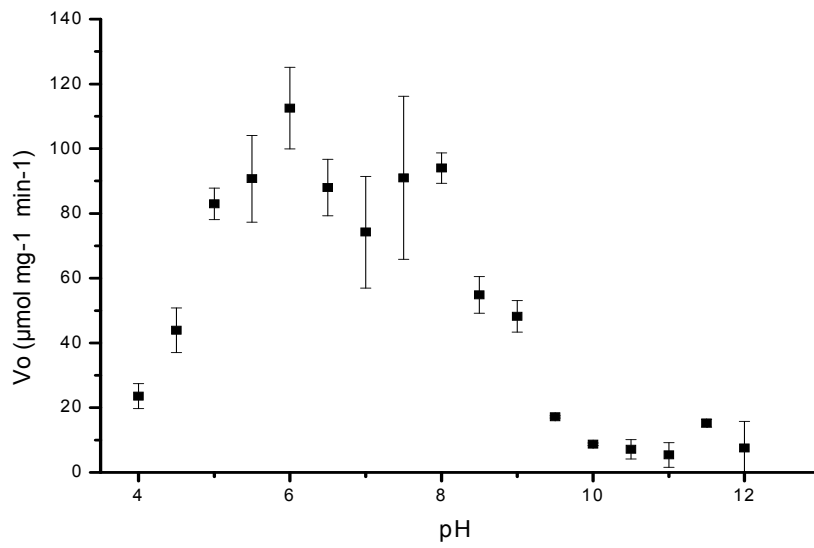


Figura 35. La Gráfica muestra el valor de pH 6.0 como el óptimo de la reacción catalítica para la LDH 1.

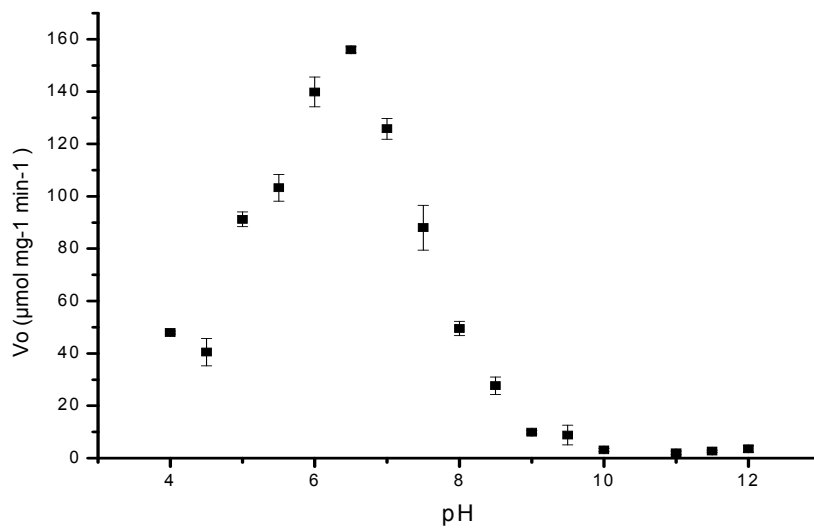


Figura 36. La Gráfica muestra el valor de pH 6.5 como el óptimo de la reacción catalítica para la LDH 2.

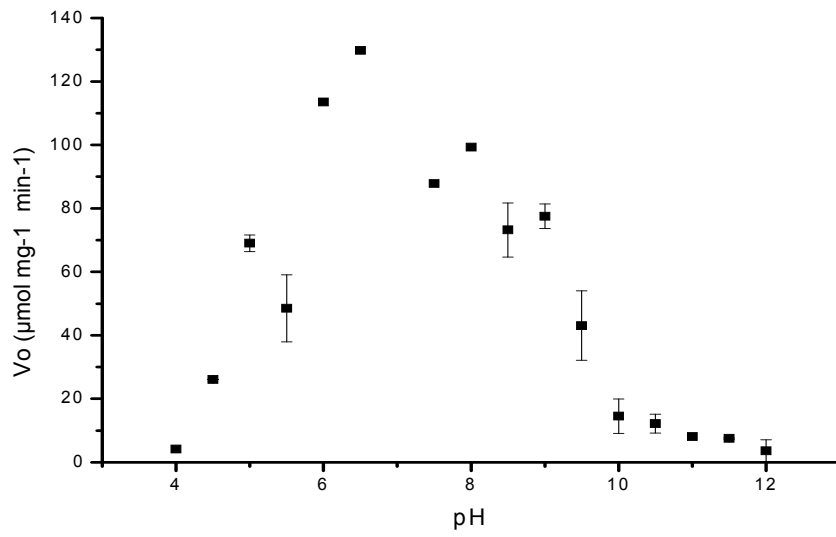


Figura 37. Gráfica que muestra la estabilidad de la LDH 1a pHs de 6 a 7.5.

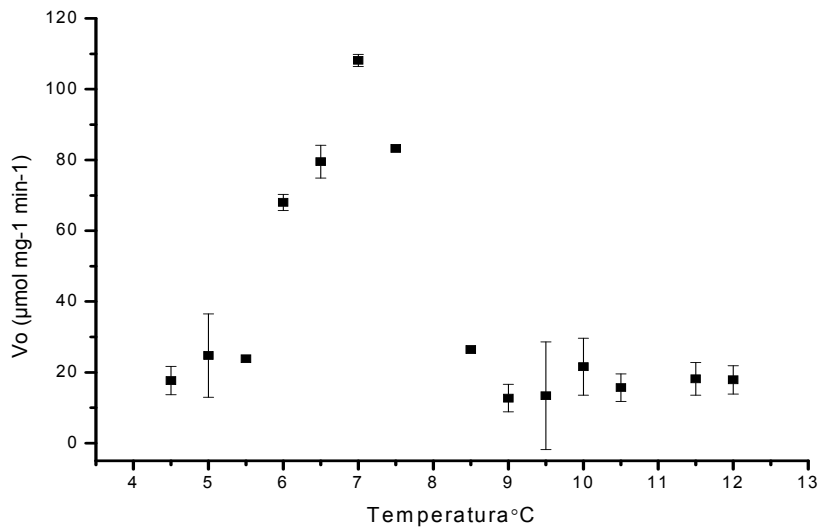


Figura 38. Gráfica que muestra la estabilidad de la LDH 2 a pHs de 6.5 a 7.5.

Estabilidad de la actividad de LDH a diferentes temperaturas

Tanto LDH 1 como LDH 2 fueron estables a la temperatura en un rango de 10 a 40 °C .Temperaturas mayores condujeron a la desnaturalización de las enzimas (Figuras 39, 40).

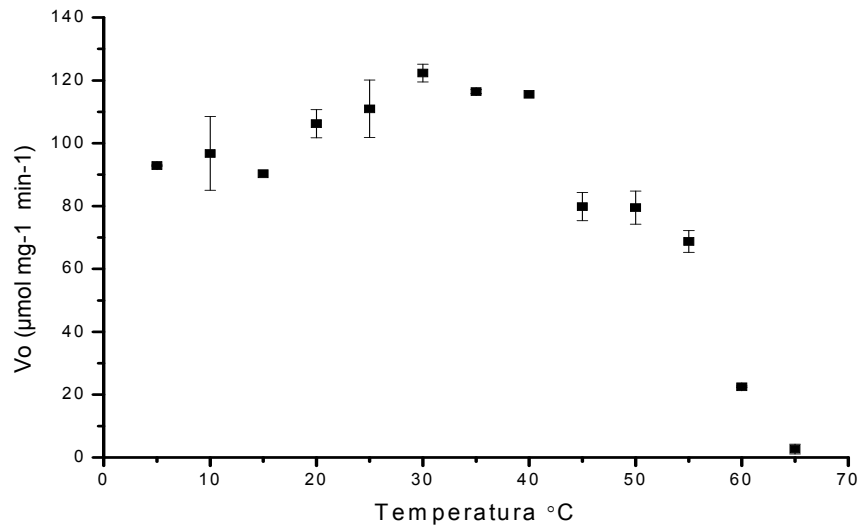


Figura 39. Temperatura optima de reacción catalítica de LDH 1, ésta se observa en un rango de 5 a 40 °C.

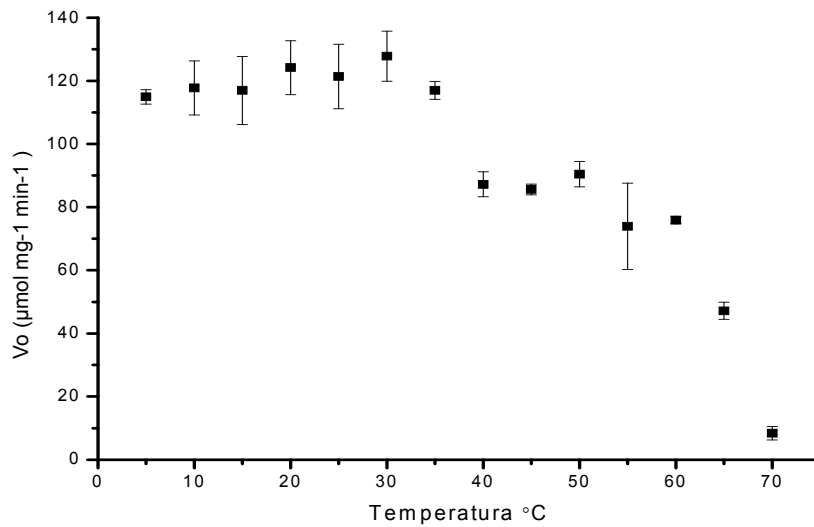


Figura 40. Temperatura óptima de reacción catalítica de LDH 2, ésta se observa en un rango de 5 a 35 °C.

Cuadro 11. Parámetros físicos de LDH 1 y LDH 2 en el sentido de reducción de piruvato.

PARAMETROS	LDH Ts 1	LDH Ts 2
pH óptimo	6	6.5
Estabilidad pH	6.5	7
Temperatura óptima de reacción °C	5 -40	5 -35

Determinación de constantes catalíticas

La figura 41 presenta los resultados de la evaluación del cambio de absorbancia por unidad de tiempo de las reacciones enzimáticas de la LDH 1, utilizando diversas concentraciones de NADH y a concentración saturante del piruvato. Las pendientes de las rectas se fueron incrementando conforme se incrementó la concentración de NADH, hasta no presentar cambios a niveles

de saturación del piruvato, en reducción del piruvato. La figura 42 muestra lo descrito anteriormente utilizando piruvato a diversas concentraciones y NADH a una concentración saturante.

Para oxidación de lactato se muestra en la figura 43 diversas concentraciones de NAD y a concentración saturante del lactato. Las pendientes de las rectas se fueron incrementando conforme se incrementó la concentración de NAD, hasta no presentar cambios a niveles de saturación del lactato. La figura 44 muestra lo descrito anteriormente utilizando lactato a diversas concentraciones y nad a una concentración saturante.

De manera similar, Las Figuras 45 – 48, presenta los resultados de las reacciones enzimáticas de la LDH 2. Podemos observar en las gráficas tanto de LDH 1 y LDH 2 tienen un comportamiento semejante.

Al analizar los datos de las LDHs en gráficas de la V_o frente a la concentración del substrato, se obtuvieron las Figuras 49, 51, 53, 55 y 57,59, 61,63 para LDH 1 y LDH 2, respectivamente. Todas las gráficas mostraron una hipérbola rectangular con límites de V_{max} y K_m características de enzimas que se ajustan a la cinética de Michaelis-Menten. Para tener valores más precisos de las constantes catalíticas se construyeron gráficos de Lineweaver-Burk con los datos de las figuras mencionados anteriormente. La figura 50 muestra la gráfica de la doble recíproca para la LDH 1 frente a diversas concentraciones de NADH. A partir del intercepto de la recta en el eje de las ordenadas se obtiene un valor para la $V_{max(Nadh)} = 135 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ mientras que el intercepto de la misma recta pero en el eje de las abscisas permite calcular un valor para la $K_{m(Nadh)} = 0.0098 \text{ mM}$. La figura 52 es la gráfica de la doble recíproca equivalente a la anterior, pero describe los valores en función de las

concentraciones empleadas con piruvato. De esta forma se aprecia que la $V_{max_{(Piruvato)}} = 156.25 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y la $Km_{(Piruvato)} = 0.103 \text{ mM}$. La figura 54 muestra la gráfica de la doble recíproca para la LDH 1 frente a diversas concentraciones de NAD. A partir del intercepto de la recta en el eje de las ordenadas se obtiene un valor para la $V_{max_{(Nad)}} = 27.58 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ mientras que el intercepto de la misma recta pero en el eje de las abscisas permite calcular un valor para la $Km_{(Nad)} = 0.22 \text{ mM}$. La figura 56 es la gráfica de la doble recíproca equivalente a la anterior, pero describe los valores en función de las concentraciones empleadas con lactato. De esta forma se aprecia que la $V_{max_{(Lactato)}} = 21.33 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y la $Km_{(Lactato)} = 2.59 \text{ mM}$.

La figura 58 muestra la gráfica de la doble recíproca para la LDH 2 frente a diversas concentraciones de NADH. A partir del intercepto de la recta en el eje de las ordenadas se obtiene un valor para la $V_{max_{(Nadh)}} = 79.09 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ mientras que el intercepto de la misma recta pero en el eje de las abscisas permite calcular un valor para la $Km_{(Nadh)} = 0.11 \text{ mM}$. La figura 60 es la gráfica de la doble recíproca equivalente a la anterior, pero describe los valores en función de las concentraciones empleadas con piruvato. De esta forma se aprecia que la $V_{max_{(Piruvato)}} = 49.6 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y la $Km_{(Piruvato)} = 0.65 \text{ mM}$. La figura 62 muestra la gráfica de la doble recíproca para la LDH 1 frente a diversas concentraciones de NAD. A partir del intercepto de la recta en el eje de las ordenadas se obtiene un valor para la $V_{max_{(Nad)}} = 17.04 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ mientras que el intercepto de la misma recta pero en el eje de las abscisas permite calcular un valor para la $Km_{(Nad)} = 0.018 \text{ mM}$. La figura 64 es la gráfica de la doble recíproca equivalente a la anterior, pero describe los valores en

función de las concentraciones empleadas con lactato. De esta forma se aprecia que la $V_{max}(\text{Lactato}) = 15.87 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y la $K_m(\text{Lactato}) = 2.72 \text{ mM}$.

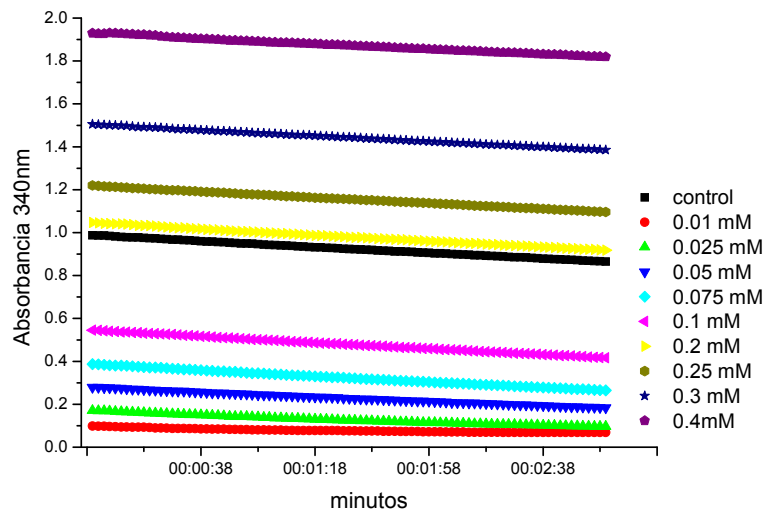


Figura 41. Grafica en la que se observa el cambio de absorbancia por unidad de tiempo de las reacciones enzimáticas de la LDH 1 en el sentido de la reducción del piruvato, utilizando diversas concentraciones de NADH y a concentración saturante del piruvato.

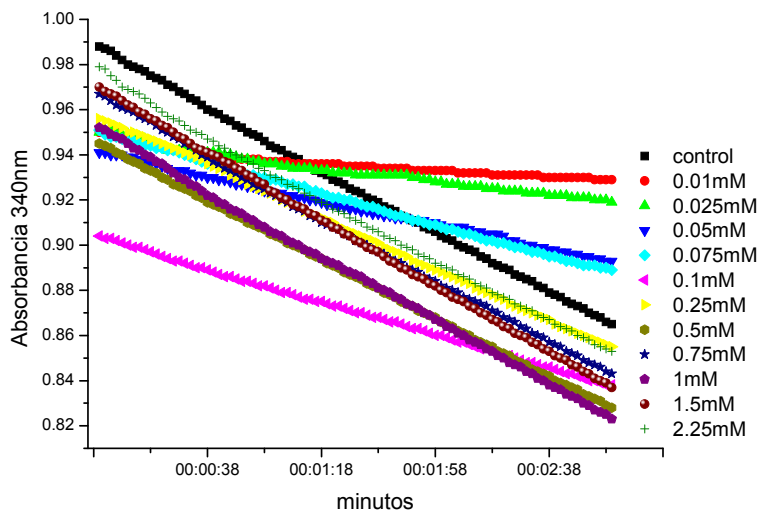


Figura 42. Grafica en la que se observa el cambio de absorbancia por unidad de tiempo de las reacciones enzimáticas de la LDH 1 en el sentido de la reducción del piruvato, utilizando diversas concentraciones de piruvato y a concentración saturante del NADH.

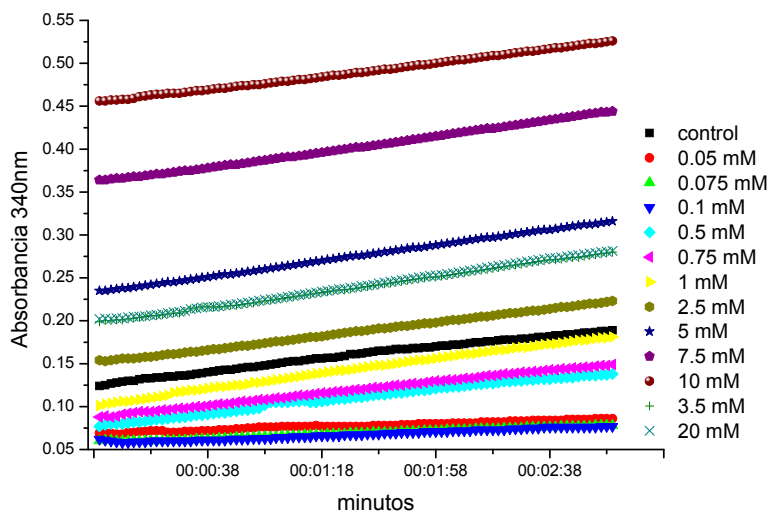


Figura 43. Grafica en la que se observa el cambio de absorbancia por unidad de tiempo de las reacciones enzimáticas de la LDH 1 en el sentido de la oxidación de lactato, utilizando diversas concentraciones de NAD y a concentración saturante del lactato.

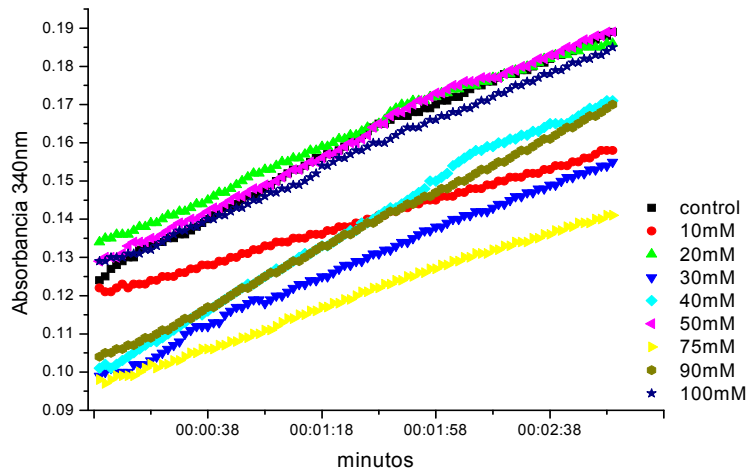


Figura 44. Grafica en la que se observa el cambio de absorbancia por unidad de tiempo de las reacciones enzimáticas de la LDH 1 en el sentido de la oxidación de lactato, utilizando diversas concentraciones de lactato y a concentración saturante del NAD.

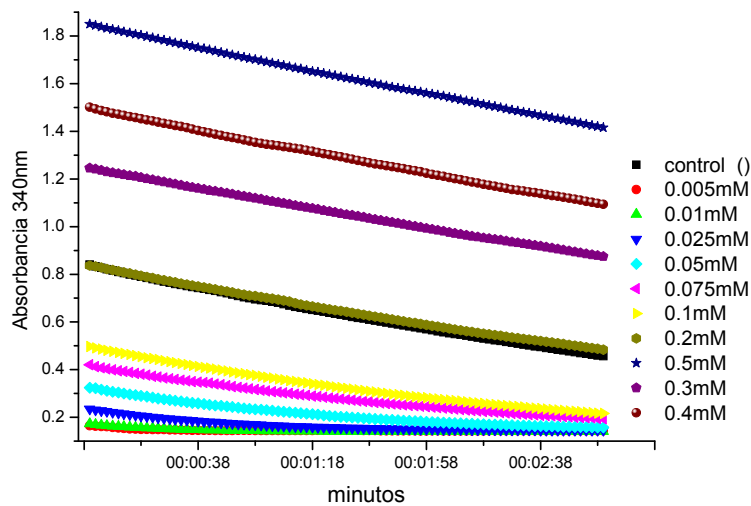


Figura 45. Grafica en la que se observa el cambio de absorbancia por unidad de tiempo de las reacciones enzimáticas de la LDH 2 en el sentido de la reducción del piruvato, utilizando diversas concentraciones de NADH y a concentración saturante del piruvato.

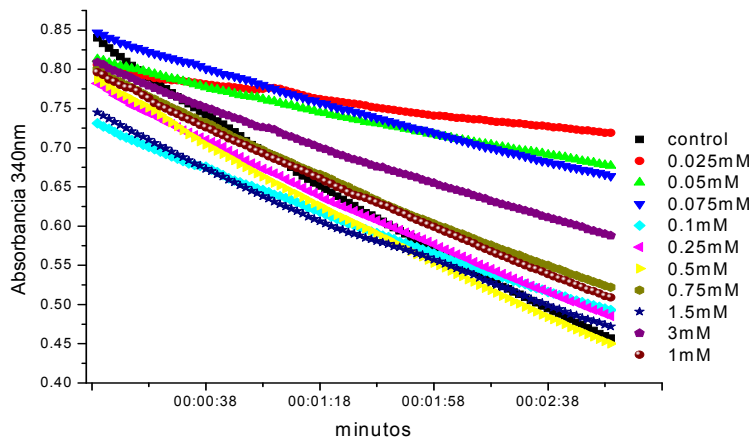


Figura 46. Grafica en la que se observa el cambio de absorbancia por unidad de tiempo de las reacciones enzimáticas de la LDH 2, en el sentido de la reducción del piruvato, utilizando diversas concentraciones de piruvato y a concentración saturante del NADH.

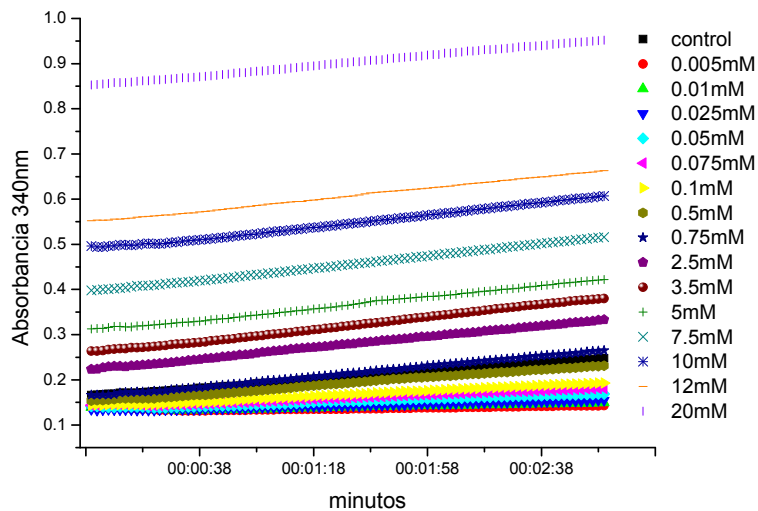


Figura 47. Grafica en la que se observa el cambio de absorbancia por unidad de tiempo de las reacciones enzimáticas de la LDH 2 en el sentido de la oxidación de lactato, utilizando diversas concentraciones de NAD y a concentración saturante del lactato.

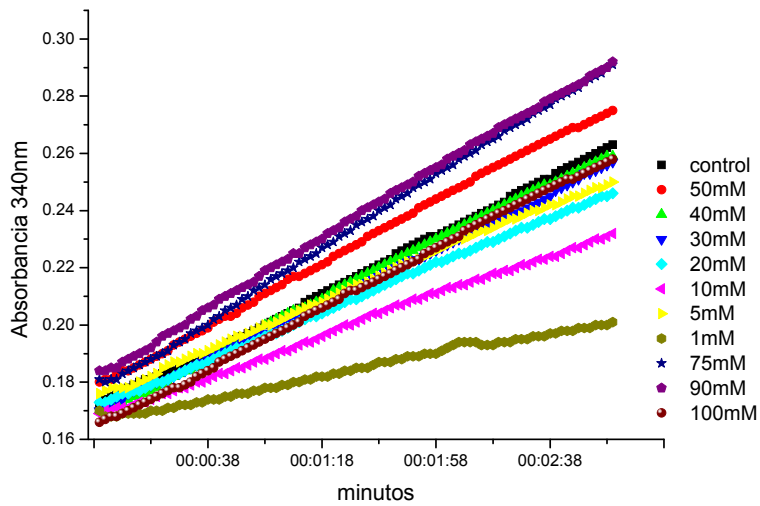


Figura 48. Grafica en la que se observa el cambio de absorbancia por unidad de tiempo de las reacciones enzimáticas de la LDH 2 en el sentido de la oxidación de lactato, utilizando diversas concentraciones de lactato y a concentración saturante del NAD.

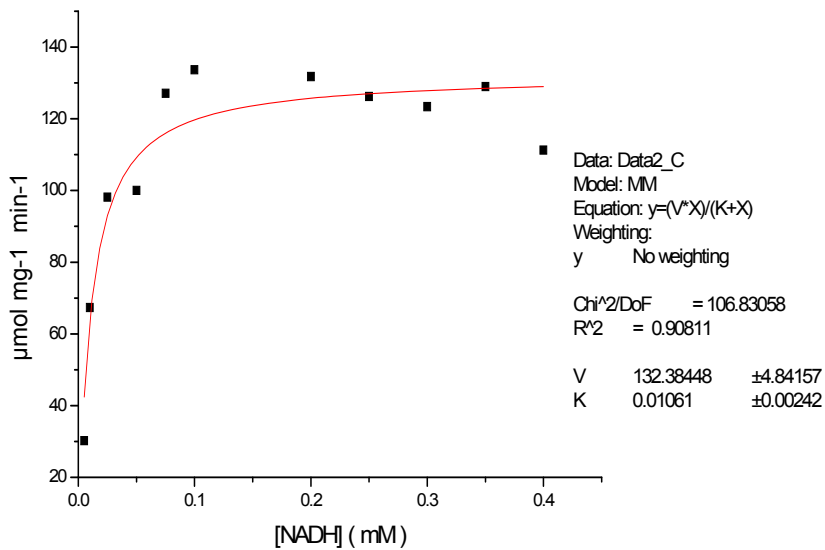


Figura 49. Grafica de Michaelis – Menten para obtener los valores de $K_m = 0.01 \text{ mM}$ y $V_{max} = 132.38 \text{ } \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ de la LDH 1, usando NADH como sustrato.

En la figura 50 se muestra una doble recíproca donde a diferentes concentraciones de NADH, a partir del intercepto de la recta en el eje de las ordenadas se obtiene un valor para la $V_{max(NADH)} = 135 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ mientras que el intercepto de la misma recta pero en el eje de las abscisas permite calcular un valor para la $K_{m(NADH)} = 0.0098 \text{ mM}$.

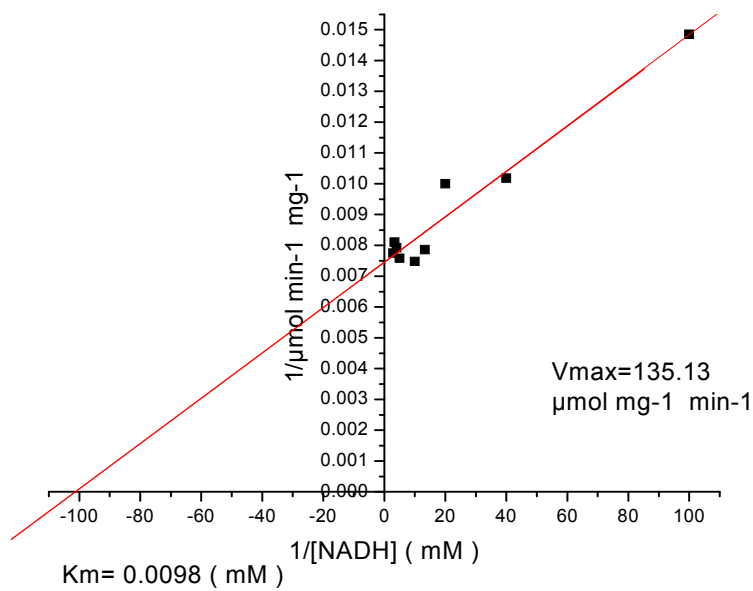


Figura 50. Grafica de Lineweaver-Burk, para obtener los parámetros cinéticos de $K_m = 0.0098 \text{ mM}$ y de la $V_{max} = 135.13 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el NADH usando la LDH 1.

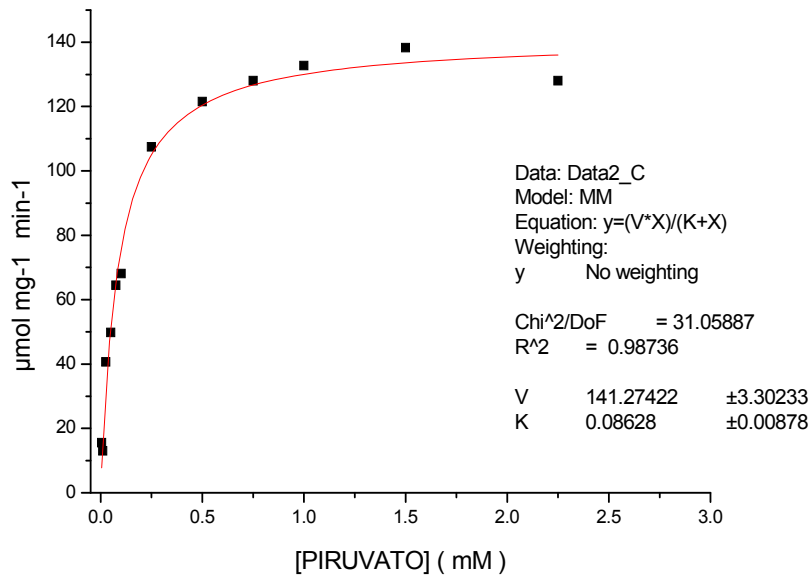


Figura 51. Grafica de Michaelis – Menten para obtener los valores de $K_m = 0.086$ mM y de la $V_{max} = 141.27 \mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, para el piruvato usando la LDH 1.

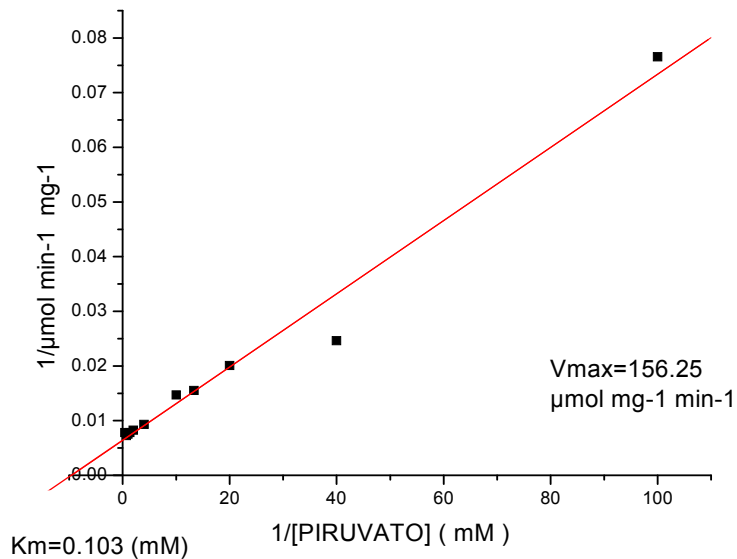


Figura 52. Grafica de Lineweaver-Burk, para obtener los valores de la $K_m = 0.103$ mM y de la $V_{max} = 156.25 \mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ para el piruvato usando la LDH 1.

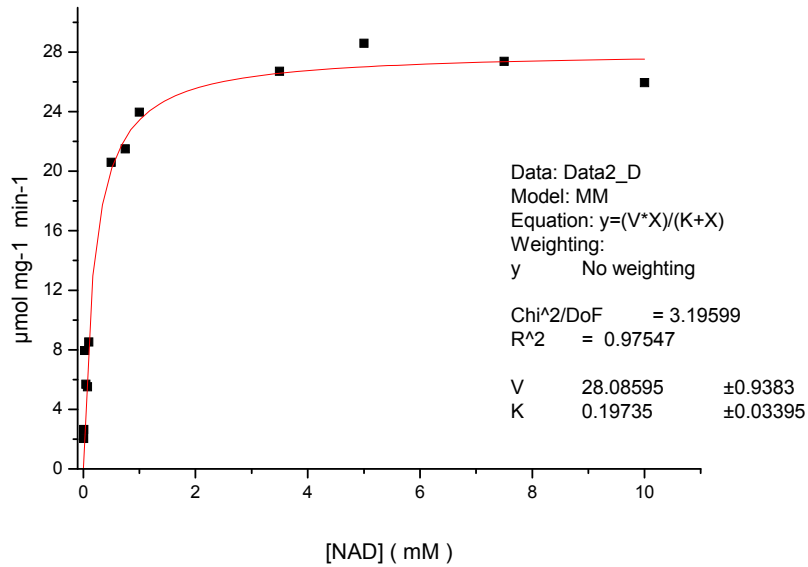


Figura 53. Grafica de Michaelis – Menten para obtener los valores de $K_m = 0.197$ mM y $V_{max} = 28.08 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el nad usando a la LDH 1.

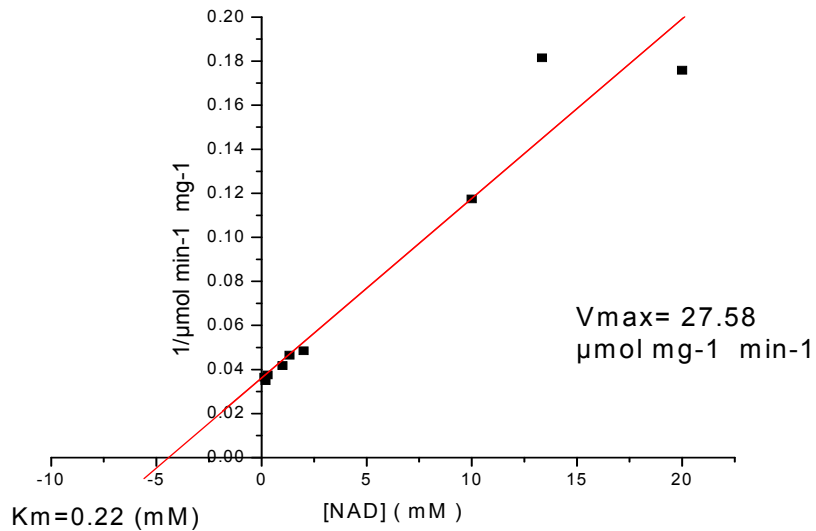


Figura 54. Grafica de Lineweaver-Burk para obtener los valores de la $K_m = 0.22$ mM y de la $V_{max} = 27.58 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el nad usando a la LDH 1.

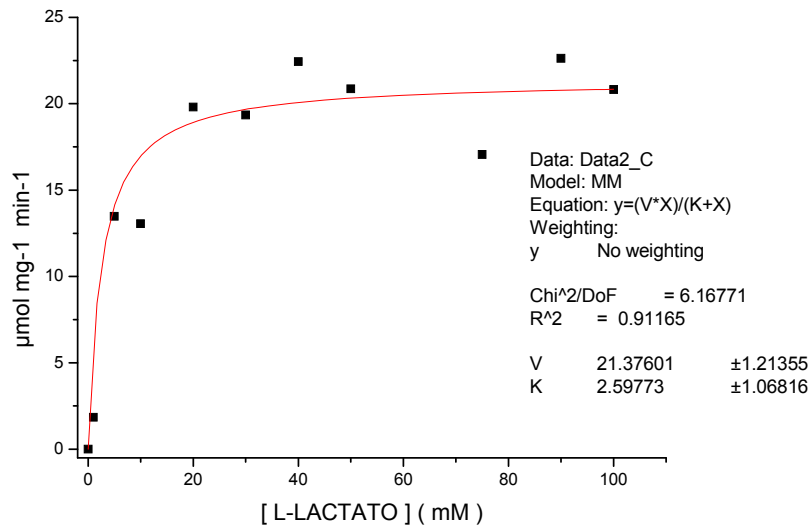


Figura 55. Grafica de Michaelis – Menten para obtener los valores de $K_m = 2.59 \text{ mM}$ y $V_{max} = 21.37 \text{ } \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el lactato, usando a la LDH 1

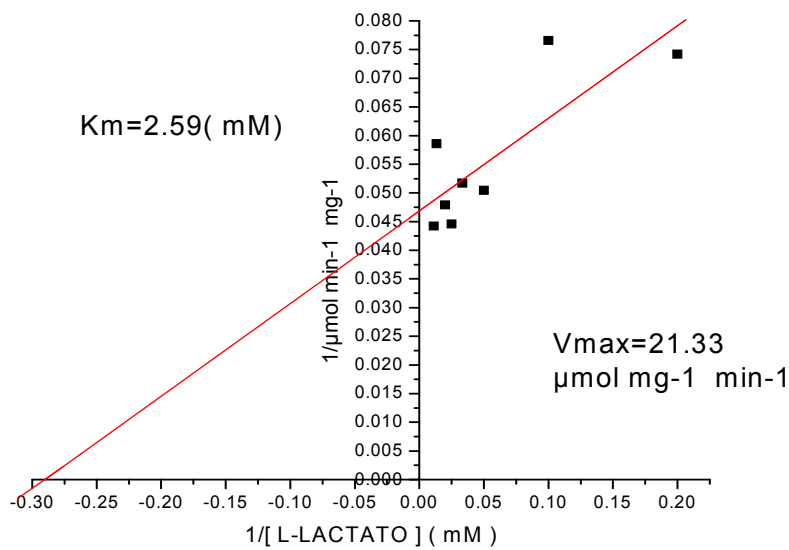


Figura 56. Grafica de Lineweaver-Burk, para obtener los valor de la $K_m = 2.59 \text{ mM}$ y de la $V_{max} = 21.33 \text{ } \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el lactato, usando a la LDH 1.

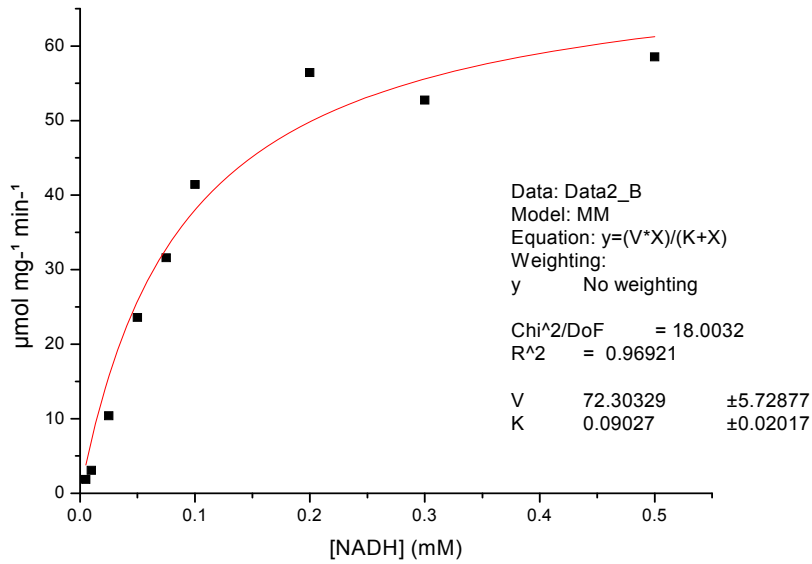


Figura 57. Grafica de Michaelis – Menten para obtener los valores de $K_m = 0.090$ mM y $V_{max} = 72.30 \mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ para el nadh usando a la LDH 2.

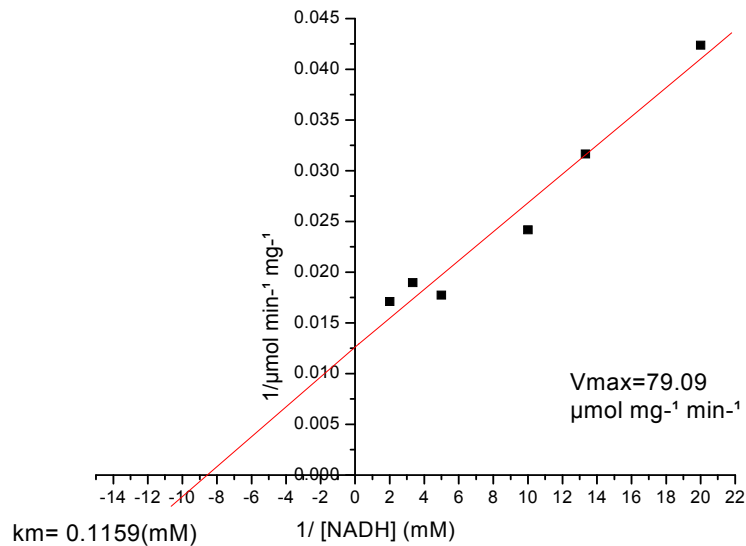


Figura 58. Grafica de Lineweaver-Burk, para obtener el valor de la $K_m = 0.1159$ mM y de la $V_{max} = 79.09 \mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ para el nadh usando la LDH 2.

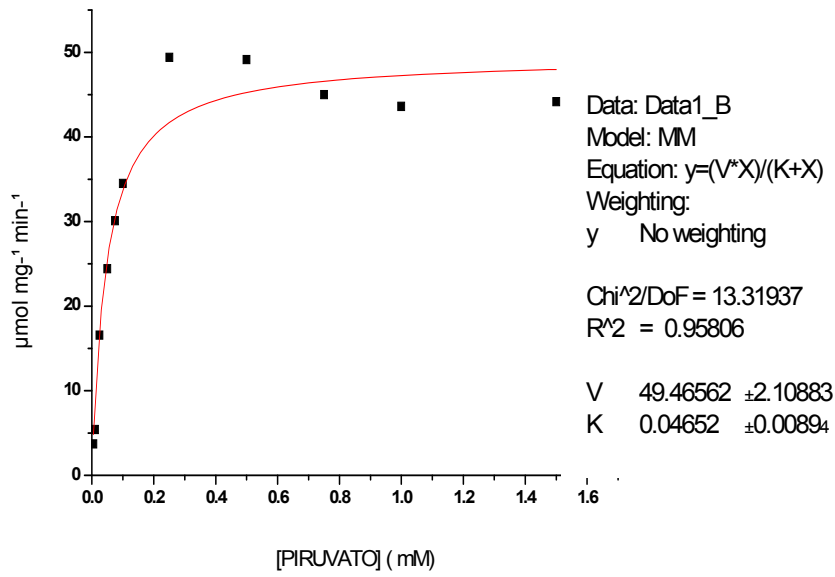


Figura 59. Grafica de Michaelis – Menten para obtener los valores de $K_m = 0.046$ mM y $V_{max} = 49.46$ $\mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ para el piruvato usando a la LDH 2.

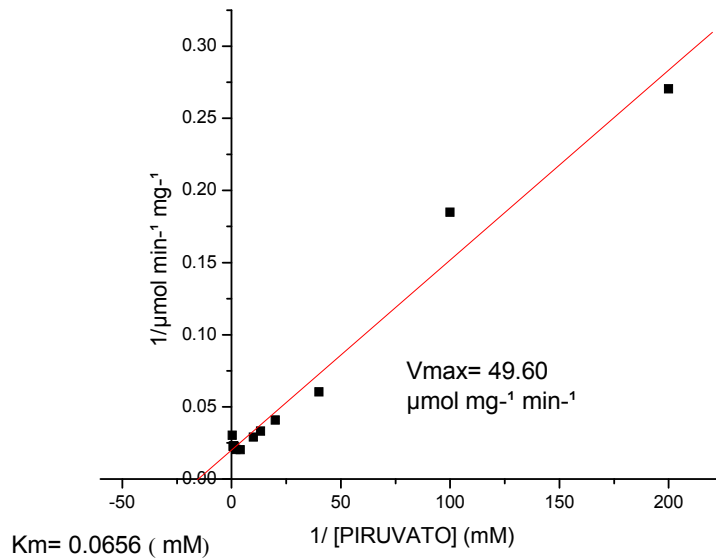


Figura 60. Grafica de Lineweaver-Burk para obtener el valor de la $K_m = 0.065$ mM y de la $V_{max} = 49.60$ $\mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ para el piruvato usando a la LDH 2.

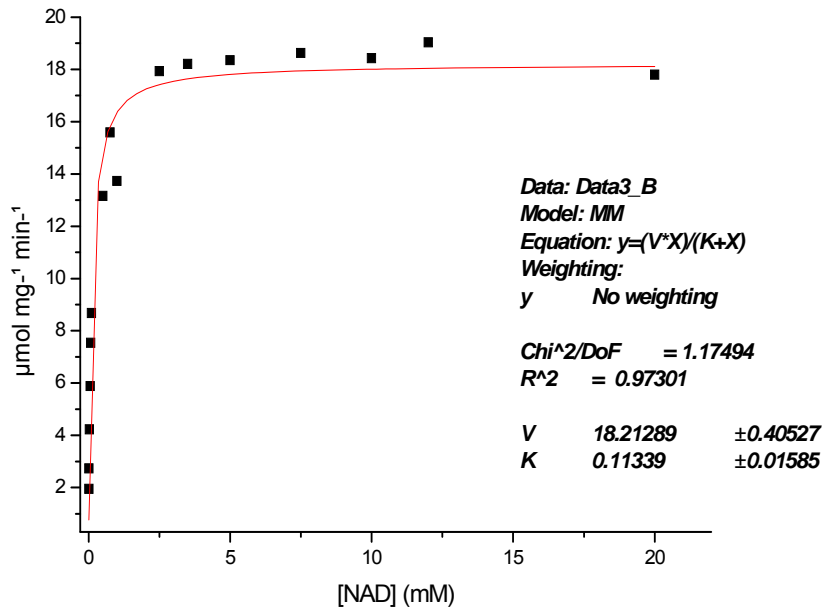


Figura 61. Grafica de Michaelis – Menten para obtener los valores de $K_m = 0.113 \text{ mM}$ y $V_{max} = 18.21 \text{ } \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ del nad usando a la LDH 2.

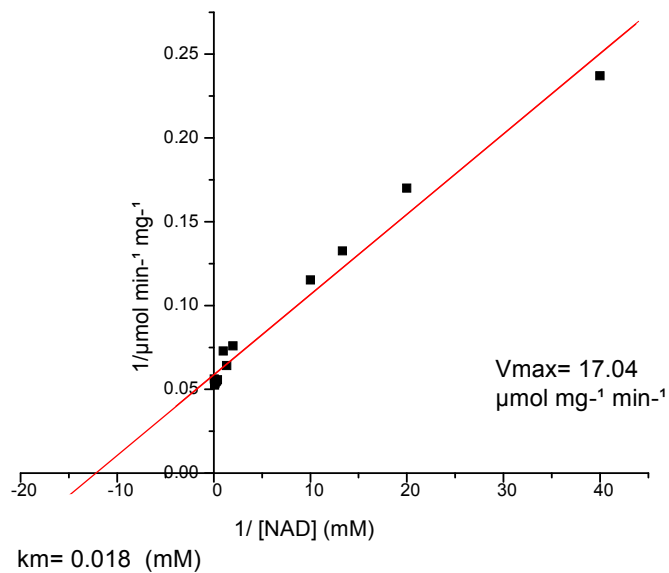


Figura 62. Grafica de Lineweaver-Burk para obtener los valores de la $K_m = 0.018 \text{ mM}$ y de la $V_{max} = 17.04 \text{ } \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el NAD usando a la LDH 2.

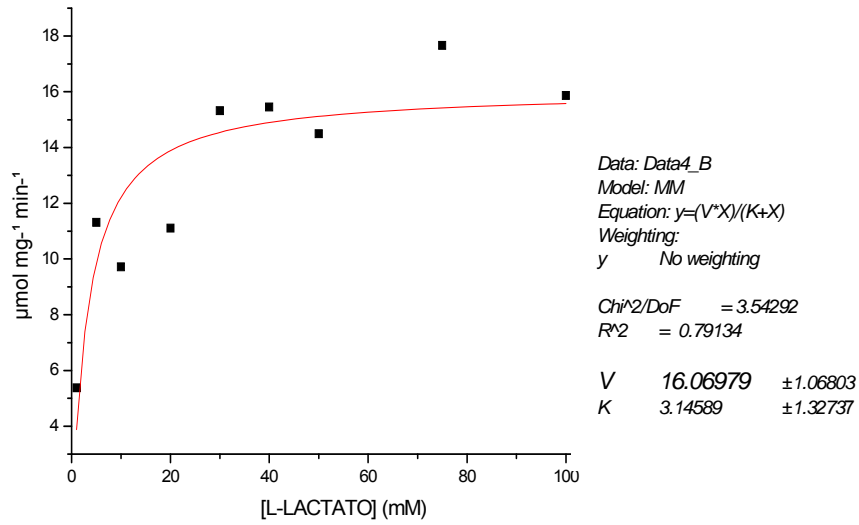


Figura 63. Grafica de Michaelis – Menten para obtener los valores de $K_m = 3.14 \text{ mM}$ y $V_{max} = 16.06 \mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ para el lactato usando a la LDH 2.

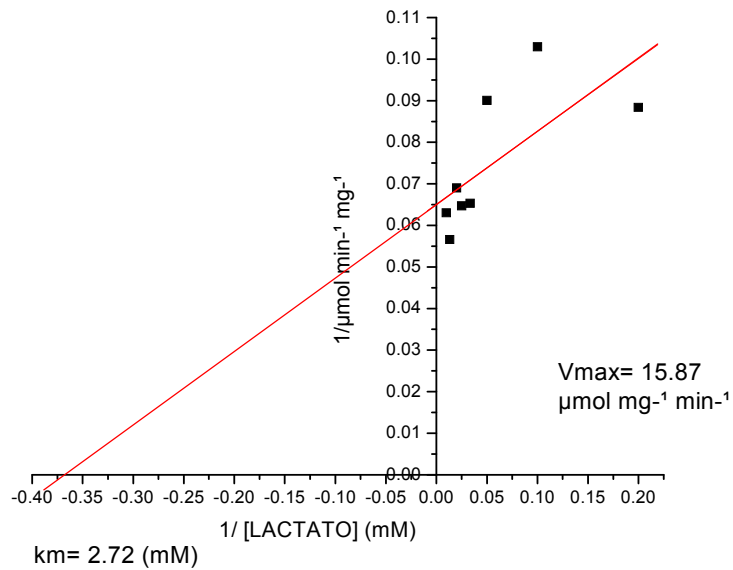


Figura 64. Grafica de Lineweaver-Burk para obtener los valores de la $K_m = 2.72 \text{ mM}$ y de la $V_{max} = 15.87 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el lactato usando a la LDH 2.

Cuadro 12. Constantes catalíticas K_m y V_{max} de las LDH 1 y LDH 2 de *T.s*

SUSTRATOS	LDH T.S 1		LDH T.S 2	
	K_m (mM)	V_{max} $\mu\text{mol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$	K_m (mM)	V_{max} $\mu\text{molmg}^{-1}\text{min}^{-1}$
NADH	0.01	132.38	0.09	72.30
PIRUVATO	0.08	141.27	0.04	49.46
NAD	0.19	28.08	0.11	18.21
L-LACTATO	2.59	21.37	3.14	16.06

Estudios de inhibición (I_{50} , K_i y tipo de inhibición)

En las figuras 65, 66 se presentan las gráficas del porcentaje de la actividad residual (% actividad) de la LDH 1 frente a las concentraciones de p-hidroximercuribenzoato (p-hmb) en el sentido de la reducción del piruvato y oxidación del lactato respectivamente. Los valores de las I_{50} obtenidos fueron para reducción de piruvato = 0.6 μM , oxidación de lactato = 925.92 μM .

Las figuras 67 y 68 muestran los valores obtenidos de la I_{50} para reducción de piruvato = 0.079 μM y oxidación de lactato = 0.260 μM cuando se empleó a la LDH 2.

Se observa que al utilizar mayor concentración del inhibidor la velocidad de la reacción disminuye.

Al usar el oxalato como inhibidor en una muestra de LDH 1, se obtuvieron los valores de I_{50} = 0.36 μM y 3 μM para reducción de piruvato y oxidación de lactato respectivamente (figuras 69, 70).

En las figuras 71, 72 aparecen las gráficas de la actividad residual del extracto crudo del parásito frente a concentraciones de ácido omaxico mostrando los valores de I_{50} para reducción de piruvato = 0.73 μM y para oxidación de lactato = 3 μM .

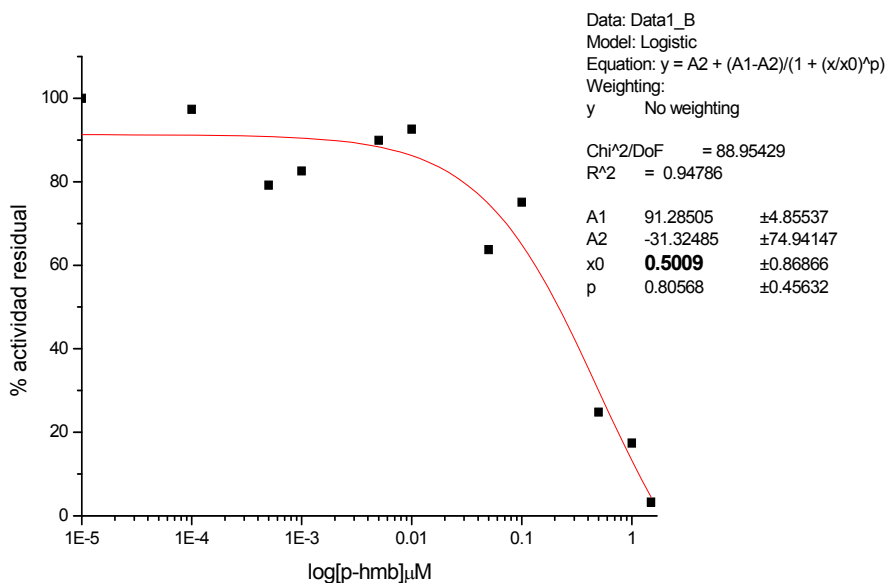


Figura 65. Porcentaje de inhibición residual obtenida por concentraciones ascendentes de p- hmb así como la $I_{50} = 0.6\mu\text{M}$. Para LDH 1 Reducción de piruvato.

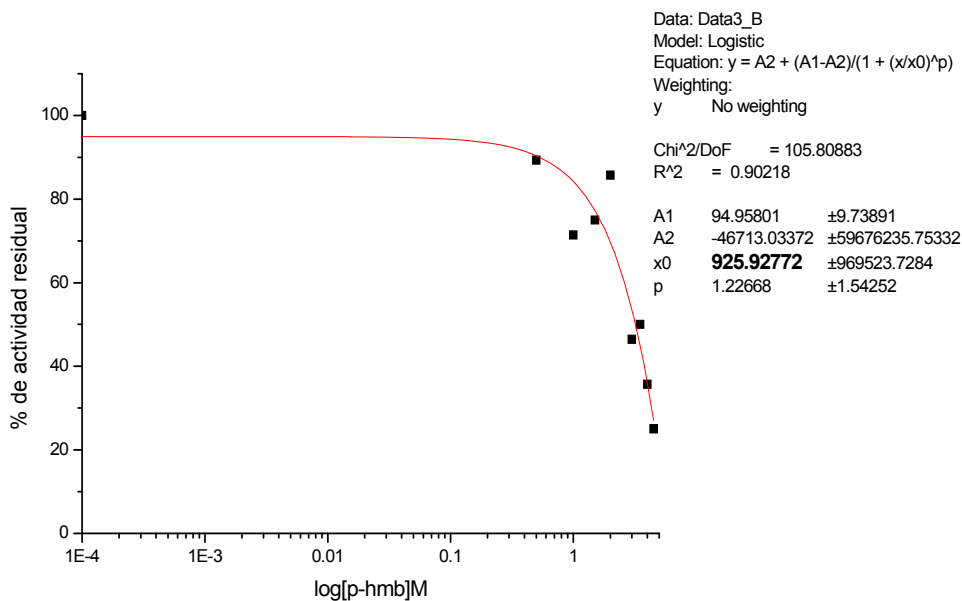


Figura 66. Porcentaje de inhibición residual obtenida por concentraciones ascendentes de p- hmb así como la $I_{50} = 925.92\mu\text{M}$. Para LDH 1 oxidación de lactato.

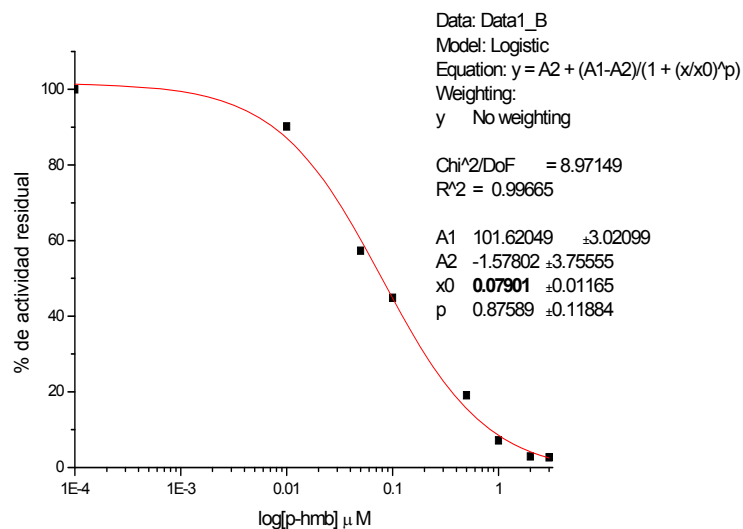


Figura 67. Porcentaje de inhibición residual obtenida por concentraciones ascendentes de p- hmb así como la $I_{50} = 0.07 \mu\text{M}$. Para LDH 2, reducción de piruvato.

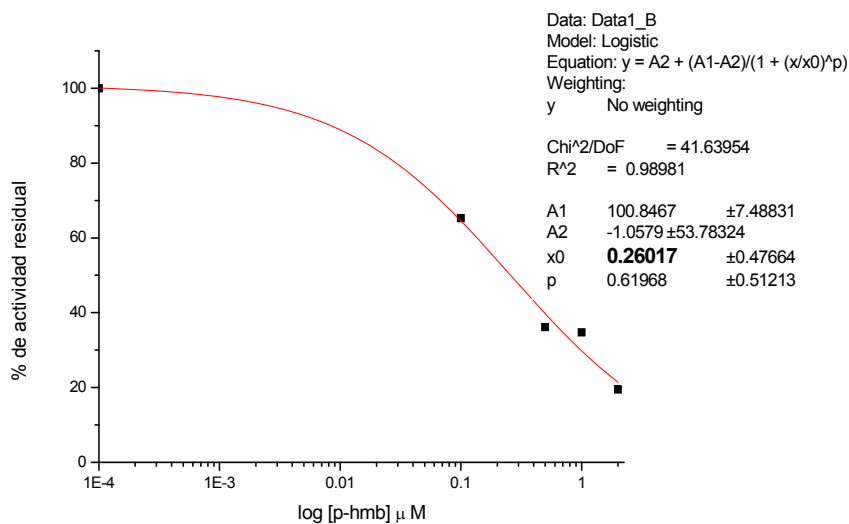


Figura 68. Porcentaje de inhibición residual obtenida por concentraciones ascendentes de p- hmb sobre la LDH 2 ($I_{50} = 0.26 \mu\text{M}$). Oxidación de lactato.

Cuadro 13. Valores de I_{50} desarrollados por el p-hmb (p-hidroximercuribenzoato) sobre las LDH 1 y LDH 2 en ambos sentidos de la reacción.

	LDH T.s 1 Log [p-hmb] μ M	LDH T.s 2 Log [p-hmb] μ M
REDUCION DE PIRUVATO	0.6	0.079
OXIDACION DE LACTATO	925	0.260

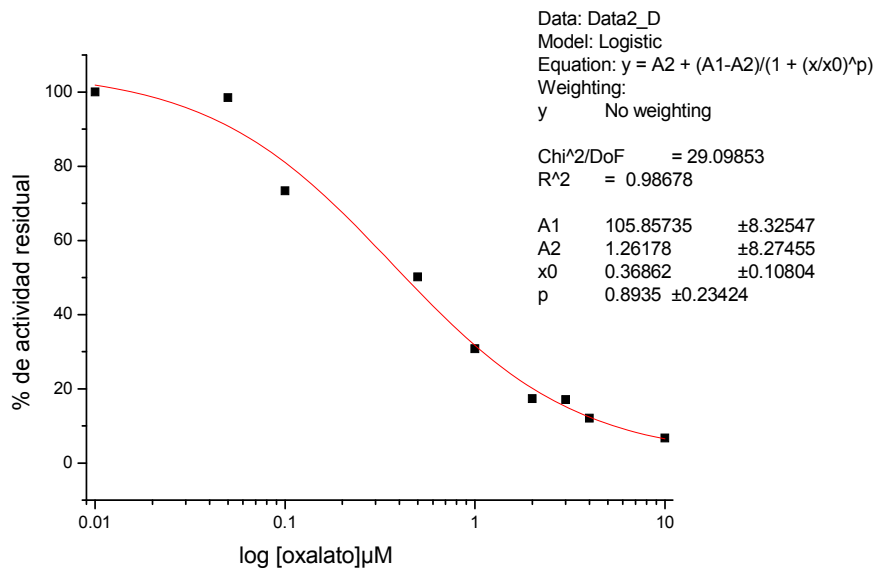


Figura 69. Porcentaje de inhibición residual obtenida por concentraciones ascendentes de oxalato sobre la LDH 1 ($I_{50} = 0.36 \mu\text{M}$). Reducción del piruvato.

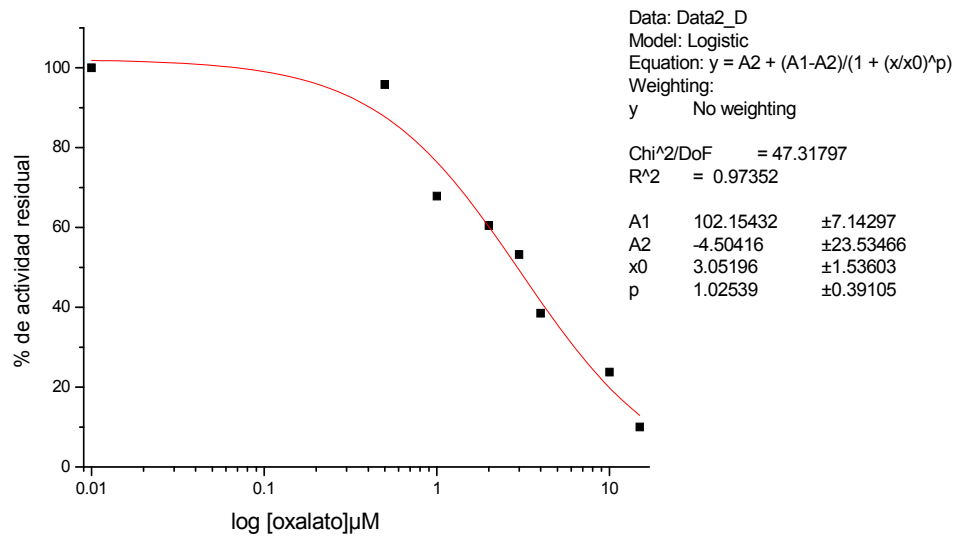


Figura 70. Porcentaje de inhibición residual obtenida por concentraciones ascendentes de oxalato sobre la LDH 1 ($I_{50} = 3.05 \mu\text{M}$). Oxidación del lactato.

Cuadro 14. Valores de I_{50} desarrollados por el oxalato sobre la LDH 1, utilizando al oxalato como inhibidor.

	LDH T.s 1 Log [Oxalato] μM
REDUCION DE PIRUVATO	0.36
OXIDACION DE LACTATO	3

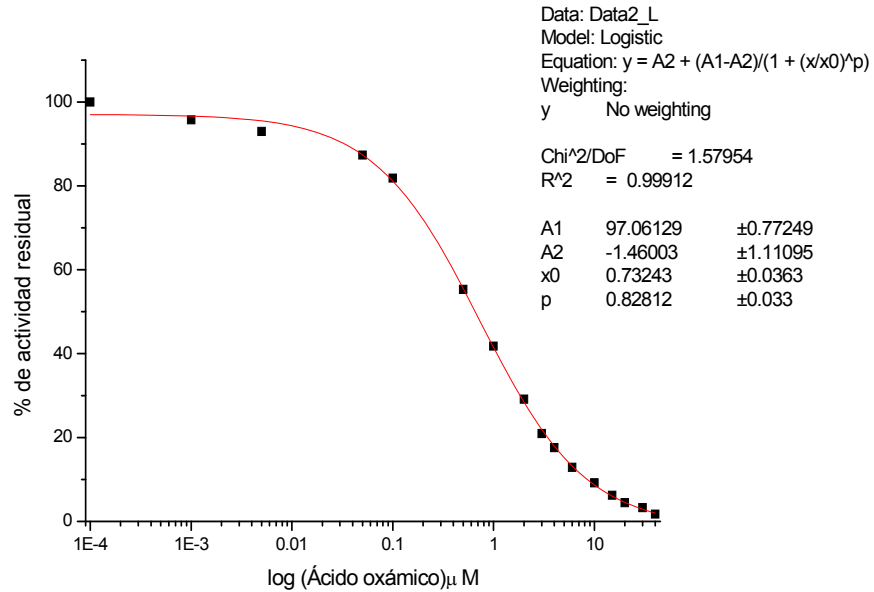


Figura 71. Porcentaje de inhibición residual obtenida por concentraciones ascendentes de ácido oxámico así como la $I_{50} = 0.73 \mu\text{M}$. Para un extracto crudo. Reducción de piruvato. Realizado en el programa Origin Pro 7.

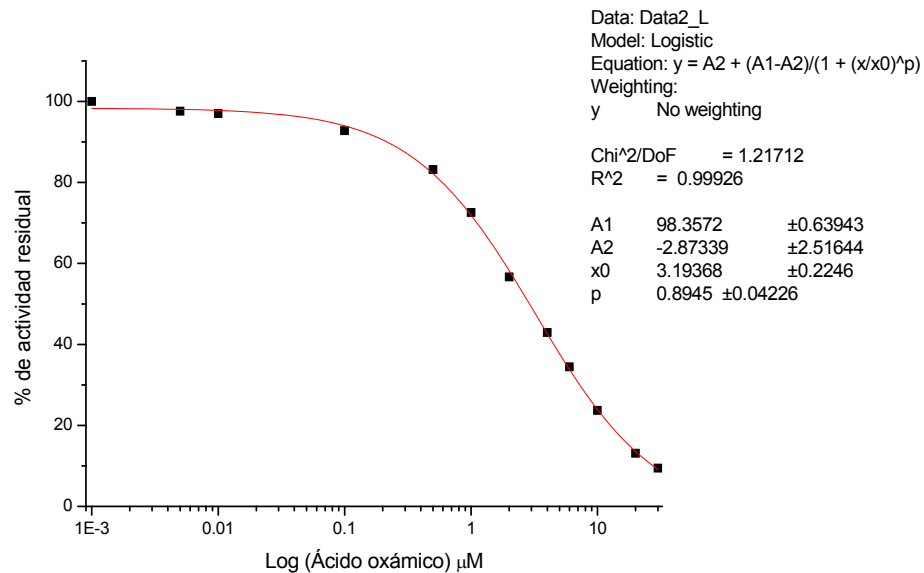


Figura 72. Porcentaje de inhibición residual obtenida por concentraciones ascendentes de ácido oxámico así como la $I_{50} = 3.19 \mu\text{M}$. Para un extracto crudo. Oxidación de lactato. Realizado en el programa Origin Pro 7.

Cuadro 15. I_{50} de LDH de un extracto crudo de cisticercos de *T.solium*, utilizando como inhibidor ácido oxámico.

Extracto crudo de <i>T.s</i> Log [Ácido Oxámico] μ M	
REDUCION DE PIRUVATO	0.73
OXIDACION DE LACTATO	3

LDH 1 inhibición por sustratos

También se obtuvo la inhibición de la actividad enzimática de LDH 1 por la creciente concentración de sustratos con nadh (figura 73), piruvato (figura 74), nad (figura 75) y lactato (figura 76), en un solo sentido de la reacción (Reducción de piruvato).

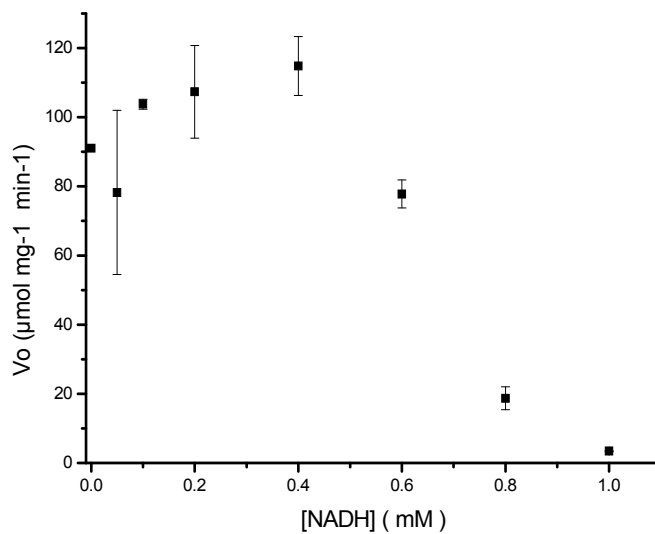


Figura 73. Inhibición de la velocidad de reacción obtenida por elevadas concentraciones de NADH. Para LDH 1 Reducción de piruvato. Realizado en el programa Origin Pro 7.

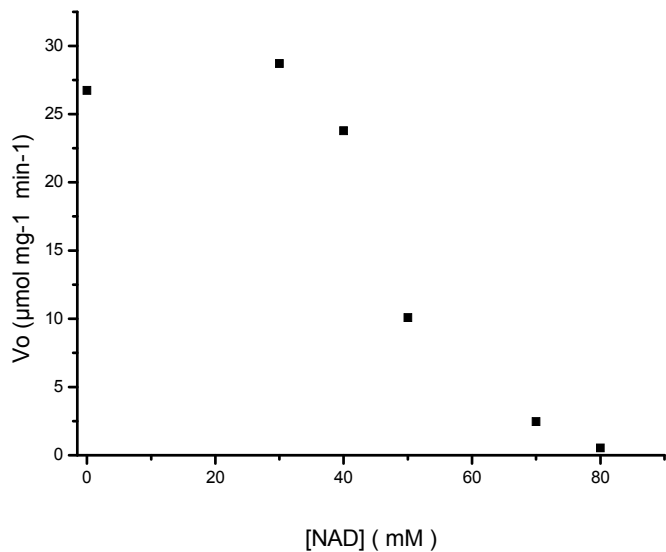


Figura 74. Inhibición de la velocidad de reacción obtenida por elevadas concentraciones de NAD. Para LDH 1. Oxidación de lactato. Realizado en el programa Origin Pro 7.

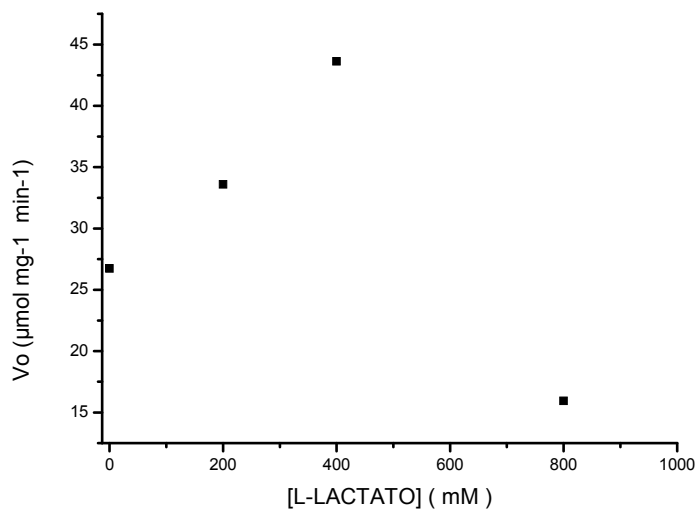


Figura 75. Inhibición de la velocidad de reacción obtenida por elevadas concentraciones de lactato. Para LDH 1. Oxidación de lactato. Realizado en el programa Origin Pro 7.

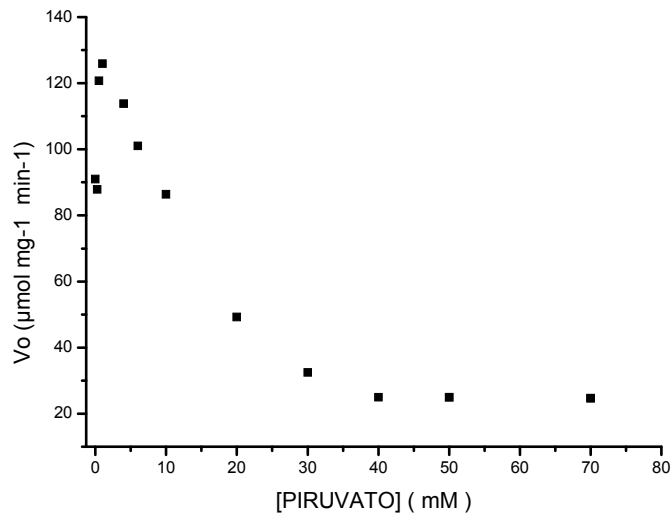


Figura 76. Inhibición de la velocidad de reacción obtenida por elevadas concentraciones de piruvato. Para LDH 1. Reducción del piruvato. Realizado en el programa Origin Pro 7.

DISCUSIÓN

Desde hace varios siglos, el cestodo *T. solium* es un parásito endémico en países subdesarrollados y en algunos desarrollados en las últimas décadas se ha observado un resurgimiento de esta parasitosis. En el mundo existen actualmente 200 millones de personas infectadas por este helminto y se producen 50 mil muertes al año debido a su presencia en el mayor de los casos en el sistema nervioso central.

El principal problema para la salud humana que produce *T. solium* es la neurocisticercosis (NC). La NC puede ser una enfermedad crónica desgastante y en ocasiones, como se mencionó, fatal. Otros aspectos importantes donde afecta esta parasitosis es tanto en el económico, por el decomiso de la carne de cerdo parasitada, como el cerdo es un eslabón vital para el ciclo biológico de *T. solium*.

Debido a estas consideraciones es necesario instrumentar acciones enfocadas al control de esta parasitosis.

Diversos autores han desarrollado diversos trabajos sobre el metabolismo intermediario (MI) de los helmintos. El objetivo de esto es el de incidir en alguna parte del MI que permita obstruir o eliminar la producción de energía en estos organismos de manera específica. Así, se tienen ejemplos de enzimas parasitarias tanto de la glucólisis como del ciclo de los ácidos tricarbóxicos que han sido evaluadas con este propósito.

Sin embargo, prácticamente no hay información sobre este tema en relación a *T. solium*. En nuestro laboratorio recientemente se ha iniciado un proyecto dirigido a evaluar enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos con el fin mencionado. Por procedimientos bioquímicos se purificó en forma homogénea a la malato deshidrogenasa citosólica de cisticercos de *T. solium* cMDHTs. Esta enzima se caracterizó cinéticamente y con la información derivada de su secuencia de amino ácidos se logró clonar y caracterizar su gen. Esta última información permitió construir a la proteína recombinante de la cMDHTs la cual está siendo analizada con el interés de inhibirla con el uso de derivatizantes químicos que modifique su estructura molecular.

Para ampliar las posibilidades de contar con un mayor número de enzimas candidatas que permitan controlar la producción energética de *T. solium*, en este trabajo se decidió estudiar a la lactato deshidrogenasa citosólica de cisticercos de *T. solium*.

La lactato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.27), L-lactato: NAD⁺ oxidoreductasa (LDH), cataliza de manera reversible la transformación del piruvato en ácido láctico la cual es la última reacción de la vía glicolítica. Las LDHs son enzimas poliméricas compuestas de cuatro subunidades. Cada subunidad está codificada por diferentes genes con un alto grado de similitud y funciones.

Las LDHs son enzimas con funciones muy importantes en varias vías metabólicas. Principalmente ejerce su acción en la producción energética en condiciones anaeróbicas. También estas enzimas llevan a cabo la reacción inversa de la gluconeogénesis durante el ciclo de Cori, donde se produce glucosa y ATP a partir de compuestos diferentes de los carbohidratos. Además, se ha observado que participa en la transferencia del ácido láctico al interior de la mitocondria el cual culmina como acetil Co A y así ingresar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Las LDHs de los tejidos de los cisticercos de *T. solium* se obtuvieron a través de un proceso bioquímico de purificación de proteínas nativas. En el Sn 1 (extracto crudo de los cisticercos) se pudo demostrar la actividad catalítica de LDH (Cuadro 9) sin poder definir en esta muestra la presencia de isoformas de LDH. Sin embargo, al cromatografiar al Sn 1 en Sefarosa Q, se demostró la presencia de dos isoformas de LDH, diferentes entre sí por su carga eléctrica neta. Esta observación fue repetidamente consistente en las replicas cromatográficas realizadas en Sefarosa Q. Así, a la LDH excluida de la Sefarosa Q y en consecuencia con carga positiva (catiónica) se denominó LDH 1, mientras que a la LDH aniónica o eluída de Sefarosa Q se nombró LDH 2. Cuando LDH 1, obtenida de Sefarosa Q se cromatografió en una columna de CM-Sefarosa (intercambiadora catiónica), si interaccionó con la resina y solo se desprendió de la misma con un gradiente salino, así mismo no existió ninguna actividad de LDH en ninguna otra fracción obtenida de la HTP. En relación a la LDH 2 salida de Sefarosa Q y cromatografiada en CM-Sefarosa no interaccionó con la resina porque salió en la fracción excluida de la columna. De forma similar a la descrita para la previa cromatografía, tampoco se encontró

actividad de LDH en alguna otra fracción derivada de esta cromatografía. Estas observaciones confirman la presencia de dos isoformas de LDHs presentes en los tejidos del parásito.

El análisis en geles de poliacrilamida (PAGE 15%) (Figura 31) de la fracción excluída de Sefarosa Q reveló el enriquecimiento de una banda de ~ 35 kDa que coincide con el reportado para las subunidades de LDHs de mamíferos. Adicionalmente, en esta misma fracción también se observaron otras bandas de mayor y menor peso molecular que el mencionado para la LDH. Los datos obtenidos de la fracción eluída de Sefarosa Q en PAGE igualmente presentaron una banda de ~ 35 kDa y un mayor número de otras bandas contaminantes en comparación con la fracción excluída.

Cuando las dos fracciones obtenidas en Sefarosa Q se cromatografiaron por separado en columnas de HTP ambos resultados fueron similares en el sentido de reflejar, para cada cromatografía, una sola fracción eluída con actividad de LDH (Figura 15). Sin embargo, este tipo de cromatografía fue más eficaz para purificar a la LDH 1 de sus contaminantes que para la LDH 2 (Figura 19).

La LDH 1 fue purificada a homogeneidad al pasar la fracción con actividad de LDH eluída de la cromatografía de HTP en una columna de exclusión por peso molecular (Figura 31). La imagen del PAGE (Figura 32) muestra una sola banda de ~ 35 kDa que coincide con la presencia de la actividad para LDH en el ensayo tanto en la oxidación del lactato como en la reducción del piruvato.

El punto isoeléctrico de la LDH 1 fue de ~ 7.8 al análisis, de la fracción obtenida de una CM-Sefarosa y cromatografiada en la resina de PBE 98.

El análisis del proceso de purificación (Cuadro 10) nos indica que la actividad específica tanto de la LDH 1 como de la LDH 2 se incrementó conforme se pasó del Sn o extracto crudo hasta la última cromatografía realizada. De manera inversa se mostró con la actividad total en las mencionadas fracciones. Por razones desconocidas la actividad de las enzimas fue disminuyendo conforme se obtenía de manera más pura a las enzimas. Esta observación fue similar a la obtenida por Marchat y col. 1996.

El análisis por geles de poliacrilamida de los diferentes pasos de purificación demostraron que la LDH 1 se purificó a homogeneidad mientras que la LDH 2 solo se logró semi-purificar (Figura 31).

Las constantes catalíticas aparentes de la LDH 1 están resumidas en el cuadro 12 y nos informan que estas dos enzimas tienen una mayor afinidad por el piruvato que por el ácido láctico en una proporción, para la LDH 1 de ~ 30 veces y para la LDH 2 de ~ 68 veces. Es decir, la LDH 2 resultó tener una mayor afinidad para el piruvato que la LDH 1. Sin embargo, la velocidad de reacción para transformar al piruvato en lactato fue mayor en LDH 1 que en LDH 2.

Estas constantes catalíticas resultaron ser similares con las publicadas tanto para otros helmintos como mamíferos.³⁴

Muchos helmintos tienen, tanto la capacidad de fijar CO₂ vía el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) como producir lactato vía la fermentación del ácido láctico. En *T. solium* se desconoce si tiene la secuencia completa del CAT. Sin embargo, la alta producción de lactato y la gran actividad de LDH 1 y LDH 2, demostrada por sus constantes catalíticas, sugieren que la fermentación del lactato podría ser la vía predominante en la producción de energía en este cestodo.

La LDH 1 de *T. solium* fue inhibida, en ambos sentidos de sus reacciones catalíticas, por el p-hidroximercurio benzoato (p-hmb)³⁵ y tales efectos inhibitorios pudieron ser parcialmente revertidos por la adición de compuestos con grupos mercaptos como el ditioneitol (DTT) en el orden de milimoles, fenómeno similar como el demostrado en las LDHs de mamíferos. Adicionalmente, LDH 1 y LDH 2 también fueron inhibidas por unas cuantas micromolas tanto de oxamato como de oxalato. Es conocido que estos dos compuestos químicos son inhibidores específicos para las lactatos deshidrogenasas, El oxamato es un análogo del piruvato y el oxalato impide la oxidación del ácido láctico³⁶. Particularmente, nuestros resultados relacionados con la inhibición de la enzima por el oxalato en el sentido de la reducción del piruvato fueron similares a los obtenidos por Winer y Schwert (1959).³⁷ Era de esperarse que este compuesto no inhibiese a la LDH del parásito en este sentido de la reacción, puesto que el oxalato impide la oxidación del ácido láctico y no inhibiría al piruvato sino al ácido láctico. Sin embargo, los autores mencionan que se forman complejos ternarios inactivos entre la enzima el piruvato y el oxalato (EPO) los cuales comparten una similitud estructural a los complejos enzima lactato y oxalato inactivo (ELO) para explicar esta inhibición.

La LDH 1 del parásito también fue inhibida por altas concentraciones de sustratos. Las gráficas de la actividad enzimática frente a la concentración de los sustratos en ambos sentidos de la reacción mostraron que la actividad catalítica llega a un máximo en 0.1, 5.0, 40 y 1.5 mM de NADH, NAD lactato y piruvato respectivamente. Así concentraciones mayores a las mencionadas decrecieron la actividad de la LDH 1. Estos resultados fueron similares a los reportados para *Molinema dessetae*³⁸

En mamíferos el efecto inhibitorio por sustratos es más obvio y pronunciado con isoenzimas de músculo cardíaco (un tejido aerobio) que con las de músculo esquelético (tejido anaerobio). Nuestros resultados sugieren que nuestra LDH 1 fue similar a la LDH del músculo cardíaco de mamíferos que a la del músculo esquelético. Esta inhibición podría resultar de la formación de complejos ternarios abortivos LDH/NAD/piruvato y LDH/NAD/lactato. El complejo LDH/NAD/piruvato es ventajoso en tejidos aeróbicos (corazón y cerebro), siendo capaz de retener cantidades significativas de piruvato, las cuales pueden ser lentamente oxidadas en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, resultando en la formación de 4 a 6 moléculas de adenosina trifosfato (ATP) en comparación con 2 moléculas de ATP en la vía glicolítica. El significado biológico de esta observación es que la primera vía confiere una mayor ventaja fisiológica a los helmintos parásitos.

Este trabajo describe la información experimental relacionada con dos lactatos deshidrogenasas de cisticercos de *T. solium*. Estas enzimas difieren en sus características bioquímicas y cinéticas. Su elevada actividad específica de cada una de ellas así como alta capacidad del piruvato para inhibir a la LDH 1 permiten sugerir un papel importante en la obtención de energía de *T. solium*.

Conclusiones:

Se mostró la presencia de dos isoenzimas de LDH en cisticercos de *Taenia solium*.

Se purificó y caracterizó cinéticamente dos isoformas de LDH en cisticercos de *T. solium*

LDH-1 es principalmente catiónica mientras que la LDH-2 es aniónica.

Las dos LDHs tienen mejor afinidad al piruvato sobre el lactato.

Tanto LDH-1 como LDH-2 tienen valores de constantes catalíticas en el rango de diversos organismos.

La LDH-1 se inhibió tanto por exceso de sustratos como por p-hidroximercuribenzoato y oxalato como una característica de las LDHs

La LDH-2 se inhibió con p-hidroximercuribenzoato

Las LDHs en un extracto crudo fueron inhibidas por ácido oxámico

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

Glosario de abreviaturas

Act Enz	Actividad enzimática
Act total	Actividad total
ATP	Trifosfato de adenosina
CM-Sefarosa	Resina de intercambio iónica de Sefarosa carboxil – metil
DTT	Ditiotreitol
E	Enzima
EDTA	Etilanadamina ácido tetra-acético
EI	Complejo enzima – inhibidor
ES	Complejo enzima - sustrato
ESI	Complejo enzima – sustrato – inhibidor
HCl	Ácido clorhídrico
HTP	Hidroxiapatita
kDa	Kilodaltons
Ki	Constante de inhibición
Km	Constante de Michaelis – Menten
pl	Punto isoeléctrico
pp	Precipitado
SDS	Sodio dodecil sulfato
Sn	Sobrenadante
LDHs	Lactato deshidrogenasas
p-hmb	P-hidroximercuribenzoato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Bibliografía

1. Kuchenmeister F. Offenes Sindschreiben and 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, 1855;5:1-4. Translated in: Kean BH, Mot JE, Russell, AJ. Trop. Med. Parasitol. Classic Invest. Cornell Univ. Press. Ithaca 1978:677
2. Van Benden PJ. Note sur des experiences relatives au developpement des cysticerques. Annal Scien. Natur. 1854 ;1 :104
3. Yoshino K. studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part I. on the hatching of the eggs of *Taenia solium*. J Med Ass Formosa. 1933;32:139-141
4. Yoshino K. studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part II. On the migratory cause of the oncosphaera of *Taenia solium* within the intermediate host. J Med Ass Formosa 1933;32:155-158.
5. Yoshino K. studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part II. On the development of the *Cysticercus cellulosae* whitin the definite intermediate host. J Med Ass Formosa. 1933;32:166-169.
6. Yoshino K. On the evacuation of eggs from detached gravid proglottis of the *Taenia solium* and on the structure of its eggs. *Taiwan Igakkai Zasshi*. 1934;33:47-58.summary.
7. Yoshino K. On the subjective symptoms caused by the parasitism of *Taenia solium* and its development in man. *Taiwan Igakkai Zasshi*. 1934;33:183-194.
8. Crosby, A. W. (1972), The Columbian Exchange (Contributions in American Studies, num 2.), Greengood Press, Connecticut.
9. Smyth, J.D. (1994) Introduction to Animal Parasitology, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, pp 277-387.
10. Larralde C., Aluja A., Cisticercosis guía para profesionales de la salud, fondo de cultura económica, México, 2006.p.19.
11. Larralde C., Aluja A., Cisticercosis guía para profesionales de la salud, fondo de cultura económica, Mexico, 2006. p.21.
12. Cañedo L, Lacleste JP, Morales E. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*,
13. Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Larralde C, Madrazo I, Velazquez V, Willms K. Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. México: Fondo de Cultura Económica; 1987; p.115.

14. Silverman, P. H. (1954), Studies on the biology of some tapeworms of the genus *Taenia*. II. The morphology and development of the taeniid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the state of development and propagation of gravid segments, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 48(4):356-366.
15. Cheng, T. *General Parasitology*. Harcourt Brace Haranovich, Publishers. New Cork. 1986.
16. Smyth, J. (1969), *The Physiology of Cestodes*, Oliver and Boyd, Edimburgo, p.279.
17. Larralde C., Aluja A., *Cisticercosis guía para profesionales de la salud*, fondo de cultura económica, México, 2006. p.22,25,26.
18. Trejo V, *Caracterización del embrioforo del huevecillo de Taenia solium*. Tesis. Facultad de ciencias, UNAM, México, D.F. 1986.
19. Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Willms K. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs,
20. Sosa A, Giron H, Alva S, Calzada L. Presence and nature of a glycocalyx-like coat on the external vesicular membrana of *Cysticercus cellulosae*. A high resolution histochemical study. *Life Sci.* 1977;21:1021-1032.
21. Medina MT, Rosas E, Rubio Donnadieu F, Sotelo J. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Arch Intern Med.* 1990;150:325-327.
22. Briceño CE, Biagi F, Martinez B. Cisticercosis. Observaciones de 97 casos de autopsia. *Prensa Med Mex.* 1961;26:193-197.
23. Rabiela MT, Lombardo L, Flores F. Cisticercosis cerebral. Estudio de 68 casos de autopsia. *Patología, México*, 1972; 10: 27-40.
24. Vazquez V, Sotelo J. The course of seizures after treatment of cerebral cysticercosis. *New England J. Med.* 1992; 327: 696-701.
25. White, A.C. Jr, Robinson, P., Kuhn, R.(1997) *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interaction and the immune response. *Clinical Immunology* p.66, 209-230.
26. Eric E, P.K Stumpf, *Bioquímica Fundamental*, Editorial Limusa, México, 1993, p.145-163.
27. De Robertis, Nowinski W, Sáez F. *Biología Celular*. Buenos Aires, Argentina, El Ateneo, octava ed, p.60.
28. Tielens AGM, Energy generation in parasitic helminthes, *Parasitology today*, 1994, vol. 10, N° 9.
29. Champe PC, Harvey RA & Ferrier DR. *Lippincott's Illustrated Reviews, Biochemistry*, 3rd edition, Lippincott-Williams & Wilkins, 2005, p 53-57
30. De Robertis, Nowinski W, Sáez F. *Biología Celular*. Buenos Aires, Argentina, El Ateneo, octava ed, p.60.
31. Boyer D. Paul, *The enzymes oxidation – reduction parte A Dehydrogenases (I) Electron transfer (I)*, volume 10, third edition, Academic press, New York, 1975, p 191-289.
32. Lehninger A.L. *Bioquímica Las bases moleculares de la estructura y función celular*, Ediciones Omega, 1980, Barcelona, España, p 201-207
33. Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione transferase *J Biol Chem* 261: 1048-1051.

34. Marchat L, Loiseau PM, Petek F. 1996. Purification and characterization of lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 2 from *Molinema deséate* (Nematoda: Filaridoidea). *Parasito Res* 82: 672-680. Holbrook JJ, Liljas A, Steindel SJ, Rossman MG. 1975. Lactate dehydrogenase. In: Boyer PD (ed) *The enzymes*, vol 11 Academic Press, New York, pp 191-291.
35. Massaro E, Markert C. 1966. Ionic effects on self-reactivation of p-hydroxymercuribenzoate inhibited lactate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 116: 319-331.
36. Novoa W B, Winer A D, Glaid A J, Schwert GW. 1959. Lactic dehydrogenase. V. Inhibition by oxamate and by oxalate. *J Biol Chem* 234: 1143-1148.
37. Winer AD, SchwertGW. 1959. Lactic Dehydrogenase: VII. Fluorescence spectr of ternary complexes of lactic dehydrogenase, reduced diphosphopiridine nucleotide, and carboxylic acids *J Biol Chem*. 234: 1155-1161
38. Marchat L, Loiseau PM, Petek F. 1996. Purification and characterization of lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 2 from *Molinema deséate* (Nematoda: Filaridoidea). *Parasito Res* 82: 672-680. Holbrook JJ, Liljas A, Steindel SJ, Rossman MG. 1975. Lactate dehydrogenase. In: Boyer PD (ed) *The enzymes*, vol 11 Academic Press, New York, pp 191-291.