



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

MALATO DESHIDROGENASA CITOSÓLICA
DE CISTICERCOS DE *Taenia solium*
PROVEEDORA DE MALATO:
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR,
GENÓMICA Y CINÉTICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

GABRIELA NAVA BALDERAS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMÁN
DR. JUAN LUIS RENDÓN GÓMEZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de abril de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **NAVA BALDERAS GABRIELA** con número de cuenta **94063853** con la tesis titulada: **"MALATO DESHIDROGENASA CITOSÓLICA DE CISTICERCOS DE *Taenia solium* PROVEEDORA DE MALATO: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, GENÓMICA Y CINÉTICA"** realizada bajo la dirección de : **DR. AGUSTIN PLANCARTE CRESPO**

Presidente: DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMÁN
Vocal: DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO
Secretario: DRA. GLADIS CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Suplente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Suplente: DR. JUAN LUIS RENDÓN GÓMEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 05 de agosto de 2011

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

**A la Facultad de Medicina, UNAM
Depto. Microbiología y Parasitología
Lab. de Inmunobioquímica de *Taenia solium***

**Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e
Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM
Proyecto IN200510 – 3**

Al Comité Tutor

Dr. Agustín Plancarte Crespo

Dr. Juan Pedro Laclette San Román

Dr. Juan Luis Rendón Gómez

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Julio César Carrero por su asesoría, correcciones y ayuda incondicional en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. José Raúl Bobes por su asesoría, observaciones y ayuda incondicional en el desarrollo de este trabajo.

A la M. en C. Patricia de la Torre por la secuenciación de la r-TscMDH y ayuda técnica en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Horacio Reyes Vivas por sus sugerencias al proyecto de investigación y por permitir el uso de equipo e instalaciones en el Laboratorio de Bioquímica Génética del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Al Dr. Sergio Enríquez Flores por su asesoría y sugerencias realizadas al proyecto de investigación.

A la Dra. Gloria Hernández Alcántara por su asesoría, enseñanza y comentarios realizados.

Al Dr. Jesús Oria Hernández por los comentarios realizados.

A la Dra. Edith González Mondragón por su asesoría, comentarios y ayuda incondicional.

A la M.V.Z Martha Adriana Bautista Hernández por su ayuda incondicional.

Al M.V.Z. José Agustín Jiménez Rodríguez por su asesoría técnica y ayuda incondicional.

A la M. en C. Alicia Ochoa Sánchez por su asesoría técnica y ayuda incondicional.

Al Biólogo José Rodrigo Romero Díaz por su ayuda incondicional.

Al Dr. Ricardo Parra Unda por sus comentarios y ayuda incondicional.

Al M.V.Z. Víctor Manuel Salgado Alfaro por su asesoría técnica y ayuda incondicional.

Dedicatorias

A la Vida...

Al Azar...

Dar ejemplo no es la principal manera de influir sobre los demás, es la única. - AE

A mi s padres, gracias por todo

La alegría de ver y entender es el más perfecto don de la naturaleza. - AE

A mis hermanos, gracias por acompañarme en esta aventura llamada vida

A mi familia, gracias por estar siempre

A mis amigos, por el toque especial que ponen

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad. -AE

A ti Javier, gracias por ser parte de mí

A mi existencia, mi niña, mi razón: Naty

AE- albert eisntein

Índice

Resumen	13
Abstract	14
1. Introducción	
1.1. Historia	15
1.2. Clasificación taxonómica	15
1.3. Ciclo Biológico y Morfología	15
1.4. Enfermedad en el hombre	17
1.5. Tratamiento farmacológico contra la cisticercosis	18
1.6. Metabolismo	19
1.6.1. Metabolismo energético en helmintos	19
1.6.2. Metabolismo en <i>Taenia solium</i>	21
1.7. Deshidrogenasas	22
1.7.1. Malato deshidrogenasa citosólica (cMDH)	22
1.8. El DNA recombinante	23
1.8.1. DNA y RNA	23
1.8.2. Gen: amplificación, aislamiento, clonación y expresión	25
1.9. Cinética enzimática	26
1.10. Inhibición enzimática	29
1.11. Fluorescencia	31
1.14. Dicroísmo Circular	34
2. Justificación	36
3. Objetivos	36
4. Material y Métodos	
4.1. Ensayo enzimático de MDH citosólica de cisticercos de <i>T. solium</i> (TscMDH)	37
4.2. Purificación de la fracción cMDH nativa de cisticercos de <i>T. solium</i>	
4.2.1. Extracción de cisticercos de <i>Taenia solium</i>	37
4.2.2. Preparación del homogenado de cisticercos (fr TscMDH)	37
4.2.3. Cromatografía líquida de intercambio iónico (CM – Sef)	38
4.2.4. Cromatografía de afinidad (Sef- Azul), elución con gradiente salino	38
4.2.5. Cromatografía de afinidad (Sef- Azul), elución con gradiente de NADH	38
4.3. Purificación de la fracción r-TscMDH	
4.3.1. Extracción de RNAs totales	38
4.3.2. Diseño de oligos para la amplificación del gene de TscMDH	40
4.3.3. RT- PCR (Transcriptasa reversa – Reacción en cadena de la polimerasa)	40

4.3.4. Extracción de cDNA, restricción y ligación para la expresión de la TscMDH	41
4.3.5. Transformación de células <i>Escherichia coli</i> (TOP 10) con el inserto TscMDH y selección de colonias positivas	41
4.3.6. Transformación de células <i>E. coli</i> (BL21) y expresión de la r-TscMDH	42
4.3.7. Cromatografía y purificación de la enzima r-TscMDH (Sef – HiTRAP – IMAC)	43
4.4. Caracterización parcial del gen de la enzima r-TscMDH	43
4.5. Estudio de dominios conservados de la secuencia proteica de r-TscMDH	43
4.6. Caracterización bioquímica	
4.6.1. Estabilidad y capacidad catalítica de TscMDH y r-TscMDH en función del pH	44
4.6.2. pH óptimo de la reacción de las enzimas TscMDH y r- TscMDH	44
4.6.3. Estabilidad de las enzimas en función de la temperatura	44
4.6.4. Determinación del peso molecular nativo y del monómero de la enzima TscMDH	44
4.6.5. Afinidad de las enzimas por sustratos homólogos al NAD	45
4.7. Caracterización cinética y estudios de inhibición	
4.7.1. Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de MM (Km), velocidad máxima de reacción (Vmax), número de recambio (kcat) y la constante de especificidad (kcat/Km).	45
4.7.2. Estudios de inhibición con la enzima TscMDH con NaAsO ₂	46
4.7.3. Estudios de inhibición por producto con la enzima TscMDH	47
4.8. Caracterización a nivel de estructura secundaria por medio del espectro de dicroísmo circular en el UV cercano.	48
4.9. Determinación de la Tm (temperatura media de desnaturalización) por medio del espectro de dicroísmo circular en el UV cercano.	48
4.10. Estudios de unión de ligando – proteína por medio de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos (λ_{295} nm) de la enzima r-TscMDH	49

5. Resultados

TscMDH nativa

5.1. Purificación de la fracción cMDH de cisticercos de <i>Taenia solium</i>	49
5.1.1. Cromatografía líquida de intercambio iónico (CM – Sef)	49
5.1.2. Cromatografía de afinidad (Sef- Azul), elución con gradiente salino	50
5.1.3. Cromatografía de afinidad (Sef- Azul), elución con gradiente de NADH	51

r-TscMDH, enzima recombinante

5.2.1. Amplificación del gene de TscMDH	52
5.2.2. Extracción de cDNA y su secuenciación	53

5.2.3. Restricción y ligación del TscMDH	53
5.2.4. Transformación de células <i>E. coli</i> TOP 10 competentes y secuenciación de pET23a – TscMDH	54
5.2.5. Expresión de la r-TscMDH	55
5.2.6. Cromatografía y purificación de la enzima r-TscMDH	56
5.3. Caracterización parcial del gen de la enzima r-TscMDH	57
5.4. Estudio de dominios conservados de la secuencia proteica de r-TscMDH	59
5.5. Caracterización bioquímica	
5.5.1. Estabilidad y capacidad catalítica de TscMDH y r-TscMDH en función del pH	61
5.5.2. pH óptimo de la reacción de las enzimas	62
5.5.3. Actividad de las enzimas en función de la temperatura	63
5.5.4. Determinación del peso molecular nativo y del monómero de la enzima TscMDH	63
5.5.5. Afinidad de las enzimas por sustratos homólogos al NAD	64
5.6. Caracterización cinética y estudios de inhibición	
5.6.1. Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de MM (Km), velocidad máxima de reacción (Vmax), número de recambio (kcat) y la constante de afinidad (kcat/Km).	65
5.6.2. Estudios de inhibición con la enzima TscMDH con NaAsO ₂	68
5.6.3. Determinación del mecanismo de reacción cinético de la enzima TscMDH	70
5.6.4. Estudios de inhibición por producto con la enzima TscMDH	76
5.7. Caracterización a nivel de estructura secundaria por medio del espectro de dicroísmo circular en el UV cercano de TscMDH y de r-TscMDH	80
5.8. Determinación de la T _m (temperatura media de desnaturalización), por medio del espectro de dicroísmo circular en el UV cercano.	82
5.9. Estudios de unión de ligando – proteína por medio de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos (λ_{295} nm) de la enzima r-TscMDH	82
6. Discusión	87
7. Conclusión	94
8. Referencias	95

Índice de Figuras

1. Ciclo biológico de <i>Taenia solium</i>	16
2. Metabolismo energético en helmintos	21
3A. Modelo de Michaelis – Menten	27
3B. Modelo de Lineweaver – Burk	27
4. Tipo de inhibición competitivo	30
5. Tipo de inhibición acompetitivo	30
6. Tipo de inhibición no competitivo	31
7. Diagrama de Jablonski	33
8. Cromatografía en CM–Sef del extracto crudo de cisticercos de <i>T. solium</i>	50
9. Cromatografía en Sef–Azul de la fracción eluída de CM–Sef	50
10. Segunda cromatografía en Sef–Azul para obtener a la TscMDH eluída con NADH	51
11. Análisis del proceso de purificación de la TscMDH en SDS–PAGE	52
12. Análisis de RNA extraído de cisticercos de <i>T. solium</i> en gel de agarosa al 0.1%	53
13A. Análisis del gen de TscMDH digerido con EcoRI y HindIII en gel de agarosa al 0.1%	54
13B. Análisis del plásmido pET23a en gel de agarosa al 0.1%	54
13C. Análisis en gel de agarosa al 0.1% del alineamiento del plásmido pET23a digerido con EcoRI y HindIII.	54
14. Análisis en gel de agarosa al 0.1% del producto de PCR de colonias de <i>E. coli</i> transformadas con el plásmido pET23a–TscMDH	54
15. Alineamiento de la secuencia genómica de cMDH	55
16. Análisis en SDS–PAGE de bacterias BL21 transformadas con pET23a–TscMDH	56
17. Cromatografía de la r-TscMDH en HiTrap – IMAC	57
18. Secuencia genómica completa de TscMDH (cDNA)	58
19. Posible región promotora del gen de TscMDH	59
20. Alineamiento, comparación y análisis de secuencias proteicas de MDHs	60
21. Predicción estructural de la TscMDH	61
22A. Estabilidad de la TscMDH en función del pH	62
22B. Estabilidad de la r-TscMDH en función del pH	62
23A. pH óptimo de reacción de la TscMDH	62
23B. pH óptimo de reacción de la r-TscMDH	62
24A. Estabilidad de la TscMDH en función de la temperatura	63
24B. Estabilidad de la r-TscMDH en función de la temperatura	63
25A. Cromatografía en Sefacril S-200 de un extracto crudo de cisticercos de <i>T. solium</i>	64
25B. Extrapolación de los valores de K_{av} de la fracción excluida de Sefacril S–200	64

26A. Determinación del peso molecular del monómero de TscMDH	64
26B. Determinación del peso molecular del monómero de r – TscMDH	64
27A. Gráfica de MM, determinación de Km y Vmax para el malato con la TscMDH	67
27B. Gráfica de LB, determinación de Km y Vmax para el malato con la TscMDH	67
28A. Gráfica de MM, determinación de Km y Vmax para el malato con la r-TscMDH	67
28B. Gráfica de LB, determinación de Km y Vmax para el malato con la r-TscMDH	67
29A. Porcentaje de inhibición residual en la actividad de TscMDH provocada por el NaAsO ₂ , reacción reducción del OAA	68
29B. Porcentaje de inhibición residual en la actividad de TscMDH provocada por el NaAsO ₂ , reacción oxidación de malato	68
30A. Gráfica de doble recíproca (LB) de la TscMDH en presencia de dos concentraciones de NaAsO ₂ , reacción reducción del OAA	69
30B. Gráfica de doble recíproca (LB) de la TscMDH en presencia de dos concentraciones de NaAsO ₂ , reacción oxidación de malato	69
31A. Ki del NaAsO ₂ en la actividad de TscMDH, intercepto en 1/Vmax; reducción del OAA	70
31B. Ki del NaAsO ₂ en la actividad de TscMDH, intercepto en 1/Km; reducción del OAA	70
31C. Ki del NaAsO ₂ en la actividad de TscMDH, intercepto en 1/Vmax; oxidación de malato	70
31D. Ki del NaAsO ₂ en la actividad de TscMDH, intercepto en 1/Km; oxidación de malato	70
32A. Mecanismo de reacción: concentraciones de OAA y de NADH empleadas.	71
32B. Mec de reacción: OAA constante (0.025 mM) vs a [NADH] variables (0.05-.05 mM)	71
33. Gráfica de Vo: OAA sustrato variable frente a NADH sustrato constante	72
34. Gráfica de Vo : NADH sustrato variable frente a OAA sustrato constante	73
35. Gráfica de LB: 1/Vo vs 1/[NADH], usando diversas concentraciones de OAA.	74
36. Gráfica LB: 1/Vo vs 1/[OAA], usando diversas concentraciones de NADH.	75
37A. Efecto de inhibición de NAD en la actividad de TscMDH; reacción oxidación de malato	77
37B. Efecto de inhibición de malato en la actividad de TscMDH; reac. oxidación de malato	77
37C. Efecto de inhibición de NADH en la actividad de TscMDH; reac. reducción del OAA	77
37D. Efecto de inhibición de OAA en la actividad de TscMDH; reac. reducción del OAA	77
38A. Gráficas de LB: [NADH] variable, en ausencia y presencia de dos concentraciones de malato. Reacción reducción de oxaloacetato	78
38a. Ki de malato: NADH sustrato variable, OAA sustrato constante	78
38B. Gráficas LB: [OAA] variable, en ausencia y presencia de dos concentraciones de malato. Reacción reducción de oxaloacetato	78
38b. Ki de malato: OAA sustrato variable, NADH sustrato constante	78
38C. Gráficas LB: [NADH] variable, en ausencia y presencia de dos concentraciones de NAD. Reacción reducción de oxaloacetato	78

38c. Ki de NAD: NADH sustrato variable, OAA sustrato constante	78
38D. Gráficas LB: [OAA] variable, en ausencia y presencia de dos concentraciones de NAD. Reacción reducción de oxaloacetato	78
38d. Ki de NAD: OAA sustrato variables, NADH sustrato constante	78
39A. Gráficas de LB: [NAD] variable, en ausencia y presencia de dos concentraciones de OAA. Reacción oxidación de malato.	79
39a. Ki de OAA: NAD sustrato variable, malato sustrato constante	79
39B. Gráficas LB: [malato] variable, en ausencia y presencia de dos concentraciones de OAA. Reacción oxidación de malato.	79
39b. Ki de OAA: malato sustrato variable, NAD sustrato constante	79
39C. Gráficas de LB: [NAD] variable, en ausencia y presencia de dos concentraciones de NADH. Reacción oxidación de malato.	79
39c. Ki de NADH: NAD sustrato variable, malato sustrato constante	79
39D. Gráficas de LB: [malato] variable, en ausencia y presencia de dos concentraciones de NADH. Reacción oxidación de malato.	79
39d. Ki de NADH: malato sustrato variable, NAD sustrato constante	79
40A. Elipticidad molar de la TscMDH vs espectro de dicroísmo circular en el UV cercano	81
40B. Elipticidad molar de la r-TscMDH vs espectro de dicroísmo circular en el UV cercano	81
41. Desnaturalización térmica de la r-TscMDH registrada en el espectro de dicroísmo circular en el UV cercano (222 nm)	82
42. Composición de residuos de aminoácidos que codifican para la TscMDH	83
43. Intensidad de fluorescencia intrínseca de la r-TscMDH por la excitación a λ 295 nm	84
44. Intensidad de fluorescencia intrínseca de la r-TscMDH, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de NADH.	84
45A. Apagamiento de la intensidad de fluorescencia intrínseca de la r-TscMDH por diferentes concentraciones de NAD	86
45B. Porcentaje de intensidad de fluorescencia vs concentración de NAD	86
45C. Apagamiento de la intensidad de fluorescencia intrínseca de la r-TscMDH por diferentes concentraciones de malato.	86
45D. Porcentaje de intensidad de fluorescencia vs concentración de malato.	86
45E. Apagamiento de la intensidad de fluorescencia intrínseca de la r-TscMDH por diferentes concentraciones de OAA.	86
45F. Porcentaje de intensidad de fluorescencia vs concentración de OAA.	86

Índice de Tablas

I. Condiciones de amplificación en el RT - PCR	41
II. Amortiguadores con diferentes rangos de pH	44
III. Concentraciones de los sustratos para determinar la K_m y V_{max}	46
IV. Concentraciones de los sustratos y de los productos para la determinación del mecanismo de inhibición por producto de la TscMDH	47
V. Purificación de la TscMDH	52
VI. Co-sustratos homólogos de NAD	65
VII. Parámetros cinéticos de la TscMDH y de la r-TscMDH	68
VIII. Mecanismos de tipo de inhibición por producto de la TscMDH	80
IX. Análisis de la estructura secundaria registrada con el espectro de dicroísmo circular en el UV cercano de la TscMDH	81

Resumen

Esta tesis describe el trabajo bioquímico, cinético y de biología molecular desarrollado para caracterizar a la enzima malato deshidrogenasa citosólica de cisticercos de *Taenia solium* (TscMDH).

La TscMDH se obtuvo a homogeneidad empleando cuatro etapas de purificación: precipitación con sulfato de amonio, cromatografías de intercambio catiónico (CM-sefarosa) y dos de afinidad (Sefarosa Azul). La forma nativa de la enzima tiene un peso molecular de 64 kDa y presenta dos subunidades cada una de 33 KDa. La enzima es parcialmente positiva con un pI = 8.1. El NaAsO₂ fue capaz de inhibir a la TscMDH en ambos sentidos de su reacción desarrollando un tipo de inhibición acompetitivo. Con la finalidad de determinar el mecanismo de reacción catalítica, se llevaron a cabo reacciones de la velocidad inicial utilizando como inhibidores a los productos de la catálisis. Los resultados preliminares indicaron que la enzima efectúa un mecanismo de reacción bi-bi ordenado en el cual solo la coenzima puede reaccionar con la enzima libre.

También se indica la secuencia completa del gen que codifica a la enzima. Esta información está de acuerdo con la que se obtiene para el único gen de MDH encontrado en la base de datos del Consorcio del genoma de *T. solium*. El fragmento del gen de TscMDH codifica para una proteína de 332 amino ácidos que presentan homología para otras MDHs publicadas de diversos organismos y en particular con la de *Echinococcus granulosus*. Adicionalmente, tanto la forma nativa como la recombinante de TscMDH mostraron características fisicoquímicas y cinéticas muy similares. También se describe la caracterización parcial de la estructura del gen de cMDH al analizar un ensamble genómico de 1.5 Kb. Este trabajo informa por primera vez de la presencia y descripción de una malato deshidrogenasa en *T. solium*.

Abstract

This thesis describes the biochemical, kinetic and molecular biology work developed for the characterization of *Taenia solium* cytosolic malate dehydrogenase (TscMDH).

The TscMDH was obtained to homogeneity through a four-step procedure involving salt fractionation, exchanged ionic and a double dye affinity chromatography. TscMDH had a native M_r of 64,000 while the corresponding value per subunit, obtained under denaturing conditions, was 32,000. It is partially positive, with 8.1 isoelectric point. Sodium arsenate, evaluated in the forward and reverse reaction resulted with values of 65.5 and 307 mM correspondingly. This classic inhibitor for MDHs could inhibit the enzyme in an uncompetitive pattern in both reaction directions. In order to determine whether the sequential reaction mechanism was conducted by the enzyme, inhibition patterns for the eight products in relationship to the forward and reverse catalytic reactions of the TscMDH were obtained. Preliminary results of the reaction mechanism of the cMDHTs were qualitatively consistent with an Ordered Bi Bi reaction mechanism, in which only the coenzymes can react with the free enzyme.

Also we report the complete coding sequence of TscMDH which is in accord with the only MDH gene found in the database of the genome of *T. solium* Consortium. The cDNA fragment encoded a protein of 332 amino acid residues with homology to other reported cMDHs and high percentage of identity for cMDH of *Echinococcus granulosus*. The physicochemical and catalytic parameters of the native and the recombinant TscMDH are very similar.

We also report here a partial characterization of TsMDH gene structure after analysis of a 1.56 Kb genomic contig assembly. This is the first report in *T. solium* about a malate dehydrogenase and its molecular characterization.

Introducción

1.1. Historia

El cestodo *Taenia solium* es un parásito del humano y del cerdo. Los primeros indicios médicos sobre su existencia se remontan al año 460 A.C. comunicados por Hipócrates (Rodríguez RR, 1962). En el primer siglo de la Era Cristiana, Plínico y Columela hacen referencia a éste parásito (Rodríguez RR, 1962). En 1550 Paranoli es el primero en describir la presencia de los metacestodos en el hombre. En 1558 Rumler y Gessner publican el primer caso de neurocisticercosis, encontrando a un metacestodo alojado en la dura madre del cerebro de un epiléptico (Nieto D., 1982).

En 1683 Redi precisó que el cisticerco era la etapa larvaria de *T. solium* (Gómez Alanís A, 1994). En el siglo XVIII Linneo clasifica a la forma larvaria como *Cisticercus cellulosae* y a la forma adulta como *Taenia solium* (Slais Jaroslava, 1970). En 1853 P. J. Van Beneden da a conocer la relación existente entre los estadios del parásito (Rodríguez RR, 1962). Vosgien, Van Beneden, Haubner, Leuckart entre otros, empezaron a obtener cisticercos de cerdos alimentados con proglótidos grávidos de *T. solium*. En 1856 Kuchenmeister comprueba y establece el ciclo biológico del parásito al darle de comer cisticercos a un condenado a muerte para corroborar la presencia del cestodo en su intestino delgado (Gómez Alanís A, 1994). En México y Latinoamérica, el cisticerco de *T. solium* fue conocido en la época de la conquista, cuando los españoles introdujeron al cerdo (Zedillo G, 1987).

1.2. Clasificación taxonómica

Subreino: *Metazoarios*, Phylum: *Plathelminthos*, Clase: *Cestoidea*, Subclase: *Cestoda*, Orden: *Cyclophyllidea*, Familia: *Taeniidae*, Género: *Taenia*

Especie: *Taenia solium* (Cheng T, 1986).

1.3. Ciclo biológico y morfología

Taenia solium es un endoparásito dioico con un ciclo de vida indirecto, presenta una etapa larvaria o cisticerco y una etapa adulta o tenia (Saiz Moreno L, 1987). Esta última se aloja en el yeyuno del ser humano (Aluja A, 1987), único hospedero (Abdussalam M, 1975) y se caracteriza por ser un gusano plano dorso-ventral de 3 – 7 m de longitud, constituido por tres principales regiones:

- a) La cabeza o escólex, el cual contiene el sistema de sujeción: cuatro ventosas y una doble corona de ganchos o róstelo.

- b) El cuello, región caracterizada por estar constituido de células germinales que promueven el continuo crecimiento de la tenia
- c) El cuerpo o estróbilo. Está formado por segmentos llamados proglótidos en diferentes estadios de maduración. Los segmentos próximos al cuello son jóvenes e inmaduros y conforme se van alejando del escólex comienzan a observarse diversas estructuras reproductoras (Cordero del Campillo, 1990). Los proglótidos terminales presentan múltiples ramas uterinas que contienen miles de huevos cada una. La tenia desprende estos proglótidos y los libera al ambiente junto con las heces del portador (Acha PN, 1986).

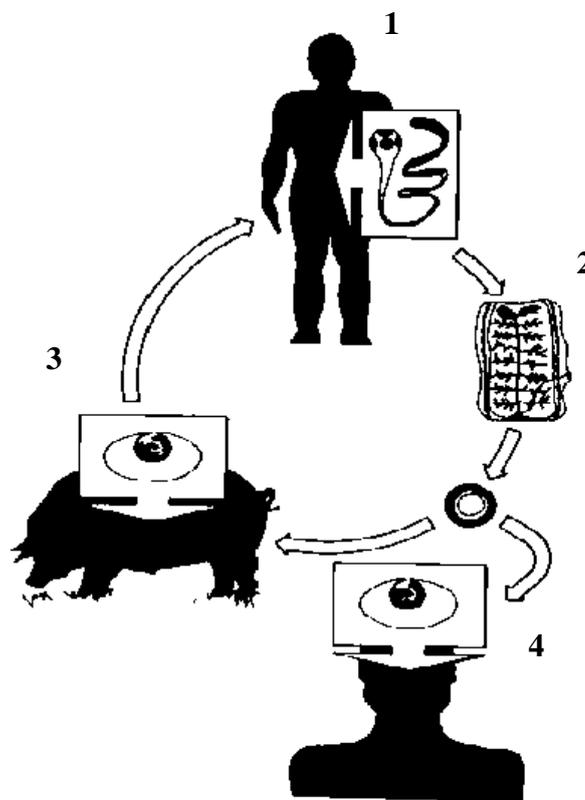


Figura 1. Ciclo biológico de *Taenia solium* (Willms K. *et al*, 2006)

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 en ellos se desarrollan en metacestodos. El ciclo se cierra cuando el hombre ingiere la carne cruda o mal cocida del cerdo parasitado. 4) El hombre puede ser hospedero accidental de la forma larvaria.

Cuando un cerdo consume heces contaminadas con proglótidos de *T. solium*, los huevos del parásito son liberados y activados en su tracto digestivo por acción de la bilis y enzimas

digestivas (Smyth JD, 1963). De esta forma se expone a la oncósfera (embrión liberado) de aproximadamente 20 X 30 µm de diámetro, la cual penetra la mucosa intestinal e ingresa al torrente sanguíneo y linfa, instalándose principalmente en las masas musculares y sistema nervioso central del animal (Sartí E, 1986). Por un proceso de vesiculización, la oncósfera se desarrolla en larva o cisticerco en un tiempo aproximado de 3 a 4 meses (Gómez Alanís A, 1994). Existen múltiples reportes de la existencia de cisticercos en casi todos los tejidos y órganos del animal (Abdussalam M, 1975; Aluja A, 1994; Flisser A, 1988), solo no se han encontrado evidencias de su presencia en el tejido óseo.

Morfológicamente los metacestodos de *T. solium* tienen una forma vesiculosa y monocefálica, de 0.5 a 2 cm de diámetro, formado por un escólex invaginado, rodeado de líquido (Saiz Moreno L, 1976). El pequeño escólex al igual que el de la tenia, está armado con una doble corona de ganchos y cuatro ventosas, se encuentra rodeado por tejido conectivo y muscular, los cuales constituyen al canal espiral y al canal de entrada, futuros formadores del cuello y estróbilo de la tenia (Slais Joroslav, 1970). La membrana que separa al metacestodos del hospedero es un tegumento citoplásmico y sincicial, presenta prolongaciones digitiformes llamadas microticas o microvilli que permiten la adsorción de los nutrientes (Ramírez-Bon, 1982).

El ciclo natural de este parásito se completa cuando el humano come la carne del cerdo infectada cruda o insuficientemente cocida. El cisticerco es activado nuevamente por sales biliares lo que provoca la evaginación del escólex (Smyth JD, 1963) y por ende la sujeción a la pared intestinal, permitiendo el crecimiento de una nueva tenia (Flisser A, 1994).

Esta parasitosis se convierte en una zoonosis de importancia cuando el humano es hospedero accidental de la forma larvaria y cuando los cisticercos se alojan en el sistema nervioso central (SNC), la enfermedad se conoce como Neurocisticercosis (NC) (Escobar A, 1983).

1.4. Enfermedad en el hombre

Los datos de prevalencia de la enfermedad se enfocan a regiones endémicas de países en vía de desarrollo de América Latina, Asia y África. Estos datos varían, por lo general; menos de 1:1 000 para la teniasis humana, del 1 al 10% para el caso de cisticercosis en humanos (no se diferencian los casos de NC) y hasta un 20 al 40% de casos de cerdos infectados; dándose esta variación de acuerdo a factores de zona (urbano o rural), método de diagnóstico (imagenología frente a serología) y factores de riesgo (antecedentes de teniasis). En otros estudios; necropsias realizadas en México, muestran una tasa del 5.1% de NC y esta parasitosis representa aproximadamente el 25% de las craneotomías, siendo la causa más

frecuente de epilepsia en pacientes neurológicos (Sciutto E, *et al.* 2000; Fleury A, *et al.* 2003; Fleury A, *et al.* 2006).

La NC es una enfermedad compleja (Fleury A, *et al.* 2010), puede presentar una gran variedad de signos y síntomas, los cuales dependen de diversos factores, tanto del individuo (genéticos, respuesta inflamatoria) como del parásito (número, localización, estadio y tipo) (Sotelo J, 1996). Entre los síntomas más frecuentes están las crisis convulsivas en un 70 % de los casos; la epilepsia de aparición tardía ha sido reportada en la India en un 58% y en México en un 50% en los pacientes (Sotelo J, 1996; OMS, 2002). En el 23% de los casos de NC existe hipertensión endocraneal, además se reportan cefaleas, trastorno mental y demencia (Flisser A, 2000). Sin embargo existen casos asintomáticos, en los cuales el diagnóstico de la enfermedad fue fortuito o los pacientes comenzaron a manifestar alguna sintomatología después de un período muy prolongado (30 años) de haberse infectado (Dixon H, 1961).

1.5. Tratamiento farmacológico contra la cisticercosis

El prazicuantel y el albendazol son dos fármacos de amplio espectro antihelmíntico y antiparasitario usados principalmente en el tratamiento contra la NC (Sotelo J, 1988).

El prazicuantel (2 ciclohexicarbonil – (1, 2, 3, 6, 7, 11b)- hexahidro 4, 11 pirazina (2, 1a) isoquinolina) fue identificado en 1972 y es un fármaco usado en humanos contra helmintos y trematodos. El mecanismo de acción observado *in vitro* refiere primero a la penetración del tegumento para llegar al tejido, provocando contracción muscular o parálisis y daño tegumental, los eventos moleculares que promueven estos cambios pueden ser elucidados por cambios en el flujo de cationes divalentes, particularmente de Ca^{+} , incrementando la permeabilidad de la membrana. Consecuentemente se han observado cambios en carbohidratos, proteínas y en el metabolismo de nucleótidos, decremento en actividades enzimáticas y cambios en las propiedades de superficie de membrana (Harnett W, 1988; Jung H, 2002).

El albendazol (metil (5-[propil tiol]-1H) ácido carbámico metil ester) pertenece a la gran familia de benzimidazoles (Sotelo J, 1988). Son fármacos que contienen sulfuro y su forma activa (al ser metabolizados) sulfóxido. Se ha observado que su mecanismo de acción se concentra en propiedades anti-mitóticas, se une a moléculas de tubulina causando inhibición en la formación de microtúbulos citoplasmáticos provocando la interrupción de los organelos y fallo en el transporte de gránulos de secreción, lisis y desintegración celular. Existe la interrupción de los procesos metabólicos en el parásito debido a la interacción directa del fármaco con las enzimas metabólicas, decayendo el ATP del parásito, de tal forma que es

incapaz de mantenerse en el hospedero (Coles GC, 1977; McKellar QA, 1990). En *Haemonchus contortus*; el tiabendazol, cabendazol y mebendazol inhiben a las enzimas succinato deshidrogenasa y fumarato reductasa (Harnett W, 1998). En *Ascaris suum*, *Fasciola hepatica* y *Moniezia expanda*, la actividad de la malato deshidrogenasa; tanto la citosólica como la mitocondrial, son inhibidas por albendazol, parabendazol, mebendazol y tiabendazol; produciendo una inhibición general en la vía glucogénica como consecuencia del decremento en las reservas energéticas (Tejeda, 1987).

1.6. Metabolismo

Es el proceso global a través del cual los sistemas vivos adquieren y utilizan la energía libre para realizar sus diversas funciones. Este proceso se realiza acoplando las reacciones exergónicas de oxidación de nutrientes a los procesos endorgónicos necesarios para recomponer enlaces químicos y construir componentes de las células como lo son las proteínas y los ácidos nucleicos.

Las vías metabólicas son una serie de reacciones enzimáticas consecutivas que generan productos específicos. Sus sustancias reactivas, intermediarios y productos se denominan metabolitos.

Las vías que componen al metabolismo se pueden clasificar en dos categorías: a) las que participan en la degradación (catabolismo) y b) las que intervienen en la biosíntesis (anabolismo). En las vías catabólicas los metabolitos complejos se degradan exergómicamente a productos más sencillos. La energía libre de estos procesos se conserva por síntesis de ATP (adenosín trifosfato) a partir de ADP (adenosín difosfato) y fosfato o por la reducción del NAD^+ a NADH (nicotinamida adenina dinucleótido). El ATP y el NADP son las principales fuentes de energía de las vías anabólicas. El metabolismo degradativo se caracteriza por su capacidad para transformar carbohidratos, lípidos y proteínas en el intermediario común, Acetil CoA, continuando con la oxidación del grupo acetilo a CO_2 y H_2O por la acción secuencial del ciclo del ácido cítrico, la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Nelson DL, 2000; Voet D, 1992).

1.6.1 Metabolismo energético en los helmintos

Los helmintos presentan un metabolismo energético complejo, llevan a cabo reacciones metabólicas tanto vía anaeróbica como aeróbica, probablemente debido a las circunstancias ambientales a que son sometidos en las diferentes etapas durante su ciclo de vida (Bryant C, 1978; Barrett J, 1984).

Los helmintos poseen un sistema de transporte de glucosa muy activo, con transportadores que son capaces de unir glucosa aún cuando esta se encuentra en muy bajas concentraciones. Luego de ser absorbida, la glucosa puede ser convertida en glucógeno que es la principal molécula de reserva o ser metabolizada directamente por la vía glucolítica hasta fosfoenolpiruvato (PEP). Este puede seguir diversos caminos: fermentación láctica o dismutación málica (Smith JD, 1989; Tielens AGM, 1994).

La fermentación láctica ocurre principalmente en la etapa adulta de los parásitos (figura 2) (Lloyd GM, 1983); en ella la glucosa es convertida en ácido láctico vía glucólisis, en un mecanismo independiente de oxígeno que da como rendimiento dos moléculas de ATP por mol de glucosa. Estos ATPs son sintetizados a nivel de la fosfoglicerato quinasa y piruvato quinasa (PK), siendo el producto final el lactato que es excretado por el parásito (Tielens AGM, 1994).

La dismutación del malato es una alternativa metabólica en los helmintos (figura 2). Hasta el momento se ha observado que la gran mayoría de estos parásitos presentan un ciclo de los ácidos tricarbóxicos incompleto por la ausencia o poca actividad de la citrato sintasa (CS) o la isocitrato deshidrogenasa; sin embargo, se ha reportado que la malato deshidrogenasa (MDH), la fumarasa (FM) y la fumarato reductasa (FRD), catalizan reacciones que revierten parte del ciclo de Krebs y están involucradas en la dismutación del malato, el cual involucra la formación de oxaloacetato a partir de PEP, reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). Este es posteriormente convertido en malato por la malato deshidrogenasa citosólica (MDHc). Este malato producido en el citosol entra a la mitocondria para continuar degradándose. En lugar de una oxidación seguida por una reducción, como ocurre en la producción de lactato para mantener el balance redox, en este caso el sustrato se divide en dos vías: una parte del malato es reducido a succinato mientras que la otra es oxidada a acetato.

La oxidación del malato ocurre en dos pasos, primero a piruvato, catalizada por la enzima málica (ME), y luego a acetato por el complejo piruvato deshidrogenasa (CPD) junto con un ciclo succinato/succinil-CoA.

La reducción de malato a succinato ocurre también en dos pasos que revierten parte del ciclo de Krebs, utilizando la fumarasa y la fumarato reductasa. Adicionalmente, en la oxidación del malato se obtienen dos moléculas de NADH, mientras que cuando se reduce, se obtienen solo una de NAD, manteniendo el balance redox.

En el proceso de dismutación málica, los helmintos obtienen una producción neta de 3.7 moles de ATP por mol de glucosa, cuando el producto final es acetato ó 5.4 moles si se

produce succinato y propionato, mientras que en la fermentación láctica solo 2 moles de ATP, entonces la primer vía (dismutación málica) confiere una mayor ventaja fisiológica a los helmintos parásitos (Barrett J, 1984; Smith JD, 1989; Tielens AGM, 1994).

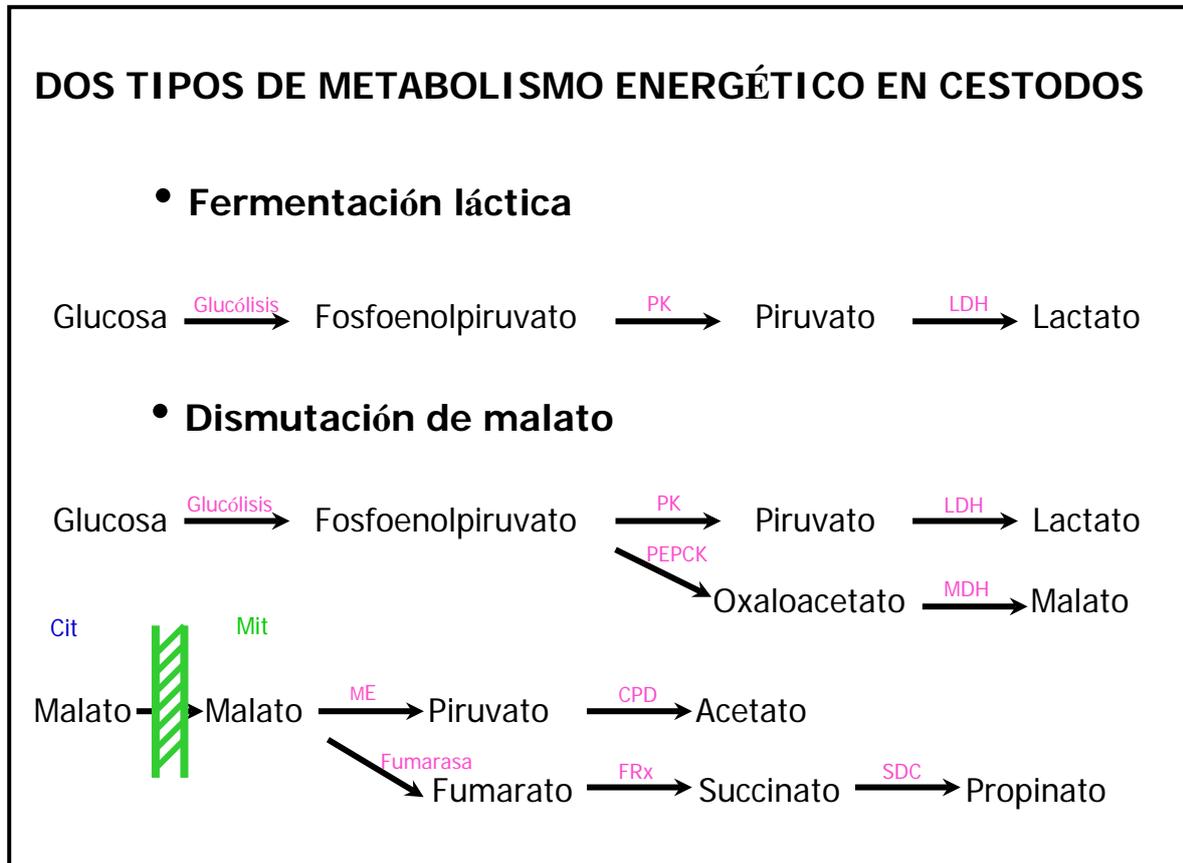


Figura 2. Metabolismo energético en helmintos: probables vías anaerobias. Tomado de Barrett J, 1984.

1.6.2. Metabolismo en *Taenia solium*

Existen pocos estudios relacionados con la adquisición de nutrientes y metabolismo en *Taenia solium*. En 1998 el grupo de Laclette (Rodríguez–Contreras, *et al.* 1998) describe dos transportadores de glucosa (TGTP 1 y TGTP 2), apoyando la idea de que el parásito tanto en estado adulto como en su fase larvaria introduce glucosa del hospedero y posiblemente esta glucosa podría ser oxidada a hasta piruvato en la vía de glucólisis. Por otro lado, Jiménez *et al* identifica y clona a la triosa fosfato isomerasa (TPI) de cisticercos de *T. solium* (Jiménez L, 2000), la cual es la enzima de la glucólisis encargada de la inter-conversión entre dihidroxiacetona fosfato a gliceraldehído 3 fosfato, siendo el punto donde se generan 2 moléculas de gliceraldehído 3 fosfato, las cuales permiten obtener una ganancia neta de 2

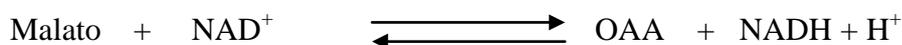
ATP's por molécula de glucosa. Esta vía se relaciona directamente con la gluconeogénesis, la síntesis de ácidos grasos y la vía de las pentosas fosfato (PPP). Esta última vía representa una alternativa en la oxidación de la glucosa celular, siendo sus productos más importantes la ribosa 5 fosfato y el NADPH, los cuales son esenciales para la sobrevivencia de la célula y tienen papeles importantes en la biosíntesis de lípidos y nucleótidos, así como la regulación del estado redox. Esta serie de evidencias apoyan la observación de que el parásito al absorber la glucosa del hospedero cuenta con la herramienta enzimática para su oxidación hasta fosfoenolpiruvato (PEP) y piruvato el cual es convertido a lactato, sin embargo el PEP también puede ser transformado a oxaloacetato por la enzima fosfoenolpiruvato carboxicina (PEPCK) y la enzima malato deshidrogenasa citosólica (cMDH) producir malato y continuar con la vía de dismutación del malato ya antes mencionada.

1.7. Deshidrogenasas

Las deshidrogenasas son una familia de enzimas que catalizan reacciones de oxido-reducción dependientes de $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$. Algunos ejemplos son la lactato deshidrogenasa (LDH), la alcohol deshidrogenasa (ADH), la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la malato deshidrogenasa (MDH). Sin embargo; entre las LDH's y las MDH's, existe homología con una identidad significativa a nivel de estructura primaria, reflejándose a su vez en la estructura tridimensional de las subunidades (Branden C, 1991).

1.7.1. Malato deshidrogenasa citosólica (cMDH)

Las cMDH (E.C.1.1.1.37) catalizan tanto la conversión del oxaloacetato a malato como la reacción inversa oxidando al NADH y reduciendo al NAD^+ respectivamente.



Su constante de equilibrio fue descrita por Williamson *et al* en 1967:

$$\frac{[\text{Oxaloacetato}^{2-}] [\text{NADH}]}{[\text{malato}^{2-}] [\text{NAD}^+]} = 2.78 \times 10^{-5}$$

El monómero de esta enzima pesa de 30 a 35 kDa y generalmente se organiza en dímeros o tetrameros, cada subunidad es catalíticamente independiente; sin embargo, la forma activa de la enzima es en estado de dímero. El sitio activo de las MDHs semeja una “vacuola

hidrofóbica”, la cual contiene sitios de unión para el sustrato (OAA/ Malato) y para el anillo del NADH/NAD⁺ (Goward CR, 1994).

Las MDH son enzimas que juegan un papel regulador tanto en la respiración aeróbica y anaeróbica. Forman parte del metabolismo intermediario (MI) de múltiples organismos, incluyendo los cestodos (Agüero F, 1995). La importancia de esta enzima estriba en la necesidad de mantener altos niveles de energía para la sobrevivencia del parásito (Fukumoto S, 1985); además, cataliza la interconversión de malato a oxaloacetato y este último juega un papel crucial en muchas vías metabólicas: participa en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, en el enlace con el glioxilato, en la síntesis de los aminoácidos, la gluconeogénesis, el mantenimiento en el equilibrio oxido-reductor (Saz, 1969; Saz, 1972; Sánchez-Moreno, 1987) y la facilitación del intercambio de metabolitos entre el citoplasma y organelos (Banaszak L, 1970; Zheng N, 2005). Las MDH citosólicas, a diferencia de las mitocondriales, presentan mayor afinidad por el oxaloacetato que por el malato, es decir catalizan con mayor eficacia la producción del malato el cual es transportado al interior de las mitocondrias y es utilizado como se mencionó anteriormente favoreciendo la producción de ATP por la reducción de dinucleótidos y flavinas (Minárik P, 2002).

1.8. El DNA recombinante

Para comprender el ácido desoxirribonucleico (DNA) recombinante es necesario remontarse a los primeros estudios de biología molecular que incluyen el descubrimiento de la doble hélice de DNA por Watson y Crick en 1953; iniciándose el estudio intensivo de los mecanismos moleculares que permiten la duplicación, reparación, recombinación y transposición del DNA. El descubrimiento del código genético por Francis Crick marcó un punto crucial en el entendimiento de la síntesis de proteínas. El hallazgo de las enzimas de restricción permitió el nacimiento de la ingeniería genética. Sin embargo, el estudio del DNA recombinante se vio revolucionado con la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) gracias a su practicidad y rapidez para amplificar una región de DNA en cantidad suficiente para luego realizar todo tipo de análisis (Watson JD, *et al.* 1998).

1.8.1. DNA y RNA

En el DNA de las células de un organismo se encuentra toda la información que lo define. La molécula del DNA es un polímero que se forma por enlaces covalentes de miles de desoxinucleótidos; éste último, es la unidad estructural del DNA y el cual contiene un ácido fosfórico, un azúcar de cinco átomos de carbono o pentosa y una base nitrogenada. El DNA

tiene 4 bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Su estructura secundaria es una hélice de giro a la derecha formado por dos hebras de polidesoxinucleótidos orientados en sentido antiparalelo (Ramírez SJ, Gómez EC, 2003). Un gen es una unidad de información genética, el cual contiene la información para la síntesis de una molécula de ácido ribonucleico (RNA). El RNA es una macromolécula polinucleotídica de una sola cadena constituida por bases nucleotídicas que son del tipo de la adenina, citosina, guanina y uracilo (U), así como azúcar ribosa. Se han identificado tres clases fundamentales de RNA, el RNA mensajero (mRNA), el cual representa de 3 a 5% del RNA total celular, el RNA de transferencia (tRNA) con una abundancia del 5 al 7% y el RNA ribosomal (rRNA) cuyo porcentaje de RNA total celular oscila entre el 85 al 90%. Los RNA son resultado de la copia o transcripción de un DNA genómico, esta copia es mediada en sistemas procariontes por la acción de la enzima RNA polimerasa, en tanto que en sistemas eucariontes participan tres tipos de RNA polimerasas, las cuales catalizan la síntesis de cada uno de los RNA: polimerasa I, síntesis del pre-rRNA; polimerasa II, síntesis del pre-mRNA y polimerasa III, síntesis del pre-tRNA. Las RNA polimerasas están constituidas por dos regiones: la región funcional de la enzima (sitio activo), constituido por 4 subunidades, dos del tipo α , una β y una β' ; y la otra región es denominada factor σ , el cual es un factor proteico de una sola subunidad que se une al DNA en aproximadamente 50 a 80 nucleótidos, localizados tanto hacia la izquierda como a la derecha del sitio de iniciación (Cortés HJ, 2003).

La información para la secuencia de aminoácidos de una proteína esta codificada en el mRNA, en unidades independientes de tres bases llamadas codones. La combinación de 4 letras: A, T, C y G en el DNA o A, U, C y G en el RNA, en unidades de tres, pueden generar 64 codones (4^3); éstos codones y su significado forman el código genético. Una proteína está formada por la combinación de alrededor de 20 aminoácidos diferentes, por lo que varios codones pueden codificar para un mismo aminoácido; sin embargo tres de los 64 codones, no codifican para un aminoácido, sino que funcionan como señal de terminación en la síntesis de proteínas (Ramírez SJ, Gómez EC, 2003).

La organización del DNA genómico incluye secuencias específicas denominadas promotores, sitios de iniciación, motivos, sitios de amplificación, secuencias específicas de transcripción tanto hacia la izquierda como a la derecha del sitio de iniciación; así como sitios de terminación en la transcripción. En células eucariontes, las RNA polimerasas I, II y III transcriben los diferentes grupos de genes. Los genes de cada uno de estos grupos tienen, en su región promotora, al menos dos elementos: los elementos que constituyen el promotor basal y los elementos moduladores o proximales del promotor. Los primeros son necesarios y

suficientes para determinar la especificidad de una de las RNA polimerasas, son en un inicio reconocidos por un grupo específico de factores de transcripción. Por su parte, los elementos moduladores incrementan o reducen los niveles basales de transcripción de manera específica. La RNA polimerasa II transcribe la gran mayoría de los genes que codifican para proteínas celulares; esta enzima es capaz de catalizar la síntesis de RNA, pero es incapaz por sí sola de inducir de manera específica la transcripción de un gen. Son factores accesorios o factores de transcripción también llamados TF, de los cuáles se han definido TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH; los que en conjunto con la RNA polimerasa II, le dan la posibilidad de reconocer e iniciar de manera específica la transcripción de un gen.

Los promotores para mRNA se dividen en dos subgrupos generales: los que tiene la caja TATA y los que no la tienen. El promotor más estudiado es la caja TATA, la cual se localiza entre el -25 y -30 pb y una evidencia relacionada con su importancia es la unión de TFIID a esta secuencia. La transcripción de promotores de mRNA que no tiene caja TATA dependen básicamente del elemento Inr (*initiator sequence*) o secuencia de inicio (Recillas TF, Zurita ME, 2003).

1.8.2. Gen: amplificación, aislamiento, clonación y expresión.

Como se mencionó anteriormente un gen se define como una unidad de información genética que contiene la información para la síntesis de una molécula de RNA. Mediante la técnica de PCR es posible producir una gran cantidad de copias de una secuencia específica de DNA o un gen. Ésta técnica explota algunas características de la replicación del DNA: la DNA polimerasa usa una pequeña cantidad de DNA (el cual puede ser de cadena sencilla) como templado para la síntesis de una nueva cadena complementaria. No es necesario aislar la secuencia a amplificar debido a que la reacción es precisa al diseñar secuencias específicas y complementarias (oligos o iniciadores) al fragmento de DNA de interés. Un factor clave en la especificidad del PCR es la temperatura, la cual depende de la secuencia a amplificar. Esta técnica permite obtener cantidad suficiente para cualquier tipo de análisis, incluyendo su purificación mediante resinas de agarosa con afinidad para el DNA y su secuenciación.

Una vez que se ha amplificado y purificado el gen, éste es introducido a un vector de clonación. Los tipos de vectores de clonación utilizados en *Escherichia coli* son: a) Plásmidos, son moléculas de DNA circular que se encuentran en bacterias y algunas levaduras, adoptan una conformación de doble hélice, presentan un gen de resistencia a antibióticos y una secuencia específica donde comienza la replicación, conocida como ORI, habilitando al DNA a ser duplicado independientemente del DNA cromosomal. b)

Bacteriófago; son virus que infectan exclusivamente a bacterias, están constituidos por una cubierta proteica o cápside en cuyo interior está contenido su material genético junto con el inserto de interés, que puede ser DNA o RNA de simple o doble cadena, circular o lineal. Su importancia radica en que algunos fagos presentan un ciclo lisogénico; es decir, el genoma del fago puede integrarse en el DNA cromosómico de la bacteria hospedadora, replicándose al mismo tiempo que lo hace la bacteria; o bien puede mantenerse estable en forma de plásmido, replicándose de forma independiente a la replicación bacteriana. En cualquier caso, el genoma del fago se transmite a toda la progenie de la bacteria originalmente infectada y c) Cósmidos, son vectores híbridos, tienen la secuencia *cos* del fago lambda (extremos complementarios del genoma del fago que se emplean para la recircularización del mismo), la cual es necesaria para el empaquetamiento del DNA del fago dentro de su cubierta proteica y contienen las secuencias de los plásmidos necesarias para la replicación y los genes de resistencia a antibióticos.

El gen clonado puede ser expresado como una proteína recombinante, en bacterias *E. coli*, cuya ventaja además de la facilidad de almacenamiento y crecimiento, es el conocimiento de su genoma; sin embargo, el mayor problema que presenta la producción de proteínas recombinantes en bacterias, es que en ellas no existe glicosilación proteica, por lo que algunas proteínas expresadas por este método pierden totalmente su función. Otro sistema de expresión es el usado mediante levaduras, las cuales además de tener un alto rendimiento, estabilidad de la cepa productora, crecimiento a alta densidad, productividad y crecimiento en medios baratos; son capaces de glicosilar y de plegar proteínas complejas, incluyendo aquellas que tienen un número elevado de puentes disulfuro; sin embargo su sistema de glicosilación proteica es distinta a la humana. El patrón de glicosilación de un determinado polipéptido es específico de especie, tejido y célula.

La proteína recombinante es purificada mediante la lisis de la célula de expresión, su solubilización y cromatografías de afinidad (Watson JD, *et al.* 1998).

1.9. Cinética enzimática

La cinética enzimática permite conocer las diversas características de una enzima. Esta información es fundamental para poder describir su mecanismo de reacción, especificidad por el sustrato o sustratos, incluyendo las diversas etapas y las secuencias de las mismas (Segel I, 1975). También nos informa sobre la influencia que tienen sobre la enzima diversas condiciones experimentales. Así es factible apreciar la estabilidad de la enzima frente a cambios de temperatura, pH y fuerza iónica. Se pueden tener características de regulación

enzimáticas al emplear sustancias inhibitorias, además de adquirir información sobre su estructura molecular. La cinética enzimática nos permite determinar los parámetros catalíticos de una enzima, como la constante de Michaelis (K_m), velocidad máxima de reacción (V_{max}), constante de inhibición (K_i), que son datos numéricos que facilitan las comparaciones entre enzimas (Segel I, 1975; Voet D, 1992; Nelson DL, 2000).

La actividad de algunas enzimas depende de uno o más componentes no proteicos llamados cofactores, los cuales pueden ser iones metálicos (Zn, Mg, K, etc.) o moléculas orgánicas llamadas coenzimas.

Los principios generales de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas. En condiciones biológicas, las reacciones no catalizadas tienden a ser más lentas. Las enzimas proporcionan un ambiente específico dentro del cual una reacción determinada transcurre a mayor velocidad; un factor clave que afecta la velocidad de una reacción es la concentración de sustrato presente [S]. Se puede medir la velocidad inicial de una reacción (V_o) cuando la [S] es mucho mayor que la concentración de enzima [E]. La velocidad de reacción depende de la cantidad de enzima en complejo con su sustrato. A concentraciones bajas de sustrato, la V_o es casi proporcional a la concentración del sustrato; a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial de la reacción deja de ser proporcional a la concentración de sustrato. A muy altas concentraciones del sustrato, la velocidad de la reacción llega a ser independiente de dicha concentración y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante (figura 3A).

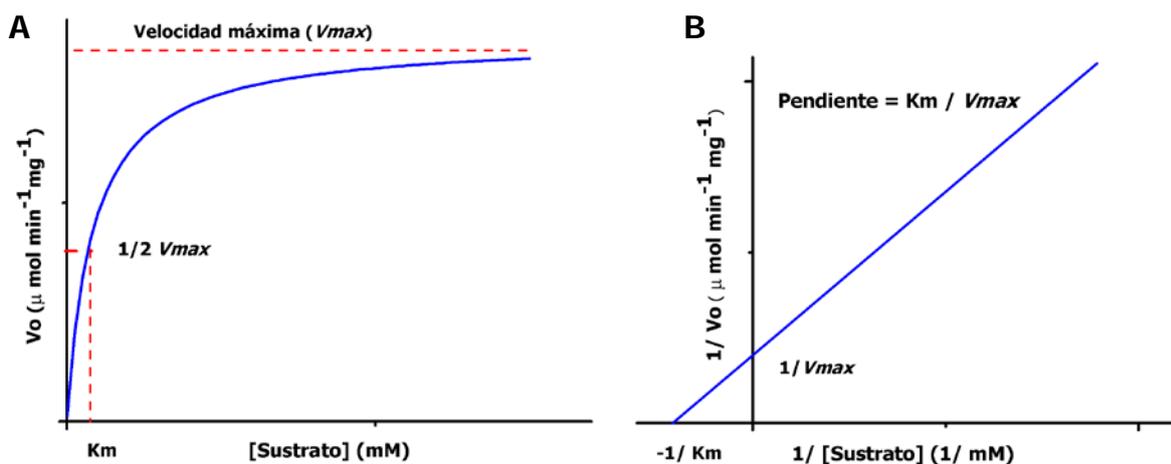


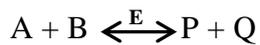
Figura 3. A) Modelo de Michaelis – Menten, efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente. B) Modelo de Lineweaver – Burk, doble recíproca.

Esta forma de saturación permitió formular la hipótesis de que la enzima y el sustrato reaccionan reversiblemente para formar un complejo, ES.

La teoría de Michaelis –Menten (MM), supone que la enzima (E) se combina con el sustrato (S), formando el complejo ES, el cual se disocia dando lugar a enzima libre y producto P, siendo todos estos pasos reversibles.



Muchas enzimas catalizan reacciones con dos sustratos que se influyen mutuamente, el análisis cinético de estas reacciones se simboliza por la ecuación



Donde pueden existir varios complejos enzima ya sea con los sustratos o los productos (EA, EB, EP, EQ, EAB, EPQ, EAQ y EPB). La determinación de K_m y V_{max} es semejante al sistema utilizado en las reacciones con un solo sustrato, manteniendo uno de los sustrato a concentración constante y saturante (B), mientras que el otro sustrato (A) se emplea a concentraciones variables para determinar su efecto sobre la velocidad inicial de la reacción y obtener así la constante de Michaelis – Menten (MM) para el sustrato (A).

La constante MM es una magnitud cuantificable experimentalmente y definida operativamente, siendo la concentración del sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima. Para una enzima particular, constituye una característica útil en la determinación cuantitativa de la actividad enzimática en los tejidos y la purificación de la enzima. La velocidad máxima es un parámetro de utilidad para el análisis de algunos mecanismos de regulación enzimática.

Si se parte de la ecuación de Michaelis – Menten, la ecuación de la velocidad $V = V_{max} [S] / K_m + [S]$, se deriva una relación numérica importante en el caso especial en que la velocidad inicial de reacción sea exactamente la mitad de la velocidad máxima, es decir cuando $V_0 = \frac{1}{2} V_{max}$, se tiene $V_{max}/2 = V_{max} [S] / K_m + [S]$, que al ser dividido por V_{max} se obtiene $\frac{1}{2} = [S] / K_m + [S]$, que al transformarse da $K_m = [S]$.

Existen factores físicos y químicos que afectan a la actividad de las enzimas, entre ellos el pH y la temperatura. La mayoría de las enzimas presentan un pH característico al cual su actividad es máxima. Esta relación depende del comportamiento ácido–base de la enzima y del sustrato. El pH óptimo de catálisis de una enzima no es necesariamente idéntico al pH de su entorno intracelular, sugiriendo que la relación pH–actividad de una enzima puede constituir un factor en el control intracelular de su actividad.

La temperatura, al igual que en las reacciones químicas, aumenta la velocidad de la reacción dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activa. La forma que

presenta la dependencia de la actividad enzimática respecto de la temperatura es la resultante de dos procesos: 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura y 2) el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica de la enzima al sobrepasar una temperatura crítica (Segel I, 1975; Voet D, 1992; Nelson DL, 2000).

1.10. Inhibición enzimática

El efecto de un inhibidor enzimático es disminuir la velocidad de la reacción catalítica al unirse a la enzima. El estudio de la acción de los inhibidores ha permitido dilucidar el mecanismo y los caminos de la catálisis enzimática, así como la naturaleza de los grupos funcionales en el sitio activo y la participación de ciertos grupos funcionales en el mantenimiento de la conformación activa de la enzima.

Existen diferentes tipos de inhibición:

1. Inhibición irreversible.

El inhibidor se une a la enzima por enlaces covalentes y provoca una modificación química a sus grupos catalíticos.

2. Inhibición reversible.

La unión del inhibidor con la enzima es reversible, al quitar el inhibidor del medio se recupera la actividad. Los tipos de inhibición de esta clase son:

- Competitiva. El inhibidor se une a la enzima de tal manera que interfiere con la unión del sustrato normal. Un inhibidor competitivo reacciona reversiblemente con la enzima para formar un complejo enzima –inhibidor (EI) análogo al complejo enzima –sustrato.



La molécula del inhibidor no resulta químicamente alterada por la enzima.

Se puede definir la *constante del inhibidor* K_i , como la constante de disociación del complejo enzima –inhibidor:

$$K_i = [E] \cdot [I] / [EI]$$

Para atenuar la inhibición competitiva (y aumentar la velocidad) se incrementa la concentración del sustrato, que lo desplazará. La V_{max} no se afecta porque $V_{max} = K_{CAT} [E_T]$, aunque se necesita una concentración de sustrato más alta que en ausencia del inhibidor para obtener dicho valor. Cinéticamente se puede distinguir el tipo de inhibidor. La K_m determina la afinidad de la enzima por el sustrato (concentración de enzima y velocidad constantes). Un inhibidor competitivo actúa bajando la afinidad, por lo tanto la K_m será mayor. Un inhibidor competitivo se caracteriza por no afectar el valor de V_{max} , por lo tanto no interfiere con la velocidad de ruptura del complejo enzima –sustrato (figura 4).

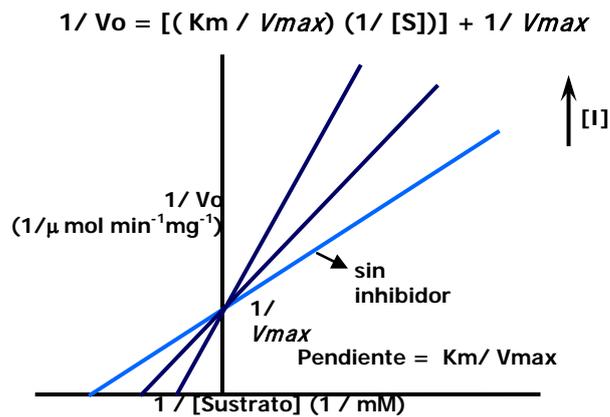


Figura 4. Tipo de inhibición competitiva. El inhibidor compite por el sitio activo del enzima, modificando la K_m pero no la V_{max} . Gráfica de doble recíproca.

- Inhibición acompetitiva. El inhibidor no se combina directamente con la enzima libre, ni afecta su reacción con el sustrato. El inhibidor se combina con el complejo ES para formar un complejo inactivo ESI, provocando que no exista la transformación hacia los productos $ES + I \rightleftharpoons ESI$, disminuyendo la velocidad de reacción. El inhibidor no se une al centro activo si no a cualquier otro sitio, lo que hace que cambie la conformación y la enzima ya no sea tan efectiva, su K_i es: $K_i = [ES][I]/[ESI]$

El grado de inhibición aumenta cuando la concentración del sustrato aumenta. En este caso no se puede superar la inhibición aumentando la concentración de sustrato (figura 5).

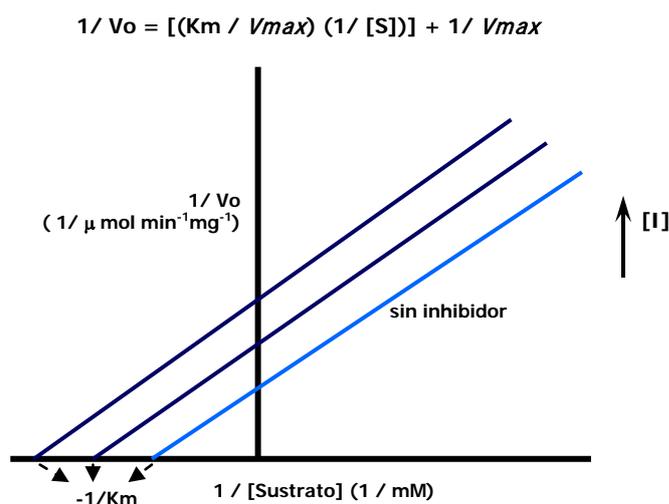


Figura 5. Tipo de inhibición acompetitiva. El inhibidor no compite por el sitio activo del enzima, se une al complejo ES y modifica tanto la K_m como la V_{max} . Gráfica de doble recíproca.

- Inhibición no competitiva. Los inhibidores no competitivos se unen en un lugar del enzima, distinto del sitio activo. Esto origina un cambio conformacional en la estructura de la enzima y evita la formación del complejo ES a su velocidad normal y que una vez formado no se descomponga a su velocidad habitual para liberar los productos de reacción. Sus efectos no se anulan al aumentar la concentración del sustrato. En este tipo de inhibición, la reacción con el inhibidor produce dos formas inactivas de la enzima: EI y ESI. Por lo tanto existen dos constantes del inhibidor (Segel I, 1975; Voet D, 1992; Nelson DL, 2000).

$K^{EI}_i = [E][I]/[EI]$ y $K^{ESI}_i = [ES][I]/[ESI]$ (figura 6).

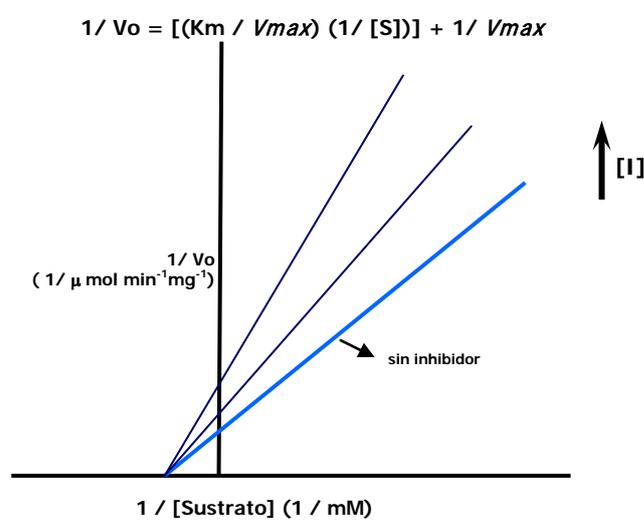


Figura 6. Tipo de inhibición no competitivo. El inhibidor se une a un sitio distinto del activo, provocando un cambio conformacional en la estructura de la enzima, evitando la formación del complejo ES, no modifica la K_m pero si la V_{max} . Gráfica de doble recíproca.

1.11. Fluorescencia

La fluorescencia y la fosforescencia son dos manifestaciones diferentes de la fotoluminiscencia, la cual ocurre cuando una especie química es excitada por medio de radiaciones electromagnéticas y al regresar a su estado basal pierde la energía adquirida. Esto es porque la especie química regresa a su estado basal liberando la energía adquirida, parte en forma de choques moleculares o parte en forma de radiación.

La fluorescencia y la fosforescencia difieren entre sí en el mecanismo a través del cual son producidos, además del tiempo de duración en cada uno de estos fenómenos; la fluorescencia cesa casi inmediatamente después de que la muestra se le suspende la radiación ($<10^{-6}$ seg), mientras que la fosforescencia puede durar varios segundos o minutos en iguales circunstancias. Ambas técnicas son muy útiles en el estudio teórico de la estructura química, enlaces moleculares, configuración electrónica en las moléculas, niveles de energía en teoría

de orbitales moleculares, etc.; en química analítica la aplicación de estos fenómenos está restringida a la fluorimetría, que consiste en la cuantificación de la radiación emitida por fluorescencia de una especie química que posee estas características y que es directamente proporcional a su concentración.

La fosforescencia presenta una sensibilidad con límites de detección que son a menudo tres órdenes de magnitud más pequeños que los encontrados en espectroscopia de absorción.

Los estados excitados tienen lugar cuando se forma un enlace entre dos átomos en una molécula, los orbitales atómicos de cada uno de los átomos que forman el enlace generan dos orbitales: uno enlazante de baja energía y otro antienlazante de energía mucho mayor. Cuando la molécula no está excitada, los electrones que forman un enlace específico se encuentran ocupando los orbitales enlazantes, debido a que estos son de energía menor y por lo tanto de esta manera la molécula es más estable.

Asociados a cada nivel electrónico se encuentran diferentes niveles vibracionales, por lo que cuando una molécula es irradiada con energía de cierta frecuencia o longitud de onda esta puede pasar a diferentes niveles vibracionales de alguno de los estados excitados S_0 y S_1 (Figura 7).

Existe una relación entre fluorescencia y concentración, la cual es directamente proporcional; a mayor concentración mayor fluorescencia y viceversa, por lo que una gráfica de intensidad de fluorescencia contra concentración es una línea recta.

La intensidad de la fluorescencia es afectada por los siguientes factores:

a) Estructura: La fluorescencia se presenta más comúnmente y en forma más intensa con compuestos que tienen grupos funcionales aromáticos con bajas energías de transición $\pi \rightarrow \pi^*$. Compuestos que tienen estructuras de carbonilos alifáticos y alicíclicos o de dobles enlaces conjugados con un alto grado de estabilidad de resonancia también pueden presentar fluorescencia, pero el número de estos es relativamente pequeño comparado con el número de sistemas aromáticos fluorescentes.

La sustitución del grupo funcional en el anillo de benceno cambia la longitud de onda de máxima absorción de la fluorescencia en relación al mismo compuesto no sustituido. Este cambio se observa tanto en la posición como en la intensidad de la línea de máxima emisión de la fluorescencia.

b) Temperatura y naturaleza del solvente: El efecto de un aumento en la temperatura incrementa el número de choques moleculares, por lo que la desactivación tiende a efectuarse a través de procesos no radiativos y por lo tanto se inhibe la fluorescencia. La viscosidad del

solvente tiene efectos contrarios, a mayor viscosidad menor número de choques moleculares y mayor intensidad de fluorescencia.

c) Efecto del pH: Debido a las diferentes formas químicas que son posibles de existir en las moléculas a diferentes condiciones de pHs, la intensidad de fluorescencia también es afectada por este factor.

d) Efecto del oxígeno disuelto: Debido al paramagnetismo de la molécula de oxígeno, esta tiende a desactivar cualquier estado activado por oxidación fotoquímica de la especie fotoluminiscente, provoca cruzamiento, intersistemas y conversiones de las moléculas excitadas al estado triplete por lo que es deseable que el oxígeno no se encuentre presente en solución o su concentración sea mínima.

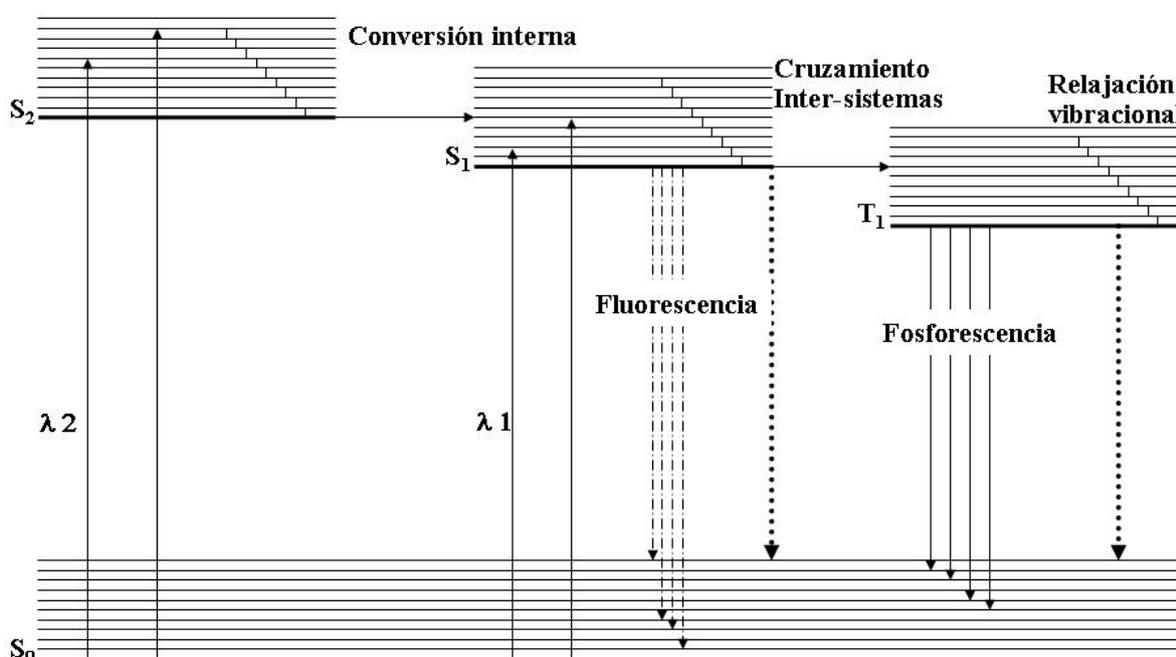


Figura 7. Diagrama de Jablonski (Skood DA, *et al.* 2000.)

La figura 7 representa al diagrama de Jablonski. En él se muestran los diferentes niveles de energía presentes para una hipotética molécula fotoluminiscente. La línea horizontal S_0 representa la energía del estado basal de la molécula, la cual normalmente es un estado singulete, en este nivel electrónico al igual que en los otros estados excitados se encuentran asociados varios niveles vibracionales de la molécula. A temperatura ambiente la energía electrónica de prácticamente todas las moléculas es S_0 . Las dos líneas horizontales de la izquierda del diagrama representan a S_1 y S_2 respectivamente, primero y segundo estado singulete excitado. La línea horizontal de la derecha T_1 corresponde al primer estado triplete

excitado. Hay que señalar que el estado triplete es menos energético que el correspondiente estado excitado singulete.

La excitación de esta molécula puede tener lugar por absorción de dos bandas de radiación, una centrada alrededor de la longitud de onda λ_1 ($S_0 \rightarrow S_1$) y la segunda alrededor de la longitud de onda más corta λ_2 ($S_0 \rightarrow S_2$). El paso directo de la molécula de un estado singulete basal S_0 a un triplete excitado T_1 no ocurre debido a que ciertas transiciones están prohibidas por las Leyes cuánticas, pero es posible tener la molécula en un triplete excitado a través de una transición indirecta (Campbell ID, 1984; Lakowick JR, 1999; Sharma A, 1999).

1.12. Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular (CD) es un método de espectroscopia de absorción; que depende, en el hecho de que algunas moléculas interactúan de forma diferente a derecha e izquierda en un plano de luz circularmente polarizada (Woody RW, 1995).

Un rayo de luz polarizada en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud; al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente actúa de un modo diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce al desfaseamiento y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados a la luz. Estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse.

La rotación del plano y la diferencia de absorción de los componentes circularmente polarizados (dicroísmo circular) varían de acuerdo con la longitud de onda. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones de UV (luz ultravioleta) cercano de 250 a 350 nm y lejano de 180 nm a 250 nm, de la radiación electromagnética. En la región del UV cercano los cromóforos más importantes en proteínas son los grupos aromáticos de las cadenas laterales del triptófano, tirosina y fenilalanina, ya que la asimetría en estos grupos químicos se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Además las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios de conformación.

Los espectros de dicroísmo circular (DC) en la región de UV lejano, se debe principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos

cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína; por lo cual, las señales de DC se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, el porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (α -hélice y estructura β).

El fenómeno de DC es muy sensible a la estructura de polipéptidos y proteínas, se observa cuando la materia ópticamente activa absorbe de forma diferente luz circularmente polarizada hacia la izquierda y derecha.

Un polarímetro, básicamente presenta una lámpara que emite radiación, la cual llega a un monocromador y permite que el paso de radiación sea de una determinada longitud de onda (λ). Posteriormente pasa a través de un prisma que polariza los rayos en dos planos. Al llegar éstos al modulador, se retardará la fase de uno de los componentes de la radiación originando con ello la polarización circular hacia izquierda y derecha de la luz incidente. Una vez que se ha logrado tener al haz luminoso en estas condiciones, se hace pasar a través de la muestra, la cual debido a sus características ópticas absorberá una determinada cantidad de luz. La luz que no sea absorbida por la muestra será cuantificada al llegar al detector, que por medio de una serie de instrumentos electrónicos arrojará un valor numérico: la elipticidad (θ).

La elipticidad es el fenómeno de DC y está definido como la cotangente del cociente del eje menor al eje mayor de la elipse:

$$\theta = \cot [E_R/E_L]$$

Este parámetro mostrará valores específicos dependiendo de las características estructurales que posee la muestra en función del pH, temperatura, grado de desnaturalización, pureza, etc. Dependiendo del equipo de DC, los datos son registrados como la diferencia de la luz circularmente polarizada hacia la derecha e izquierda y esta diferencia a su vez se relaciona con el coeficiente de extinción (ϵ) por la Ley de Lambert y Beer:

$$\Delta = \epsilon bc \rightarrow \epsilon = A / b * c$$

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = A_L - A_R / b * c$$

Donde A_L , A_R = absorbancia de los vectores izquierdo y derecho (adimensional)

c = concentración de la muestra ópticamente activa (mol/L)

$b = d$ = longitud de recorrido óptico (cm)

$\Delta\epsilon$ = diferencia del coeficiente de extinción de derecha a izquierda ($[\text{mol cm}]^{-1}$ o $[\text{mol residuo cm}]^{-1}$).

Las bandas de DC de proteínas ocurren en dos regiones espectrales: a) región de UV lejano o región amida (170 -250 nm), está dominada por contribuciones de los enlaces peptídicos y b)

la región del UV cercano (250 a 350 nm) donde se aprecia la presencia de aminoácidos aromáticos, enlaces di-sulfuro y grupos prostéticos. Las dos regiones espectrales muestran información distinta acerca de la estructura de la proteína (Shulz GE, 1979; Van Holde K, 1998; Branden C, 1999).

Justificación

Taenia solium es un parásito estudiado principalmente en función de prevención y control; sin embargo, existe escasa información de los mecanismos que emplea para metabolizar los nutrientes que obtiene de su hospedero. El hallazgo de la actividad enzimática de una malato deshidrogenasa y su estudio descriptivo, nos ayudará a elucidar el tipo de metabolismo que emplea el parásito y diseñar nuevas y precisas estrategias para su control.

Objetivo Particular

Estudiar a la enzima cMDH de cisticercos de *T. solium* desde un punto de vista molecular, genómico y cinético.

Objetivos Particulares

- Purificar a la cMDH de *T. solium* por métodos cromatográficos.
- Caracterizar parcialmente a la enzima desde el punto de vista bioquímico.
- Determinar sus parámetros cinéticos (K_m , V_{max} ; k_{cat}).
- Determinar su mecanismo de reacción.
- Purificar y clonar a la cMDH de *T. solium*.
- Llevar a cabo estudios espectrofotométricos de dicroísmo circular y fluorescencia.

Materiales y Métodos

4.1. Ensayo enzimático de la MDH citosólica de cisticercos de *T. solium* (TscMDH)

El ensayo de la actividad enzimática para la TscMDH se realizó a temperatura ambiente empleando un espectrofotómetro Ultrospec 3100 (Amersham) y celdas de cuarzo de 1cm para el paso de luz.

Para la reacción en sentido de la reducción del oxaloacetato (OAA), se utilizó el OAA como sustrato en una concentración de 0.21 mM y 0.21 mM de β - NADH en Tris – HCl 50 mM pH 8 en un volumen final de reacción de 1 ml. La reacción se inició al adicionar con 0.05 μ g de la TscMDH. Con la finalidad de obtener la velocidad inicial de reacción se registró el cambio de absorbancia a 340 nm por el decremento del β - NADH (Englard, 1969).

Para llevar a cabo el ensayo enzimático en el sentido inverso de la reacción anteriormente mencionada o la oxidación del malato se siguió el procedimiento de Prichard y Schofiel (1968) con algunas modificaciones. Brevemente consistió en el uso de glicina 50 mM pH 9.6, 1 mM de L - malato y 0.52 mM NAD, en un volumen final de 1 ml de reacción. La reacción se inició al adicionar 0.1 μ g de la enzima. La velocidad inicial se determinó midiendo el incremento del β - NADH a 340 nm. Una unidad de MDH es definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar o reducir un 1 μ mol de coenzima en min^{-1} . La actividad específica fue definida como las unidades de enzima por miligramo de proteína.

4.2. Purificación de la fracción cMDH nativa de cisticercos de *T. solium*

4.2.1. Extracción de cisticercos de *T. solium*

Los cerdos infectados naturalmente con cisticercos de *T. solium* fueron obtenidos del estado de Morelos. Los cisticercos se extrajeron de los músculos de los animales y se seleccionaron aquellos que estuvieran en etapa vesicular (Aluja AS, Vargas G, 1988), éstos se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos 10 mM, NaCl 150 mM (PBS) pH 7.2 y se guardaron a -20°C hasta su uso.

4.2.2. Preparación del homogenado de cisticercos (TscMDH)

Se descongelaron 30 grs. de cisticercos (González, *et al.* 2002) y se mezclaron en una relación de 1:3 (m:v) en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 6.5 en presencia de 1 mM fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF). Los parásitos se homogenizaron a 4°C con ayuda de un Polytron

(Brinkmann Instruments) a 1500 rpm en secuencias de descanso-homogenización a intervalos de ~30 seg.

Posteriormente el homogenado se centrifugó a 10000 g por 20 minutos a 4 °C; el precipitado se desechó (detritus) y el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) en una concentración final de 70% de la sal, centrifugando a 10000 g por 20 minutos a 4°C.

La muestra se dializó contra un amortiguador de fosfatos a 10 mM, pH 6.5 para eliminar el sulfato de amonio y continuar con la purificación de la cMDH por medio de cromatografías líquidas (Agüero, *et al.* 1995).

4.2.3. Cromatografía líquida de intercambio catiónico carboxi metil-Sefarosa (CM – Sef)

El homogenado TscMDH se hizo pasar por una columna (2.5 X 15 cm) de CM–Sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech), lavada inicialmente con acetato de sodio 0.5 M, pH 6.0 y posteriormente con el mismo amortiguador pero en una concentración de 0.05 M. Antes de realizar las cromatografías, esta resina se equilibró con fosfato de sodio (NaH₂PO₄) 10 mM pH 6.5 (amortiguador de equilibrio) (Karlsson, *et al.* 1997). En cada cromatografía se utilizaron aproximadamente 120 mg/ 9 ml de muestra proteica solubilizada en el mismo amortiguador de equilibrio. Se colectaron fracciones de 3 ml a un flujo de 57 ml/ h. Después de ingresar toda la muestra a la resina, la columna se lavó con tres veces su volumen (235 ml) de amortiguador de equilibrio. En las fracciones colectadas se determinó el valor de absorbancia a 280 nm para demostrar la presencia de proteínas excluidas de la cromatografía. Cuando se obtuvieron valores de absorbancia cercanos a cero se conectó a la columna un gradiente salino de 0 a 0.7 M de NaCl en amortiguador de equilibrio. Esto último permitió eluir a las proteínas adsorbidas a la resina. El desempeño cromatográfico se siguió espectrofotométricamente mediante la actividad enzimática de la cMDH a 340 nm.

Las fracciones que mostraron actividad para cMDH se juntaron y se concentraron en Amicon (aproximadamente a 7 ml), el concentrado se dializó contra Tris – HCl 50 mM pH 7.5.

4.2.4. Cromatografía de afinidad (Sef- Azul), elución con gradiente salino

La fracción eluída de CM – Sef, con actividad para MDH, se cromatografió en una columna (2.5 X 7 cm) de sefarosa azul *fast flow* (Sef – Blue, resina de afinidad) (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada con Tris – HCl 50 mM pH 7.5 (Lowe y Paerson, 1984). En cada cromatografía se utilizaron aproximadamente 26 mg/ 5 ml de muestra proteica solubilizada en el mismo amortiguador de equilibrio. Se colectaron fracciones de 1 ml a una velocidad de flujo de 36 ml / h, siguiendo el mismo método de lavado descrito anteriormente. Las proteínas

adsorbidas a la resina se eluyeron usando un gradiente salino de 0 a 0.5 M de NaCl disuelto en el amortiguador de equilibrio. El desempeño espectrofotométrico se siguió mediante la actividad enzimática de la cMDH a 340 nm. Las fracciones que mostraron actividad para cMDH se juntaron y concentraron en Amicon (aproximadamente a 7 ml), el concentrado se dializó contra Tris – HCl 50 mM pH 7.5.

4.2.5. Cromatografía de afinidad (Sef- Azul), elución con gradiente de NADH

La fracción eluída de Sef- Azul (7.6 mg/ 2.5 ml), se cromatografió en una columna (2.5 X 7 cm) de Sef-Azul similar a la ya descrita. Se colectaron fracciones de 2 ml a un flujo de 15 ml / h, siguiendo el mismo método de lavado descrito anteriormente. Las proteínas adsorbidas se eluyeron usando un gradiente de NADH de 0 a 0.3 M disuelto en el amortiguador de equilibrio. Nuevamente el desempeño se siguió espectrofotométricamente mediante la actividad enzimática de la cMDH a 340 nm. Las fracciones que mostraron actividad para cMDH se juntaron y concentraron en Amicon (aproximadamente a 3 ml), el concentrado se dializó contra Tris – HCl 50 mM pH 8.

4.3. Purificación de la fracción r-TscMDH

4.3.1. Extracción de RNAs totales

Tres cisticercos de *T. solium* fueron macerados en presencia de 500 µl de Trizol. La mezcla se centrifugó a 13000 g por 3 min a 4°C; el sobrenadante (sn) fue colocado en un tubo limpio y se le adicionó 220 µl de cloroformo, después de ser mezclado con la ayuda de un vortex se incubó por 5 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 10000 g durante 15 min a 4°C. En este proceso se formaron tres fases: la fase pigmentada (DNA), la interfase (proteínas) y una acuosa (RNA), esta última se colocó en un tubo limpio para evitar su contaminación.

Se continuó con la precipitación del RNA, para ello se le adicionó a la fase acuosa 600 µl de isopropanol, se agitó manualmente durante 5 min y se dejó incubando 1 h a 4°C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 13000 g durante 15 min a 4°C. Se tomó el precipitado (pp), al cual se le añadió 300 µl de etanol al 80 % en H₂O más dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1%, se agitó suavemente y se volvió a centrifugar a 13,000 g por 5 min a 4°C; el pp formado se secó con la finalidad de evaporar cualquier traza de etanol y se resuspendió en 40 µl de H₂O DEPC (Chomczynski P, *et al.* 1987).

El RNA fue cuantificado en un espectro de absorción UV- VIS Ultrospec 3100 (Amersham), a una λ 260 nm y se determinó su pureza a λ 260/ λ 280 y por geles de agarosa al 0.1% en presencia de 0.001 % de bromuro de etidio.

4.3.2. Diseño de oligos para la amplificación del gene de TscMDH

Para llevar a cabo el diseño de los oligos se analizó la secuencia del gene de la cMDH encontrado en el banco de datos del consorcio del genoma de *T. solium* (Aguilar-Díaz H, *et al.* 2006). Esta secuencia se examinó en el programa Webcutter 2.0 con la finalidad de observar qué sitios de corte son identificados por las múltiples enzimas de restricción conocidas. Se encontró que EcoRI y Hind III no cortaban la secuencia de la enzima, por ello se determinó diseñar los oligos con estos sitios de corte, adicionando a EcoRI (GAATTC) los primeros 17 nucleótidos encontrados después del codón de inicio (ATG) y a Hind III (AAGCTT), los 18 nucleótidos antes del primer codón de término (TGA); con cuatro nucleótidos iniciales para darles estabilidad y evitar plegamientos. Con la ayuda del programa OligoCalc se determinó su temperatura media (Tm). Los oligos usados fueron:

FEMDH – AGCGGAATTCATGCCTGGACCTCTTAG Tm = 61°C

RHMDH – ATGGAAGCTTCTTGAAGGAGGAGGGAGC Tm = 62.9 °C

Se eligió el plásmido pET23a para llevar a cabo la clonación del gen de la TscMDH, debido a que presentó los sitios de corte para EcoRI y Hind III y expresa como parte de la proteína recombinante una etiqueta de seis histidinas que permiten su purificación por métodos cromatográficos.

4.3.3. RT- PCR (Transcriptasa reversa - Reacción en cadena de la polimerasa)

Para realizar la amplificación del gen TscMDH se utilizó el kit Super script™ one step, RT-PCR System with Platinum^R Taq DNA Polymerase (Invitrogene). Se siguieron las especificaciones del proveedor adicionando 200 ng del RNA purificado de cisticercos a los oligonucleótidos FEMDH (10.5 pmol) y RHMDH (13.6 pmol), en un volumen final de 25 μ l. Las condiciones usadas en el termociclador marca Eppendorf Mastercycler gradient, consistieron en una desnaturalización a 94 °C por 2 min; la amplificación consistió en 40 ciclos a 94 °C por 30 s con un alineamiento a 55 °C por 90 s y la extensión a 72 °C por 90 s, realizando una incubación final a 72 °C por 10 min (Sambrook J, 1989).

Las condiciones óptimas para la amplificación en el RT –PCR usando el kit Super script™ III One step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase se describen en la tabla I.

Tabla I. Condiciones de amplificación en el RT – PCR

Compuesto	Volumen (µl)
2X Reaction Mix	12.5
Templado RNA (200 ng)	2
Sense primer (10 µM)	1
Anti-sense primer (10 µM)	1
Super Script	1
H ₂ O	7.5
Vol final	25

El producto final del PCR fue corrido electroforéticamente en un gel de agarosa al 0.1% con marcadores moleculares comerciales de DNA y visualizado con bromuro de etidio (Sambrook, 1989).

4.3.4. Extracción del cDNA, restricción y ligación para la expresión de la enzima TscMDH

El DNA amplificado por PCR se cortó del gel y se purificó con el kit de Invitrogen Pure Link Quick gel extraction, siguiendo las especificaciones del proveedor. El DNA obtenido fue secuenciado por el método de Sanger (Sanger y Goulson, 1975) y analizado en el 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). La secuencia obtenida de aminoácidos fue comparada y confirmada como MDH citosólica con el programa BLAST del NBCI (Altschul, *et al.* 1979). La restricción tanto del gen como del plásmido pET23a, el cual se encontraba en estado helicoidal; consistió en incubar el DNA o el plásmido con las enzimas de restricción antes mencionadas (EcoRI y HindIII) en presencia del amortiguador REact 2 (Invitrogen) durante 2 h a 37°C siguiendo las especificaciones del proveedor. Este procedimiento además permitió linealizar al plásmido.

Se continuó con la ligación del inserto (gen con restricción) y del plásmido pET23a específico para el inserto. Se colocaron 2 µg del gen y 5 µg del plásmido en presencia de la T₄DNA ligasa (Invitrogen) y el amortiguador específico para la reacción de acuerdo al proveedor. La reacción se dejó incubando a 15°C por 12 h (Sambrook J, 1989).

4.3.5. Transformación de células *Escherichia coli* (TOP 10) con el inserto TscMDH y selección de colonias positivas

Se descongelaron 30 µl de células *E. coli* TOP 10 en hielo por 5 min, se les añadió el producto de la ligación mezclando suavemente e incubando nuevamente en hielo por 30 min.

Transcurrido el tiempo, las células se sometieron por 1 min a 42°C, regresándolas inmediatamente al hielo durante 2 min, se les agregó 1 ml de medio de cultivo estéril LB (Luria- Bertoni) y se agitaron a 30 rpm durante 90 min a 37°C. Terminada la incubación, las células se centrifugaron a 3000 g por 5 min, el sn fue desechado y las células se sembraron en una caja de cultivo (LB con agar en presencia de ampicilina 0.15mg/ml), dejando crecer a las bacterias durante 12 h a 37 °C (Sambrook J, *et al.* 1989).

Se seleccionaron cinco colonias al azar con la finalidad de observar cuál de ellas tenía el inserto, a estas colonias se les colocó en 0.5 ml de medio de cultivo LB con ampicilina 0.2 mg/ml, se les dejó incubar durante a 5 h a 37°C y 300 rpm, transcurrido el tiempo se tomaron 2 µl de cada colonia y se llevó a cabo un PCR con las condiciones descritas anteriormente con la finalidad de observar sí se amplificaba el gen TscMDH Al resto de las bacterias se les adicionó 4.5 ml de medio de cultivo LB con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C y 300 rpm.

Se purificó el plásmido con el inserto de las colonias positivas al gen TscMDH y se secuenció nuevamente por el método de Sanger (Sanger y Goulson, 1975) y analizado por el 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.3.6. Transformación de células *E. coli* (BL21) y expresión de la r-TscMDH

Se tomó el plásmido con el inserto puro y se transformaron células *E. coli* BL21 con la finalidad de expresar a la proteína r-TscMDH. El procedimiento fue similar al de las TOP 10: las células se descongelaron en hielo por 10 min, se les agregó el plásmido con el inserto y se dejaron incubar en hielo durante 30 min, 1 min a 37°C por y 2 min más en hielo. Se les adicionó 1 ml de medio LB- ampicilina 0.15 mg/ml y se les agitó a 300 rpm por 90 min a 37°C, finalmente se centrifugó a las bacterias y se sembraron en cajas de cultivo (LB con agar en presencia de ampicilina 0.15mg/ml), dejándolas crecer durante 12 h a 37 °C.

Se seleccionaron dos colonias al azar y se dejaron crecer a 37°C en 50 ml de LB – ampicilina 0.2 mg/ml hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6, momento considerado como tiempo cero (T0) de inducción a la expresión por lo que se tomó 10 ml del cultivo con la finalidad de recuperar a las bacterias por centrifugación y guardarlas a -20°C hasta su visualización en un SDS-PAGE. Al resto del cultivo se le agregó 1 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) siguiendo una cinética de inducción, es decir se tomo un ml del cultivo a diferentes tiempos: 1, 3, 5 y 24 horas correspondiendo a los tiempos T1, T2, T3 y T4 respectivamente (Sambrook J, *et al.* 1989). Las bacterias se recuperaron para ser analizadas como las del T0. Estandarizando el tiempo de inducción al T2.

4.3.7. Cromatografía y purificación de la enzima r-TscMDH (Sef – HiTRAP - IMAC)

Para purificar a la enzima r-TscMDH, se fraccionaron las bacterias por sonicación y se centrifugaron a 13000 g para separar la fracción soluble. Se tomo 2 ml de este sobrenadante y se cromatografió en una columna (1cm x 5cm) con resina HiTRAP – IMAC equilibrada con NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 0.5 mM, imidazol 30 mM pH 7.4. Después de ingresar toda la muestra a la resina, la columna se lavó con amortiguador de equilibrio tres veces su volumen (15 ml) con amortiguador de equilibrio. Se colectaron fracciones de 1 ml a una velocidad de flujo de 50 ml/h. Las proteínas adsorbidas se eluyeron usando NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 0.5 mM, imidazol 250 mM, pH 7.4 y se determinó espectrofotométricamente la absorbancia a 280 nm y la actividad enzimática de la cMDH a 340 nm. Las fracciones que mostraron actividad para cMDH se juntaron y se concentraron a 1 ml (GE Healthcare, 2008).

4.4. Caracterización parcial del gen de la enzima r-TscMDH

La secuencia de nucleótidos proporcionada por el consorcio del genoma de *T. solium* (Aguilar – Díaz H, *et al.* 2006) incluía más nucleótidos tanto al inicio como al final del gen, por ello se decidió buscar en dicha base, secuencias del gen dónde existiera mayor información correspondiente a posibles regiones promotoras y/o regiones no traducidas (UTRs) tanto del extremo 3' como del 5', con la finalidad de determinar hipotéticamente dichas regiones, identificar al codón de inicio, al de termino y analizar la presencia de intrones y de exones. Para ello se utilizaron diferentes programas de bioinformática: Expasy, Expasy Translate tool, BDGP, BIMAS-ProScan y Signal Scan.

4.5. Estudio de dominios conservados de la secuencia proteica de r-TscMDH

La secuencia del gen TscMDH fue traducida a una secuencia proteica con ayuda del programa Expasy Traslate tool. Esta secuencia fue comparada con la base de datos del NCBI usando el programa BLAST del NCBI, para observar el porcentaje de identidad con cMDHs previamente reportadas.

Se determinó el grado de conservación de esta proteína tomando como referencia a cMDHs de otras especies distantes evolutivamente. Además se mostró qué aminoácidos participan en la unión a sustratos y sí son homólogos a las secuencias comparadas; mediante el programa Conserved Domains.

El programa 3Djigsaw permitió modelar la secuencia proteica de la r-TscMDH tomando como base la estructura cristalográfica de la cMDH de cerdo (Chapman, ADM, *et al.* 1999). El modelo fue visualizado y analizado con el programa PymolTM.

4.6. Caracterización bioquímica

4.6.1. Estabilidad de las enzimas, TscMDH y r-TscMDH en función del pH

Alícuotas de 0.1 mg/100 µl, tanto de la enzima TscMDH como de la r-TscMDH, se dializaron durante 16 hr a 4°C en amortiguadores con un rango de valores de pH de 4 a 12 (Tabla II). Se tomo 0.005 mg (5 µl) de cada una de las alícuotas y se incluyeron en el amortiguador de ensayo (Tris- HCl 50 mM, pH 8.0) para llevar a cabo la reacción catalítica en sentido de la reducción del OAA (Englard, 1969), obteniendo la velocidad inicial de cada reacción.

4.6.2. pH óptimo de reacción de las enzimas TscMDH y r-TscMDH

La determinación del pH óptimo de la reacción se llevó a cabo siguiendo el ensayo enzimático en sentido de reducción del OAA (Englard, 1969) antes descrito, variando el amortiguador de ensayo dependiendo del pH a evaluar (Tabla II).

Tabla II. Amortiguadores con diferentes rangos de pH

Amortiguador	pH
50 mM citrato de sodio – 50 mM ácido cítrico	4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0
50 mM fosfato de sodio monobásico – dibásico	6.5, 7.0, 7.5, 8.0
50 mM Tris – HCl	8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12

4.6.3. Estabilidad catalítica de las enzimas en función de la temperatura

La estabilidad catalítica de las enzimas TscMDH y r-TscMDH a diferentes temperaturas se determinó por ensayos enzimáticos en sentido de la reducción del OAA. Para cada ensayo se uso 5 µg de cada una de las dos enzimas, las cuales se agregaron al amortiguador de ensayo y se dejó incubando esta mezcla durante 5 minutos ajustado a una temperatura específica. El intervalo de temperatura empleado fue de 5-70°C y en el análisis se consideraron intervalos de 5 °C. Inmediatamente después de transcurrido el tiempo de incubación se realizaron las cinéticas, adicionando los sustratos y registrando el cambio de absorbancia durante un minuto (Englard, 1969).

4.6.4. Determinación del peso molecular de las enzimas TscMDH y r-TscMDH

Una alícuota de 50 µg de cada una de las enzimas y marcadores moleculares comerciales se corrieron en un SDS-PAGE acrilamida (Laemmli, 1970) al 15% a 100 volts y 25 mA durante 3 hr. El gel fue teñido con azul de Commassie y desteñido con ácido acético, posteriormente

se midió la distancia existente entre cada una de las bandas de los marcadores moleculares conocidos y el frente de corrida del gel. Con esto se pudo determinar el valor del factor de movilidad relativa (Rf) para cada una de las proteínas controles y así extrapolar el valor de desplazamiento de la banda correspondiente a la TscMDH y de la recombinante y conocer el peso molecular de su monómero.

El valor del peso nativo de la TscMDH se obtuvo empleando una cromatografía de filtración. Sesenta y cinco mg/500 μ l de un extracto crudo de cisticercos de *T. solium* se pasaron por una columna (0.9 X 50 cm) con resina Sefacril S-200 equilibrada con PBS (amortiguador de fosfatos) pH 7.2, a una velocidad de flujo de 16.5 ml/h (Murphy, *et al.* 1967). La columna fue previamente calibrada con las proteínas γ - globulina (150 KDa), albúmina sérica bovina (66 KDa), anhidrasa carbónica (31 KDa), mioglobina (16.9 KDa) y lisozima (14 KDa) determinando para cada una de ellas su constante de distribución (Kav) (Laurent TC y Killander J, 1964). Los valores de estas constantes se graficaron frente a cada uno de los valores de sus pesos moleculares correspondientes y se trazó una recta sobre de ellos. Así, se pudo interpolar el valor de la Kav de la enzima en la recta trazada.

4.6.5. Afinidad de las enzimas por sustratos análogos al NAD

Se analizó la capacidad catalítica de la oxidación de malato (Yoon y Anderson, 1988) de la TscMDH y su recombinante frente a cinco diferentes análogos del dinucleótido β -NAD. Estos análogos presentan motivos alterados en los grupos piridina. Las concentraciones empleadas fueron de 0.2 a 0.8 mM de 3-acetil piridina adenina dinucleótido (APA), nicotinamida mononucleótido (NM), ácido nicotina adenina dinucleótido (NAAD), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) y α nicotinamida adenina dinucleótido (NAD).

4.7. Caracterización cinética y estudios de inhibición

4.7.1. Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de MM (Km), velocidad máxima de reacción (Vmax), número de recambio (kcat) y la constante de especificidad (kcat/Km).

Para obtener estos valores se realizaron ensayos de velocidad inicial en ambos sentidos de la reacción, catalizados por las enzimas TscMDH y r-TscMDH. Los ensayos consistieron en mantener fija la concentración de la enzima en cuestión (aprox. 0.5 μ g), y en concentración elevada un sustrato y variable la del otro. Las condiciones para determinar los parámetros cinéticos se resumen en la Tabla III.

Para determinar los valores de las constantes cinéticas se utilizó la ecuación de Michaelis – Menten y se construyeron gráficas de Lineweaver – Burk con los valores inversos de las velocidades iniciales frente a los valores inversos de las concentraciones de los sustratos. De estas gráficas la pendiente de la recta es la K_m / V_{max} el intercepto de la recta en la ordenada es $1 / V_{max}$ y el intercepto de la recta en la abscisa es $-1 / K_m$ (Lineweaver y Burk, 1934).

Tabla III. Concentraciones de los sustratos para determinar la K_m y V_{max}

Reducción del OAA		Oxidación del malato	
[Sustrato fijo] mM	[Sustrato variable] mM	[Sustrato fijo] mM	[Sustrato variable] mM
NADH 0.21	OAA 0.005 – 0.5	NAD 0.52	Malato 0.005 – 2
OAA 0.21	NADH 0.005 – 0.5	Malato 1	NAD 0.005 – 1

4.7.2. Estudios de inhibición de la enzima TscMDH con NaAsO_2

Los estudios de inhibición se llevaron a cabo siguiendo el método descrito por Tahir y Mannervik (Tahir y Mannervik, 1985). Primeramente se determinó el valor de la I_{50} del NaAsO_2 sobre la enzima en ambos sentidos de la reacción. Para ello se realizaron ensayos de velocidad inicial con cantidades constantes de la enzima (5 μg), sus dos sustratos a saturación y concentraciones del NaAsO_2 en el rango 2.5 mM a 1 M. Este parámetro se utilizó para establecer una concentración referente del inhibidor en los ensayos enzimáticos de inhibición enfocados a establecer el mecanismo de inhibición y su constante inhibitoria (K_i) para este inhibidor (Segel IH, 1993). Para este último fin y en sentido de la reducción del oxaloacetato, se usaron diferentes concentraciones de NADH (4 a 20 mM) y se mantuvo constante la concentración de la enzima (5 μg) y del OAA (0.21 mM); estos experimentos se realizaron tanto en ausencia del NaAsO_2 como en presencia de dos diferentes concentraciones de éste (25 y 100 mM). Para la reacción en sentido de la oxidación del malato, el NAD se utilizó en un rango de concentración de 40 a 80 mM, manteniendo constante la concentración de enzima (5 μg) y del malato (1 mM); nuevamente, las catálisis se realizó tanto en ausencia del NaAsO_2 como en presencia de dos diferentes concentraciones de éste (100 y 250 mM) (Albassam, 1998). Los datos se analizaron en gráficas de doble inversa (Lineweaver – Burk) (Lineweaver y Burk, 1934).

4.7.3. Estudios de inhibición por producto con la enzima TscMDH

Estudios de inhibición similares a los previamente descritos, se realizaron usando como inhibidores a los productos catalíticos de la TscMDH (Heyde y Ainsworth, 1968). Para la reacción en el sentido de la reducción del OAA, se usó al malato y al NAD y en el sentido de la oxidación del malato, al OAA y NADH. Se determinó la I_{50} para cada uno de los inhibidores y con base en los resultados se determinaron las condiciones para la obtención del mecanismo de reacción y su K_i (Tabla IV).

Tabla IV. Concentraciones de los sustratos y de los productos para la determinación del mecanismo de inhibición por producto de la TscMDH

Reducción del oxaloacetato (OAA)		
Sustrato constante	Sustrato Variable	Producto
OAA	NADH	Malato
0.2 mM	0.06 – 0.42 mM	5, 15 mM
OAA	NADH	NAD
0.2 mM	0.06 – 0.42 mM	10, 50 mM
NADH	OAA	Malato
0.21 mM	0.6 – 200 mM	5, 15 mM
NADH	OAA	NAD
0.21 mM	5 – 160 mM	10, 50 mM
Oxidación del malato		
Malato	NAD	OAA
3 mM	0.2 – 0.6 mM	0.1, 0.4 mM
Malato	NAD	NADH
3 mM	0.2 – 0.6 mM	4.2, 42 mM
NAD	Malato	OAA
0.52 mM	0.1 – 3 mM	0.1, 0.4 mM
NAD	Malato	NADH
0.52 mM	0.1 – 3 mM	4.2, 42 mM

4.8. Caracterización a nivel de estructura secundaria por medio del espectro de dicroísmo circular (DC) en el UV cercano de la enzima r-TscMDH

El espectro de la r-TscMDH se realizó en un espectropolarímetro (Jasco J-810), usando una celda de cuarzo de 0.1 cm a 25°C. Las lecturas de DC se registraron en la región del espectro UV-cercano (190–240 nm) usando 1 mg/mL de la enzima dializada contra NaH₂PO₄ 25mM, DTT (ditiotreitól) 1 mM, pH 7.4. Los resultados fueron expresados en elipticidad molar (θ), la cual es definida como:

$$\theta = \theta_{\text{obs}}(\text{MRW})(100) / lc$$

$$\text{MRW} = \text{Mr} / \text{Na}$$

Donde:

θ_{obs} es la elipticidad observada en grados

c es la concentración de proteína en mg/mL

MRW es la masa promedio por residuo

Mr es la masa molecular de la proteína

Na es el número de aminoácidos de la proteína

l es la longitud del recorrido de la luz en centímetros.

4.9. Determinación de la T_m (temperatura media de desnaturalización) por medio del espectro de dicroísmo circular en el UV lejano.

La desnaturalización térmica de la r-TscMDH se monitoreó siguiendo la elipticidad molar a 222 nm usando una celda de cuarzo de 0.1 cm. La temperatura fue incrementada de 25 a 80 °C a una velocidad de 1°C/min. La r-TscMDH (1mg/mL) fue previamente dializada contra amortiguador de NaH₂PO₄ 25mM, DTT 1 mM, pH 7.4. Los datos obtenidos correspondientes a la fracción de las subunidades desnaturalizadas aparentes (f_D) fueron calculados usando la siguiente ecuación:

$$f_D = y_N - y / y_N - y_D$$

Donde y_N e y_D son valores de elipticidad de la fracción nativa y de la fracción desnaturalizada, respectivamente. Ambos parámetros son extrapolaciones lineales tanto de la porción inicial como de la terminal de la curva, siendo y una función de la temperatura.

4.10. Estudios de unión ligando – proteína por medio de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos (λ_{295} nm) de la enzima r-TscMDH

Se estudió la fluorescencia intrínseca de la enzima en función de la interacción con cada uno de sus sustratos (NADH, NAD, OAA y malato) a diferentes concentraciones, así como la combinación de éstos dependiendo de la dirección de la reacción; es decir, en el sentido de la reducción del oxaloacetato, la combinación fue OAA/NADH y en el sentido inverso (oxidación del malato) se usó NAD/malato.

La r-TscMDH (1 mg/mL) se dializó contra Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Los registros de la intensidad de la fluorescencia se obtuvieron en un espectro de fluorescencia (Perkin Elmer LS 45), excitando a los triptófanos a 295 nm. La apertura de entrada de la luz fue de 9 nm y la apertura de salida de 8 nm, se empleó una celda de cuarzo de 1cm con capacidad de 400 μ l en agitación continua, por lo que la celda con la muestra no se movió del espectro hasta terminar el ensayo.

5. Resultados

TscMDH

5.1. Purificación de la cMDH de cisticercos de *T. solium*

El sobrenadante obtenido de la homogenización y ultracentrifugación de los cisticercos de *T. solium* se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70%, con el objetivo de concentrar la fracción de proteína con actividad de malato deshidrogenasa; de un volumen inicial de 71 ml con un total de 490 mg de proteína y una actividad específica de 54 U/mg, la fracción precipitada aumentó su actividad específica alrededor de tres veces en un volumen aproximado de 9 ml (Tabla V).

5.1.1. Cromatografía líquida de intercambio iónico (CM – Sef)

La figura 8 muestra la gráfica de la cromatografía en CM-Sef usando el precipitado de cisticercos de *T. solium* (119.63 mg de proteína). Se aprecian dos picos principales de absorbancia a 280 nm, el primero corresponde a la fracción excluida y el segundo a la fracción adsorbida. Los valores de conductividad indicaron que las proteínas que interaccionaron con la resina se eluyeron entre 8 y 38 mS/cm. La actividad enzimática de MDH ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) detectada a 340 nm se apreció abundantemente en la fracción eluída entre 18 a 35 mS/cm y en menor medida en la fracción excluida. Probablemente esta última corresponda a la MDH mitocondrial.

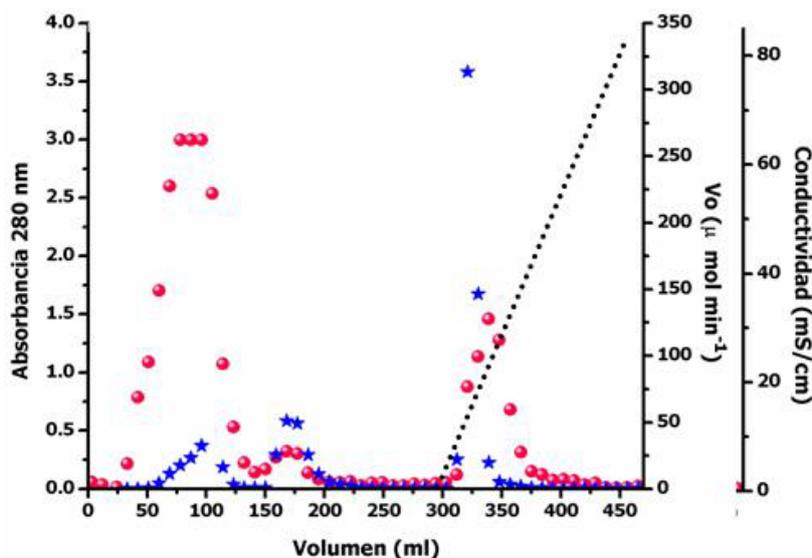


Figura 8. Cromatografía en CM – Sef del extracto crudo de cisticercos de *T. solium*. Se muestran los valores de absorbancia a 280 nm ●, la actividad catalítica de malato deshidrogenasa ★ y el incremento de la fuerza iónica (●●● conductividad mS/cm).

5.1.2. Cromatografía de afinidad (Sef- Azul), elución con gradiente salino

La figura 9 muestra la cromatografía en Sef-Azul de las fracciones con actividad para cMDH (26.55 mg) obtenidas en la columna previa de CM- Sef (Fig.8). Sus valores de absorbancia a 280 nm mostraron las fracciones proteicas excluidas y eluidas; y a 340, nm la actividad enzimática para cMDH que eluyó en el intervalo de 7 a 30 mS/cm.

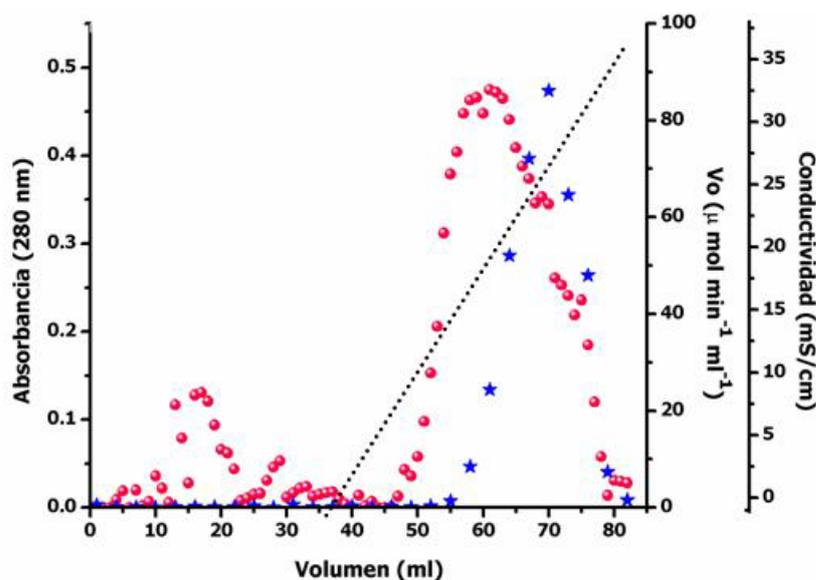


Figura 9. Cromatografía en Sef-Azul de la fracción eluida de CM-sef con actividad de MDH. Se observan los valores de absorbancia a λ 280 nm ●, la actividad catalítica de malato deshidrogenasa ★ y el incremento de la fuerza iónica (●●● conductividad mS/cm).

5.1.3. Cromatografía de afinidad (Sef- Azul), elución con gradiente de NADH

La figura 10 muestra el perfil cromatográfico de las fracciones con actividad enzimática de MDH (7.6 mg de proteína) obtenidas de la cromatografía de afinidad de Sef-Azul (Fig. 9). Se observa que prácticamente toda la enzima se absorbió a la resina y que pudo ser eluída de la misma con un gradiente de 0 – 0.3 mM de NADH.

Este proceso de purificación permitió obtener a homogeneidad a la malato deshidrogenasa de cisticercos de *T. solium* (TscMDH) (figura 11).

La Tabla V resume el proceso de purificación de esta enzima, la cual tiene una actividad específica de 2615 U/mg y un rendimiento del 0.5%.

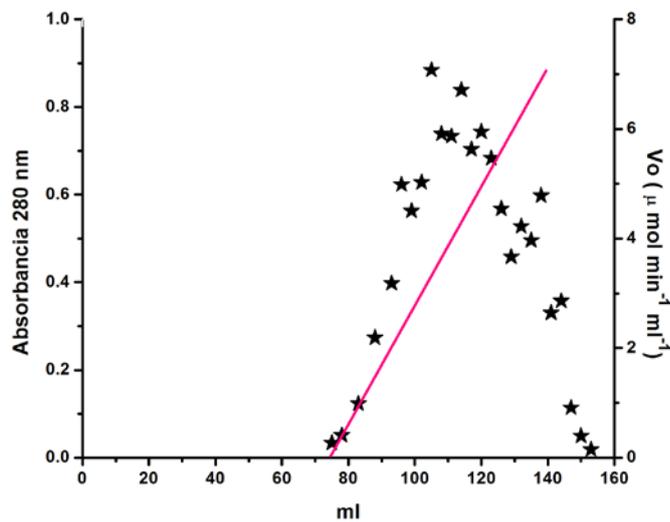


Figura 10. Segunda cromatografía de Sef-Azul para obtener la TscMDH eluída con NADH. Se muestran los valores de la actividad catalítica de malato deshidrogenasa ★ y la absorbancia a λ 280 nm -, esta línea representa el incremento del NADH utilizado para eluir a la TscMDH absorbida.

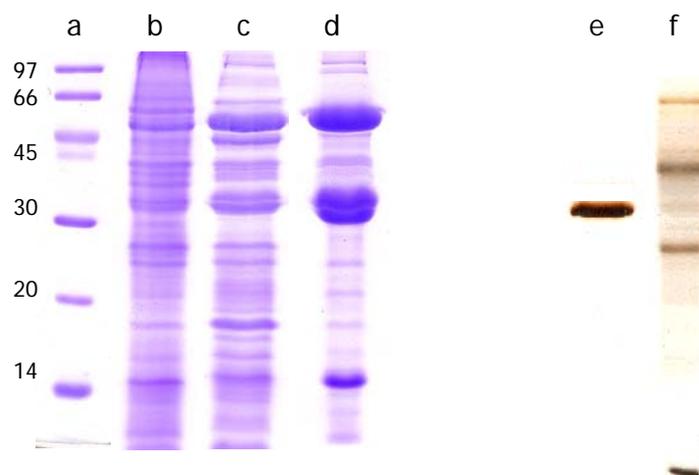


Figura 11. Análisis del proceso de purificación de la TscMDH en SDS- PAGE al 15% (Laemmli UK. 1970), tinción en azul de Coomassie y en plata. a) Marcadores de peso molecular, b) extracto crudo de cisticercos de *T. solium*, c) fracción eluída de CM- sef, d) fracción eluída de sefarosa azul gradiente salino, e) fracción eluída de la resina sefarosa azul, gradiente 0.3 mM NADH, f) marcadores de peso molecular.

Tabla V. Purificación de la TscMDH

Etapa	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Act. Especifica (U/mg)	Actividad total (U)	% Rendimiento	Veces de purificaciones
Extracto crudo	71	489.9	54	26 552	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 70%	8.7	119.63	146	17 513	66	2.7
CM ^a	4.5	26.55	343	9 130	34.4	6.34
Sef – azul ^b	2.5	7.625	368	2197	8.3	7.3
Sef – azul ^c	9.5	0.0475	2615	124	0.5	48.3

Se partió de 30 g de cisticercos. Una unidad de MDH es definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μ mol de coenzima $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

a Cromatografía de CM-Sefarosa

b Cromatografía de sefarosa azul, gradiente salino

c Cromatografía de sefarosa azul, gradiente de NADH

r- TscMDH, enzima recombinante

5.2.1. Amplificación del gene de TscMDH

Con el RNA (total) extraído de los cisticercos de *T. solium* (figura 12A) se llevó a cabo un RT-PCR, amplificando específicamente al gen de la cMDH y con los sitios de corte mediante EcoRI (5' a 3') y HindIII (3' a 5'). En la figura 12B se observan en tres diferentes carriles,

una banda con un tamaño molecular de alrededor de 1100 pares de bases (pb), que coincide con el tamaño del gen de la TscMDH

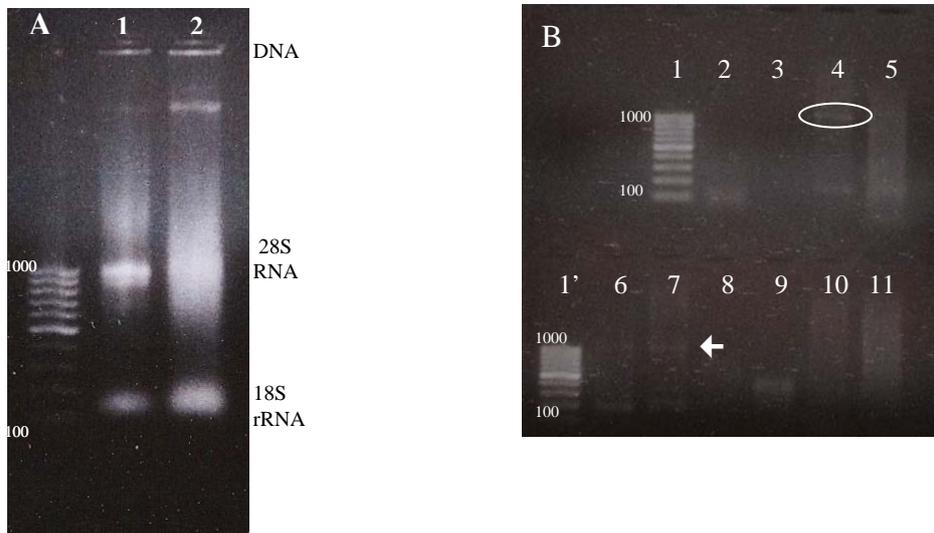


Figura 12. Gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio. A) Se observa en los carriles 1 y 2 RNA total (28S y 18S) obtenido de dos lotes diferentes de cisticercos de *T. solium* mediante la técnica de Trizol y con elevado peso molecular contaminación de DNA. B) Visualización de la amplificación del gen de la TscMDH por medio de un RT-PCR, cada uno de los carriles corresponde a cierta condición (concentración de iniciadores o de RNA); en los carriles 4, 6 y 7 se señala una banda con un tamaño de aproximadamente 1100 pb, la cual corresponde con el peso molecular del gen de 1100 pb.

5.2.2. Extracción del cDNA y su secuenciación

De acuerdo a las condiciones estandarizadas y empleadas en el RT-PCR, se amplificó una mayor cantidad del cDNA de nuestro gen. Al analizar su secuencia en la base de datos del NCBI, ésta mostró una secuencia de nucleótidos con identidad a diversas cMDHs. Entre las especies con mayor porcentaje de identidad figuran *Echinococcus granulosus* con un 86% y *Taenia asiatica* con un 85%.

5.2.3. Restricción y ligación del TscMDH

En la figura 13C se observa el plásmido pET23a previamente digerido con las enzimas específicas de corte ligado al gen de la TscMDH

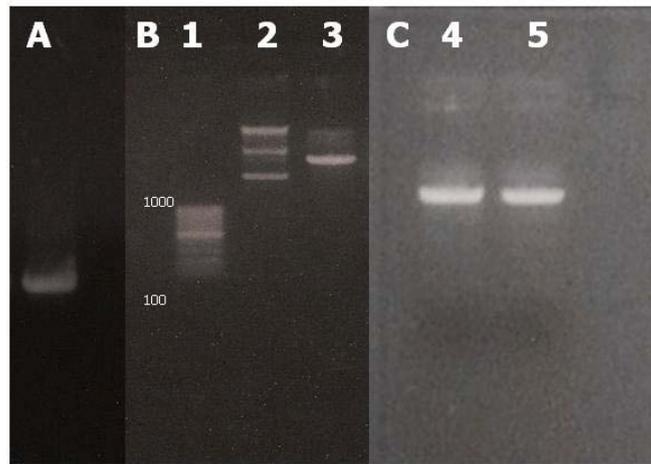


Figura 13. Gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio. A) Se muestra el gen de TscMDH digerido específicamente con las enzimas EcoRI y HindIII (inserto). B) 1.- Peso molecular, 2 y 3.- Se observa el plásmido pET23a sin digerir, se aprecian diferentes bandas de alto peso molecular debido al estado helicoidal del plásmido. C) En ambos carriles se observa el alineamiento del plásmido pET23a al ser digerido con las enzimas EcoRI y HindIII.

5.2.4. Transformación de células de *E. coli* TOP 10 competentes y secuenciación de pET23a - TscMDH

Dos de las cinco colonias de *E. coli* Top 10 transformadas con el plásmido pET23a-TscMDH, lograron clonar al plásmido con el inserto (figura 14). Posteriormente se llevó a cabo la purificación y secuenciación de estos dos plásmidos. El resultado del análisis de la secuencia obtenida en ambos mostró un 100% de identidad con la secuencia del gen de la cMDH proporcionado por el consorcio de genoma de *T. solium* (figura 15) (Aguilar-Díaz H, *et al.* 2006).



Figura 14. Gel de agarosa al 0.1% teñido con bromuro de etidio. En el gel se muestra el producto de PCR de cinco colonias de *E. coli* Top 10 transformadas con el plásmido pET23a - TscMDH; dos de ellas lograron clonar el gen de TscMDH, como se observa en los carriles 1 y 2, una banda de 1100 pb que corresponde al gen amplificado.

Ts - cMDH	atgcctggacctcttagggttcttatcaccggcgccgctggccaaatcgcctacaacctctccaatatgg	70
pET23a/TscMDH	atgcctggacctcttagggttcttatcaccggcgccgctggccaaatcgcctacaacctctccaatatgg	70
Ts - cMDH	ttgccaacggtaaatctgttcggcaaaagaccagaagatcattctccacctcctcgatccccgaggccaa	140
pET23a/TscMDH	ttgccaacggtaaatctgttcggcaaaagaccagaagatcattctccacctcctcgatccccgaggccaa	140
Ts - cMDH	gactgttctggaaggtgttgatggagttgcaggactcgcctttaccgctctggagggcatcgtccct	210
pET23a/TscMDH	gactgttctggaaggtgttgatggagttgcaggactcgcctttaccgctctggagggcatcgtccct	210
Ts - cMDH	acacactgccttaaggaggccttactgacatcgatgtcgctctaatggttgggtgccatgccacgcaaac	280
pET23a/TscMDH	acacactgccttaaggaggccttactgacatcgatgtcgctctaatggttgggtgccatgccacgcaaac	280
Ts - cMDH	agggtatggaacgcagagaccttctctctccaacgtgaagatcttcaaggatcaaggtgaggccctcga	350
pET23a/TscMDH	agggtatggaacgcagagaccttctctctccaacgtgaagatcttcaaggatcaaggtgaggccctcga	350
Ts - cMDH	gaagtacgccaagaagaccgttaagggtgctggttggcaaccctgctaacactaactgctcatcatg	420
pET23a/TscMDH	gaagtacgccaagaagaccgttaagggtgctggttggcaaccctgctaacactaactgctcatcatg	420
Ts - cMDH	agcaagtacgctccttccattccgaaagagaactttacggctcttcccgttggatcataaccgtgcc	490
pET23a/TscMDH	agcaagtacgctccttccattccgaaagagaactttacggctcttcccgttggatcataaccgtgcc	490
Ts - cMDH	tctatcaggtcgctgccaaaggttggagttcccagtgatgtgaagaacgtatgtatctggggcaacca	560
pET23a/TscMDH	tctatcaggtcgctgccaaaggttggagttcccagtgatgtgaagaacgtatgtatctggggcaacca	560
Ts - cMDH	cagcaataaacaattccccgatctggctcacgccgttgtcaccaggcgggaagcagcaccggctaaa	630
pET23a/TscMDH	cagcaataaacaattccccgatctggctcacgccgttgtcaccaggcgggaagcagcaccggctaaa	630
Ts - cMDH	gagttgatcaacgatgaaaagtgggtcaaggaggtgttcaactccatcogttcaaaatcgtggtgccg	700
pET23a/TscMDH	gagttgatcaacgatgaaaagtgggtcaaggaggtgttcaactccatcogttcaaaatcgtggtgccg	700
Ts - cMDH	ttatggcttgcgaaaactgagcagcgcgcgatcagccgcaaggcaattgtcgatcagatgacgactg	770
pET23a/TscMDH	ttatggcttgcgaaaactgagcagcgcgcgatcagccgcaaggcaattgtcgatcagatgacgactg	770
Ts - cMDH	gtggtttggcaccaggagggtgaatgggttccatgtctggttacagcaccgggtaacactatggtgct	840
pET23a/TscMDH	gtggtttggcaccaggagggtgaatgggttccatgtctggttacagcaccgggtaacactatggtgct	840
Ts - cMDH	cccaaggacatctattcagcttcccgggtaccatcaagaatggacactacaaggtggtagatggtctcg	910
pET23a/TscMDH	cccaaggacatctattcagcttcccgggtaccatcaagaatggacactacaaggtggtagatggtctcg	910
Ts - cMDH	ccatggacgagtggggcaagggtctattcaaaatcactgctgacgagttggtgatgaacgagaggttgc	980
pET23a/TscMDH	ccatggacgagtggggcaagggtctattcaaaatcactgctgacgagttggtgatgaacgagaggttgc	980
Ts - cMDH	tctttcctccttcaag	996
pET23a/TscMDH	tctttcctccttcaag	996

Figura 15. Alineamiento de la secuencia genómica de la cMDH proporcionada por el consorcio Genoma de *T. solium* (Aguilar-Díaz H, *et al.* 2006) y comparada con la secuencia obtenida de la purificación del plásmido pET23a- TscMDH

5.2.5. Expresión de la r-TscMDH

La figura 16 muestra la expresión de la r-TscMDH en bacterias de *E. coli* BL21 transformadas con 146 ng del plásmido pET23a –TscMDH a diferentes tiempos de inducción con 1 mM de IPTG. El T0 corresponde al punto donde las bacterias alcanzan el valor de 0.6 de O.D y aun no es inducida la expresión de la proteína. Los tiempos T1 a T4 corresponden a 1, 3, 5 y 24 hrs de inducción, respectivamente. El gel muestra del tiempo T1 a T4, una banda de proteína intensa de ~37 KD la cual corresponde con el PM de la cMDH. Debido a que no hubo diferencias significativas en la intensidad de la banda en los diferentes tiempos de inducción (T1 a T4), se decidió inducir con 1 mM de IPTG durante 3hr a 37°C.

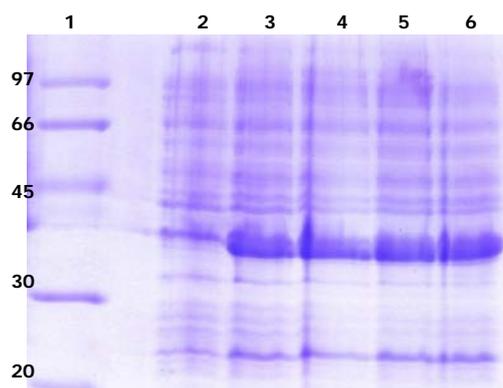


Figura 16. SDS Page (Laemmli UK. 1970), acrilamida 15%. Bacterias BL21 transformadas con el plásmido pET23a – TscMDH e inducidas con 1 mM de IPTG. 1) Marcador de pesos moleculares, 2) T0 (sin inducción), 3) T1 (1hr), T2 (3hr), 5) T3 (5hr), 6) T4 (24 hr).

A 50 ml de cultivo de bacterias transformadas con el plásmido pET23a-TscMDH se les adicionó 1mM IPTG y se mantuvo durante 3 hr a 37 °C; las bacterias recuperadas se homogenizaron mediante sonicación. En la fracción soluble se detectaron 0.3 mg de enzima r-TscMDH, mientras que en la fracción lipídica solo 0.1 mg de enzima. Estos datos indican que con este método de fraccionamiento tres cuartas partes de la enzima recombinante son liberadas en la fracción soluble y por lo tanto es adecuado para la purificación de la enzima.

5.2.6. Cromatografía y purificación de la enzima r-TscMDH (Sef – HiTRAP - IMAC)

La proteína recombinante r-TscMDH se expresó con una etiqueta de seis histidinas, lo cual permitió su purificación en el sistema de HiTrap IMAC. En la figura 17 se muestra el resultado de la cromatografía de la fracción soluble del cultivo de bacterias que expresaron a la r-TscMDH. En cada una de las fracciones colectadas se determinó el valor de la absorbancia a 280 nm y se registró la actividad enzimática de MDH ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) a 340 nm. Las fracciones excluidas presentaron altos niveles de proteína pero ninguna actividad enzimática para MDH. Esta actividad se observó en las fracciones eluidas con un pulso de imidazol, indicando que este sistema de purificación es efectivo y específico para nuestra proteína recombinante.

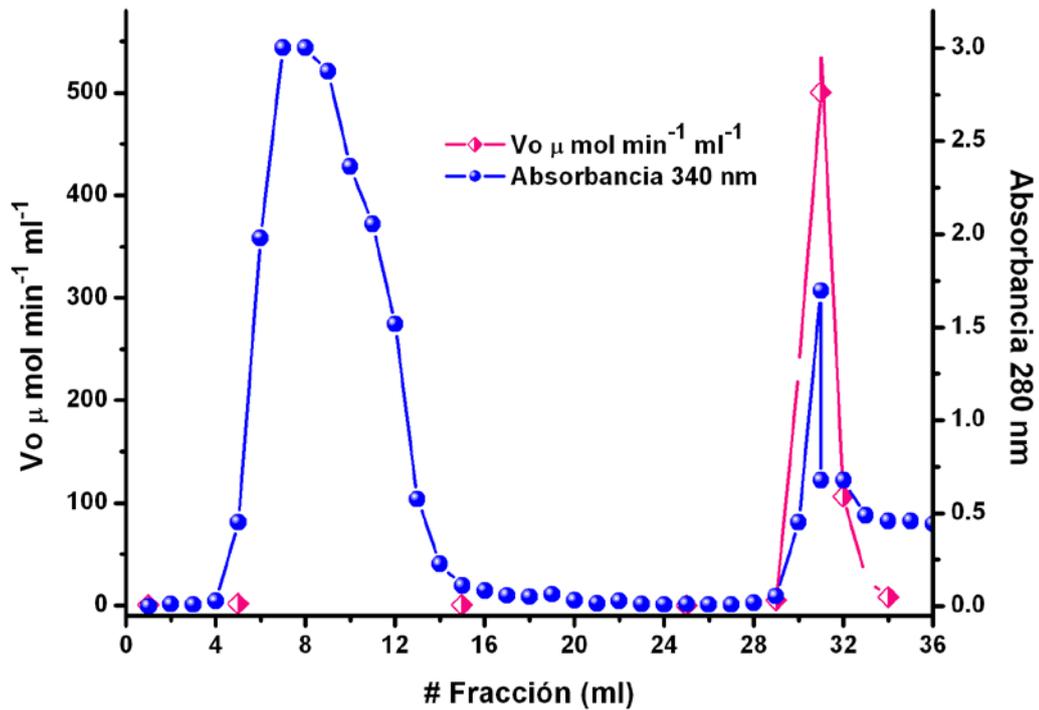


Figura 17. Cromatografía en HiTrap - IMAC de 33.15 mg de la fracción soluble del cultivo de bacterias que expresaron a la r - TscMDH Se muestran los valores de absorbancia a 280 nm ●, así como la actividad catalítica de malato deshidrogenasa ▼.

5.3. Caracterización parcial del gen de la enzima r-TscMDH

La figura 18 muestra la secuencia genómica completa que codifica para la enzima cMDH proporcionada por el consorcio de *T. solium* (Aguilar-Díaz H, *et al.* 2006). La secuencia consta de un total de 1505 pares de bases (pb). En ella se observan dos exones, cada uno formado por 498 nucleótidos y un intrón de 76 pb el cual presenta los sitios de unión-adhesión gt – ag (Vargas-Parada y Laclette JP, 2003).

-327	aagggactgcgat	acctagcctt	cactcgatt	taagcatt	taggctggt	gtagctagatt	-268
-267	ctt	cactatgcg	ttttagaat	ctccctttt	tactttt	acttaatccaaa	attt
-207	tttacaag	taaatcttt	gtaaagata	gttttat	gatctgc	ctacagcttt	ttt
	INF. 1 (Vaca, 2009)	E2F (-)				TFIID	
-147	gtgagccgattgc	cccaaaa	tataac	cttaata	aatctct	gggg tata	taaac
	Spl						
-87	gcctgc	gtgctt	ggccttt	tcg	taaac	ctgtgc	atcactat
-27	gttttt	ggctatt	cactttt	taacttt	atg	cctgg	acctcttagg
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							
Trans							
Protein							
cDNA							

El análisis de esta secuencia en los programas de bioinformática BDGP y Proscan, permitió ubicar la posible región promotora del gen que incluye los sitios de reconocimiento para los factores de transcripción, tales como la caja TATA (secuencia de DNA que permite la unión a factores de transcripción), el TFIID (factor de transcripción reconocido por la ARN polimerasa II), el Sp1 (factor de inicio en la transcripción), el E2F (factor de transcripción que regula la expresión de algunos genes) y el INF.1 (figura 19); este último factor de transcripción es similar al reportado en el gen de 2- cis- peroxiredoxina, tanto de *T. solium* como de *T. crassiceps* (Vaca-Paniagua F, *et al.* 2009).

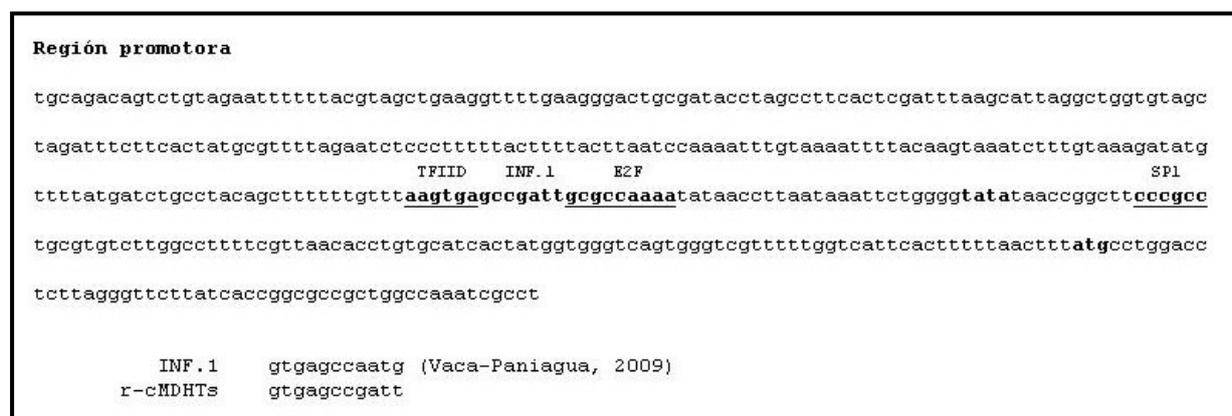


Figura 19. Posible región promotora y sitios de reconocimiento para los factores de transcripción en el gen de la TscMDH, obtenida del análisis de bioinformática.

5.4. Estudio de dominios conservados de la secuencia proteica de la r-TscMDH

Los 996 nucleótidos que forman a los dos exones codifican una secuencia proteica de 332 residuos de aminoácidos (Expasy Translate tool); dicha secuencia, al ser comparada con la base de datos del NCBI usando el programa BLAST, mostró un alto porcentaje de identidad con secuencias de malato deshidrogenasa citosólica (E.C.1.1.1.37) de otras especies, teniendo el 90% de identidad con la secuencia reportada para la cMDH de *E. granulosus* (Agüero F, *et al.* 1995). En la figura 20 se muestra el alineamiento de esta secuencia con homólogas de otros organismos, en dicha comparación se incluye a sus hospederos, el cerdo (*Sus scrofa*) (Trejo F, *et al.* 1996) y al humano (Tanaka T, *et al.* 1996) mientras que el resto de las secuencias de cMDHs corresponden a especies evolutivamente distantes. El programa Conserved Domains nos permitió determinar el grado de conservación de esta proteína, mediante el análisis de los residuos de aminoácidos que se observan en la gran mayoría de las secuencias empleadas. Es importante notar que estos aminoácidos conservados participan directamente en la unión del cofactor (NAD/NADH), en la del malato (sustrato) o en ambas. Ésta se encuentra altamente

conservada en función (catálisis) y sugerentemente en estructura. Por otro lado, el programa 3Djigsaw nos permitió modelar estructuralmente la secuencia proteica de la TscMDH tomando como base la estructura cristalográfica de la cMDH de cerdo (Chapman AD, *et al.* 1999). El análisis del modelo tridimensional (programa Pymol) muestra un empalme completo entre estas dos secuencias y es observable la conformación de los sitios activos de las enzimas homólogas (figura 21).

Ts-cMDH	3	gPLRVLITGAAGQIAYNLSNMVANGNLFgKDQKIILHLLDIPEaKTVLEGVVMELODCAFTVLEGIIVPTHCLKEAFTDIDVALMVGAMPK	94
Eg-cMDH	3	gPLRVLITGAAGQIAYNLSNMVANGNLFgKDQKIILHLLDIPEaKTVLDGVVMELODCAFTVLAGIVPTHCLKEAFTDIDVLMVGAMPK	94
Sc-cMDH	2	EPRLRVLTGAAGQIAYSLLYSIGKGSVFGKDQPIILVLLDITPmMGVLDGVLMELODCAFLPLKDVIAATDKEEIAFKDLDAIILVGSMPKR	93
Sp-cMDH	3	EPRLRVLTGAAGQIAYSLLYSIGKGSVFGKDQPIILVLLDITPmMGVLDGVLMELODCAFLPLVLSIVATADPKVAFVTGVDFAIILVGSMPKR	94
Mb-cMDH	1	ELVRVCVTGAAGQIAYSLLFSGRQDIFgEDQPVSLQLLDITPmLGVLEGVVMELODCAFLPLVKNIVATADPAEAFIDCDAAILVGVAPKR	92
Dd-cMDH	60	TPIKVLVTGAAGQIAYSLMFMIASGQMFgPHQPVILHLLDIPKmadALKGVMVMELODCAFLPLVQSVVAVTTDQIATFLHINVAIILVGVAPKR	151
Tt-cMDH	44	DEINVCVTGAAGQIAYAFPLLLLTGQCF-GDKKINLRLLDVQPaESILQGVLELQDGAFLPLKSIKTSNESILFQDQVDAVFIIGGPKR	134
Cs-cMDH	4	APIRVLITGAAGQIAYLAGMVARGDMF-GHKKILHLFDITPmLTLTSLGRLMELEDCAFETLKDIVVTVEAKDAFKDLDAIILVGSMPKR	94
Ce-cMDH	3	APLRVLVTGAAGQIAYSLIVIRIADGTVFgKEQPVVLLDITPmLTLTSLGRLMELEDCAFETLKDIVVTVEAKDAFKDLDAIILVGSMPKR	94
Xl-cMDH	3	EPVKVLVTGAAGQIAYSLFQIAGKGVFGKDQPIILVLLDITPmLTLTSLGRLMELEDCAFETLKDIVVTVEAKDAFKDLDAIILVGSMPKR	94
Mc-cMDH	3	EPRLRVLTGAAGQIAYSLLYSVAKGVFGPNQPIILVLLDITPmLGVLEGVVMELODCAFLPLLEKIVIPSVNMEAFKDVDAIILVGSMPKR	94
Ts-cMDH	Q	GMEARDLLSSNVKIFKQGEALEKYAKKTVKVLVGNPANTNCLIMSKYAPs-iPKNFTALSRDHNIAIYQVAARKVGPVSECVKWNCIUGN	186
Eg-cMDH	Q	GEMARDLLSSNVKIFKEQGEALDKYAKKTVKVLVGNPANTNCLIMSKYAPs-iPKNFTALTRDHNIAIYQVAARKVGPVNTCVKNCIUGN	186
Sc-cMDH	D	GEMARDLLKANVKIFKCQGAALDKYAKKSVKVIIVGNPANTNCLTASKSAPs-iPKNFSCLTRDHNIAKAQIALKLGVTSDVKWNCIUGN	185
Sp-cMDH	E	GMEARDLLKANVKIFESQGAALINSYAKKTVKVLVGNPANTNCLVCMKNAPs-iPKNFTALTRDHNIAQAQIALANRLSVSCDAVQWNCIUGN	186
Mb-cMDH	E	GMEARDLLQNAKIFKMGQDLDLDRVAKKSVKVLVGNPANTNCLAMITAQYAPs-iPKSQFSLTHDLNIAKGFVARRLVGNPEQVKWNCIUGN	184
Dd-cMDH	P	GMDKARDLLKVVNVIKFEQGEALMNYASIGVKVLVGNPANTNCLTALMKASG-1PTSNSFALTRDHNIAQSMISEKVTGTVNVDNWHVNCIUGN	243
Tt-cMDH	P	GMEARDLLTINGNIFKQGAALDVTAKKTCCKSLVGNPANTNCLLAEVAKS-iPKQNFSLALTRDHNIAISQIALKALGNVSDVKWNCIUGN	226
Cs-cMDH	E	GMEARDLLKANVNIKFEQKALDQFAKKTVKVLVGNPANTNCLMMSKNAPs-iPQENFTALSRDFNIAKSIQIALRLGVPVSAVKNCIUGN	186
Ce-cMDH	E	GMEARDLLAANVKIFKSQKALAEYAKPTTKVIIVGNPANTNAFLAAKYAAGkiPAKNFSAALTRDHNIALAQIALKLTGTTIGNVKWNCIUGN	187
Xl-cMDH	E	GMEARDLLKANVNIKFSQGAALNKYSKSVKVIIVGNPANTNCLTALKSAPs-iPKNFSCLTRDHNIAKAQIALKLVNSDDVKWNCIUGN	186
Mc-cMDH	E	GMEARDLLAANVKIFKSMGHADTQAKKNIKVVVVGNPANTNCLAYCKKYAPs-iNPNFTALTRDHNIAQAQIALKLVNSSSVKWNCIUGN	186
Ts-cMDH	H	SNKQFPDLAHAVVtkg---gkQHPAKELINdEKWVKEVFTPCVQNRGAAVGLRKLSSAASAAKAIVDQMRDWWFGTkeGEWVMSVYSTGEh	277
Eg-cMDH	H	SNKQFPDLASHAVVtkg---gkQHPAKELINdEKWVKEVFTPCVQNRGAAVGLRKLSSAASAAKAIVDQMRDWWFGTkeGEWVMSVYSTGDh	277
Sc-cMDH	H	SSTQYPDVNHAKVklq---akEVGVEAVKdDQSWLKGFFITVQQRGAAVKARKLSSAMSAAKAICDHVRDIWFGTpeGEFVSMGLISDGNs	276
Sp-cMDH	H	SSTQYPDAAHASVdin---gkKENVVAAVKNDWLNGEFIKTVQVRGASVKARKLSSAMSAAKAICDHMKDWWFGTpeGSVWSMGVYNNGSy	277
Mb-cMDH	H	SATQYPDVSHAYVnpp---dgtKVKVTEAVNDdAWLHGEFVQSVQSRGGAVKARKLSSALSAAKAISDHMTWWFGTpdGEFTSMGVVSDGS-	276
Dd-cMDH	H	SQTQYPDVNHGVIlnyprnglIEPISSVNDKWLNEQFIPLVQNRGATVAAARKLSSAASANAIVGHVRDILLGTRdGEHVSMAVYSDGS-	337
Tt-cMDH	H	SSTQYPDVNHGTV1-----GKRIRQFINdEAYLNNAFIERVQKRGGEVAAARKLSSVMSAANAIVKDLHLHDWYFGTkeGEFVSMMAVYSDGS-	313
Cs-cMDH	H	SNTQFADVAHAKVmlp---ggEKSVEAVKdDSWIRNEYLSTIQKRGAAISARKLSSAMSAAKAIVDHMHWWFGTpeGEWVMSVSDGS-	277
Ce-cMDH	H	SGTQYPDVTHATVnkn---gtETDAYAAGVdNAFLQGPFIATVQKRGGVIEKRKLSSAMSAAKAICDHIHDWFGTkeGQFVSMMAVPSDGS-	278
Xl-cMDH	H	SSTQYPDASHASVtlq---gkDVGAFEAVKNDWLGKGGFITVQQRGAAVKARKLSSAMSAAKAICDHVRDIWFGTpeGQFVSMGLISDGNs	277
Mc-cMDH	H	SSTQYPDVNVQAVVdin---gkTNPVREAVKdDNLNNEFIKTVQQRGAAVKARKLSSAMSAAKAIVDHVRDWWMGVpdGTYSMAVPSDGS-	277
		Identity (%)	
Ts-cMDH	Y	GAPKDIYFSFPVTIKNGH-YKVVVDGLAMDdWKGKLFKITADELVDEREVAL	328
Eg-cMDH	Y	GAPKDIYFSFPVTIKDGH-YKVVVDGLSMDdWSRSLFNLDAELVDEREVAL	328
Sc-cMDH	Y	GVPPDLLYFSFPVTIKDKT-WKIVEGLPINDfSREKMDLTAKE LAEEKE TAF	327
Sp-cMDH	Y	GIPADLIYSLPVTIGKGGdEWSVVPGLTITdFAREKMDLTAKE LVDERD TAN	329
Mb-cMDH	Y	GTEGIIYFSFPVSVKNGQ-LNIVQGLSVDdFSREMMDRIDQELTQEKETAL	326
Dd-cMDH	Y	NPVKGLIYFSFPVTCHNGQ-WTIVQGLKINSSTQKIDATIKE LQEEKETAM	387
Tt-cMDH	Y	GVPKGLIYFSFPVTCNSFN-YKIVQGLNIDdFSKEKIRITTEE LLSSEKADAF	363
Cs-cMDH	Y	GAPLDIMFSFPVEIKDKK-WKIVKNLSMDdWAKSKFKITADELVEEREMAL	327
Ce-cMDH	Y	GIPQGLIYFSFPVTIEGGE-WKIVQGLSFDdFAKGIKIAATTE LEEERD DAL	328
Xl-cMDH	Y	GVPEGLMYSFPLTIKNTK-WKIVEGLCINDfSREKMDLTAKE LQEEKETAF	328
Mc-cMDH	Y	NIEEGLIYFSFPVRTKPDHtYEIVKGLTINDfSREKMDATEKE LSEKKNMAL	328

Figura 20. Alineamiento, comparación y análisis con el programa Conserved Domains entre la secuencia proteica de TscMDH y secuencias de cMDHs, reportadas en *E. granulosos* y organismos distantes evolutivamente. Los aminoácidos marcados participan con la unión al NAD⁺, al Malato²⁻ o a la unión de NAD⁺ y malato²⁻; los cuales se encuentran conservados en las secuencias alineadas, sugiriendo que las cMDHs son altamente conservadas en su función catalítica. Ts: *T. solium*, Eg: *Echinococcus granulosus*, Sc: *Sus scrofa* (Chain A), Sp: *Strongylocentrotus purpuratus*, Mb: *Monosiga brevicollis* MX1, Dd: *Dictyostelium discoideum*, Tt: *Tetrahymena thermophila*, Cs: *Clonorchis sinensis*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Xl: *Xenopus laevis*, Mc: *Mytilus californianus*.

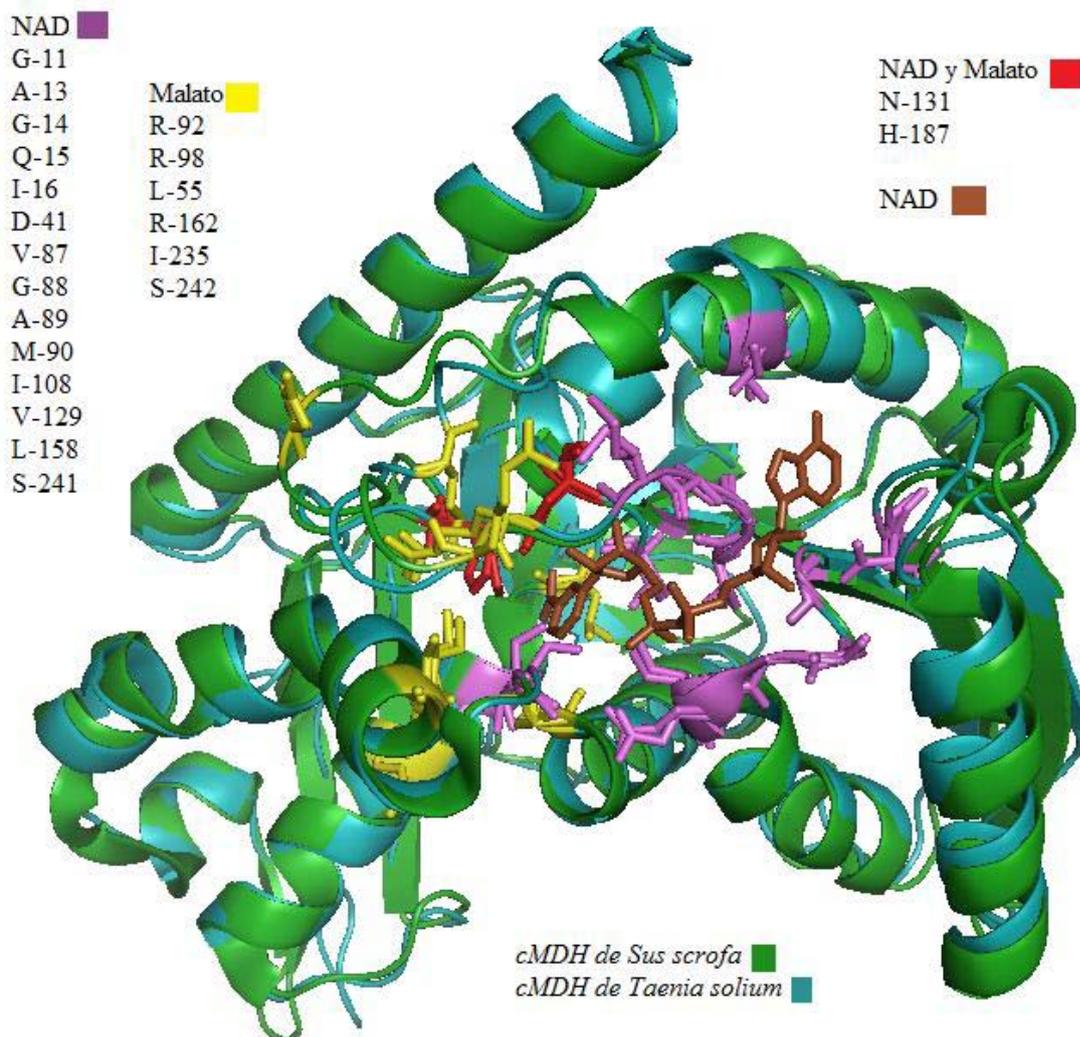


Figura 21. Predicción estructural de la TscMDH con base en la estructura cristalográfica de cMDH de *S. scrofa*. Las cMDHs son acopladas casi en su totalidad por lo que fue posible señalar los residuos de aminoácidos involucrados con la unión al NAD ■, al Malato ■ o la unión de NAD y malato ■.

5.5. Caracterización bioquímica

5.5.1. Estabilidad y capacidad catalítica de las enzimas, TscMDH y r-TscMDH en función del pH

En la figura 22 se observa la estabilidad de las TscMDH y r-TscMDH, evaluada por su capacidad catalítica en función del pH. La forma silvestre fue estable en el rango de pH de 7.5 a 10; de manera similar la enzima recombinante mostró estabilidad en el rango de pH de 7 a 9. En ambos casos, la mayor estabilidad detectada se establece en un pH ligeramente básico (8.0 – 9.0).

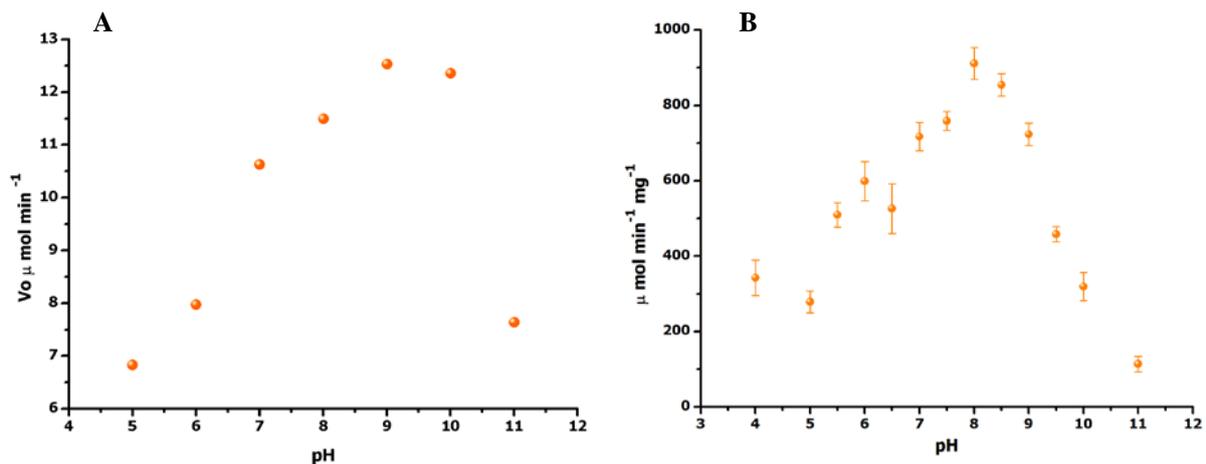


Figura 22. Estabilidad de las enzimas TscMDH en función del pH; tanto para la forma silvestre como para la recombinante, se analizó la reacción en el sentido de la oxidación del oxaloacetato vs pH. Se muestra el valor de los rangos de pH, donde la TscMDH (A) y la r-TscMDH (B) fueron más estables. Las figuras se obtuvieron mediante el programa Origin Pro 7.

5.5.2. pH óptimo de la reacción de las enzimas

El pH óptimo de reacción para cada una de las formas de la cMDH de *T. solium* se muestra en la figura 23. Los rangos de mayor actividad son de 7 a 8.5 y de 7.5 a 9 para la TscMDH y la r-TscMDH, respectivamente. Nótese que estos valores coinciden con la estabilidad de la proteína en función del pH y de su punto isoeléctrico (pI 8.1).

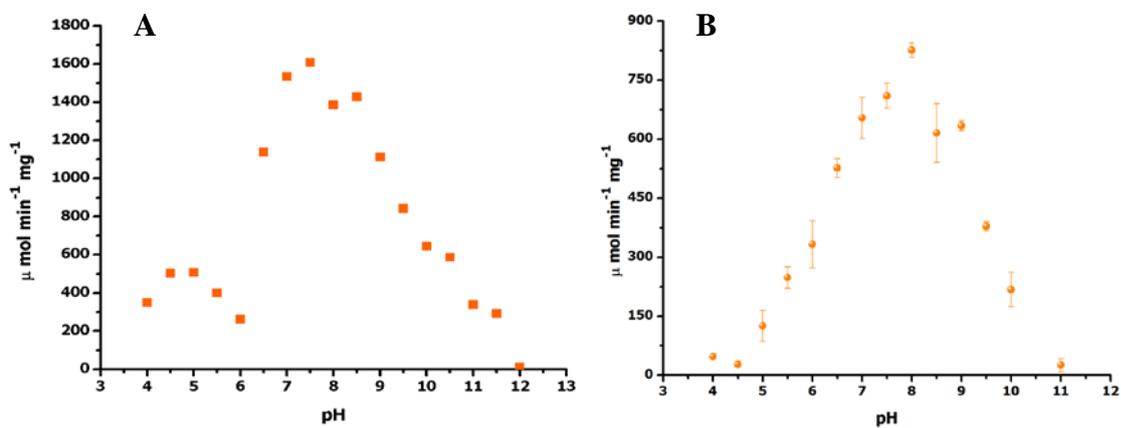


Figura 23. A) pH óptimo para la reacción catalítica de la TscMDH B) pH óptimo para la reacción catalítica de la r-TscMDH. Las figuras y los datos se obtuvieron, procesando las velocidades de reacción a diferentes pH, con el programa Origin Pro 7.

5.5.3. Actividad de las enzimas en función de la temperatura

La figura 24 muestra la actividad enzimática de la forma silvestre y de la recombinante de la TscMDH en función de la temperatura. Para el caso de la enzima nativa, la actividad se mantuvo constante entre los 5 y 45°C; a los 50°C la actividad enzimática decae alrededor del 50 % y a los 65°C se observa totalmente inactiva. En el caso de la cMDH recombinante se registró la mejor actividad enzimática entre los 15 y 30°C; en temperaturas de 5 y 10°C, su actividad es de alrededor del 50% y a los 35 °C la actividad decae alrededor del 70%, observándose totalmente inactiva a los 45 °C. Estos datos sugieren que la enzima clonada presenta menor estabilidad a temperaturas ligeramente elevadas.

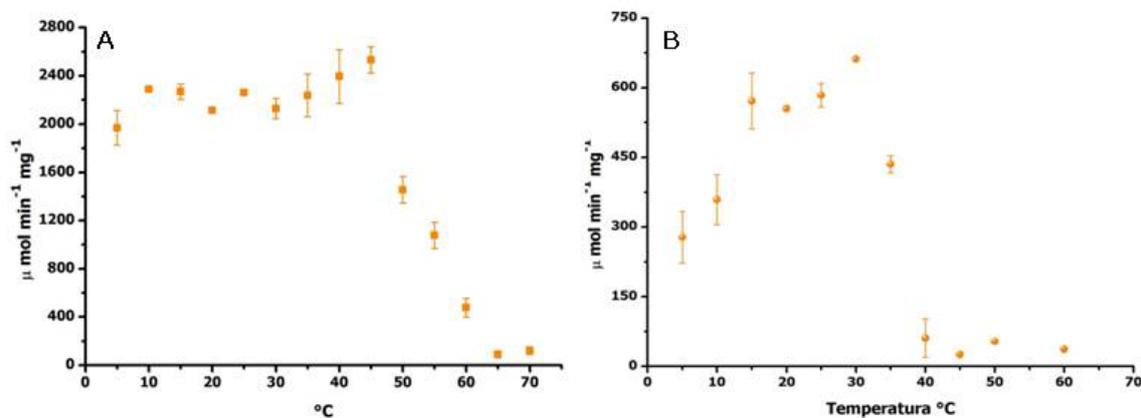


Figura 24. A) Se observa el efecto de la temperatura en la estabilidad catalítica de la TscMDH, la enzima es estable de 5 – 45°C, mientras que la r-TscMDH (B) solo es estable en el rango de 15 – 30 °C.

5.5.4. Determinación del peso molecular nativo y del monómero de la enzima TscMDH

LA figura 25A muestra la cromatografía del extracto crudo de cisticercos de *T. solium* en Sefacril S- 200. La línea continua presenta el comportamiento de la proteína a 280 nm y en estrellas negras la actividad de cMDH. La mayor actividad catalítica se registró en un volumen de elución de 23 ml. Este dato se utilizó para obtener el coeficiente de distribución (Kav) de esta muestra el cual, al interpolarlo en la gráfica construida con valores de Kav de proteínas de peso molecular conocido (fig. 25 B), dio un valor de 65.6 KDa para la forma nativa de la TscMDH

El peso molecular del monómero de la TscMDH se determinó mediante su análisis en geles de SDS – PAGE (Laemmli UK, 1970) (figura 10). La figura 26 muestra el peso molecular de proteínas estándar frente a su movilidad relativa (Rf) en la matriz de acrilamida. La TscMDH tuvo un Rf de 0.52 y un peso molecular de 33.64 kDa. Este dato junto con el peso molecular de la enzima nativa, indican que la TscMDH es un dímero en su estado nativo.

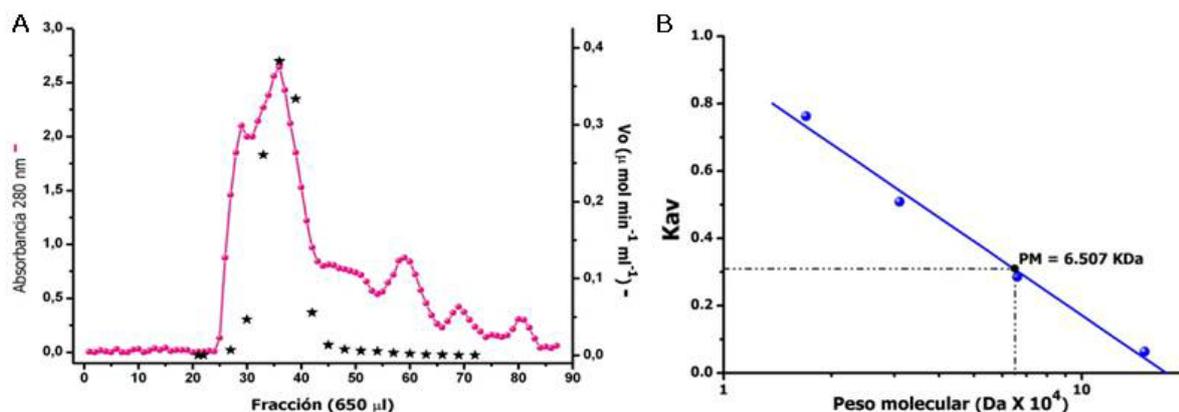


Figura 25. A) Cromatografía de un extracto crudo de cisticercos de *T. solium* en Sepacril S-200, se observa tanto valores de absorbancia a λ 280 nm \bullet como la actividad catalítica de malato deshidrogenasa \star . B) Extrapolación de los valores de K_{av} (coeficiente de distribución) de la fracción excluida de Sepacril S-200 con actividad de MDH, en la gráfica construida con los valores de K_{av} de proteínas controles. Se observa que la TscMDH en su forma nativa pesa 6.5 kDa.

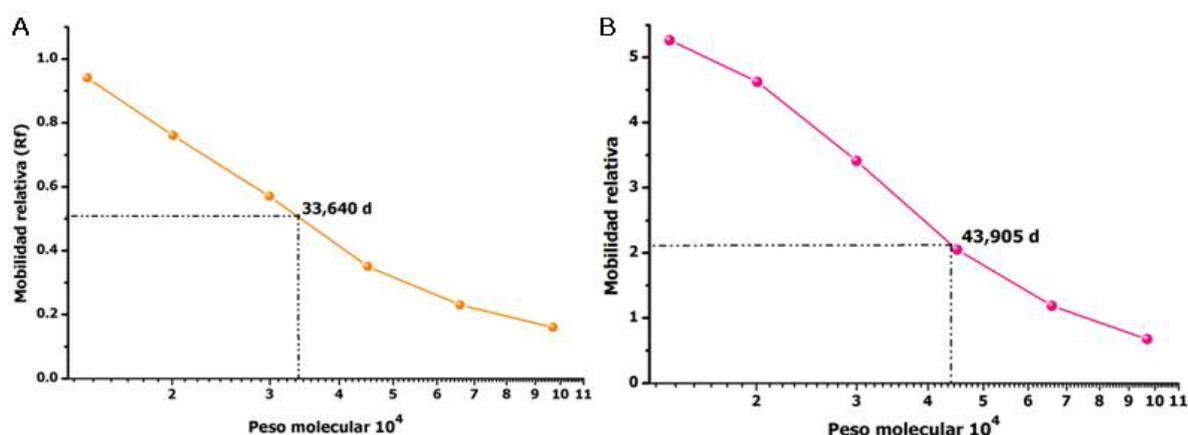


Figura 26. Determinación del peso molecular de cada uno de los monómeros de la enzima mediante su movilidad relativa en un gel de SDS-PAGE al 15 %, usando proteínas controles de peso molecular conocido. A) TscMDH, cada sub-unidad de la enzima silvestre pesa 33.64 kDa. B) r-TscMDH, el peso molecular del monómero de la enzima recombinante es de 43.9 kDa.

5.5.5. Afinidad de las enzimas por sustratos homólogos al NAD

Se evaluó la actividad de la TscMDH y de la r-TscMDH con diferentes co-sustratos homólogos al NAD (tabla VI). Tanto la enzima silvestre como la recombinante mostraron actividad catalítica con los compuestos 3-acetil piridina adenina (APA) y nicotinamida guanina (NG). La TscMDH mostró valores de actividad específica muy similares entre el NAD (sustrato control) y el APA; 22.5 ± 0.085 vs 25 ± 1.7 $\text{m mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, respectivamente y poca actividad con el NG (4.17 ± 0.31). En contraste, la enzima recombinante tuvo actividad catalítica significativamente mayor con el NAD (379.3 ± 18) que con el APA (133.2

± 7.6) o el NG (38.26 ± 2.41); el resto de los nucleótidos estudiados: β -nicotinamida mononucleótido (NMN), ácido nicotínico adenina (NAA), β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), β -nicotinamida adenina dinucleótido hidratado (NADH₂O) y β -nicotinamida 1, N₆-etenodenina (N1N₆E); no mostraron ninguna señal de actividad catalítica.

Tabla VI. Co-sustratos homólogos de NAD

Sustrato	[Sustrato] mM	Act. Específica $\mu \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$
NAD (control)	0.52	* 22.5 ± 0.85 ▼ 37.93 ± 1.8
NG	0.8	* 4.17 ± 0.31 ▼ 3.83 ± 0.24
N ₁ N ₆ E	----	----
α NAD	----	----
APA	0.5	* 25.76 ± 1.7 ▼ 13.32 ± 0.76
NMN	----	----
NAA	----	----
NADP	----	----

* TscMDH ▼ r – TscMDH

α – Nicotinamida adenina dinucleótido (α NAD)

3 – acetil – piridina adenina (APA)

β – nicotinamida mononucleotido (NMN)

Ácido nicotínico adenina (NAA)

β – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP)

β – nicotinamida adenina dinucleótido hidratado (NADH₂O)

Nicotinamida guanina (NG)

β nicotinamida 1, N₆ – etenodenina (N1N₆E)

5.6. Caracterización cinética y estudios de inhibición

5.6.1. Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de MM (K_m), velocidad máxima de reacción (V_{max}), número de recambio (k_{cat}) y la constante de especificidad (k_{cat}/K_m).

La TscMDH silvestre y la r-TscMDH se caracterizaron cinéticamente. Para cada uno de sus sustratos (malato, oxaloacetato, NAD y NADH) se determinó la velocidad máxima de la reacción (V_{max}), la afinidad de la enzima hacia ellos (K_m), las constantes catalíticas o

número de recambio (k_{cat}) y la constante de especificidad (k_{cat}/K_m), que se refiere a la capacidad de la enzima para tomar el sustrato.

La figura 27A muestra la gráfica de la velocidad inicial ($\mu\text{ mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) de la TscMDH en función de la concentración de malato. Se observa que a bajas concentraciones de sustrato la velocidad inicial se incrementa rápidamente; sin embargo, a concentraciones elevadas de sustrato (después de 2.5 mM), la velocidad de reacción no varía drásticamente entre las concentraciones empleadas, indicando que los sitios activos de la enzima se encuentran ocupados y prácticamente se ha alcanzado la velocidad máxima de reacción (V_{max}). Es decir, se estabiliza la velocidad de la reacción independientemente de la concentración saturante del malato (ya no existen sitios activos libres en la enzima). Tal comportamiento se ajusta al modelo de Michaelis – Menten (MM), el cual nos permite determinar la K_m y la V_{max} de la enzima.

Adicionalmente, se construyeron gráficas de doble recíproca (Lineweaver-Burk), para linealizar los datos de velocidad inicial ($\mu\text{ mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) obtenidos vs la concentración de malato (figura 27B). Las gráficas de LB corroboraron los parámetros cinéticos ajustados con la ecuación de MM.

En la figura 28 se observan las gráficas de MM y de LB para la r-TscMDH. La enzima recombinante también se ajustó al modelo de MM; sin embargo, su K_m disminuye casi 3 veces y su V_{max} se mantiene constante en comparación con la forma nativa. En la tabla X se muestran los parámetros cinéticos de las enzimas para cada uno de sus sustratos. Se observa que cuando las enzimas (silvestre y recombinante) catalizan en dirección de la oxidación del malato, tanto la K_m y V_{max} del NAD y malato para ambas tienen valores muy similares; sin embargo, cuando vemos los valores en el sentido de la reducción del OAA, los valores de la K_m en la r-TscMDH son mayores a los de la enzima nativa y la V_{max} en la recombinante es alrededor de 3 veces menor, sugiriendo que la enzima clonada perdió tanto afinidad por el OAA y el NADH como velocidad para transformarlos. Este hecho se manifiesta en los valores de k_{cat}/K_m , la k_{cat} nos muestra el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por segundo; para la enzima silvestre, tanto el NADH como el OAA producen 3 veces más que la enzima clonada. En el caso de la constante de especificidad K_{cat}/K_m que nos refiere la velocidad de conversión de los sustratos, es de un orden mayor en la TscMDH que en la recombinante (tabla VII).

Es importante mencionar que las gráficas obtenidas con cada uno de los sustratos empleados formaron una hipérbola rectangular característica del modelo MM.

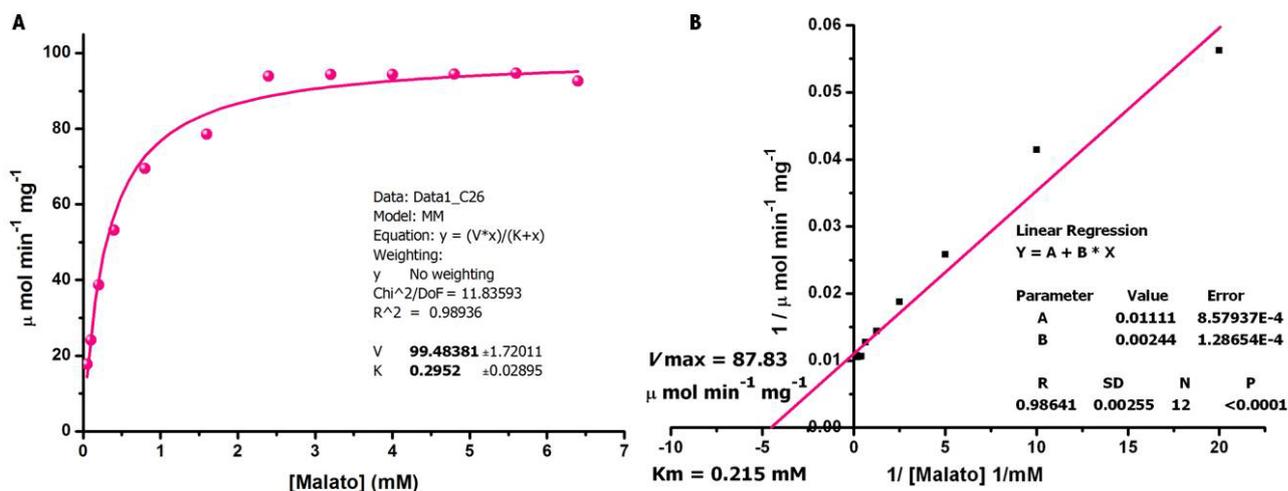


Figura 27. A) Gráfica de Michaelis – Menten, donde se observan los parámetros cinéticos de V_{\max} y K_m para el malato con la TscMDH B) Gráfica de Lineweaver – Burk, dobles inversas, para corroborar los parámetros cinéticos de V_{\max} y K_m para el malato con la TscMDH

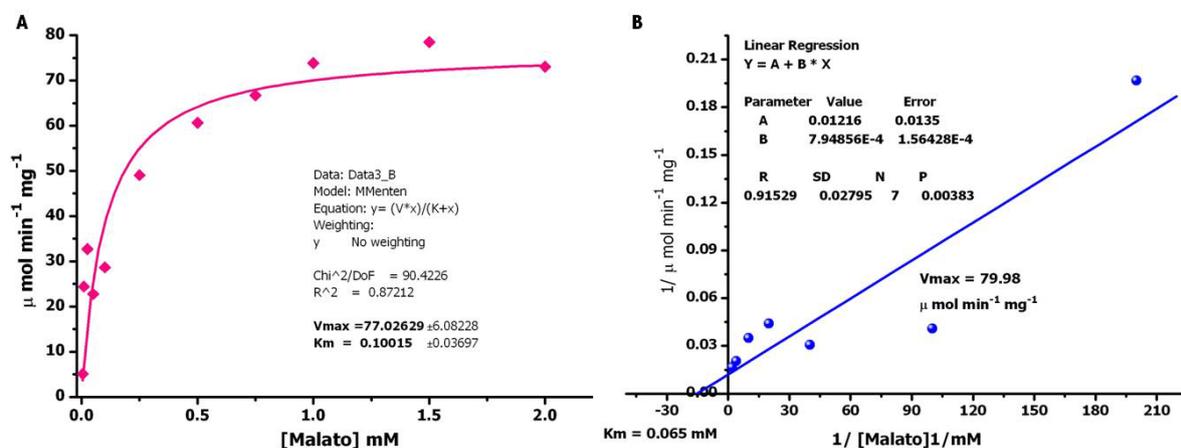


Figura 28. A) Gráfica de Michaelis – Menten, se observan los parámetros cinéticos de V_{\max} y K_m para el malato con la r – TscMDH B) Gráfica de Lineweaver – Burk, dobles inversas, para corroborar los parámetros cinéticos de V_{\max} y K_m para el malato con la r – TscMDH

Tabla VII. Parámetros cinéticos de la TscMDH y de la r-TscMDH

Sustrato	Km (μ M)	V max μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹	Kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (s ⁻¹ M ⁻¹)
NADH *	48	1490	835.4	1.74 x 10 ⁷
	▼ 167	721.4	404.5	2.42 x 10 ⁶
OAA *	24	1714	961	4 x 10 ⁷
	▼ 44	450.3	252.5	5.74 x 10 ⁶
NAD *	49	104.3	58.5	1.2 x 10 ⁶
	▼ 42	79.12	43.4	1.06 x 10 ⁶
Malato *	215	87.8	49.2	2.29 x 10 ⁵
	▼ 100	77.03	43.2	4.32 x 10 ⁵

* TscMDH ▼ r – TscMDH

5.6.2. Estudios de inhibición con NaAsO₂ sobre la enzima TscMDH

Una característica común de las cMDHs es que son inhibidas con el NaAsO₂. Como parte de la caracterización general de la enzima TscMDH, se llevaron a cabo ensayos enzimáticos en presencia de concentraciones crecientes de NaAsO₂ en ambos sentidos de la reacción. El análisis de estos datos (figura 29) muestra que el NaAsO₂ inhibe la actividad catalítica de la TscMDH. En el caso de la reducción del OAA, se requiere de una concentración de 65.5 mM de NaAsO₂ para inhibir la mitad de la actividad de la enzima, mientras que en el sentido de oxidación de malato la concentración del inhibidor requerida para tener el efecto de inhibición al 50 % es de 308 mM.

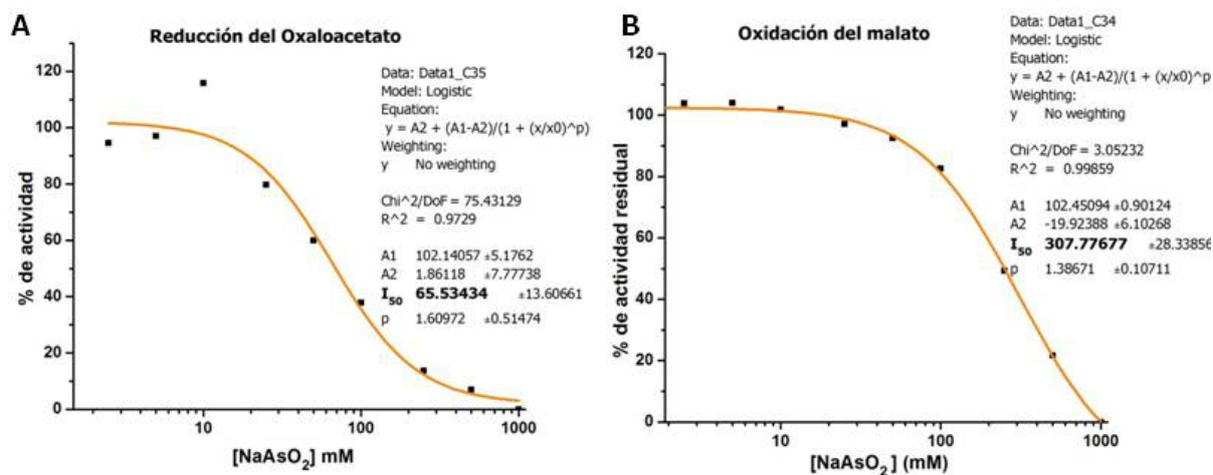


Figura 29. Se observa el porcentaje de inhibición residual provocada por la concentración creciente del inhibidor NaAsO₂ en la TscMDH, tanto en la reducción del OAA (A) como en la oxidación del malato (B).

Continuando con los estudios de inhibición con el NaAsO_2 , se realizaron ensayos con dos concentraciones diferentes del inhibidor –las cuales se determinaron a partir de los valores I_{50} obtenidos– y cinco concentraciones crecientes de NADH o NAD, dependiendo el sentido de la reacción. El propósito de estos ensayos fue determinar el mecanismo de inhibición del NaAsO_2 sobre el sitio activo de NAD/NADH. En la figura 30 (A en el sentido de reducción del OAA y B en el sentido de oxidación de malato) se muestran gráficas de doble recíproca (LB); la línea marcada con cuadros negros corresponde a la enzima en ausencia del inhibidor y las líneas con círculos rojos y triángulos verdes a las dos diferentes concentraciones del inhibidor. Estas dos líneas son equidistantes entre sí y con la línea sin NaAsO_2 . El intercepto de cada una de estas líneas, tanto en el eje de las abscisas como en el de las ordenadas, es diferente en cada caso, implicando la modificación de la K_m y de la V_{max} ; por lo tanto el NaAsO_2 presenta un mecanismo de inhibición acompetitivo con respecto al nucleótido (NAD ó NADH) en ambos sentidos de la reacción. En la figura 31, se muestran los valores de las constantes de inhibición (K_i) obtenidas para el NaAsO_2 en ambos sentidos de la reacción; éstas gráficas fueron construidas tomando los valores, tanto del intercepto en el eje $1/V_{max}$ (A y C), como el intercepto en el eje $1/K_m$ (B y D). Así el promedio de dichos valores permitió determinar una K_i de 8.2 mM en el sentido de la reacción de oxidación del malato y en el sentido de la reducción del OAA, la K_i es de 75 mM, esta concentración es 10 veces mayor que la requerida para inhibir la reacción en el sentido de reducción del oxaloacetato.

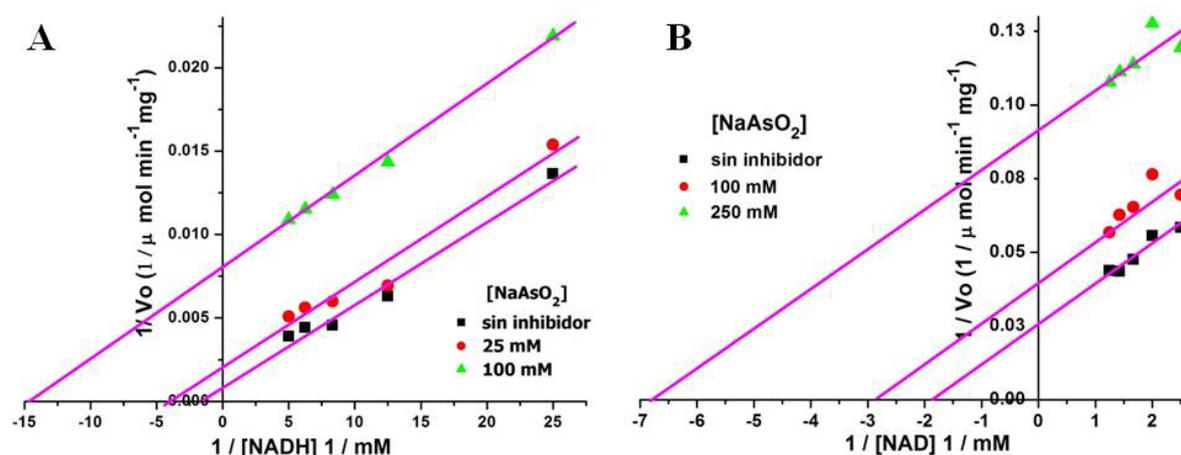


Figura 30. A) Gráfica de doble recíproca (LB) en el sentido de reducción del OAA; en ausencia \blacksquare o presencia de 25 \bullet y 100 \blacktriangle mM de NaAsO_2 . B) Gráfica de doble recíproca (LB) en el sentido de oxidación de malato; en ausencia \blacksquare o presencia de 100 \bullet y 250 \blacktriangle mM de NaAsO_2 . Las gráficas presentan un mecanismo de inhibición de tipo acompetitivo; tanto la K_m como la V_{max} son afectadas por la presencia del inhibidor, en ambos sentidos de la reacción enzimática.

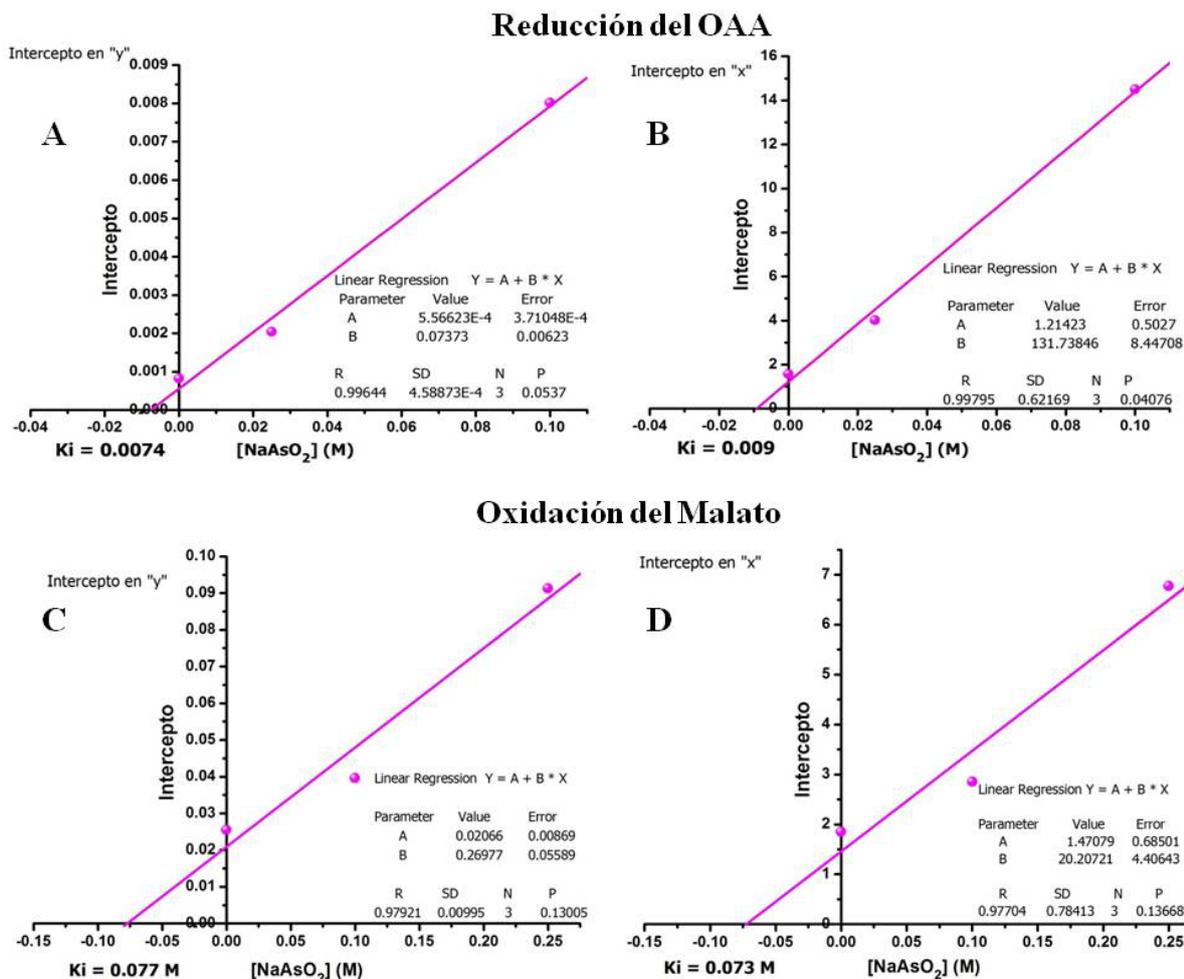


Figura 31. Determinación de la K_i del NaAsO_2 en la actividad de TscMDH, en el sentido de reducción del OAA (A y B) y oxidación de malato (C y D). Las gráficas muestran los valores de intercepto en el eje $1/V_{\text{max}}$ (A y C) y en el eje $1/K_m$ (B y D) en función de la concentración del NaAsO_2 .

5.6.3 Determinación del mecanismo cinético de la enzima TscMDH

Como se ha venido mencionando, la TscMDH cataliza la reacción tanto en sentido de la reducción del OAA como en el sentido de la oxidación del malato; estas reacciones están condicionadas al dinucleótido NAD/NADH y a la oxido/reducción de los sustratos malato y oxaloacetato, respectivamente; es decir la TscMDH es una enzima que cataliza una reacción bisustrato; en el sentido de oxidación del malato, la enzima oxida el grupo hidroxilo de malato a una cetona en una reacción dependiente de NAD^+ , produciendo OAA y $\text{NADH} + \text{H}^+$. Las reacciones bisustrato se estudian en función de analizar si se une primero un sustrato antes que el otro, importando el orden o no y cómo es la liberación de los productos (Voet D, *et al.* 2007). Con este fin se realizaron ensayos enzimáticos que nos permitieran observar la velocidad inicial (V_0) de la enzima al variar las concentraciones de los sustratos.

La estrategia consistió en variar las concentraciones de los sustratos (OAA y NADH); en la figura 32 se muestran las condiciones empleadas y se ejemplifica la estrategia a seguir para obtener una serie de datos que al graficar forman una hipérbola en las figuras 33 y 34.

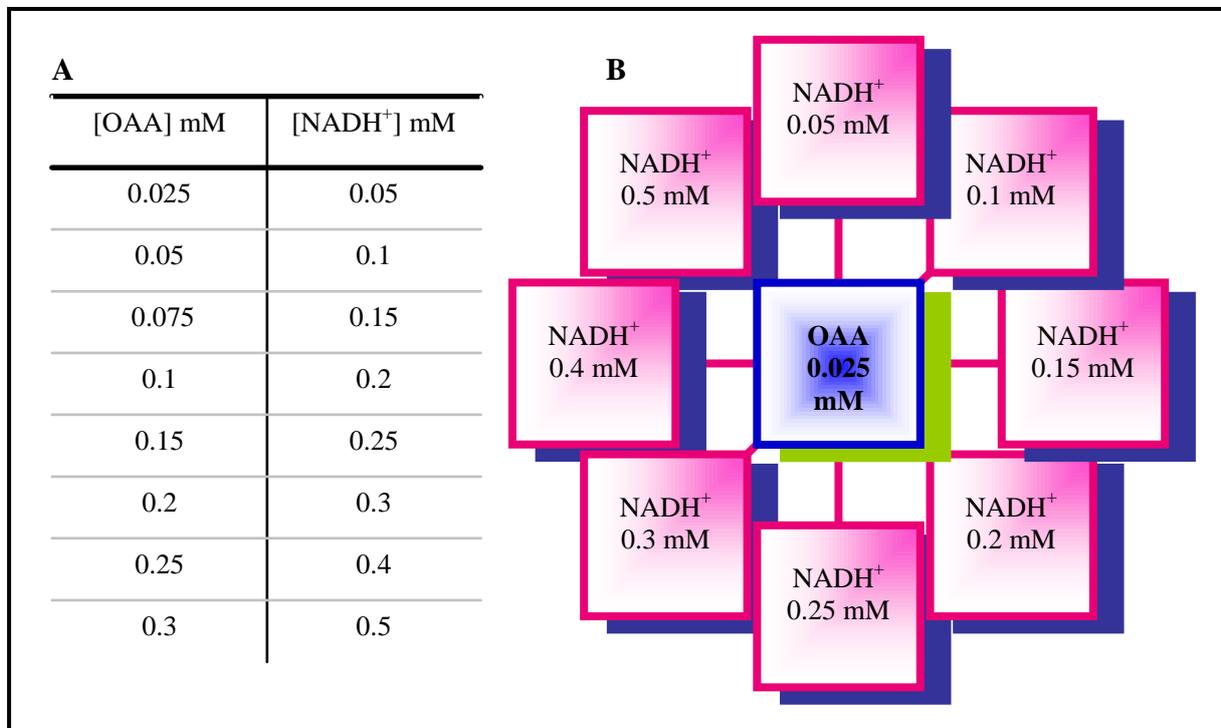


Figura 32. A) Se muestran las concentraciones empleadas del OAA y del NADH para determinar el mecanismo de reacción, las concentraciones mostradas fueron probadas todas vs todas, en la figura B se ejemplifica el caso de OAA 0.025 mM como sustrato constante y el NADH como sustrato variable. Esta metodología fue empleada con cada una de las concentraciones de OAA.

En la figura 33 observamos la velocidad inicial de la enzima en función de la concentración variable del OAA; cada una de las hipérbolas corresponde a una concentración constante diferente de NADH y se ajustan al modelo de MM. Es decir, de acuerdo a la concentración creciente del OAA, las V_o al principio incrementan rápidamente pero conforme aumenta la concentración del OAA se alcanza la V_{max} , reflejando la saturación de los sitios activos de la enzima por sus sustratos. En la figura 34 se muestra el mismo tipo de gráfica, velocidad inicial frente a la concentración variable del NADH y cada hipérbola corresponde a una concentración constante diferente de OAA. Los datos se ajustan también al modelo de MM.

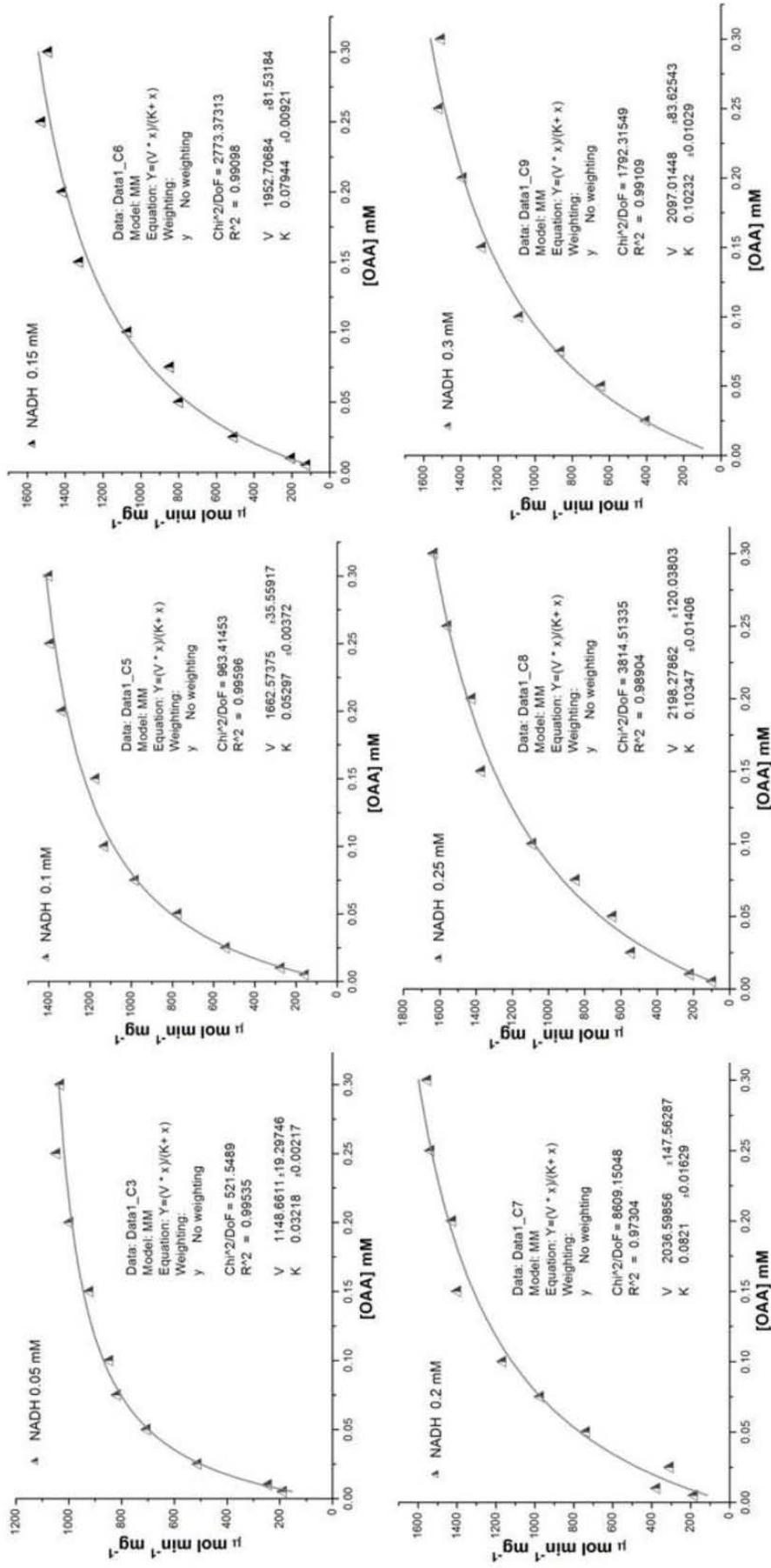


Figura 33. Gráficas de velocidad inicial en función de la concentración variable del OAA. Cada una de las hipérbolas formadas corresponde a una concentración creciente de NADH y cada una de ellas se ajusta al modelo de Michaelis – Menten.

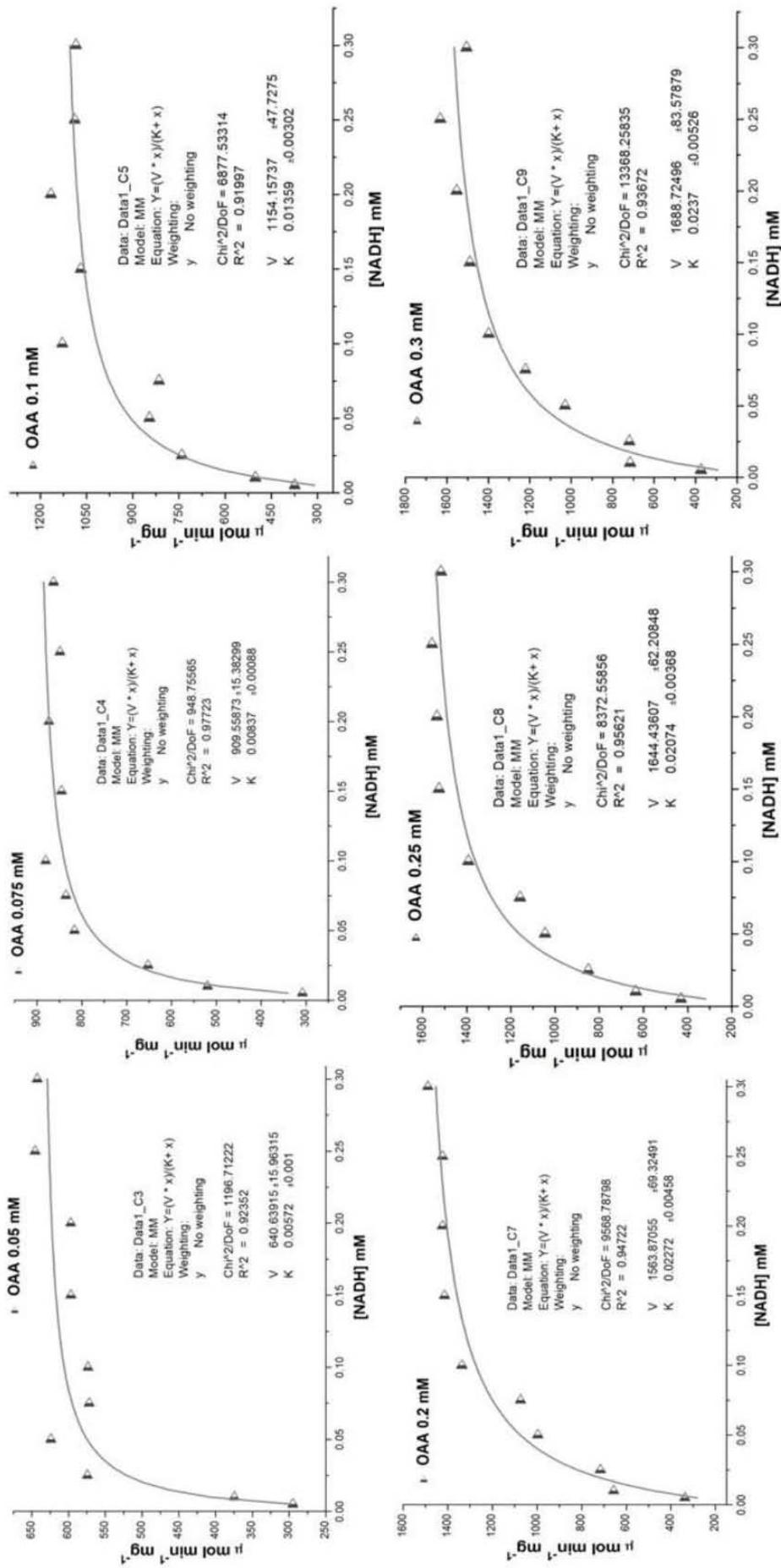


Figura 34. Gráficas de velocidad inicial en función de la concentración variable del NADH. Cada una de las hipérbolas formadas corresponde a una concentración creciente de OAA y cada una de ellas se ajusta al modelo de Michaelis – Menten.

Con la finalidad inferir sobre el mecanismo de reacción, se analizó el efecto de la concentración de los sustratos sobre la pendiente de la reacción y/o el intercepto a la izquierda del eje $1/V_o$, mediante la construcción de gráficas de doble recíproca (LB). En la figura 35 se representa a $1/V_o$ (Y) vs a $1/[NADH]$ (X) usando al [OAA] en condición constante y creciente, obteniendo gráficas lineales con intersección en el eje $1/V_o$, las cuales coinciden en la parte izquierda del eje $1/V_o$, sin la modificación de la K_m . Cuando las variables son $1/V_o$ vs $1/[OAA]$ y [NADH] constante y creciente, también se obtiene una gráfica lineal con intercepto en el eje $1/V_o$ y todas las gráficas lineales interceptan en la parte izquierda del eje $1/V_o$ (figura 36). Este tipo de comportamiento: entrecruzamiento de las gráficas lineales a la izquierda del eje $1/V_o$, es indicativo de un mecanismo bi – bi secuencial.

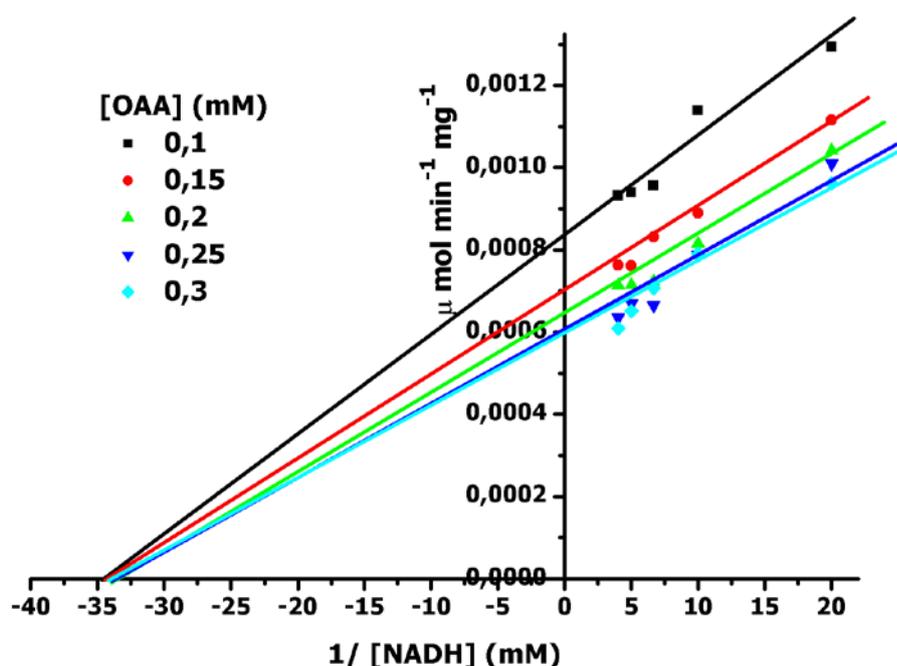


Figura 35. Representación de dobles recíprocas (LB) de la reacción enzimática de TscMDH con un mecanismo bi – bi secuencial, $1/V_o$ vs $1/[NADH]$ para diversas concentraciones de OAA.

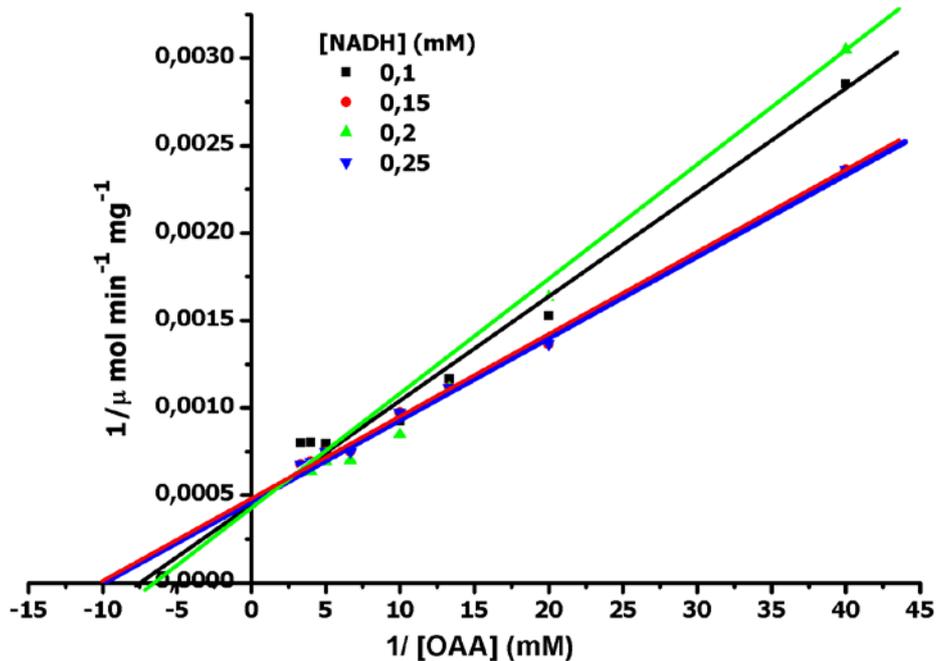
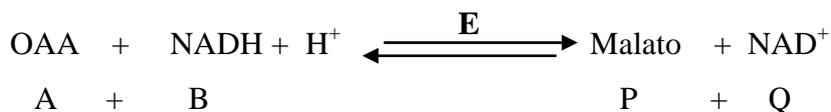


Figura 36. Representación de dobles recíprocos (LB) de la reacción enzimática de TscMDH con un mecanismo bi – bi secuencial, $1/V_o$ vs $1/[OAA]$ para diversas concentraciones de NADH.

Para determinar sí el mecanismo bi–bi secuencial es ordenado o al azar, nos apoyamos en los estudios de inhibición por producto, ya que los productos de la reacción son formados en el sitio catalítico en la superficie de la enzima y son los sustratos para la reacción reversa, por lo que pueden ocupar el mismo sitio activo actuando como inhibidores.

Si consideramos la reacción de la TscMDH



El NADH actúa como cofactor y forma al complejo EB, el cual da lugar al complejo EAB y este a su vez al complejo EPQ, pero cuando el producto Q compite directamente con B, evita la formación del complejo EAB y por lo tanto Q es inhibidor competitivo de B. Al analizar el tipo de inhibición por producto obtenidos de nuestros datos (tabla VIII), observamos que el NAD (Q) es inhibidor competitivo del NADH (B). En el resto de los ensayos de inhibición, A es inhibido competitivamente por P y Q; y B es inhibido competitivamente por P; es decir, la enzima presenta un solo sitio para B y Q y al parecer A y P tienen cada uno su propio sitio de unión. En un mecanismo bi–bi secuencial, solo los sustratos que actúan como cofactores

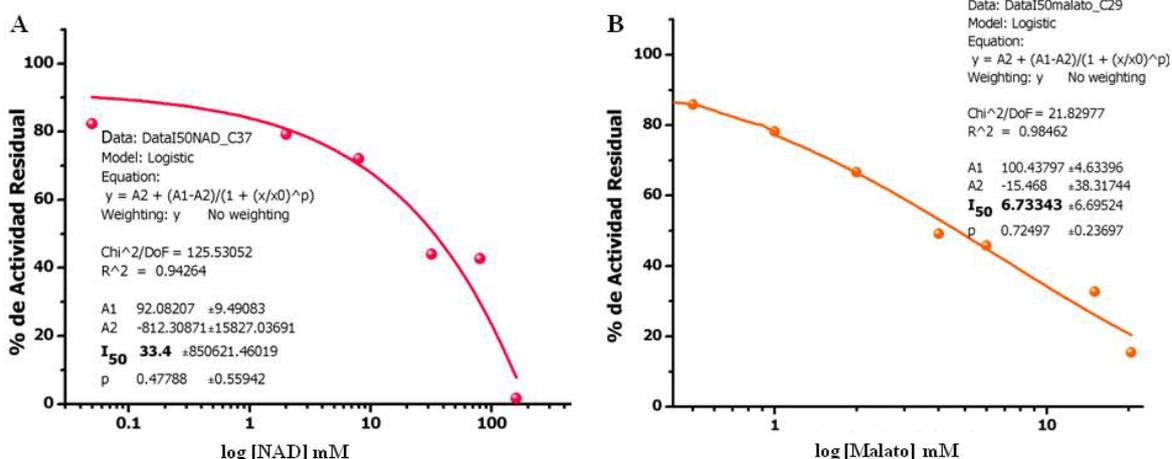
compiten por el mismo sitio, mientras que el resto de los sustratos y productos deben de presentar un tipo de inhibición no competitivo, datos coincidentes a los que obtuvimos en los ensayos de inhibición por producto (tabla XI). A diferencia de un mecanismo del tipo secuencial bi-bi azaroso, en el que no importa el orden de unión de los sustratos, dado que tanto los dos productos como los dos sustratos pueden combinarse directamente con la enzima, tanto P como Q son inhibidores competitivos de A cuando la [B] es constante y de B cuando la [A] es constante (Voet D, *et al.* 2007). Por tales circunstancias la TscMDH presenta un mecanismo de reacción bi -bi ordenado secuencial.

5.6.4. Estudios de inhibición por producto con la enzima TscMDH

La figura 37 muestra las gráficas de inhibición con los valores de I_{50} para cada uno de los productos involucrados en la catálisis de la cMDH. En el sentido de la reducción del oxaloacetato; el NAD y el malato se emplearon para inhibir la actividad de la TscMDH, demandando 33.4 mM de NAD (A) y 6.7 mM de malato (B) para disminuir su actividad en un 50%. En la reacción de oxidación de malato, los inhibidores fueron el OAA y el NADH. La concentración determinada del NADH para disminuir la actividad de la enzima al 50% de actividad fue de 42.5 mM (C), mientras que para el OAA fue de 0.32 mM (D).

Los valores de I_{50} para el NAD y NADH son muy semejantes entre sí (33.4 mM vs 42.5 mM), a diferencia del OAA y malato donde existe una diferencia de concentración de 20 veces entre ellos. El OAA inhibe de forma más eficiente la actividad de la enzima, es decir se requiere de menor concentración de éste para inactivar la reacción de la oxidación de malato; esta observación coincide con el valor de su K_m , la enzima es muy afín al OAA.

Reducción de OAA



Oxidación de malato

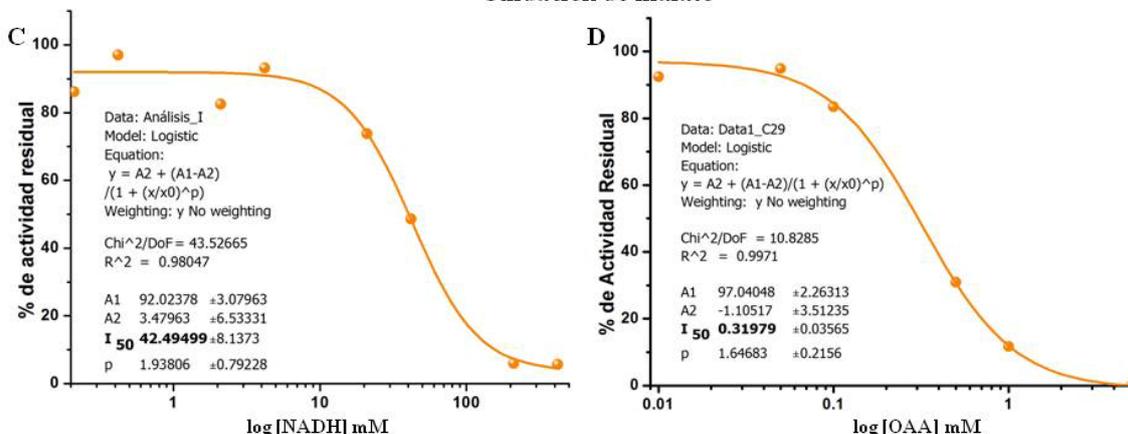


Figura 37. Se observa el porcentaje de inhibición residual provocada por la concentración creciente de inhibidor. En la reacción de reducción del OAA se usaron como inhibidores al NAD (A) y al malato (B) y en la reacción oxidación de malato al NADH (C) y al OAA (D).

Una vez que fueron determinados los valores de I₅₀, se diseñaron experimentos para determinar el tipo de inhibición de cada producto en ambos sentidos de la reacción. Se mantuvo fija la concentración de un sustrato, se varió la concentración del otro sustrato y se emplearon dos diferentes concentraciones del producto en el intervalo en el cual inhibe.

En la figura 38 se muestran los resultados obtenidos en forma de gráficas de Lineweaver – Burk en la dirección de reducción del OAA; los patrones de inhibición se ajustan a los tipos competitivo y no competitivo (A - D), empleando el malato y NAD como inhibidores, además se presentan los re-gráficos secundarios, los cuales se construyeron en función de la concentración del inhibidor y del valor de la pendiente obtenida de cada una de las rectas del mecanismo de inhibición (a – d). En la figura 39 se muestran los patrones de inhibición por producto correspondientes a la reacción en el sentido de oxidación del malato.

Reducción del oxalacetato

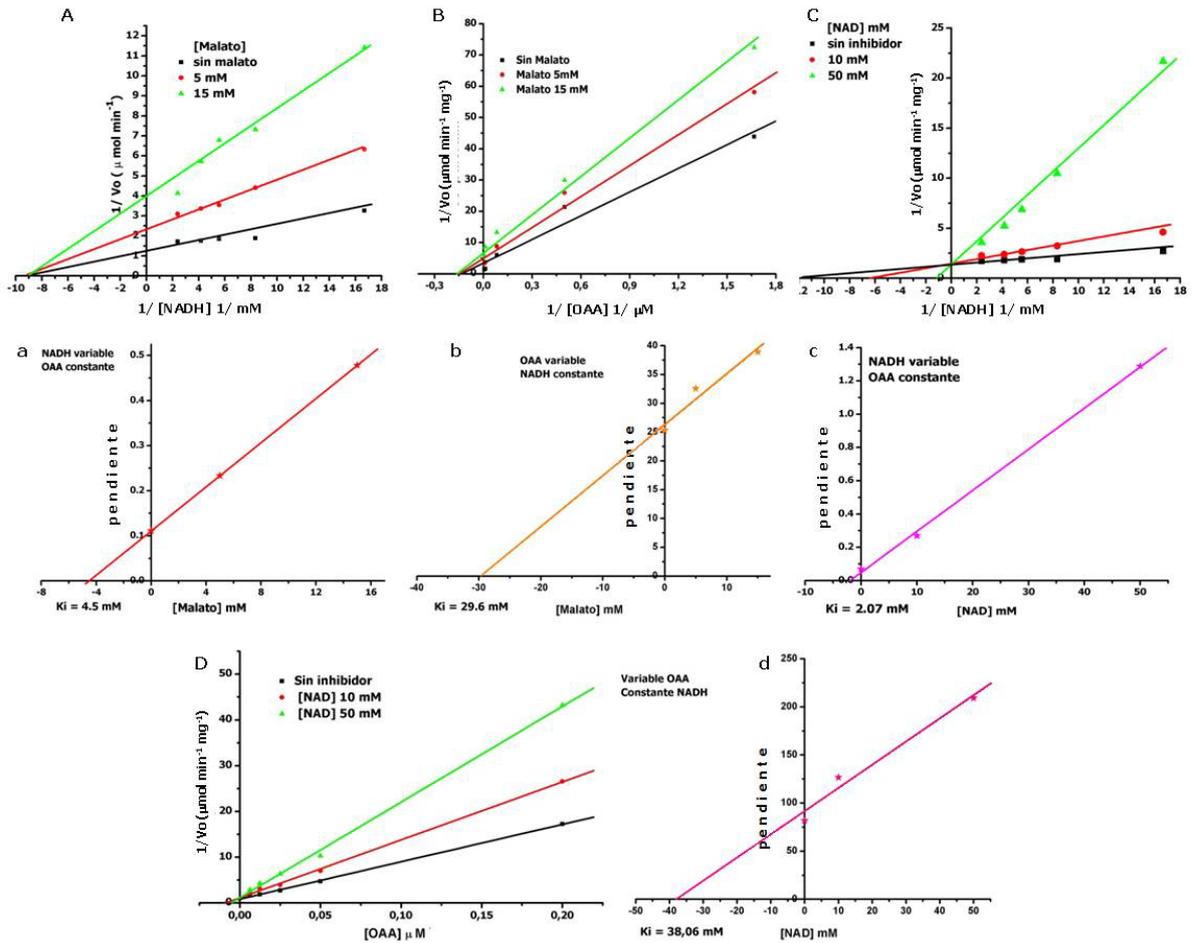


Figura 38. Mecanismos de inhibición obtenidos por medio de gráficas de doble recíproca (LB). A) Sustrato variable NADH, en ausencia ■ o presencia de 5 ● y 15 ▲ mM de malato, su valor de K_i se muestra en la figura a. B) Sustrato variable OAA, en ausencia ■ o presencia de 5 ● y 15 ▲ mM de malato, su valor de K_i se muestra en la figura b. C) Sustrato variable NADH, en ausencia ■ o presencia de 10 ● y 50 ▲ mM de NAD, su valor de K_i se muestra en la figura c. D) Sustrato variable OAA, en ausencia ■ o presencia de 10 ● y 50 ▲ mM de NAD, su valor de K_i se muestra en la figura d.

Oxidación de malato

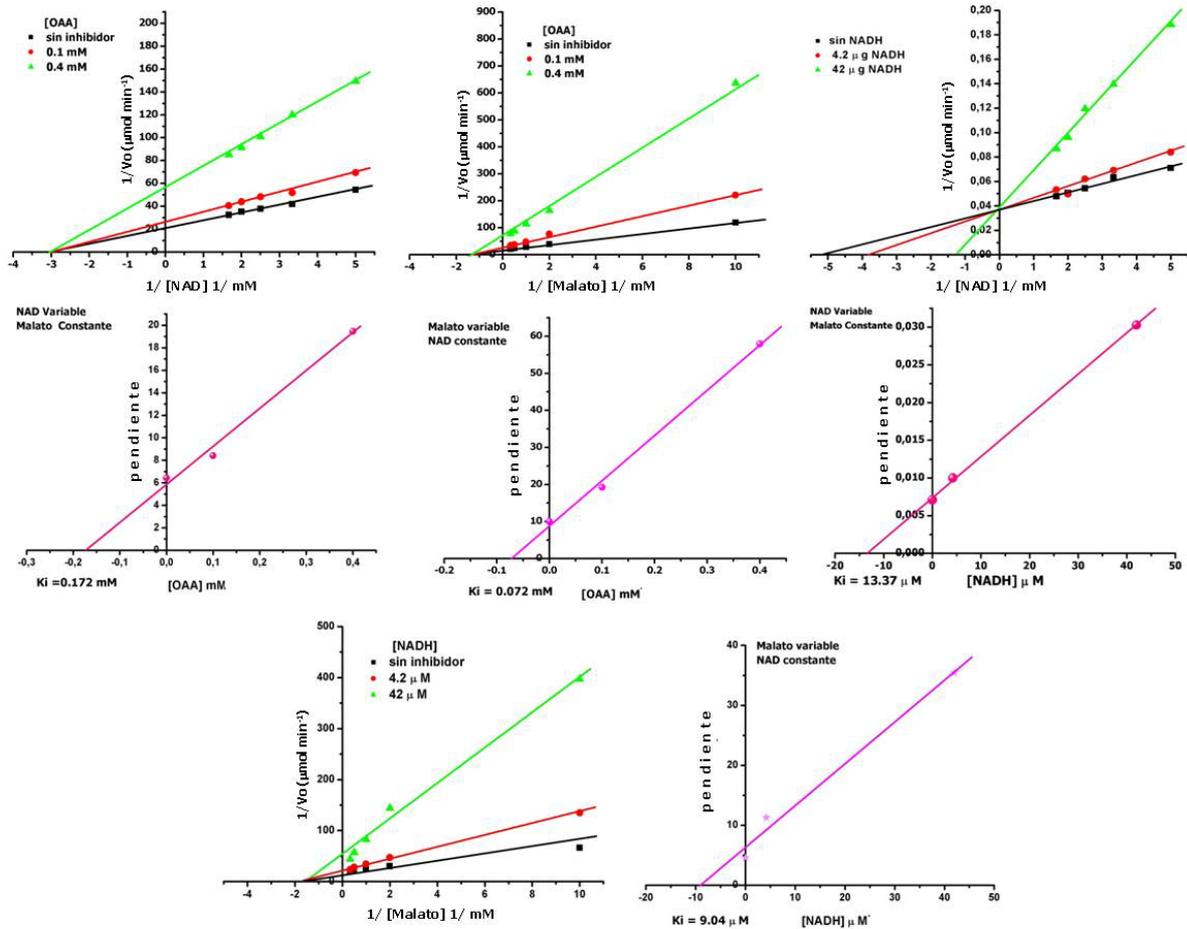


Figura 39. Mecanismos de inhibición ajustados a gráficas de doble recíproca (LB). A) Sustrato variable NAD, en ausencia \blacksquare o presencia de 0.1 \bullet y 0.4 \blacktriangle mM de OAA, su valor de K_i se muestra en la figura a. B) Sustrato variable malato, en ausencia \blacksquare o presencia de 0.1 \bullet y 0.4 \blacktriangle mM de OAA, su valor de K_i se muestra en la figura b. C) Sustrato variable NAD, en ausencia \blacksquare o presencia de 4.2 \bullet y 42 \blacktriangle μ M de NADH, su valor de K_i se muestra en la figura c. D) Sustrato variable malato, en ausencia \blacksquare o presencia de 4.2 \bullet y 42 \blacktriangle μ M de NADH, su valor de K_i se muestra en la figura d.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en el caso del NAD como sustrato variable y el NADH como inhibidor y viceversa (el NADH como sustrato variable y el NAD como inhibidor) los datos en las gráficas de LB se ajustan a un mecanismo de inhibición del tipo competitivo; es decir, todas las líneas cruzan en el eje $1/V_o$ y coinciden en el punto $1/V_{max}$, de modo que la V_{max} de la reacción no se ve afectada pero si la K_m , debido a que las líneas tocan el eje $1/[S]$ en puntos diferentes, demostrando que el NADH y NAD se unen a un sitio específico de la enzima, compiten por el mismo sitio de unión (sitio activo) en la enzima.

En el caso del papel del OAA y del malato, estos sustratos no compiten por el mismo sitio, todas las gráficas muestran un mecanismo de inhibición del tipo no competitivo; en este

mecanismo el inhibidor puede unirse a la enzima libre así como al complejo ES. En las gráficas se observan que las líneas interceptan en el mismo punto de $1/K_m$, es decir la afinidad de la enzima por su sustrato no se ve afectado pero si la V_{max} de la reacción. Estos datos se resumen en la tabla VIII.

Tabla VIII. Mecanismos de inhibición por producto de la TscMDH

Reducción del oxaloacetato (OAA)				
Sustrato Constante	Sustrato Variable	Producto variable	Tipo de Inhibición	K_i (mM)
OAA	NADH	Malato	No competitiva	4.5
OAA	NADH	NAD	Competitiva	2.07
NADH	OAA	Malato	No competitiva	29.6
NADH	OAA	NAD	No competitiva	38
Oxidación del malato				
Malato	NAD	OAA	No competitiva	0.172
Malato	NAD	NADH	Competitiva	0.0134
NAD	Malato	OAA	No competitiva	0.072
NAD	Malato	NADH	No competitiva	0.0043

5.7. Caracterización a nivel de estructura secundaria por medio del espectro de dicroísmo circular (DC) en el UV cercano de TscMDH y de r-TscMDH

Otro aspecto de la caracterización de la TscMDH fue llevar a cabo espectros de dicroísmo circular en la región de absorción del UV cercano, con la finalidad de conocer la composición de la estructura secundaria presente en la proteína y el grado de desnaturalización de la enzima.

En la figura 40 se observa el espectro de DC realizado a la TscMDH de la variante silvestre (A) y en la forma recombinante (B). En ambos espectros se observa una conformación característica de estructura hélice α . En la figura A es muy notoria la señal en forma de cuneta, de negativo a positivo en la longitud de 208 a 190 nm. En la figura B se distingue tanto la señal a 208 – 190, como la señal a 222 nm en la región negativa; ambas enzimas presentan señal de estructura secundaria. Adicionalmente en la región de 215 – 218 nm (región negativa) se observa una ligera señal de estructura lámina β .

La serie de datos obtenidos del espectro de DC fueron analizados con el Programa CDNN 2.1 Simple Spectra. Los resultados se resumen en la tabla IX, la cual describe el porcentaje de estructura secundaria en diferentes rangos de longitud del UV cercano, teniendo el mejor ajuste en la suma del porcentaje total de estructura secundaria, en el rango de 210 – 260 nm. La TscMDH es una proteína de estructura secundaria α/β , constituida principalmente por estructura hélice α (46.8%), en menor medida (26.1%) por estructura β , que incluye estructura lámina β antiparalela y paralela así como giro β . El porcentaje restante (25.2%) es estructura no determinada o azarosa. Estos datos coinciden con los reportados para la estructura cristalográfica de la cMDH porcina, la cual en su subunidad A presenta 45 % de estructura α y 15% de lámina de β y la subunidad B está formada por 44% de hélice α y 18% de lámina β (Chapman AD, *et al.* 1999).

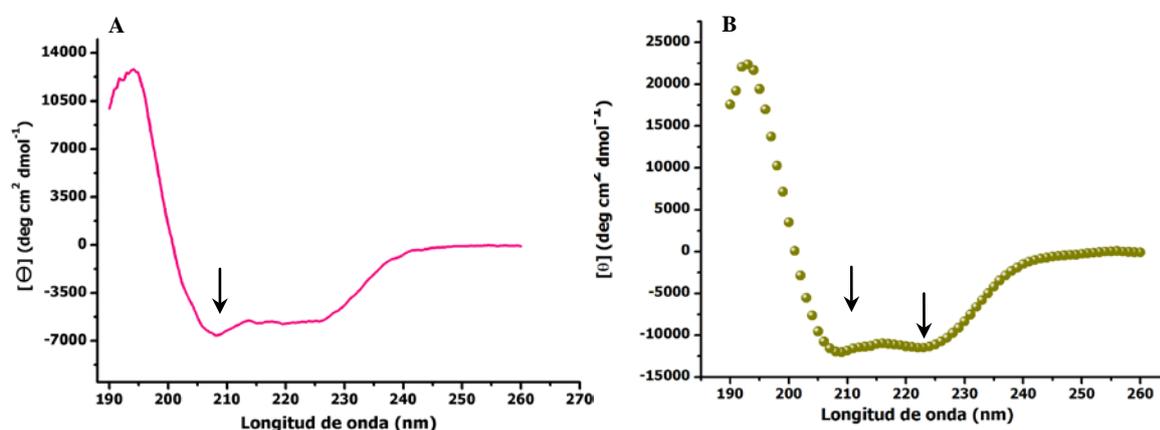


Figura 40. Elipticidad molar frente a longitud de onda (nm) del UV cercano cercano. Las gráficas representan una curva característica de estructura secundaria hélice α mostrando señal a λ 222 nm y en λ 208 de la región negativa; también se observa una leve señal de estructura β en la λ 215 -218. A) TscMDH B) r – TscMDH

Tabla IX. Análisis de la estructura secundaria registrada en TscMDH

	190 – 260 nm	195 – 260 nm	200 – 260 nm	205 – 260 nm	210 – 260 nm
α – hélices	50.2 %	50.6 %	46.9 %	49.7 %	46.8 %
β – antiparalela	2.4 %	3-9 %	5.1 %	5.1 %	5.4 %
β – paralela	5.5 %	5.2 %	5.5 %	5.5 %	6.1 %
β – giro	14.4 %	14.2 %	14.4 %	14.4 %	14.6 %
Azar	20.7 %	20.8 %	23.3 %	23.3 %	25.2 %
Suma Total	93.1 %	94.8 %	98 %	98 %	98.3 %

5.8. Determinación de la T_m (temperatura media de desnaturalización) por medio del espectro de dicroísmo circular en el UV cercano

La conformación de la r-TscMDH fue estudiada en función de su termoestabilidad, mediante el registro de la elipticidad molar a 222 nm en el espectro de DC del UV cercano. En la figura 41 se observa el comportamiento de la enzima al aumento creciente de la temperatura. La proteína mantiene una estructura secundaria estable de los 25 a los 30°C; conforme empieza a elevarse la temperatura, la señal de elipticidad comienza a aumentar; de los 45 a los 55°C es notoria la desnaturalización de la proteína, siendo 50.5°C la temperatura a la cual se encuentra el 50% de proteína desnaturalizada (T_m). Este valor es coherente con el obtenido en la temperatura óptima de reacción, como se mencionó anteriormente, la r-TscMDH a los 40°C no registra actividad enzimática y comparando con la enzima silvestre, a los 50°C pierde el 50% de su actividad enzimática.

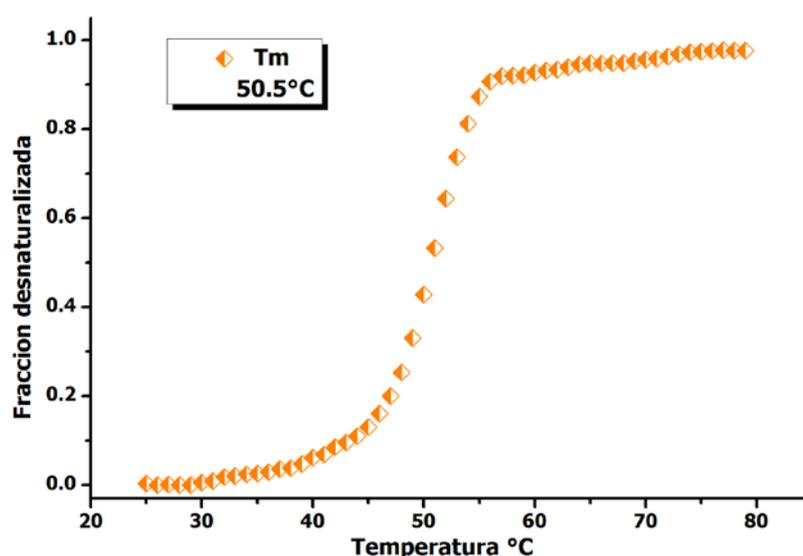


Figura 41. Desnaturalización térmica de la r-TscMDH, registrando la elipticidad molar a 222 nm. La gráfica muestra la fracción desnaturalizada vs la temperatura (°C), considerando a la unidad como proteína sin estructura secundaria. La temperatura media de desnaturalización (T_m) fue de 50.5°C.

5.9. Estudios de unión ligando–proteína por medio de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos (295 nm) de la enzima r-TscMDH

La TscMDH está formada por 332 residuos de aminoácidos, la secuencia se muestra en la figura 18 y en la figura 42 se muestra la composición de aminoácidos. Nótese que esta proteína tiene un total de 7.8% de aminoácidos aromáticos, los cuales absorben en una λ de 280 nm y por lo tanto también tienen la capacidad de emitir en una λ de 310 nm. Con este principio se decidió estudiar la fluorescencia intrínseca de la r-TscMDH y su relación con la

unión de los sustratos (NAD^+ , NADH , OAA y malato), exclusivamente en la señal de emisión de λ 353 nm, correspondiente a la excitación de los residuos de triptófano en λ 295 nm.

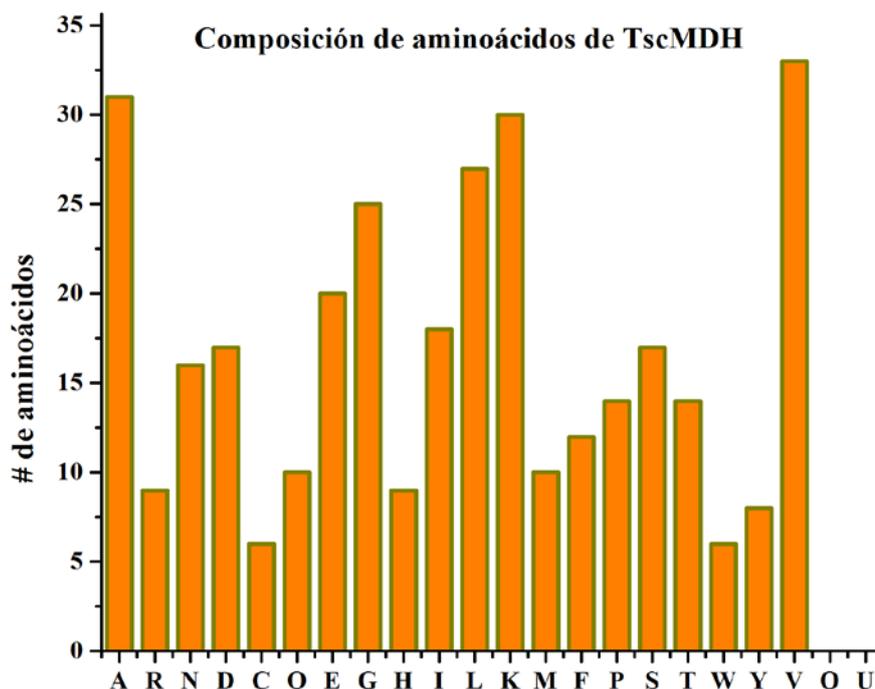


Figura 42. Composición de residuos de aminoácidos para la TscMDH. Se señala el número de cada uno de los aminoácidos descritos en la secuencia mostrada en la figura 24 (nomenclatura de una letra). En el caso de los residuos de aminoácidos aromáticos, su composición es: F = 12, W = 6 y Y = 8, el 7.8 % del total de la proteína.

En la figura 43 se observa la intensidad de fluorescencia de la r-TscMDH frente a la longitud de onda, excitando en la región de λ 295 nm. La r-TscMDH (cMDH *Ts*-rec) emite en una λ máxima de 350 nm, valores correspondientes para los residuos de triptófano. También se muestra el apagamiento de la intensidad de fluorescencia de la r-TscMDH en presencia de 2 mM de NAD. Este efecto, también se observó con el NADH, lo que nos llevó a realizar una serie de titulaciones con diferentes concentraciones del dinucleótido; los resultados se muestran en la figura 44 y es evidente que el NADH provoca un apagamiento de la intensidad de fluorescencia de la r-TscMDH, proporcional a la concentración de éste.

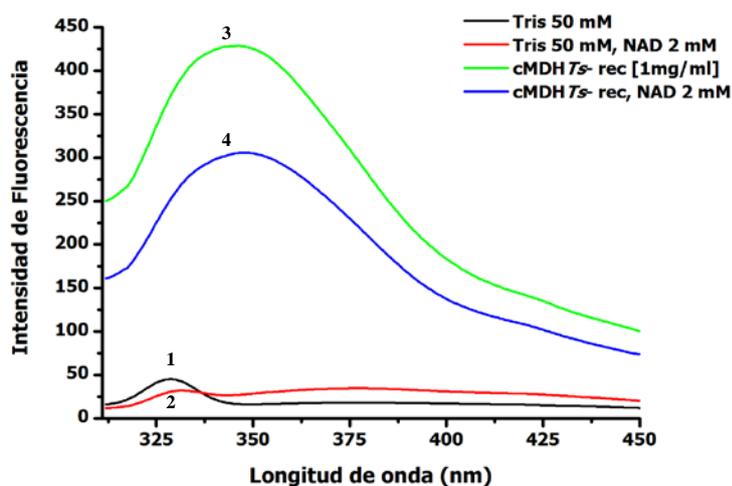


Figura 43. Intensidad de la fluorescencia de la r-TscMDH producida por la excitación a λ 295 nm vs longitud de onda. Se observa una emisión con λ máxima en 350 nm (3) correspondiente a los triptófanos de la r-TscMDH. El NAD 2mM provoca una disminución en esta intensidad de fluorescencia (4). Para verificar que el efecto de emisión era provocado por la r-TscMDH, se usó al amortiguador de ensayo en ausencia (1) y presencia de NAD^+ (2) como registros control.

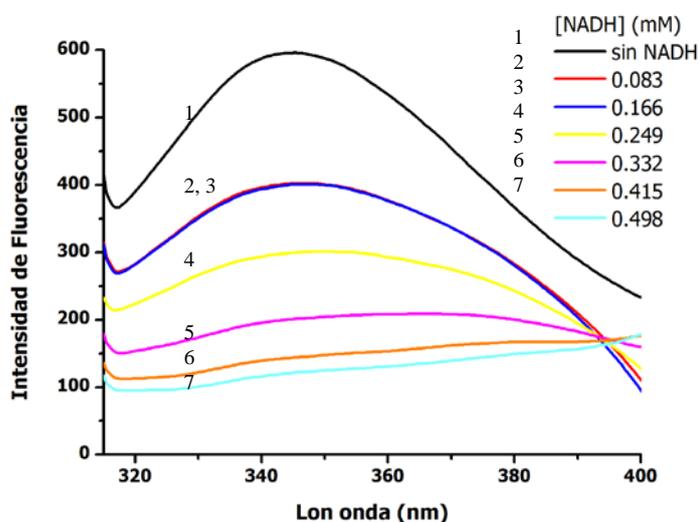


Figura 44. Intensidad de la fluorescencia de la r-TscMDH producida por la excitación a λ 295 nm vs longitud de onda. Se observa el apagamiento de la intensidad de fluorescencia de la r-TscMDH, provocado por concentraciones crecientes de NADH.

Continuando con los estudios de apagamiento de la intensidad de la fluorescencia intrínseca de la enzima, en la figura 45A se muestra el efecto del NAD de manera gradual. A cada gráfica resultante se le obtuvo el área bajo la curva y con estos datos, se construyeron figuras donde se representa el porcentaje de intensidad de fluorescencia frente a la concentración del NAD (figura 45B), apreciando que el porcentaje de intensidad de la fluorescencia disminuye con las concentraciones crecientes del dinucleótido. La figura 45B muestra 35% de intensidad de fluorescencia con 3.8 mM de NAD y una tendencia a una inhibición total.

La figura 45C muestra el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la enzima, debido a las concentraciones crecientes de malato, estos datos fueron analizados como se describió anteriormente con el NAD y en la figura 45D se observa un apagamiento casi lineal con concentraciones de hasta 6 mM; sin embargo, esta tendencia se estabiliza y el % de intensidad de fluorescencia se vuelve independiente de la concentración creciente de malato. Este sustrato inhibe la intensidad en un máximo de 60 %, indicando que no todos los triptófanos que intervienen con la emisión de fluorescencia colaboran en la unión a malato. De manera similar, puede apreciarse este efecto con el OAA (figura 45E), en esta gráfica el apagamiento de la fluorescencia de la r-TscMDH por la unión a OAA semeja una hipérbola invertida (figura 45F), consiguiendo también el apagamiento de intensidad de fluorescencia en un 60% y sugiriendo nuevamente que no todos los residuos de triptófanos que emiten participan con la unión al OAA.

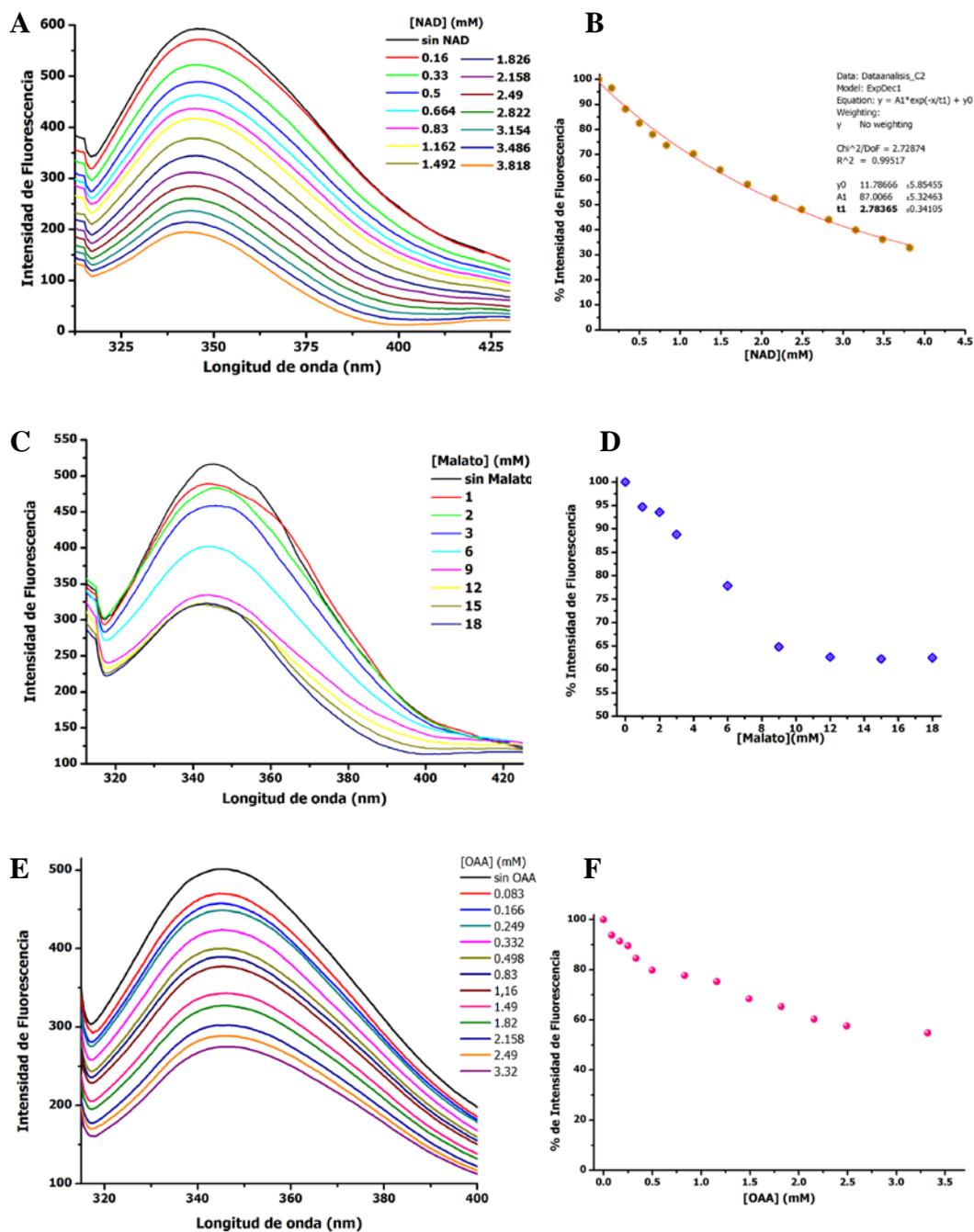


Figura 45. Intensidad de la fluorescencia de la r-TscMDH producida por la excitación a λ 295 nm vs longitud de onda. A) Se observa el apagamiento de la intensidad de fluorescencia, provocado por concentraciones crecientes de NAD. B) Porcentaje de intensidad de fluorescencia vs concentración de NAD. C) Apagamiento de la intensidad de fluorescencia provocada por concentraciones crecientes de malato. D) Porcentaje de intensidad de fluorescencia vs concentración de malato. E) Apagamiento de la intensidad de fluorescencia provocada por concentraciones crecientes de OAA. F) Porcentaje de intensidad de fluorescencia vs concentración de OAA.

6. Discusión

En este trabajo se caracterizó de manera global a la cMDH de cisticercos de *T. solium*, siendo el primer estudio que reporta la existencia de esta enzima en el parásito y su posible función al producir malato, el cual puede ingresar a las mitocondrias y dismutarse.

El metabolismo energético de los helmintos es complejo debido a que llevan a cabo sus reacciones tanto vía aeróbica como vía anaeróbica, probablemente por las circunstancias ambientales a que son sometidos en las diferentes etapas durante su ciclo de vida (Barret J, 1984; Bryant C, 1978).

Los helmintos poseen un sistema de transporte de glucosa muy activo, con transportadores que son capaces de unir glucosa aún cuando esta se encuentra en bajas concentraciones. En *T. solium* se han reportado dos secuencias de genes homólogas a los transportadores de glucosa de vertebrados, TGTP1 y TGTP2, los cuales fueron clonados y expresados funcionalmente en oocitos de *Xenopus*. Esta observación sugiere fuertemente que el parásito, tanto en su forma adulta (TGTP1) como larvaria (TGTP2) usa estos transportadores para la absorción de azúcar (Rodríguez – Contreras, 1998).

La glucosa en cestodos puede ser convertida en glucógeno –que es la principal molécula de reserva– y ser metabolizada directamente por la vía glucolítica hasta fosfoenolpiruvato (PEP) y entrar a la fermentación láctica con un rendimiento de dos moléculas de ATP por mol de glucosa (Lloyd GM y Barret J, 1983). Sin embargo; se ha reportado que malato deshidrogenasa (MDH), fumarasa (FM) y fumarato reductasa (FRD), catalizan reacciones que revierten parte del ciclo de Krebs (el cual es incompleto en los helmintos), permitiendo la dismutación del malato a partir del PEP (Smith JD y McManus DP, 1983). La oxidación del malato conlleva a la formación de piruvato por la enzima málica (ME) y luego a acetato por el complejo piruvato deshidrogenasa (CPD) junto con un ciclo succinato/succinil-CoA obteniendo dos moléculas de NADH y una producción neta de 3.7 moles de ATP por mol de glucosa. La reducción de malato a succinato utiliza a la fumarasa y la fumarato reductasa con la obtención de una molécula de NAD y una producción neta de 5.4 moles de ATP por mol de glucosa

La cMDH juega un papel crucial en la dismutación del malato y por ende en la obtención de un mayor número de moléculas de ATP que permiten la supervivencia del parásito en el hospedero. Como se ha mencionado, la cMDH catalizan la interconversión de los sustratos malato–OAA dependiendo de la oxido–reducción del dinucleótido $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$ (Minárik P, *et al.* 2002).

Nosotros purificamos a homogeneidad a la malato deshidrogenasa citoplásmica de los cisticercos de *T. solium* (TscMDH) (Plancarte A, *et al.* 2009) y en colaboración con el consorcio Genoma de *T. solium* (Aguilar-Díaz H, *et al.* 2006) pudimos identificar a un único gen codificante para esta enzima (Nava G, *et al.* 2011). Este gen fue analizado con programas de bioinformática, determinando la estructura del gen con una región promotora iniciadora, dos exones, un intrón y una región promotora de término. La región promotora de inicio incluye a tres posibles factores de transcripción: INF.1, TFIID y Sp1 y a la caja TATA. El factor INF.1 es reportado como un factor de transcripción funcional en el gen de 2-cis-peroxirredoxina de *T. solium* y *T. crassiceps* (Vaca-Paniagua, *et al.* 2009). En el exón 1 se localizó el codón ATG que codifica para el primer aminoácido, la metionina. Cada exón está formado por 498 nucleótidos y en conjunto codifican para una proteína de 332 residuos de aminoácidos, cuando es llevado el empalme de éstos. El intrón está formado por 76 nucleótidos y presenta las secuencias señal reportadas por Vargas-Parada de secuencia donadora N/GT y secuencia receptora AG/N (Vargas-Parada L y Laclette JP, 2003). Finalmente se localiza la región de término, donde se encuentra el codón TGA siendo la secuencia complementaria ACT y al ser transcrita el codón es UGA, el cual es una señal de alto en la transcripción. Adicionalmente se identificaron a otras secuencias de alto (UUA y UAG) y una secuencia repetitiva de adeninas: la señal poli A que protege a los genes de la degradación (Lewin B, 2008).

En este trabajo se llevó a cabo la purificación de la TscMDH (nativa) de cisticercos de *T. solium* así como la clonación, expresión y purificación de la r-TscMDH de manera funcional. Así mismo, se llevó a cabo la caracterización bioquímica y cinética de ambas enzimas.

Los valores de los parámetros bioquímicos fueron similares entre las enzimas; sin embargo, se observó que la r-TscMDH es menos estable en su actividad catalítica al incremento de la temperatura, probablemente porque la expresión de la proteína incluyó la adición de algunos residuos del plásmido de clonación y los nucleótidos codificantes de la señal de histidinas. Al comparar nuestros datos con los reportados para algunos cestodos, se encuentra que la MDH de *Echinococcus granulosus* presenta un pH óptimo de reacción de 8,2 (Agüero F, 1995), similar al determinado para la r-TscMDH de 8.0; cuando se hace la comparación con un endoparásito, se observa que *Plasmodium falciparum* (Lang-Unnasch N, 1992.) presenta un óptimo de reacción a pH 7 y el rango de estabilidad de la proteína en función de la temperatura es igual al de *T. solium* (5 – 45°C).

Referente a los parámetros catalíticos, la actividad específica obtenida para la cMDH fue de 2615 U/mg, mientras que para la recombinante se obtuvo un valor 6 veces menor (409 U/mg);

sin embargo ninguno de estos datos son comparables con las actividades específicas reportadas para *Hymenolepis microstoma* (Pappas PW y Schoroeder LL, 1979) (6.7 U/mg) y para *Taenia crassiceps* (72.4 U/mg), las cuales son menores. Pero en el caso para *Leishmania mexicana* (Mottram JC y Coombs GH, 1985) la actividad específica es de 1230 U/mg.

Las constantes cinéticas obtenidas nos indican qué sustrato le es más afín a la enzima. En el caso de la TscMDH, se observó una K_m de 24 μM para el OAA y un valor 10 veces mayor para el malato (215 μM), los valores para el dinucleótido fueron muy similares entre sí, independientemente de su estado oxidado o reducido (NAD = 49 μM y NADH = 48 μM). Los valores obtenidos para la enzima recombinante fueron: la K_m del OAA fue de 44 μM , para el malato de 100 μM , el valor de NAD se mantuvo estable con 42 μM ; sin embargo, el NADH se convirtió en el sustrato menos afín con una K_m de 167 μM . Tanto la TscMDH como la r-TscMDH presentan una alta actividad para la producción de malato, aunque la actividad específica de la enzima recombinante fue menor con respecto a la de la silvestre, reflejándose en la disminución de la V_{max} de reacción para cada uno de los sustratos y con los valores de K_m ; la pérdida de afinidad de la enzima fue de casi dos veces para el OAA, de 3.5 veces para el NADH, la concentración del NAD se mantuvo constante y en el caso del malato el valor de K_m disminuyó a la mitad; es decir, la r-TscMDH es más afín al malato que la enzima nativa, pero sigue conservando la característica de MDH productora de malato. Estos datos se comportan semejantes a los valores reportados para *T. crassiceps* (Zenca J y Prokopic J, 1989) (OAA = 78 μM , NADH = 61 μM) y para *H. microstoma* (OAA = 5.9 μM , NADH = 17 μM) (Pappas PW y Schoroeder LL, 1979); adicionalmente los tres parásitos coinciden en presentar baja afinidad para el malato (*H. diminuta* = 1090 μM , *T. crassiceps* = 140 μM) y el NAD (*H. diminuta* = 180 μM , *T. crassiceps* = 120 μM).

Los valores de k_{cat} y de k_{cat}/K_m determinados para la enzima nativa y recombinante se encuentran en los rangos reportados. Se observa en ambas que el NADH presenta un mayor número de recambio seguido por el OAA, de forma similar ocurre con la eficacia catalítica (k_{cat}/K_m) confirmando nuevamente que la TscMDH favorece a la reacción en el sentido de reducción del OAA. Referente a la reacción de oxidación de malato, el número de procesos de reacción que catalizan las enzimas es mayor al observar el NAD, siendo el malato con el menor número de recambio y los valores de K_{cat}/K_m son muy similares entre la enzima recombinante y nativa.

Hablando en términos generales, las MDH reportadas en mamíferos son proteínas diméricas con una masa molecular alrededor de 72 kDa, por lo que el peso molecular de sus monómeros

corresponde a 36 kDa (Minárik P, *et al.* 2002). Concentrándonos en las cMDHs de los hospederos naturales para *T. solium*; el monómero de la MDH de cerdo presenta una masa molecular de 36 kDa, sus constantes de afinidad son: OAA = 55 μM , NADH= 12.4 μM , malato = 5781 μM y NAD = 582 μM (Trejo F, *et al.* 1996). La subunidad de la MDH citosólica extraída de hígado de humano también está en el rango de 36 KDa y presenta un pH óptimo de reacción de 7.4 a una temperatura de 37°C, teniendo como valores máximos para la reducción del OAA 102 U/mg y en el sentido opuesto de la reacción, oxidación del malato, una actividad de 11.2 U/mg (Crow KE, *et al.* 1983).

El monómero de la TscMDH pesa alrededor de 33.6 KDa y el de la enzima recombinante aproximadamente 36.5 KDa, esta diferencia se debe al sistema de clonación pET23a que la expresa con un segmento de seis histidinas que contiene el plásmido, se adicionan aproximadamente 36 pares de bases que estarían haciendo la diferencia en el PM entre la forma nativa de la recombinante. Como se puede observar, los datos de las cMDHs, tanto del humano como del cerdo, catalizan de forma más efectiva en sentido de la producción de malato. Comparando los parámetros bioquímicos y cinéticos obtenidos para la TscMDH y r-TscMDH, observamos que existen diferencias mínimas en el valor óptimo de pH con la MDHc de humano (7.5 vs 7.4 y 8, respectivamente). Con la cMDH del cerdo (Trejo F, *et al.* 1996), las constantes de afinidad (K_m) del OAA y del NADH se encuentran en un rango de molaridad; sin embargo, existen grandes diferencias en los valores de K_m para el malato y el NAD, la enzima del cerdo es menos afín para el malato (su K_m es 27 veces mayor) y para el NAD (K_m es 12 veces mayor).

Una característica que comparten todas la cMDHs e incluye a las mMDH (malato deshidrogenasa mitocondrial) es la conformación terciaria y cuaternaria (Goward Cr y Nicholls DJ, 1994). Estructuralmente las MDH son idénticas; sin embargo, en la comparación de las secuencia de nucleótidos entre la TscMDH y la secuencia de mMDH de *E. granulosus*, no se observa homología entre ellas pero sí cuando se comparan las secuencias proteicas, existe un 27% de identidad (Agüero F, *et al.* 2004). Las cMDHs son altamente conservadas en sus secuencias proteicas pero sobre todo, en los aminoácidos que participan con la unión a sustratos (McAlister-Henn L, 1988). Esta observación se confirmó con el estudio de dominios realizado con las secuencias de *T. solium*, *E. granulosus* (Rodrigues JJ, *et al.* 1993), *S. scrofa* (Chapman AD, *et al.* 1999) y el resto de secuencias pertenecientes a organismos evolutivamente distantes entre sí (Klein S y Strausberg R, 2003; Eichinger L, *et al.* 2005; Eisen JA, *et al.* 2005; Zheng N, *et al.* 2005; Fields PA, *et al.* 2006 King N, *et al.* 2008; NCBI ref. sec. 72124124). El mayor % de identidad se obtuvo entre *T. solium* y *E. granulosus* con

el 90 % de identidad. Para el caso del cerdo el porcentaje de identidad fue del 58% y en general este valor oscilo entre el 54 y 64 %.

El modelo de estructura generado de la TscMDH y el acoplamiento con la estructura cristalográfica de la cMDH de *S. scrofa*, confirman la conformación estructural característica de las MDHs (Musrati RA, *et al.* 1998) y coincide con los aminoácidos involucrados con la unión al NAD⁺: G-11, A-13, G-14, Q-15, I-16, D-41, V-87, G-88, A-89, M-90, I-108, V-129, L-158, S-241 y al malato: R-92, R-98, L-155, R-162, I-235, S- 242. Goward R y Nicholls DJ, mencionan que los residuos R-102, R109 y R171 tienen un papel muy importante con la unión al sustrato (Nicholls DJ, *et al.* 1992) y por ende en la catálisis; estos residuos se encuentran en una región denominada asa movable (Goward R y Nicholls DJ, 1994), en la MDH de *S. scrofa* corresponden a los residuos 98 – 110 y en TscMDH a los fragmentos 90 – 105. El asa forma al sitio activo de las MDHs, los aminoácidos involucrados semejan una “vacuola hidrofóbica” donde se encuentran los sitios de unión para el anillo de nicotinamida del dinucleótido y para los sustratos; cuando se forma el complejo ternario enzima–sustratos, la proteína experimenta un cambio conformacional debido a que los aminoácidos involucrados en esta asa se aproximan cerrando el espacio y cubriendo a los sustratos (Nicholls DJ, *et al.* 1992; Goward R y Nicholls DJ, 1994; Musrati RA, *et al.* 1998). Nosotros coincidimos en esta observación, cuando graficamos los valores del factor B para cada uno de los residuos de la secuencia de la cadena B de la estructura cristalográfica de la cMDH de *S. scrofa* y comparamos la secuencia de aminoácidos del modelo tridimensional de la TscMDH mediante el empalme de la estructura tridimensional (datos no mostrados).

Los estudios de inhibición por producto colaboraron en el entendimiento de cómo la TscMDH interactúa con sus sustratos que también son productos, sugiriendo una posible autorregulación. Los estudios de inhibición incluyeron ambos sentidos de la reacción catalítica, se adicionó uno de los producto a la reacción de ensayo y observamos un claro efecto de inhibición dependiente de la concentración del producto/inhibidor; esta serie de observaciones nos permitieron obtener valores de I_{50} para cada uno de los productos/inhibidores. Solo se requiere una concentración de 0.04 mM de NADH para inhibir a la enzima en un 50%, concentración 800 veces menor a la necesaria para tener ese porcentaje de inhibición con el NAD. El valor de I_{50} para el OAA fue de 0.32 mM y para el malato 33 mM. Nuevamente estos datos indican que la TscMDH presenta una mayor afinidad para el OAA y NADH favoreciendo la producción de malato.

La determinación del tipo de inhibición para cada uno de los productos/inhibidores demostró que solo hay un sitio de unión para el dinucleótido independientemente de su estado oxidado

o reducido, el mecanismo de inhibición presentando en ambos casos cuando el NAD se puso a competir con el NADH y viceversa, mostraron mecanismo de inhibición del tipo competitivo. La enzima presenta un sitio para el OAA y otro para el malato, ya que los mecanismos de inhibición observados para estos dos sustratos en ambos sentidos de la reacción resultaron de tipo acompetitivo y no competitivo, de manera similar como cuando el OAA o el malato se pusieron a competir con el NAD y NADH o viceversa.

Mediante ensayos de velocidad inicial y variación en la concentración de NADH y OAA y estudios de inhibición por productos, se determinó que la TscMDH presenta un mecanismo de reacción del tipo bi bi ordenado secuencial. La enzima cataliza una reacción bi-sustrato ($\text{OAA} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{Malato} + \text{NAD} = \text{A} + \text{B} \longrightarrow \text{P} + \text{Q}$), donde primero se forma el complejo EB (Enzima/NADH) con posible cambio alostérico para dar lugar a la formación del complejo EAB (enzima/NADH/OAA), se lleva a cabo la transformación de los sustratos a productos, EPQ (E/NAD/Malato) y finalmente sea liberado el malato (P) seguido por el NAD (Q). Este tipo de mecanismo de reacción que presenta la TscMDH, es el comúnmente reportado para las cMDHs caracterizadas (Banaszak L y Bradshaw R. 1970).

El espectro de dicroísmo circular obtenido para la r-TscMDH, por un lado indica que la expresión de la enzima recombinante resulta en una enzima esteroquímicamente funcional. Se obtiene en condiciones óptimas que le permiten adquirir un arreglo tridimensional y dónde sus sitios activos se encuentran ionizados. Y por otro lado, se confirma su estructura secundaria α/β , siendo en su mayoría estructura α hélice, la cual es homóloga con la estructura de la cMDH de *S. scrofa*.

También con el espectro de DC determinamos la temperatura media de desnaturalización (T_m); es decir, la temperatura a la cuál el 50 % de la enzima se encuentra en estado desnaturalizado. Este valor fue de 50.5°C y apoya la estabilidad de la actividad catalítica de la TscMDH (5 – 45°C) y de la r- TscMDH (5 – 35°C); es decir, la actividad enzimática se pierde totalmente antes de que la proteína pierda la mitad de su estructura secundaria. Se ha reportado que la gran mayoría de las cMDHs son catalíticamente activas en forma de dímeros (estructura cuaternaria), sin embargo también hay MDHs que son catalíticas en forma de monómeros (estructura terciaria). El hecho de que las enzimas muestren actividad catalítica estable hasta los 35°C (recombinante) y hasta los 45°C (nativa) sugiere la pérdida de estructura terciaria, y al aumento de la temperatura la pérdida de estructura secundaria, pasando a un estado desnaturalizado y por lo tanto no funcional.

Otra característica importante de la r-TscMDH es que en su secuencia proteica presenta seis residuos de triptófanos, los cuales emiten una señal de fluorescencia al ser excitados

específicamente a λ 215 nm. Esta señal es propia de la proteína e independiente del medio en el que se encuentra. La señal fue apagada en presencia de cada uno de los sustratos, NADH, NAD, malato y OAA y este efecto es proporcional al aumento de la concentración de cada uno de ellos. Sin embargo el análisis de estos datos sugiere llevar a cabo más estudios de fluorescencia con la finalidad de ver si existe un apagamiento específico de la intensidad de la fluorescencia o es provocado por el enturbiamiento del medio. Esta observación surge debido a que exclusivamente en el apagamiento de la fluorescencia con el malato, se observó un comportamiento de inhibición específica; esto es, se llega a un punto de saturación del sustrato/apagador que aunque se adicione más de su concentración la intensidad de la fluorescencia ya no decreta, se apaga por completo la intensidad emitida por los triptófanos que interactúan con el ligando. Este efecto es observado con cierta tendencia por el OAA. Sin embargo, no se puede decir lo mismo, en las gráficas observadas con el NAD y el NADH; el efecto de apagamiento de intensidad no se estabiliza, sí se aumenta la concentración del apagador, la intensidad disminuye proporcionalmente pero no se llega a una meseta. Este efecto puede deberse a que no se llegó a una concentración de saturación de apagamiento o que el decremento es provocado por variables no específicas. Pero independientemente, de estas observaciones, la r-TscMDH presenta, como se mencionó fluorescencia intrínseca, la cual es apagada por sus sustratos, lo que permite continuar explorando el comportamiento de la proteína en presencia de sus sustratos, ya sea por separado o en la forma de cofactor – sustrato, tratando de identificar cambios estructurales.

7. Conclusión

La Malato deshidrogenasa citoplásmica de cisticercos de *T. solium*, en la base de datos del Consorcio genoma de *T. solium*, presenta un único gen formado por dos exones de 498 nucleótidos y un intrón de 76 pb. Su expresión codifica para una proteína de 332 residuos de aminoácidos con homología para otras cMDHs reportadas y alto porcentaje de identidad para la cMDH de *E. granulosus*. En estado nativo la TscMDH se encuentra en estado de dímero y cada uno de sus monómeros pesan alrededor de 33 kDa, catalíticamente es estable en un rango de pH 7.0 a 9.0 y en una temperatura de 5 a 40°C. Es inhibida en ambos sentidos de su reacción con NaAsO₂ y por sus propios productos. Su mecanismo de reacción es Bi – Bi ordenado secuencial. Estructuralmente, la proteína presenta un arreglo a nivel secundario de α/β y se encuentra en estado desnaturalizada al 50% con una temperatura de 50.5°C. Su secuencia primaria contiene seis residuos de triptófano que le dan la característica de emitir señal de fluorescencia, la cual es apagada por sus sustratos. La TscMDH es una enzima con alta afinidad por el OAA y NADH, su posible papel es proveer malato, el cual puede ser dismutado en el interior de las mitocondrias, favoreciendo la producción de energía que permita sobrevivir al parásito.

7. Referencias

1. Abdussalam M. 1975. El problema de la Teniasis–Cisticercosis. VII Reunión interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis. Organización Panamericana de la Salud. Publicación científica No. 295. 117-129.
2. Acha PN, Szyfres B. 1986. Teniasis y cisticercosis. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. 2º Ed. Publicación científica. 503. 763-774.
3. Agüero F, Repetto Y, Hellman U, Cazzuelo JJ. 1995. Purification and partial characterization of the cytosolic malate dehydrogenase from protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 72: 247 – 251.
4. Aguilar-Díaz H, Bobes R, Carrero JC, Camacho-Carranza R, Cervantes C, Cevallos M, Dávila G, Rodríguez-Dorantes M, Escobedo G, Fernández JL, Fragoso G, Gaytán P, Garciarubio A, González VM, González L, José M, Jiménez L, Laclette JP, Landa A, Larralde C, Morales-Montor J, Morett E, Ostoa-Saloma P, Sciutto E, Santamaría R, Soberón X, de la Torre P, Valés V, Yáñez J. 2006. The genome project of *Taenia solium*. *Parasitol Int* 55: S127 – S130.
5. Agüero F, Repetto Y, Hellman U, Cazzuelo JJ. 1995. Purification and partial characterization of the cytosolic malate dehydrogenase from protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 72: 247–251.
6. Agüero F, Noe G, HellmanU, RepettoY, Zaha A, Cazzulo JJ. 2004. Purification, cloning, and expression of the mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) from protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol*. 137 (2): 207–214.
7. Altschul SF, Maden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1979. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
8. Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette JP, Larralde C, Madrazo I, Velázquez V, Willms K. Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Fondo de cultura Económica. México. 1987
9. Aluja, A. 1994. Manchas de leche (Milk Spots) por metacestodos de *Taenia solium* en hígados de cerdo. *Vet. Mex.* 25 (2):155.
10. Banaszak L, Bradshaw R. Malate dehydrogenases. In: Boyer PD (Ed.). *The enzymes*, vol. II, 3rd edn. Academic Press, New York, 1970. pp 369–396.

11. Barret J. 1984. The anaerobic end – products of helminths. *Parasitology*. 88: 179– 198.
12. Bout D, Dupas H, Capron M, El Gazawi A, Carlier Y, Delacourte A, Capron A. 1978. Purification, immunochemical and biological characterization of malate dehydrogenase of *Schistosoma mansoni*. *Immunochemistry*. 15: 633 – 638.
13. Branden C, Tooze J. Enzymes that bind Nucleotides. In: Introduction to protein structure. In: C Branden, J Tooze (Eds). Introduction to protein structure. Garland Publishing. New York. 1991. 141-59
14. Branden, C y Tooze, J. Introduction to Protein Structure. 2a edición. Garland Publishing. New York. 1999.
15. Bryant C. 1978. The regulation of respiratory metabolism in parasitic helminths. *Advances in Parasitology*. 16: 311–331.
16. Campbell ID and Dwek RA. *Biological Spectroscopy*. The Benjamin/ Cummings Publishing Company Inc. California, USA. 1984.
17. Chapman AD, Cortes A, Dafforn TR, Clarke AR, Brady RL. 1999. Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases: crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase, alpha-ketomalonate and tetrahydro NAD. *J Mol Biol*. 285: 703-712.
18. Cheng T. *General Parasitology*. Harcourt Brace Haranovich, Publishers. New York. 1986.
19. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162 (1): 156– 159.
20. Coles GC, 1977. The biochemical mode of action of some modern antihelminthics. *Pestic Sci*. 8: 536–543.
21. Cordero del Campillo. *Parasitología y Enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Ed Limusa. México. 1990.
22. Cortés Hermosillo J. Ácido ribonucleico, RNA. En Jiménez García LF., Merchant Larios H (Coord.). *Biología celular y molecular*. Pearson Educación. México. 2003.
23. Crow KE, Braggins TJ, Hardman MJ. 1983. Human liver cytosolic malate dehydrogenase: Purification, kinetic properties and role in ethanol metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 225 (2): 621–629.
24. Dixon H, Lipscomb F. 1961. Cysticercosis: an analysis and follow up 450 cases. *Privy Counsil Med Res Special Report Ser*. 229: 1-58.

25. Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sucgang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P, Fey P, Pilcher K, Chen G, Saunders D, Sodergren E, Davis P, Kerhornou A, Nie X, Hall N, Anjard C, Hemphill L, Bason N, Farbrother P, Desany B, Just E, Morio T, Rost R, Churcher C, Cooper J, Haydock S, van Driessche N, Cronin A, Goodhead I, Muzny D, Mourier T, Pain A, Lu M, Harper D, Lindsay R, Hauser H, James K, Quiles M, Madan Babu M, Saito T, Buchrieser C, Wardroper A, Folder M, Thangavelu M, Johnson D, Knights A, Loulseged H, Mungall K, Oliver K, Price C, Quail MA, Urushihara H, Hernandez J, Rabbinowitsch E, Steffen D, Sanders M, Ma J, Kohara Y, Sharp S, Simmonds M, Spiegler S, Tivey A, Sugano S, White B, Walker D, Woodward J, Winckler T, Tanaka Y, Shaulsky G, Schleicher M, Weinstock G, Rosenthal A, Cox EC, Chisholm RL, Gibas R, Loomis WF, Platzer M, Kay RR, Williams J, Dear PH, Noegel AA, Barrell B, Kuspa A. 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostellium discoideum*. *Nature*. 435 (7038): 43–57.
26. Eisen JA, Wu M, Wu D, Nierman WC, Orias E, Delcher AL, Salzberg SL. Direct submission. Eukaryotic genomics. The Institute for Genomic Research. 9712. Medical Center Drive. USA. Acc Number GI: 146165401.
27. Englard S. 1969. Extramitochondrial L-malate dehydrogenase of beef heart. *Meth Enzymol* 13: 123-129.
28. Escobar A. The pathology of neurocysticercosis. *Cysticercosis of the Central Nervous System*. Ed by Palacios E, Rodríguez Carbajal MD and Taveras J M. Charles C Thomas Publisher. U.S.A. 1983: 27–54.
29. Fields PA, Rudomin EL, Somero GN. 2006. Temperature sensitivities of cytosolic malate dehydrogenase from native and invasive species of marine mussels (genus *Mytilus*): sequence –function linkages and correlations with biogeography distribution. *J Exp Biol*. 209 (PT 4): 656 – 667.
30. Fleury A, Gomez T, Alvarez I, Meza D, Huerta M, Chavarria A, Carrillo Mezo RA, Lloyd C, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G, 2003. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology*. 22: 139–145.
31. Fleury A, Morales J, Bobes RJ, Dumas M, Yáñez O, Piña J, Carrillo-Meza R, Martínez JJ, Fragoso G, Dessein A, Larralde C, Sciutto E. 2006. An epidemiological

- study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. 100: 551 - 558.
32. Fleury A, Escobar A, Fragoso G, Sciutto E, Larralde C. 2010. Clinical heterogeneity of human neurocysticercosis results from complex interactions among parasite, host and environmental factors. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 104(4): 243–250.
 33. Flisser A, Madrazo I, Delgado H. *Cisticercosis Humana*. Editorial Moderno. México. 2000.
 34. Flisser A. Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitology Today.* 1988. 4(5): 131–137.
 35. Flisser A. 1994. Teniasis and Cysticercosis due to *Taenia solium*. *Progress in Clinical Parasitology.* 4: 77–115.
 36. Fukumoto S. 1985. Pyruvate kinase isoenzymes and phosphoenolpyruvate carboxykinase during development of *Spirometra erinacei*. *Yonago. Acta Medica.* 28: 89–105.
 37. GE Healthcare. 2008. Pure simplicity for tagged proteins. GE Healthcare Bio – Sciences AB.
 38. Gómez Alanís, A. 1994. Dos casos de cisticercosis cutáneo – muscular en el hombre. *An Inst. Invest, Scientific (Monterrey).* 1(1): 79– 93.
 39. González R, Mendoza-Hernández G, Plancarte A. 2002. Purification of *Taenia solium* cysticerci superoxide dismutase (SOD Ts) and myoglobin copurification. *Parasitology Research.* 88: 881 – 887.
 40. Goward CR and Nicholls DJ. 1994. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science.* 3: 1883–1888.
 41. Harnett W. 1988. The anthelmintic action of praziquantel. *Parasitology Today.* 4(5): 144 – 146.
 42. Heyde E, Ainsworth S. 1968. Kinetic studies on the mechanism of the malate dehydrogenase reaction. *J Biol Chem.* 243: 2413–2423.
 43. Jiménez L, Vibanco-Pérez N, Navarro L, Landa A. 2000. Cloning, expression and characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *Int J Parasitol.* 30(9): 1007–1012.
 44. Jung H, Gonzalez – Esquivel DF. Pharmacology of anticysticercal therapy. En Singh G. and Prabhakar S. (Eds). *Taenia solium* cysticercosis. From basic to clinical science. CABI Publishing. UK. 2002. pp: 363– 374.
 45. Karlsson E, Ryden L, Brewer J. Ion exchange chromatography. In: Janson JC, Ryden L. (Eds). *Protein purification*. Wiley, New York. 1997. pp 145–206.

46. King N, Westbrook MJ, Young SL, Kuo A, Abedin M, Chapman J, Fairclough S, Hellsten U, Isogai Y, Letunic I, Marr M, Pincus D, Putnam N, Rokas A, Wright KJ, Zuzow R, Dirks W, Good M, Goodstein D, Lemons D, Li W, Lyons JB, Morris A, Nichols S, Richter DJ, Salamos A, Sequencing JG, Bork P, Lim WA, Manning G, Millar WT, McGinnis W, Shapiro H, Tjian R, Grigoriev IV, Rokhsar D. 2008. The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature*. 451(7180): 783–788.
47. Klein S, Strausberg R. 2003. Direct Submitted in NCBI. *Xenopus* gene collection (XGC). National Institutes of Health. Acc. Number Gi: 38014771.
48. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680 – 685.
49. Lakowics, JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 2a edición. Plenum Press, USA. 1999.
50. Lang–Unnasch N. 1992. Purification and properties of *Plasmodium falciparum* malate dehydrogenase. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 50: 17 – 26.
51. Laurent TC. Killander J. 1964. A theory of gel filtration and its experimental verification. *J Chromatogr*. 14: 317 – 330.
52. Lewin B. GENES X. 10^{ed}. Krebs JE, Kilpatrick ST, Goldstein ES (Eds.). Sudbury, Massachussets. 2008.
53. Lineweaver H, Burk DJ. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc*. 56: 658 – 666.
54. Lloyd G.M. and Barret J. 1983. *Fasciola hepatica*: carbohydrate metabolism of the adult. *Exp Parasitol*. 56(1): 81 – 88.
55. Lowe CR, Pearson JC. 1984. Affinity chromatography on immobilized dyes. *Meth Enzymol*. 104: 97–113.
56. Lowry O, Rosenbrough N, Lewis-Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265– 275.
57. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor. NY. 1982.
58. McAlister-Henn L. 1988. Evolutionary relationships among the malate dehydrogenases. *Trends Biochem Biophys*. 238: 229 – 236.
59. McKellar QAM and Scott EW 1990. The benzimidazole anthelmintic agents. A review. *J Vet Pharmacol Therap*. 13: 223 – 247.

60. Minárik P, Tomášková N, Kollárová M, Antalík M. 2002. Malate dehydrogenases – Structure and function. *Gen Physiol. Biophys.* 21: 257– 265.
61. Mottram JC, Coombs GH. 1985. Purification of particulate malate dehydrogenase and phosphoenol pyruvate carboxykinase from *Leishmania mexicana mexicana*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 827: 310 – 319.
62. Murphy W, Kitto G, Everse J, Kaplan N. 1967. Malate dehydrogenases. A survey of molecular size measured by gel filtration. *Biochem.* 6: 603 – 609.
63. Musrati RA, Kollárová M, Mernik N, Mikulášsová D. 1998. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *Gen Physiol Biophys.* 17(3): 193 – 210.
64. Nava G, Laclette JP, Bobes R, Carrero JC, Reyes-Vivas H, Enríquez-Flores S, Mendoza-Hernández G, Plancarte A. 2011. Cloning, sequencing and functional expression of cytosolic malate dehydrogenase from *Taenia solium*: Purification and characterization of the recombinant enzyme. *Exp. Parasitol.* 128(3): 217 – 224.
65. NCBI Referent Sequence. Hypothetical protein F46E10.10 (*Caenorhabditis elegans*). NP_504656.1. Acc. Number Gi: 17561064.
66. NCBI Referent Sequence. Predicted: Similar to cytosolic malate dehydrogenase (*Strongylocentrotus purpuratus*). XP_796283.1. Acc. Number Gi: 71124124.
67. Nelson DL, Cox MM. Lehninger. Principios de Bioquímica. 3er. Edición. Omega. España. 2000
68. Nicholls DJ, Millar J, Scawen MD, Clarke AR, Holbrook JJ, Atkinson T, Goward CR. 1992. The importance of arginine 102 for the substrate specificity of *Escherichia coli* malate dehydrogenase: *Biochem Biophys Res Com.* 189: 1057 – 1062.
69. Nieto D. Historical notes on cysticercosis. En Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C. *et al.* Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Academic. Press, New York. 1982.
70. Organización Mundial de la Salud. 2002. Control de la Neurocisticercosis. Informe de la Secretaría. 55° Asamblea Mundial de la Salud. A55/23.
71. Pappas PW, Schroeder LL. 1979. *Hymenolepis microstoma*: lactate and malate dehydrogenases of the adult worm. *Exp. Parasitology.* 47: 134 – 139.
72. Plancarte A, Nava G, Mendoza-Hernández G. 2009. Purification, properties, and kinetics studies of cytoplasmic malate dehydrogenase from *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol Res.* 105: 175 – 183.
73. Prichard RK, Schofield PJ. 1968. A comparative study of the tricarboxylic acid cycle enzymes in *Fasciola hepatica* and rat liver. *Comp Biochem Physiol* 25:1005–1019.

74. Ramírez-Bon E, Merchant MT, González del Pliego M, Cañedo L. Ultraestructure of the bladder wall of the metacestode of *Taenia solium*. En Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, *et al.* In Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press. New York. 1982. 261 – 279.
75. Ramírez Santos J, Gómez Eichelmann C. Ácido desoxirribonucleico, DNA. En Jiménez García LF., Merchant Larios H (Coord.). Biología celular y molecular. Pearson Educación. México. 2003.
76. Recillas Targa F, Zurita Ortega ME. 2003. Control de la expresión genética en eucariontes. En Jiménez García LF., Merchant Larios H (Coords.). Biología celular y molecular. Pearson Educación. México.
77. Rodrigues JJ, Ferreira HB, Zaha A. 1993. Molecular cloning and characterization of a *Echinococcus granulosus* cDNA encoding malate dehydrogenase. Mol Biochem Parasitol. 60 (1): 157–160.
78. Rodríguez-Contreras D, Skelly PJ, Landa A, Shoemaker CB, Laclette JP. 1998. Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. Parasitology. 117: 579 – 588.
79. Rodríguez RR. Contribución al estudio de la cisticercosis porcina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. 1962. 15-35.
80. S de Aluja A, Vargas G. 1988. The histopathology of porcine cisticercosis. Vet Parasitol. 28: 65 – 77.
81. Saiz Moreno L. Las zoonosis. Aspectos sanitarios, económicos y sociales. Epidemiología. Diagnóstico y Profilaxis. Ed. Aedos. Barcelona. 1976.
82. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TM. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY. 1989.
83. Sanger F, Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol 94: 441- 448.
84. Sartí Gutiérrez EJ, Gutiérrez Ospina I. 1986. La teniasis y cisticercosis en México. (Revisión bibliográfica). Salud Pública de México. 28(5): 556-563.
85. Saz HJ, Lescure OL. 1969. The functions of phosphoenolpyruvate carboxynase and malic enzymes in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*. Com Biochem Physiol 30:49–60.

86. Saz HJ. Effects of antihelmintics on 32-P-esterification in helminth metabolism. In: Van den Bossche H (ed.) Comparative biochemistry of parasites. Academic New York. 1972. pp 33–48.
87. Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions (Review). *Microbes and Infection*. 2:1875–1890.
88. Segel IH. Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley, New York. 1993.
89. Sharma A and Schulman SG. Introduction to Fluorescence Spectroscopy. John Wiley & Sons, Inc. New-York. 1999.
90. Shulz GE, Schirmer RH. Principles of Protein Structure. Ed. Springer-Verlag, New York. 1979.
91. Slais Jaroslav. The Morphology and Pathogenicity of the Bladder Worms. *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus bovis*. Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences. Czechoslovakia. 1970.
92. Smith JD, McManus DP. The adult: carbohydrate metabolism. In: Smith JD and McManus DP (editors). The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge, UK. 1989. pp: 77 – 113.
93. Smyth JD. The biology of cestode life – cycles. Technical Communication Number 34 of the Commonwealth Bureau of Helminthology, St. Albans, Herts, England. Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal, Bucks, England. 1963.
94. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. 5^a Ed. McGraw-Hill. Madrid. 2000.
95. Sotelo J, Escobedo F, Penagos P. 1988. Albendazole vs praziquantel for therapy for neurocysticercosis. *Arc Neurol*. 45: 532-534.
96. Sotelo J. Clínica y diagnóstico de la cisticercosis humana. Organización Pan-Americana Da Saude. 1996. 122-124.
97. Tahir and Mannervik. 1985. Inhibitors for distinction of three types of human glutathione transferase. *FEBS* 181:249–252.
98. Tanaka T, Inazawa J, Nakamura Y. 1996. Molecular cloning and mapping of a human cDNA for cytosolic malate dehydrogenase (MDH1). *Genomics*. 32: 128 – 130.

99. Tejada P, Sanchez-Moreno M, Monteoliva M, Gomez-Banqueri H. 1987. Inhibition of malate dehydrogenase enzymes by benzimidazole antihelmintics. *Vet Parasitol.* 24: 269– 274.
100. Tielens AGM. 1994. Energy generation in parasitic helminthes. *Parasitology Today.* 10 (9): 346– 352.
101. Trejo F, Costa M, Gelpí JL, Busquets M, Clarke AR, Holbrook JJ, Cortés A. 1996. Cloning, sequencing and functional expression of a DNA encoding pig cytosolic malate dehydrogenase: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Gene.* 172: 303 – 308.
102. Vaca–Paniagua F, Parra–Unda R, Landa A. 2009. Characterization of one typical 2_Cys Peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res.* 105: 781–787.
103. Van Holde K, Johnson WC, Ho PS. *Principles of Physical Biochemistry.* Prentice Hall, New Jersey. 1998.
104. Vargas–Parada L, Laclette JP. 2003. Gene structure of *Taenia solium* paramyosin. *Parasitol Res.* 89: 375 – 378.
105. Voet D, Voet JG. *Bioquímica.* Barcelona: Omega. España. 1992.
106. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. *Recombinat DNA.* Second Edition. Scientific American Books. USA. 1998.
107. Williamson DH, Lund P, Krebs HA. 1967. The redox state of free Nicotinamide – adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J.* 103: 514 -527.
108. Willms K, Vargas–Parada L, Laclette JP. *Biología del parásito.* En Schunemann de Aluja A, Larralde C. (Coords.) *Cisticercosis. Guía para profesionales de la Salud.* Fondo de Cultura Económica. México. 2006. pp 19 – 40.
109. Woody RW. 1995. Circular dichroism. *Methods in Enzymology.* 246: 34 – 71.
110. Yoon H, Anderson B. 1988. Kinetic studies of *Hemophilus influenzae* malate dehydrogenase. *Biochimi Biophys Acta* 955:10–18.
111. Zedillo G, Bobadilla Vela I. Historia de la cisticercosis porcina en México. *Archivo de Investigación Médica.* México. 1987. 18 (2): 77-90
112. Zenka J, Prokopic J. 1989. Purification and properties of cytosolic malate dehydrogenase from *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) cysticerci. *Folia Parasitologica.* 36: 59 – 65.

113. Zheng N, Xu J, Wu Z, Chen J, Hu X, Song L, Yang G, Ji C, Chen S, Gu S, Ying K, Yu X. 2005. *Clonorchis sinensis*: molecular cloning and functional expression of novel cytosolic malate dehydrogenase. *Exp Parasitol* 109:220–227.
114. 3Djigsaw, (<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>)
115. BDGP – (<http://tools.genome.duke.edu/generegulation/McPromoter/>)
116. BIMAS-ProScan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>)
117. BLAST/NBCI (<http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
118. Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).
119. Expasy (<http://expasy.org/tools/#proteome>)
120. Expasy Translate tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>)
121. OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html>)
122. Signal Scan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/signal/>)
123. Webcutter 2.0 (<http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/>)



Cloning, sequencing and functional expression of cytosolic malate dehydrogenase from *Taenia solium*: Purification and characterization of the recombinant enzyme

Gabriela Nava^a, Juan P. Lacleste^b, Raúl Bobes^b, Julio C. Carrero^b, Horacio Reyes-Vivas^c, Sergio Enriquez-Flores^c, Guillermo Mendoza-Hernández^d, Agustín Plancarte^{a,*}

^a Departamento de Microbiología y Parasitología y, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, D.F., México

^b Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México

^c Laboratorio de Bioquímica-Genética y División de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría 04530 México, D.F., México

^d Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2011

Accepted 19 March 2011

Available online 31 March 2011

Keywords:

Taenia solium
Cysticercosis
Malate dehydrogenase
Metabolism
Recombinant enzyme
Cloning

ABSTRACT

We report herein the complete coding sequence of a *Taenia solium* cytosolic malate dehydrogenase (TscMDH). The cDNA fragment, identified from the *T. solium* genome project database, encodes a protein of 332 amino acid residues with an estimated molecular weight of 36517 Da. For recombinant expression, the full length coding sequence was cloned into pET23a. After successful expression and enzyme purification, isoelectrofocusing gel electrophoresis allowed to confirm the calculated pI value at 8.1, as deduced from the amino acid sequence. The recombinant protein (r-TscMDH) showed MDH activity of 409 U/mg in the reduction of oxaloacetate, with neither lactate dehydrogenase activity nor NADPH selectivity. Optimum pH for enzyme activity was 7.6 for oxaloacetate reduction and 9.6 for malate oxidation. K_{cat} values for oxaloacetate, malate, NAD, and NADH were 665, 47, 385, and 962 s⁻¹, respectively. Additionally, a partial characterization of TscMDH gene structure after analysis of a 1.56 Kb genomic contig assembly is also reported.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Humans develop neurocysticercosis (NC) when *Taenia solium* cysticerci are lodged in their central nervous system. NC is a heterogeneous neurological disease that can sometimes be the cause of death (Sotelo and Marin, 1987). This neurologic disease is endemic to developing countries, although it has been introduced into the developed world through infected migrants (Schantz et al., 1998). In spite of its importance as a global public health problem, research on this parasite has remained neglected and little is known about its energy metabolism. Adequate knowledge of how this parasite generates and uses energy, could aid specific drug design for better treatment against *T. solium*.

A possible enzyme candidate is the NAD-dependent cytosolic malate dehydrogenase (TscMDH, EC 1.1.1.37) (Banaszak and Bradshaw, 1975; Williamson et al., 1973), a ubiquitous enzyme that exists in all eukaryotes (Gietl, 1992). The NAD-dependent dehydrogenases are one of the largest and best-studied families of nucleotide-binding proteins: over 100 different members have already been identified (Minárik et al., 2002). cMDH is an enzyme that converts malate to oxaloacetate. This reaction results in two

important products: NADH as reducing equivalent, and oxaloacetate, as metabolic substrate. Together with aspartate aminotransferase isoenzymes, cMDH is involved in the transfer of reducing equivalents from cytosol to mitochondria (aspartate–malate shuttle), in the form of malate/oxaloacetate rather than as NAD/NADH. (Musrati et al., 1998). Additionally, cMDH, in combination with the NADP dependent malate dehydrogenase (decarboxylating EC 1.1.1.39) has been proposed as a MDH-complex involved in regulating energy metabolism in helminthes (Fodge et al., 1972; Landsperger and Harris, 1976). Moreover, cMDH is important in other metabolic pathways such as the glyoxylate cycle (Davis and Goodman, 1992), glyoxylate degradation (Sakai et al., 2008), mixed acid fermentation (Amarneh and Vik, 2005) and gluconeogenesis (Chakravarty et al., 2005). Cloning and functional recombinant expression of the TscMDH should allow for structure/function studies, eventually leading to the identification of drugs that could selectively inhibit this parasite enzyme.

2. Material and methods

2.1. Materials

Plasmid vector pET23a was obtained from EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Germany). *Escherichia coli* strains BL21 was purchased

* Corresponding author. Fax: +52 55 5623 2384.

E-mail address: apc@servidor.unam.mx (A. Plancarte).

from Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). Plasmid mini-preparation kit was obtained from Invitrogen Corporation, (Carlsbad, CA, USA). Bacto tryptone and Bacto yeast extract were from Becton Dickinson and Company, (Texarkana, TX, USA). Sodium dodecyl sulfate and agarose LE were from Bio-Rad, (Hercules CA, USA). TAQ DNA polymerase, was from GoTaq Flexi DNA Polymerase Promega Corporation, (Madison WI, USA). EcoRI and Hind III restriction enzymes were from Biolabs, (Ipswich, MA, USA). T4 DNA ligase was purchased from Promega Corporation, (Madison, WI, USA). IPTG, L-malate, NAD and ampicillin were from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Other chemicals were of at least reagent biology grade.

2.2. Cloning and sequence analysis of the MDH gene

An N-terminal twenty amino acid sequence, previously obtained from purified native *T. solium* cMDH (Plancarte et al., 2009), was used to query for MDH in the *T. solium* genome project database (Aguilar-Díaz et al., 2006). The full length coding sequence was available as a cDNA clone. Two primers were designed to amplify the full length coding sequence of *TscMDH* (Invitrogen). The forward primer 5'_AGCGGAATTCATGCCTGGACCTCTTAG_3' included an EcoRI restriction site and the reverse primer 5'_ATGGAAGCTTCTTGAAGGAGGAAAGAGC_3' included a Hind III restriction site. PCR was performed as follows: an initial incubation at 94 °C for 2 min denaturizing; 40 cycles of amplification at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 90 s, and extension at 72 °C for 90 s; the final extension was at 72 °C for 10 min. The PCR product was run in 1% agarose gel electrophoresis with DNA markers as size standard, and visualized with ethidium bromide. PCR product was sequenced by Sanger procedure (Sanger and Coulson, 1975) and analyzed by 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The nucleotide sequence was identified as coding for *TscMDH* by using BLAST (<http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1979).

2.3. Recombinant expression and purification of recombinant *T. solium* cytoplasmic malate dehydrogenase (*r-TscMDH*)

The full coding region of the *r-TscMDH* obtained by PCR was cloned into EcoRI and Hind III sites of the expression vector pET23A (Novagen, Darmstadt, Germany) following standard methods. After transformation into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, positive clones were selected on ampicillin and induced for expression of amino-terminal His-tagged *r-TscMDH* by incubation with 1 mM IPTG. Lysates from BL21 (DE3) pLysS cells induced cultures were resolved in SDS-PAGE to confirm expression levels. Finally, His-tagged recombinant protein was purified from inclusion bodies by affinity chromatography using HiTrap columns (Pharmacia Biotech, USA) and stored at –20 °C until use. Protein samples were subjected to SDS-PAGE at room temperature in slab gels (15% acrylamide) (Laemmli, 1970), and the gels stained for protein with Coomassie blue or silver nitrate.

Proteins' concentration was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951) with BSA as standard. Additionally, concentration of the *r-TscMDH* was also determined by measuring its absorbance at 280 nm and using the molar extinction coefficient value of $\epsilon = 1.213$ (Stanley and von Hippel, 1989)

2.4. Isoelectric focusing and *in situ* enzyme reaction

The isoelectric focusing gel procedure of Beauchamp and Fridovich (1971) was employed. A 0.1 µg sample of *r-TscMDH* was mixed with 2 µl of sample buffer (glycerol 60%, ampholyte pH 3.5–10, 0.66%) (Amersham Pharmacia Biotech AB) and ampholyte pH 5–7, 3.3% (Amersham Pharmacia Biotech AB). Immediately

after isoelectric focusing, the gel was incubated with 0.21 mM NADH, 0.2 mM oxaloacetate and 1 mM nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich). Enzyme activity was detected by reduction of NBT in presence of 3 mM phenazide methosulfate (PMS) by the action of the NADH in the MDH forward reaction. The reaction was stopped by addition of distilled water.

2.5. MDH activity and kinetic parameters calculation for *r-TscMDH*

r-TscMDH enzyme activity was studied in an Ultrospec 3100 (Amersham) spectrophotometer, in 1 cm light path cells at room temperature, and following the procedure described elsewhere (Englard, 1969) with some modifications. Briefly, forward MDH activity, with oxaloacetate as substrate, was measure in freshly prepared solutions of 0.2 mM oxaloacetate and 0.21 mM β-NADH in Tris-HCl (pH 8.0), and 0.5 µg of *r-TscMDH* at a final volume of 1 mL. Initial velocities were determined spectrophotometrically by measuring NADH decrease at 340 nm. For reactions measuring reverse MDH activity, the procedure of Prichard and Schofield (1968) with some modifications was followed. The reaction buffer contained 50 mM glycine (pH 9.6), 3 mM L-malate and 0.52 mM NAD. Initial velocities were determined spectrophotometrically by measuring NADH increase at 340 nm. In addition, assays were carried out substituting D-malate for L-malate, and NAD for NADP. One MDH unit is defined as the amount of enzyme required to oxidize or reduce 1 µmol coenzyme min⁻¹mg⁻¹. Enzyme specific activity was defined as enzyme units per milligram of protein.

2.6. Effect of pH and temperature on *r-TscMDH* stability

The pH-dependence on MDH activity of *r-TscMDH* was evaluated by measuring its forward velocity reaction in the pH range 4.0–11, as described above. The pH-dependent stability of the *r-TscMDH* activity was determined by equilibrating aliquots of the recombinant protein (5 µg/ml) through dialysis against a 0.1 M solution of the following buffers: acetate (pH 4.0–5.5), phosphate (pH 6.0–8.0) and tris-HCl (pH 8.5–11.0) for 24 h. After incubation, the enzyme activity of each aliquot was measured at the optimum pH. All pH assays were conducted at room temperature.

The effect of temperature on the oxaloacetate reduction reaction catalyzed by *r-TscMDH* was examined under standard assay conditions (Englard, 1969). The *r-TscMDH* was incubated at temperatures ranging from 5 °C to 60 °C for 10 min in Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Afterwards, the aliquots were allowed to reach room temperature and enzymatic activity was determined at the optimum pH, as described above.

2.7. Effect of NAD analogs on MDH activity

The *r-TscMDH* enzyme activity for five different pyridine nucleotide analogues of β-NAD, altered in the pyridine moiety, were determined through initial velocity studies in the reverse reaction, as described above (Yoon and Anderson, 1988). Coenzyme analog concentrations were varied from 0.2 to 0.8 mM for 3-acetyl pyridine adenine dinucleotide (APAD); nicotinamide mononucleotide (NM); nicotine acid adenine dinucleotide (NAAD); nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), and α-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). Molar extinction coefficients at maximal absorption wavelength were used to determine the reaction rates.

2.8. Inhibition study

Inhibition studies were performed by the procedure of Tahir and Mannervik (1985) in both directions of the *r-TscMDH* activity. Praziquantel (PZQ) and albendazole (AB) (Sigma-Aldrich Chem.) were used in variable concentrations of 0.1–6 mM and

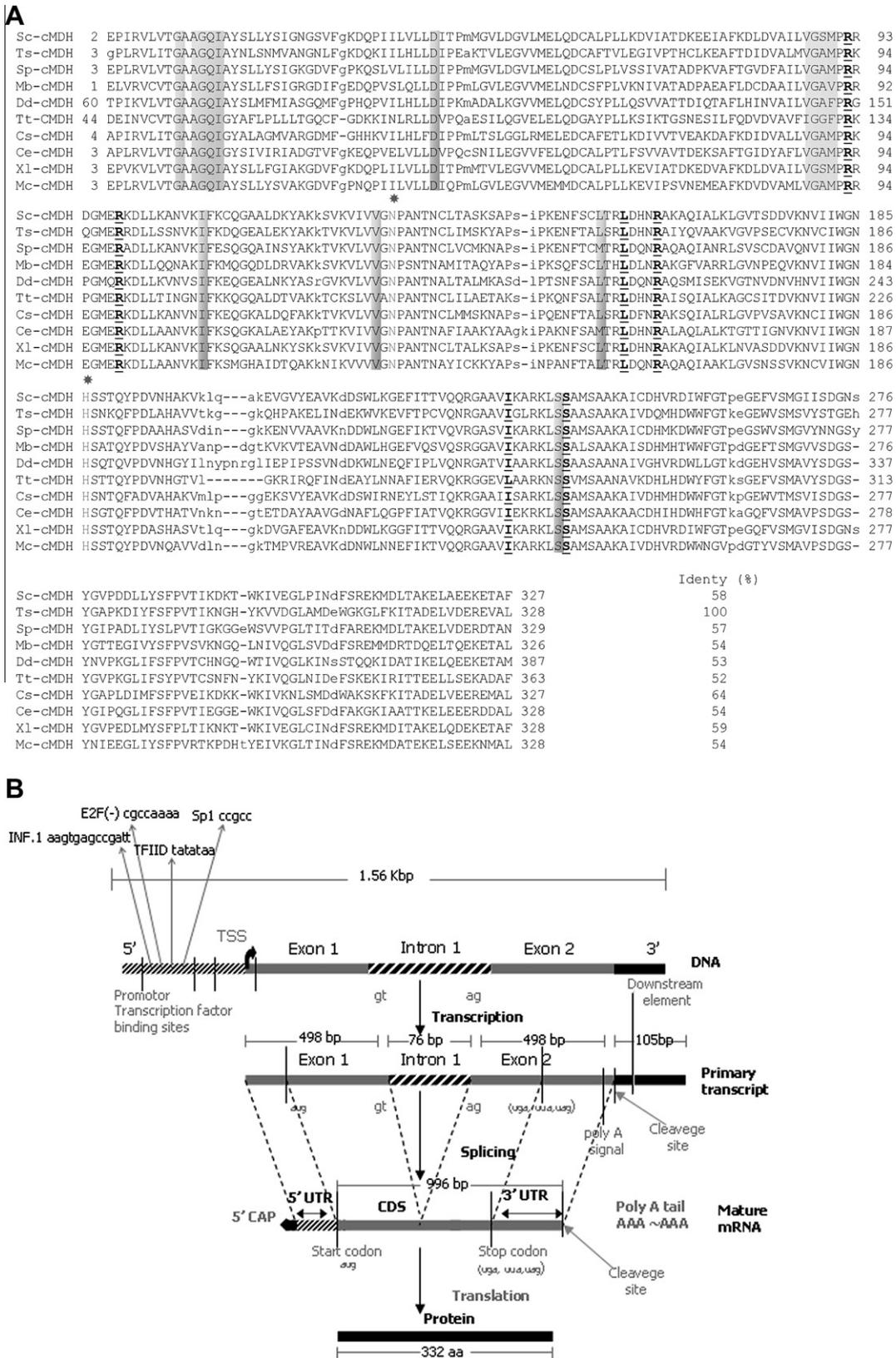


Fig. 1. (A). Alignment of the predicted amino acid sequence of the cloned r-TscMDH with other MDH sequences. Amino acids known to be involved in binding to NAD and malate are respectively shown in grey and bold. AA involved in the binding of both substrates are indicated by asterisks. Eg. *Echinococcus granulosus* (Acc. no gi 6016537), *Sc. Sus scrofa* (Acc. no gi 5107783), *Strongylocentrotus purpuratus* (Acc. no gi 72124124), *Mb. Monosiga brevicollis* MX1 (Acc. no gi 167519943), *Dd. Dictyostelium discoideum* (Acc. no gi 66804051), *Tt. Tetrahymena thermophila* (Acc. no gi 146165401), *Cs. Clonorchis sinensis* (Acc. no gi 48686715), *Ce. Caenorhabditis elegans* (Acc. no gi 17561064), *Xl. Xenopus laevis* (Acc. no gi 38014771), *Mc. Mytilus californianus* (Acc. no gi 73656362). (B). Gene structure and protein synthesis sequence of *TscMDH*. The gene is composed of two exons and one intron. TATA-box, INF1, TFIIID and SP1, as potential transcription factors are shown for 5'promotor region, and uga, uua, uag, and poly A tail as stop codons in the 3' region.

Table 1
Purification of r-TscMDH.

Step	Total protein (mg)	r-cMDHTs (mg)	Purity (%)	Yield (%)
Lysate ^a	33.15	9.95	30	100
Eluate	6	6	95	60

^a Purification was achieved from 2.5 g of wet obtained from 1 L of *E. coli* BL21 harboring plasmid pET23a.

0.1–0.3 mM, respectively. Each drug was dissolved in each one of the solvents: ethanol, methanol, isopentyl alcohol and dimethyl sulfoxide (DMSO) at 1% or less as final concentration in the assay buffer. The r-TscMDH was incubated with these drugs for 15–30 min or nonincubated before developed the MDH activity.

2.9. Circular dichroism spectra (CD) spectra

Spectra from spectropolarimeter (JASCO J-810) were recorded at 25 °C using a 0.1 cm quartz cell. CD measurements were obtained in continuous scanning mode at a speed of 100 nm/min, at far-UV (260–190 nm). r-TscMDH samples (1 mg/ml) were previously dialyzed against 25 mM sodium phosphate buffer and 1 mM DTT (pH 7.4) and centrifuged to remove any precipitated. Three scans were recorder and averaged. Results were expressed as the mean residue molar ellipticity (θ) which is defined as:

$$\Theta = \theta_{obs}(\text{MRW})(100)/lc$$

where θ_{obs} is the observed mean residue ellipticity in degrees; c is the concentration of protein in mg/ml; MRW is the mean residue weight (109.9) and l is the light path length in centimeters.

2.10. Thermal unfolding assay

Thermal denaturation curves were determined by monitoring the change in the circular dichroism (CD) value at 222 nm using a 0.1 cm quartz cell. The temperature was increased from 40 to 65 °C at a rate of 1 °C/min. For experiments, r-TscMDH (1 mg/ml) was previously dialyzed against 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). From the data, the apparent fraction of denatured subunits (f_D) was calculated using the equation:

$$F_D = yN - y/yN - y_D$$

where yN and y_D are the ellipticity values of the native and unfolded fractions, respectively. Both parameters were linear extrapolations from the initial and terminal portions of the curve of y as a function of temperature.

3. Results

3.1. Cloning and characterization of r-TscMDH

A cDNA library from *T. solium* cysticerci was screened using a DNA sequence deduced from a 20 amino acid sequence previously obtained from purified native *T. solium* cMDH (Plancarte et al., 2009). To confirm that the isolated clones corresponded to *T. solium* cMDH (r-TscMDH), inserts of positive plaques were sequenced in both directions using an automated fluorescent genetic analyzer (ABI PRISM Applied Biosystems, CA, USA). The nucleotide and deduced amino acid sequences of r-TscMDH have been deposited in GenBank accession no HQ207526.

The identified cDNA insert contained 1562 bp (Fig. 1A), encoding a protein of 332 amino acid residues, corresponding to a 36517 Da protein with an isoelectric point of 8.7. The gene is composed of two 498 pb exons, and one 76 pb intron. Bioinformat-

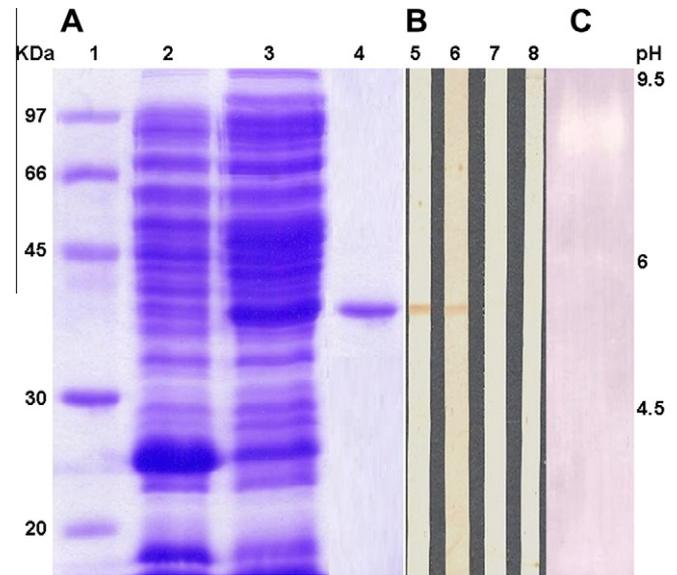


Fig. 2. SDS-PAGE, immunoblot and isoelectric focusing of r-TscMDH. (A) SDS-PAGE of r-TscMDH expressed in *E. coli* BL21. Lane 1: protein molecular weight markers, lane 2: lysate of bacteria with parent plasmid pET23a, lane 3: lysate of bacteria with recombinant r-TscMDH induced with IPTG, lane 4: recombinant r-TscMDH purified by HiTrap IMAC metal affinity resin. (B) Immunoblot. SDS-PAGE was performed as in panel A and the r-TscMDH and *T. solium* crude extract were electroblotted onto PVDF sheet. The recombinant protein was developed with a polyclonal serum raised in rabbits against r-TscMDH in the purified recombinant protein, lane 5; and in the *T. solium* crude extract, lane 6. Lanes 7 and 8 are the same as lanes 5 and 6, but incubated with a normal rabbit serum. (C) Isoelectric focusing. Lane 8: isoelectric focusing of r-TscMDH performed as described under Methods. After focusing the gel was stained for MDH activity. Only one protein appears at $pI \sim 8.5$.

ics programs yielded the potential transcription factors as TATA-box, TFIID, SP1 and INF.1, situated in the UTR 5' region. In fact, INF.1 is in the 2-Cys peroxiredoxin promoter gene region from *T. solium* and *T. crassiceps* (Vaca-Paniagua et al., 2009). The uga, uua, uag and poly A tail stop codons were ubicated in the UTR 3' (Fig. 1 B).

Alignment with other malate dehydrogenases showed the highest identity (90%) with cMDH of *Equinococcus granulosus*, a close relative of *T. solium*, as well as moderate identity with MDH of pork (*Sus scrofa*), *Tetrahymena thermophila* and *Strongylocentrotus purpuratus* (58%, 57%, 52% identity, respectively). The conserved residues Arg-92, Arg-99, Asp-159, Arg-162, and His-187 (Fig. 1A), known to participate in the substrate binding and catalysis, are present in the r-TscMDH (Goward and Nicholls, 1994).

3.2. Recombinant expression and purification of r-TscMDH

Recombinant expression of r-TscMDH was carried out in BL21 cells using pET-23a. The plasmid construct contained the full length coding sequence for r-TscMDH as a fusion protein with a His-tag at the C-terminal end. Purified r-TscMDH protein was obtained by affinity chromatography through HiTrap IMAC Sepharose columns. As shown in Table 1, up to 60% of the recombinant protein was recovered. In a typical preparation, about 33 mg of purified r-TscMDH could be obtained from 1L transformed cell culture. After concentrating the purified r-TscMDH with an Amicon system, its concentration reached up to 1.3 mg/ml. SDS-PAGE of the purified r-TscMDH (Fig. 2A) revealed a single band of around 36 kDa. This value was in agreement with the deduced monomeric molecular mass of the C-terminal His₆-tagged r-TscMDH (MW = 37340 Da). Also, r-TscMDH and *T. solium* cMDH in a crude

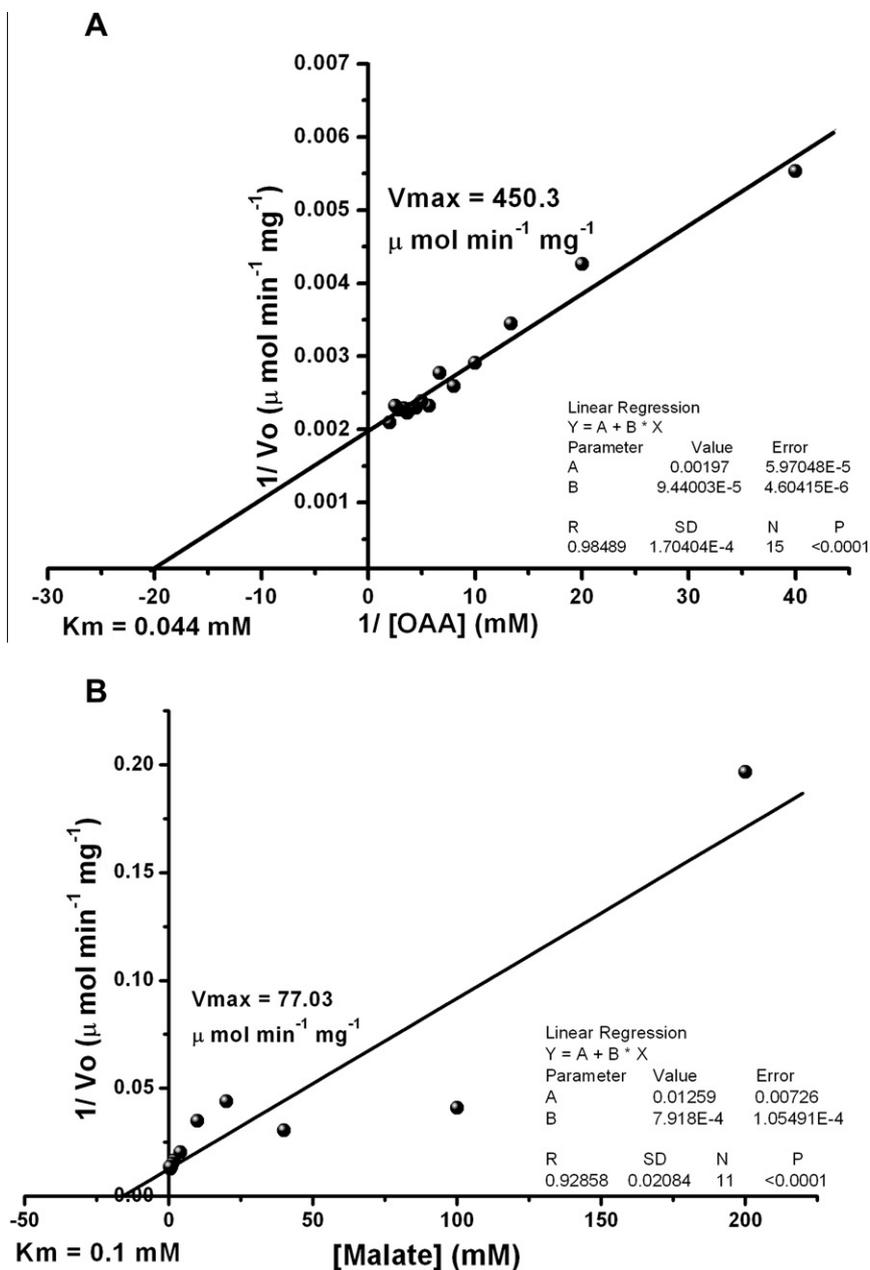


Fig. 3. (A) Lineweaver–Burk plot of initial velocities *r*-TscMDH activity ($1/v$) versus $1/[\text{oxaloacetate}]$ in the forward reaction. (B) ($1/v$) versus $1/[\text{malate}]$ in the reverse reaction. The intercepts in the ordinates are V_{max} values, the intercepts in the abscissas are k_m values.

extract were recognized by polyclonal serum raised in rabbits against *r*-TscMDH (Fig. 2B).

3.3. Isoelectric focusing and in situ enzyme reaction

When *r*-TscMDH was analyzed by isoelectric focusing gel (Fig. 2C) the estimated pI at 8.1, deduced from its amino acid sequence, was confirmed by determination of MDH activity at the position of the gel.

3.4. Kinetic characterization of *r*-TscMDH enzyme activity

The double reciprocal plots of initial velocities against several oxaloacetate and NADH fixed concentrations, produced sets of straight intersecting lines (Fig. 3A). Catalytic constants for the reverse reaction developed by *r*-TscMDH were obtained by the same

method (Fig. 3B). The k_m and V_{max} values, as well as the K_{cat} and K_{cat}/k_m ratios obtained for both reaction directions are shown in table II. The *r*-TscMDH showed specific MDH activity of 409 U mg^{-1} , and no activity was detected when NADP(H) was used as a substitute for NAD(H), even at concentrations higher than 20 mM or at 10-fold higher enzyme concentration. No enzyme LDH activity was observed, even at an enzyme concentration that was 10 times higher than that used in the MDH activity assay, in absence of D-malate.

3.5. Effect of pH and temperature on *r*-TscMDH stability

Enzyme activity, evaluated in the 4.0–11 pH range, showed the highest specific activity at pH 8.0. Functional assays carried out at various pHs and temperatures, showed highest stability in the 7.0–8.5 pH range, and within a 5 °C to 60 °C temperature range. Above

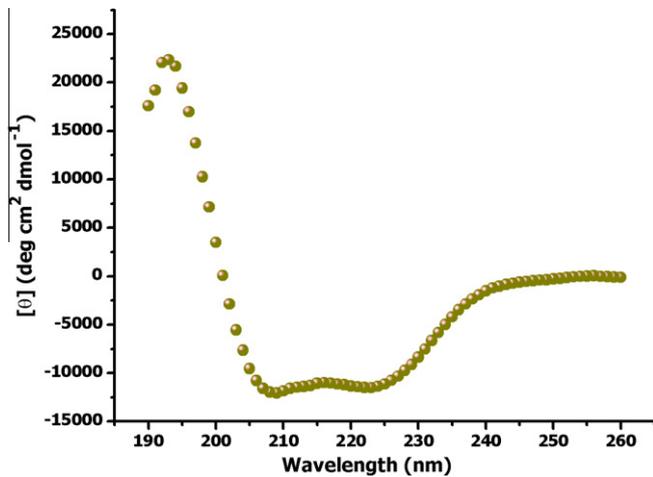


Fig. 4. Circular dichroism spectra of r-TscMDH in the near-UV. The curve is characteristic of an α -helix (208–190 and 222 nm) and β -sheet (215–218 nm) structure protein.

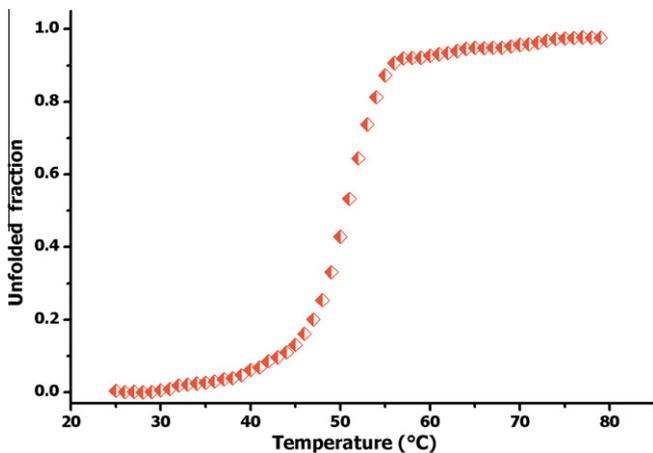


Fig. 5. Temperature-induced denaturation. The curve was determined by monitoring ellipticity at 222 nm in the near-UV circular dichroism spectra. At the 0.5 value the r-TscMDH was totally inactive.

40 °C, r-TscMDH activity gradually decreased and became undetectable at 60 °C. In addition, this enzyme was stable at 20 °C and 37 °C over a 30 min period.

3.6. Effect of NAD analogues on r-TscMDH enzyme activity

When r-TscMDH activity was evaluated in presence of five different co-substrates, only 3-acetyl pyridine adenine (APA) was reduced. However, enzyme activity for APA was lower ($9.55 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) than that obtained for NAD $27.2 (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1})$.

Table 2

K_M , K_{cat} , V_{max} values in the direct and reverse reactions catalyzed by r-cMDHTs.

Substrate	Co-substrate (mM)	K_M (mM)	K_{cat} s^{-1}	K_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	V_{max} $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
L-malate	NAD 0.52	0.1	47.4	4.74×10^5	77.03
NAD	L-malate 3	0.042	385.6	1.88×10^6	79.12
Oxaloacetate	NADH 0.21	0.044	665.34	1.51×10^7	450.3
NADH	Oxaloacetate 0.2	0.167	962.66	5.76×10^6	721.4

Kinetic constants obtained as the mean value of three measurements.

3.7. Inhibition study

Praziquantel and albendazole did not show any inhibition to the activities of the r-TscMDH.

3.8. Circular dichroism and denaturalization of r-TscMDH

The unheated r-TscMDH spectrum showed a strong positive maximum between 190 and 208 nm, together with negative minima at 222 nm (Fig. 4). These results are in agreeing with a characteristic α -helix structure. The negative region between 215 and 218 nm developed for the r-TscMDH also shown a classic β -sheet structure signal.

3.9. Thermal unfolding assay

The CD of denaturalization of r-TscMDH by heat is showed in Fig. 5. The apparent melting temperature (t_m) of r-TscMDH calculated from spectra of CD was 50.5 °C.

4. Discussion

Malate dehydrogenase activity was originally described in beef heart tissue (Siegel and England, 1961). Since then, abundant research on this enzyme from animals, plants and bacteria, has clarified its fundamental role in cellular metabolism (Rotmans, 1978; Unnasch, 1992; Goward and Nicholls, 1994; Trejo et al., 1996; Oh et al., 2002). In contrast, little attention has been directed to MDH from parasites, and few reports have described recombinant expression, purification and functional assays of parasite MDHs (Agüero et al., 2004; Leroux et al., 2006).

Analysis of the amino acid sequence of r-TscMDH, deduced from its nucleotide coding sequence, showed the characteristic glycine motifs GAXGXXG/A (Fig. 1A) close to the N-terminus, in the dinucleotide-binding domain known for MDHs that use NAD as a cofactor (Rossmann et al., 1974; Wierenga et al., 1986). We also identified the active residues Arg 92, 99, 162; Asp 42, 159; and His 187, which are important for substrate and coenzyme binding, and catalysis (Birktoft et al., 1982; Nishiyama et al., 1996). Upon formation of the enzyme-coenzyme substrate ternary complex, a conformational change brings an external loop closer to the active-site, hindering solvent interaction with substrate and catalytically important residues. This highly conserved loop region appears to be present in r-TscMDH in residues 87–104.

The His 195 and Asp 168 residues generally observed in typical MDHs and lactate dehydrogenases were situated in positions His 187 and Asp 159 in our recombinant protein. These residues are important because they form a proton relay system in the active site and allow for the histidine imidazole ring to act both as an acid and as an alkali (Rossmann et al., 1975; Birktoft and Banaszak, 1983). This pair could provide an explanation for the relatively stronger binding of NADH vs NAD in the case of cytoplasmic malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase. Residue Asp 42 found in r-TscMDH (Fig. 1A) is present in all NAD⁺ dependent MDHs, and is involved in the modulation of coenzyme specificity (Birktoft and Banaszak, 1983). This residue has

the coenzyme binding capacity and specificity towards hydrogen bonding with adenosine ribose hydroxyl groups (Wigley et al., 1992; Kelly et al., 1993).

In this report, recombinant r-TscMDH was expressed in bacterial cells and purified through affinity chromatography. Functional assays demonstrated that r-TscMDH showed typical enzymatic activity that could be inhibited by the substrate in the direction of reduction of oxaloacetate. This substrate inhibition at high concentrations of oxaloacetate (>500 μ M) is a common feature of MDHs (van Kuijk and Stams, 1996; Hunter et al., 2000). Maximum rates of oxaloacetate reduction by NADH proceeded 6 times faster than malate oxidation by NAD (Table 2). The more relevant parameter is K_{cat}/k_m , which reflects the efficiency of enzyme catalysis. Comparing K_{cat}/k_m for the non-nucleotide substrates, the NADH-dependent reduction of oxaloacetate was favored 32 times over the oxidation of malate, suggesting that r-TscMDH catalyzed the reduction of oxaloacetate more efficiently than the oxidation of malate. It is conceivable that malate enters the mitochondria to be dismutated into one of the two energy metabolite types, acetate or succinate as end products (Smith and McMannus, 1989). In this way *T. solium* obtaining of 3.7 ATPs for glucose molecule instead of two ATPs by homolactate fermentation. So, *T. solium* appears to acquire a physiological advantage by dismutated malate instead of homolactate fermentation (Tielens, 1994).

The CD spectra of r-TscMDH showed that the r-TscMDH was obtained in optimal tridimensional structure with its active sites in ionized way. Additionally, the secondary structure of the r-TscMDH is in agreement with the crystal structure of *Sus scrofa* cMDH (Chapman et al., 1999) where the α/β secondary structure is α -helix majority. The (t_m) is in accord with the results obtained with the native c-TsMDH's temperature stability assays.

Recent studies using structural analogues of nucleotide MDH substrates have demonstrated that some structural moieties may be essential for nucleotide binding (Sicsic et al., 1984; Kahn and Anderson, 1986). We show here that r-TscMDH reduced the NAD analogue 3-acetyl pyridine adenine (APA) less efficiently than NAD. It is possible that any of the two hydrides on the acetyl group of the 3-acetylpyridine molecule mimics the amide group of the nicotinamide moiety on NAD, for binding carbon C4 in L-malate. In contrast, nicotinic acid adenine dinucleotide (NAA) was not fit as substrate for r-TscMDH. NAA has a carboxyl group in the pyridine ring instead of the amide group of NAD. Therefore, the amide group could form a hydrogen bond with the C4 of L-malate becoming a better reducing agent than the carboxyl group. Another NAD analogue, β -nicotinamide mononucleotide (NMN), which lacks adenine, was also inactive towards r-TscMDH catalysis. These observations indicated the importance of the adenine dinucleotide moiety in the specificity of the enzyme for L-malate.

The NAD-dependent malate dehydrogenases play an antioxidant role through the action of oxaloacetate (Oh et al., 2002; Nath et al., 1995). Additionally, it has been reported that MDH gene expression is induced by oxygen, as a response to an imbalanced generation of reactive oxygen species (Park et al., 1995). This induced response is modulated by the protein Arca, which functions as an activator-repressor of MDH gene expression. Thus, it is conceivable that TscMDH aids this parasite to overcome oxidative stress developed by the host immune response, and keeps it alive for long periods in asymptomatic hosts' tissue (Dixon and Lipscomb, 1961).

The knowledge of the complete gene structure as well as characterization of the gene expressed recombinant protein of the cytoplasmic malate dehydrogenase of *T. solium* are tools that will allow for a better understanding of the parasite's biology, opening the possibility for manipulation of this enzyme, aimed at controlling its infection.

Acknowledgements

The present study was funded by grant from The Universidad Nacional Autónoma de México, DGAPA (PAPIIT-IN200510-3). All experiments complied with the current laws of the Universidad Nacional Autónoma de México. M in C. Gabriela Nava expresses her gratitude for the training received in the Posgraduate Program in Biological Sciences, UNAM. The authors are grateful for the sequencing work done by M. in C. Patricia de la Torre and we wish to thank Dr. Gerardo Medina for valuable English corrections.

References

- Aguilar-Díaz, H., Bobes, R., Carrero, J.C., Camacho-Carranza, R., Cervantes, C., Cevallos, M., Dávila, G., Rodríguez-Dorantes, M., Escobedo, G., Fernández, J.L., Fragoso, G., Gaytán, P., Garciarubio, A., González, V.M., González, L., José, M., Jiménez, L., Lacllette, J.P., Landa, A., Sarralde, C., Morales-Montor, J., Morett, E., Ostoa-Saloma, P., Sciuotto, E., Santamaría, R., Soberón, X., de la Torre, P., Valés, V., Yáñez, J., 2006. The genome project of *Taenia solium*. Parasitology International 55, S127–S130.
- Agüero, F., Noe, G., Hellman, U., Repetto, Y., Zaha, A., Cazzulo, J.J., 2004. Purification, cloning and expression of the mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) from protoscolices of *Echinococcus granulosus*. Molecular and Biochemical Parasitology 137, 207–214.
- Amarneh, B., Vik, S.B., 2005. Direct transfer of NADH from malate dehydrogenase to complex I in *Escherichia coli*. Cell Biochemistry Biophysics 42, 251–261.
- Altschul, S.F., Maden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1979. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. Nucleic Acids Research 25, 3389–3402.
- Banaszak, L.J., Bradshaw, R.A., 1975. Malate dehydrogenase. In: Boyer, P.D. (Ed.), The Enzymes, Third ed. Academic Press, New York, pp. 369–396.
- Beauchamp, Ch., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44, 276–287.
- Birktoft, J.J., Fernly, R.T., Bradshaw, R.A., Banaszak, L.J., 1982. Amino acid sequence homology among the 2-hydroxyacid dehydrogenases: mitochondrial and cytoplasmic malate dehydrogenases from homologous systems with lactate dehydrogenases. Proceedings of the National Academic of Science. USA 79, 6166–6170.
- Birktoft, J.J., Banaszak, L.J., 1983. The presence of a histidine-aspartic acid pair in the active site of 2-hydroxyacid dehydrogenases. Journal of Biological Chemistry 258, 472–482.
- Chakravarty, K., Cassuto, H., Resef, L., Hanson, R.W., 2005. Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. Critical Reviews of Biochemistry and Molecular Biology 40, 129–154.
- Chapman, A.D.M., Cortes, A., Dafforn, T.R., Clarke, A.R., Brady, R.L., 1999. Crystal structure of ternary complex of porcine cytoplasmic malate. Journal of Molecular Biology 285, 703–712.
- Davis, W.L., Goodman, D.B., 1992. Evidence for the glyoxylate cycle in human liver. The Anatomical Record 234, 461–468.
- Dixon, H.B.F., Lipscomb, F.M., 1961. Cysticercosis: an analysis and follow up 450 cases. Privy. Council Medicine Research. Special Report 229, 1–58.
- Englard, S., 1969. Extramitochondrial L-malate dehydrogenase of beef heart. Methods in Enzymology 13, 123–129.
- Fodge, D.W., Gracy, R.W., Harris, B.G., 1972. Studies on enzymes from parasitic helminthes. Purification and physical properties of malic enzymes from muscle tissue of *Ascaris suum*. Biochimica et Biophysica Acta 268, 271–284.
- Gietl, Ch., 1992. Malate dehydrogenase isoenzymes: Cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and organelles. Biochimica et Biophysica Acta 1100, 217–234.
- Goward, Ch., Nicholls, D., 1994. Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. Protein Science 3, 1883–1888.
- Hunter, G., Hellman, U., Cazzulo, J.J., Nowicki, C., 2000. Tetrameric and dimeric malate dehydrogenase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Molecular Biochemical Parasitology 105, 203–214.
- Kahn, D.W., Anderson, B.M., 1986. Characterization of *Haemophilus influenzae* Nucleotide Pyrophosphatase: an enzyme of critical importance for growth of the organism. Journal of Biological Chemistry 261, 6016–6025.
- Kelly, C.A., Nishiyama, M., Ohnishi, Y., Beppu, T., Birktoft, J.J., 1993. Determinants of protein thermostability observed in the 1.9 Å crystal structure of malate dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermus flavus*. Biochemistry 32, 3913–3922.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London 227, 680–685.
- Landsperger, W.J., Harris, B.G., 1976. NAD⁺-malic enzyme regulatory properties of the enzyme from *Ascaris suum*. Journal of Biological Chemistry 251, 3599–3602.
- Leroux, A., Fleming-Canepa, X., Aranda, A., Maugeri, D., Cazzulo, J.J., Sanchez, M.A., Nowicki, Ch., 2006. Functional characterization and subcellular localization of the three malate dehydrogenase isozymes in *Leishmania spp.* Molecular Biochemical Parasitology 149, 74–85.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Lewis-Farr, A., Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193, 265–275.

- Minárik, P., Tomaskova, N., Kollarova, M., Antalík, M., 2002. Malate dehydrogenases structure and function. *Gene Physiology and Biophysical* 21, 257–265.
- Musrati, R.A., Kollarova, M., Mernik, N., Mikulasova, D., 1998. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *Gene Physiology and Biophysical* 17, 193–210.
- Nath, K.A., Ngo, E.O., Hebbel, R.P., 1995. Ketoacids scavenge H₂O₂ *in vitro* and *in vivo* and reduced menadione-induced DNA injury and cytotoxicity. *American Journal of Physiology* 268, 227–236.
- Nishiyama, M., Kinoshita, M., Kudo, H., Horinouchi, S., Tanokura, M., 1996. Enhancement of the turnover number of thermostable malate dehydrogenase by deleting hydrogen bonds around the catalytic site. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 225, 844–848.
- Oh, T.J., Kim, I.G., Park, S.Y., Kim, K.Ch., Shim, H.W., 2002. NAD-dependent malate dehydrogenase protects against oxidative damage in *Escherichia coli* K-12 through the action of oxaloacetate. *Environmental Toxicology Pharmacology* 11, 9–14.
- Plancarte, A., Nava, G., Mendoza-Hernandez, G., 2009. Purification, properties and kinetic studies of cytoplasmic malate dehydrogenase from *Taenia solium* cysticerci. *Parasitology Research* 105, 175–183.
- Park, S.J., Cotter, P.A., Gunsalus, R.P., 1995. Regulation of malate dehydrogenase (MDH) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen carbon and heme availability. *Journal of Bacteriology* 177, 6652–6656.
- Prichard, R.K., Schofield, P.J., 1968. A comparative study of the tricarboxylic acid cycle enzymes in *Fasciola hepatica* and rat liver. *Compendium of Biochemistry and Physiology* 25, 1005–1019.
- Rossmann, M.G., Moras, D., Olsen, K.W., 1974. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* 250, 194–199.
- Rossmann, M.G., Liljas, A., Branden, C.I., Banaszak, L.J., 1975. The Enzymes. In: Boyer, P.I. (Ed.), Third ed. Academic Press, New York, pp. 61–102. Vol. X1A.
- Rotmans, J.P., 1978. Schistosoma mansoni Purification and characterization of malate dehydrogenases. *Experimental Parasitology* 46, 31–48.
- Schantz, P.M., Wilkins, P.P., Tsang, V.C., 1998. Immigrants, imaging and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. In: Scheld, W., Craig, A., Hughes, J.M. (Eds.), *Emerging infections*, Vol. 2. ASM Press, Washington, D.C, pp. 213–224.
- Sakai, S., Inokuma, K., Nakashimada, Y., Nishio, N., 2008. Degradation of glyoxylate and glycolate with ATP synthesis by a thermophilic anaerobic bacterium, *Moorella* sp. Strain HUC22–1. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1447–1452.
- Sanger, F., Coulson, A.R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94, 441–448.
- Stanley, C., von Hippel, G.P., 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* 182, 319–326.
- Siegel, L., Englard, S., 1961. Beef-heart malic dehydrogenases: I. Properties of the enzyme purified from extracts of acetone-dried powders. *Biochemical et Biophysical Acta* 54, 67–76.
- Sicsic, S., Durand, P., Langrene, S., le Goffrc, F., 1984. A new approach for using cofactor dependent enzymes: example of alcohol dehydrogenase. *Federation of European Biochemical Societies* 176, 321–324.
- Smith, J.D., McManus, D.P., 1989. The adult: carbohydrate metabolism. In: Smith, J.D., McManus, D.P. (Eds.), *The Physiology and Biochemistry of Cestodes*. Cambridge, UK, pp. 77–113.
- Sotelo, J., Marin, C., 1987. Hydrocephalus secondary to cysticercotic arachnoiditis. A long-term follow-up review of 92 cases. *Journal of Neurosurgery* 66, 686–689.
- Tahir, M.K., Mannervik, B., 1985. Inhibitors for distinction of three types of human glutathione transferase. *Federation of European Biochemical Societies* 181, 249–252.
- Tielens, A.G.M., 1994. Energy generation in parasitic helminthes. *Parasitology Today* 10, 346–352.
- Trejo, F., Costa, M., Gelpi, J.L., Busquets, M., Clarke, A.R., Holbrook, J.J., Cortes, A., 1996. Cloning, sequencing and functional expression of a DNA encoding pig cytosolic malate dehydrogenase: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Gene* 172, 303–308.
- Unnasch, N.L., 1992. Purification and properties of *Plasmodium falciparum* malate dehydrogenase. *Molecular Biochemical Parasitology* 50, 17–26.
- Van Kuijk, B.L., Stams, A.J.M., 1996. Purification and characterization of malate dehydrogenase from the syntrophic propionate-oxidizing bacterium strain MPOB. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 144, 141–144.
- Vaca-Paniagua, F., Parra-Unda, R., Landa, A., 2009. Characterization of one typical 2_Cys Peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research* 105, 781–787.
- Wierenga, R.K., Terpstra, P., Hol, W.G.J., 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *Journal of Molecular Biology* 187, 101–107.
- Wigley, D.B., Gamblin, S.J., Turkenburg, J.P., Dodson, E.J., Piontek, K., Muirhead, H., Holbrook, J.J., 1992. Structure of a ternary complex of an allosteric lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilis* at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 223, 317–335.
- Williamson, J.R., Safer, B., LaNoue, K.F., Smith, C.M., Walajitys, E., 1973. Mitochondrial-cytosolic interactions in cardiac tissue: role of the malate-aspartate cycle in the removal of glycolytic NADH from the cytosol. In: Davis, D.D. (Ed.), *Rate Control of Biological Processes*. Cambridge University Press., London, pp. 241–281.
- Yoon, H., Anderson, B., 1988. Kinetic studies of *Hemophilus influenzae* malate dehydrogenase. *Biochemical et Biophysical Acta* 955, 10–18.

Purification, properties, and kinetic studies of cytoplasmic malate dehydrogenase from *Taenia solium* cysticerci

Agustín Plancarte · Gabriela Nava ·
Guillermo Mendoza-Hernández

Received: 7 August 2008 / Accepted: 16 February 2009 / Published online: 10 March 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Malate dehydrogenase (L-malate: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.37) from the cytoplasm of *Taenia solium* cysticerci (cMDHTs) was purified 48-fold through a four-step procedure involving salt fractionation, ionic exchange, and dye affinity chromatography. cMDHTs had a native M_r of 64,000, while the corresponding value per subunit, obtained under denaturing conditions, was 32,000. The enzyme is partially positive, with an isoelectric point of 8.7, and had a specific activity of 2,615 U mg^{-1} in the reduction of oxaloacetate. The second to the 21st amino acids from cMDHTs N-terminal group were P G P L R V L I T G A A G Q I A Y N L S. This sequence is 100% identical to that of *Echinococcus granulosus*. Basic kinetic parameters were determined for this enzyme. The optimum pH for enzyme reaction was at 7.6 for oxaloacetate reduction and at 9.6 for malate oxidation. K_m values for oxaloacetate, malate, NAD, and NADH were 2.4, 215, 50, and 48 μM , respectively. V_{max} values for the substrates and cosubstrates as described above were 1,490, 87.8, 104, and 1,714 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Several NAD analogs, structurally altered in either the pyridine or purine moiety, were observed to function as coenzymes in the reaction catalyzed by the purified malate dehydrogenase. cMDHTs activity was uncompetitive inhibited by arsenate for both the forward ($K_i=8.2$ mM) and reverse ($K_i=77$ mM) reactions. The mechanism of the cMDHTs reactivity was

investigated kinetically by the product inhibition approach. The results of this study are qualitatively consistent with an Ordered Bi Bi reaction mechanism, in which only the coenzymes can react with the free enzyme.

Introduction

Taenia solium (Platyhelminthes, Cestoda) is the causative agent of neurocysticercosis (NC) in humans. Approximately 20,000,000 people are infected with *T. solium* cysticerci (Bern et al. 1999), and 50,000 deaths occur from this parasite every year (Mafojane et al. 2003). The diagnosis of NC is increasing significantly in nonendemic regions such as the USA, Europe, Australia, and Kuwait (Schantz et al. 1998; Shandera et al. 2002).

Although the carbohydrate metabolism of cestodes has been more extensively studied than any other aspect of their metabolism (Smith and McManus 1989; Andreassen et al. 1999), there is scant information regarding *T. solium*. Investigation in this area allows for a better understanding of energy generation developed by this parasite. This information may consequently aid in ascertaining how parasite energy generation is modified in relation to the hosts.

One particular enzyme that has been analyzed by several authors with the above concern in mind is cytoplasmic malate dehydrogenase (cMDH; Agüero et al. 1995; Rodriguez et al. 1993).

cMDH (E. C. 1.1.1.37) catalyzes the interconversion of oxaloacetate (OAA) and malate linked to the oxidation/reduction of dinucleotide coenzymes in the tricarboxylic acid cycle. The cytosolic pool of malate in helminthes represents the major mitochondrial substrate (Fukumoto 1985) where cMDH is usually involved in shuttle systems for the transfer of reducing equivalents from the cytosol into the

A. Plancarte (✉) · G. Nava
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de
Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM,
Mexico City 04510, Mexico
e-mail: apc@servidor.unam.mx

G. Mendoza-Hernández
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM,
Mexico City 04510, Mexico

mitochondrion (Banaszak and Bradshaw 1970; Zheng et al. 2005). Interestingly, Saz and Sanchez-Moreno found that the reduction of oxaloacetate to malate, catalyzed by cMDH, is the most common source of energy for helminth metabolism (Saz and Lescure 1969; Saz 1972; Sanchez-Moreno et al. 1987).

cMDH from several helminthes has been analyzed as a pharmacological target because some studies have shown it to be inhibited by anthelminthes (Das et al. 2004; Lakhdar-Ghazal et al. 2002). Cestodes catalyze oxaloacetate formation in contrast to phosphoenolpyruvate production observed in mammals. (Banaszak and Bradshaw 1970). This different host–parasite biochemical process might be of value for rational drug design. In addition, unspecific polyclonal lymphocyte activation was found in *Trypanosoma cruzi* MDH and was associated with the immunopathology and parasite escape mechanisms (Montes et al. 2002). The relevance of cMDH enzymes cannot be understated if there is to be a better understanding aimed at rational drug design. We therefore decided to purify, characterize, and develop kinetic studies with cMDHs.

Materials and methods

Materials

OAA, NAD⁺, and NADH (disodium salt) were obtained from Boehringer Mannheim; L-malate, oxaloacetate, bovine serum albumin, and all mono- and dinucleotides were purchased from Sigma; Coomassie Brilliant Blue R-250, acrylamide, *N,N'*-methylene bis acrylamide, were from Bio-Rad; low molecular weight markers from Gibco BRL; Amicon PM 10 membrane from Diaflo, Danvers, MA, USA; polyvinylidene difluoride (PVDF) from Millipore; CM-Sepharose CL-6B and Blue Sepharose CL-6B were acquired from GE Healthcare. Other chemicals used were standard reagent grade purity.

Parasites

T. solium cysticerci were dissected from skeletal muscle obtained from naturally infected cysticercotic pigs proceeding from slaughter houses and processed as previously reported (González et al. 2002)

Enzyme purification

Unless otherwise stated, all purification steps were carried out at room temperature. Purification of the enzyme was performed using previously described techniques (Agüero et al. 1995). Parasites were homogenized in 1:3 *w/v* 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) plus 5 mM phenylmethyl sulfonyl-fluoride to obtain a crude extract.

Ammonium sulfate fractionation

Parasite crude extract was salted-out with ammonium sulfate (AS). Amounts of AS required to achieve desired final concentrations were determined from a solubility table (Green and Huges 1955). AS precipitates were dialyzed against 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), and the last AS pellet was labeled cMDHsAS.

Ionic exchange chromatography

Cation exchange chromatography on CM-Sepharose (CM; GE Healthcare; 2.6 cm×18 cm) equilibrated in a 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) was performed on cMDHsAS (Karlsson et al. 1997). After washing the nonabsorbed protein, the enzyme was eluted using a linear NaCl concentration gradient (0–0.7 M), prepared in the same buffer. Fractions with MDH activity (cMDHsCM) were collected, concentrated, and dialyzed against a 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.5).

Affinity chromatography (saline gradient)

cMDHsCM was applied to a Blue Sepharose column (BS; GE Healthcare; 2.5×7 cm) equilibrated in the sample buffer (Lowe and Pearson 1984). After thoroughly washing the column, the parasite malate dehydrogenase was eluted by using a linear salt gradient (0–0.5 M NaCl) prepared in the same buffer. Fractions with cMDH activity (cMDHsBS) were collected, concentrated, and treated to be at 50 mM Tris–HCl (pH 7.5).

Affinity chromatography (nucleotide gradient)

cMDHsBS in 50 mM Tris–HCl (pH 7.5) was applied again to the previously mentioned BS column and treated in a similar procedure, except that the enzyme was eluted with a linear NADH gradient, 0–0.3 mM NADH. Fractions with MDH activity were pooled and labeled cMDHs.

Molecular weight determination

The native molecular weight of cMDHs was estimated by Sephacryl S-200 chromatography using reported techniques (Murphy et al. 1967). Under denaturing conditions, the molecular weight was determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis according to established procedures (Laemmli 1970).

Protein determination

Protein content was determined by the method of Lowry (Lowry et al. 1951) with BSA as standard.

Polyacrylamide gel electrophoresis

Enzyme samples were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of SDS at room temperature in slab gels (15% acrylamide; Laemmli 1970). The gels were stained for protein with Coomassie or silver nitrate.

Amino-terminal sequencing

Following electrophoresis, the cMDHTs was blotted onto a PVDF membrane and stained with Coomassie blue R-250. The protein band was excised and subjected to Edman degradation (Edman and Begg 1967) in a gas-phase automated protein sequencer (LF 3000, Beckman Instruments) equipped with an on-line Beckman Gold HPLC system.

Tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS)

Following electrophoresis, the cMDHTs was excised from the Coomassie-stained SDS gel, destained, reduced, carbamidomethylated, and digested with modified porcine trypsin. Peptide mass spectrometric analysis was carried out using a 3200 Q TRAP hybrid tandem mass spectrometer following the procedure of Xolalpa et al. 2007.

Assay of cMDHTs activity

MDH activity was routinely assayed in the direction of oxaloacetate reduction (forward reaction), as previously described by England (1969). For reactions measuring malate oxidation by cMDH (reverse reaction), the Prichard and Schofield (1968) procedure was followed. One MDH unit is defined as the amount of enzyme required to oxidize or reduce 1 μmol coenzyme $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. In all cases, basal absorbance changes were subtracted from the initial rates. Each enzyme assay was performed by triplicate ($N=3$).

Effect of pH on activity and stability

pH dependence on cMDHTs activity was carried out by measuring the velocity of the oxaloacetate reduction and malate oxidation reactions, as described above, in the 4.0–11 pH range. pH stability was determined by equilibrating aliquots of the protein (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 0.1 M of the following buffers: acetate (pH 4.0 to 5.5), phosphate (pH 6.0 to 8.0), and Tris-HCl (pH 8.5 to 11.0) for 24 h. Following the incubation period, enzyme activity was measured at the optimum pH.

Effect of temperature

Temperature effect on the cMDHTs catalyzed oxaloacetate reduction was examined under standard assay conditions

(England 1969). The reaction was carried out at temperatures ranging from 10°C to 70°C, and the residual activity of the enzyme was measured.

Inhibition studies (IC_{50} , K_i , simple inhibition system)

Inhibition studies were performed following the procedure of Tahir and Mannervik (1985).

NADH and oxaloacetate were used as product inhibitors in the reduction of oxaloacetate reaction, and L-malate, and NAD in the oxidation of malate reaction. In the forward reaction, variable concentrations of NADH 0.21–420 μM or oxaloacetate 0.01–5 mM were used. In the reverse reaction, variable concentrations of L-malate 0.5–20 mM, NAD 0.05–160 mM were employed. All measurements were performed at least in triplicate.

In order to ascertain the type of reversible enzyme inhibition that sodium arsenate produces on cMDHTs, initial velocities enzyme reactions in presence of the inhibitor were performed. For the reduction of oxaloacetate reaction, the enzyme was preincubated in the assay buffer with 0.21 mM of oxaloacetate and the inhibitor at 25 mM. The reaction was then initiated by addition of one of a range of different concentrations of NADH 0.04–0.2 mM, and a set of reactions in identical conditions was performed with the inhibitor at 100 mM. For the oxidation of malate reaction, similar assays were performed, but in the corresponding buffer with 0.2 mM NADH and inhibitor at 100 and 200 mM. The reactions were initiated by addition of one of a range of different concentrations of NAD 0.4–0.8 mM. The results were registered spectrophotometrically at 340 nm. The K_i s values for sodium arsenate cMDHTs inhibition, in both directions, were determined by replotting the slopes obtained from the double reciprocal plots (Lineweaver and Burk 1934) as a function of the inhibitor concentrations (Albassam 1998).

Activity toward for NAD analogs

The cMDHTs enzyme activity determinations toward nucleotide analogs of β -NAD were performed by the procedure described by Yoon and Anderson (1988). Coenzyme analog concentrations were in the range 0.02–0.08 mM for the following reagents: 3-acetyl pyridine adenine dinucleotide; nicotinamide mononucleotide; nicotinic acid adenine dinucleotide; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP); nicotinamide guanine dinucleotide; nicotinamide 1, N^6 -etheno adenine dinucleotide, and α nicotinamide adenine dinucleotide (NAD).

Product inhibition studies

In order to obtain information regarding the cMDHTs reaction mechanism, initial velocities of product inhibition

studies for the forward and reverse reactions were determined (Heyde and Ainsworth 1968). To evaluate the formation of any inhibition product, we used two different fixed concentrations of each reactant product, a constant concentration for a given substrate and a different concentration for the variable substrate. The enzyme assays were started with the addition of 0.5 μg of the enzyme in the reaction mixture. Conditions for all reactions are described in Table 4.

Results

Enzyme purification

The chromatographic profile of cMDHTsAS in CM-Sephacryl column showed two main peaks, and cMDH activity was eluted in the second peak at a conductivity of 12–32 mS/cm (cMDHTsCM). It was possible to detect some MDH activity in the excluded peak of the column, probably due to isoforms or mitochondrial types of the enzyme. A similar representative chromatogram of eight runs is shown in Fig. 1a. The chromatographic profile of the cMDHTsCM in Sepharose-Blue column is shown in Fig. 1b. cMDHTsBS was eluted from the column at a conductivity of 20–28 mS/cm. This step was repeated tenfold, yielding the same results. When cMDHTs was separated on a similar Sepharose-Blue column with a NADH gradient, as the previously mentioned BS column, it was the only eluted protein. A resulting chromatogram is shown in Fig. 1c. This step was repeated over six times, yielding the same results. Table 1 shows a summary for the purification of cMDHTs.

Physical properties

Biochemical analysis (SDS-PAGE)

The fractions obtained during the purification procedure for cMDHTs were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 2). The concentration of the parasite enzyme in the first steps of purification and the loss of contaminating proteins in the last steps are shown in Fig. 2 b–e. All of these fractions clearly showed cMDH activity. The cMDHTs eluted in the last purification step revealed a ~32 kDa homogeneous band (Fig. 2 f).

Determination of molecular weights and subunit composition

The native molecular weight of cMDHTs had a M_r of 64,000. Electrophoresis on SDS-PAGE resulted in one protein band with an apparent M_r of 32,000. These data suggest that cMDHTs exists as a dimeric protein under native conditions.

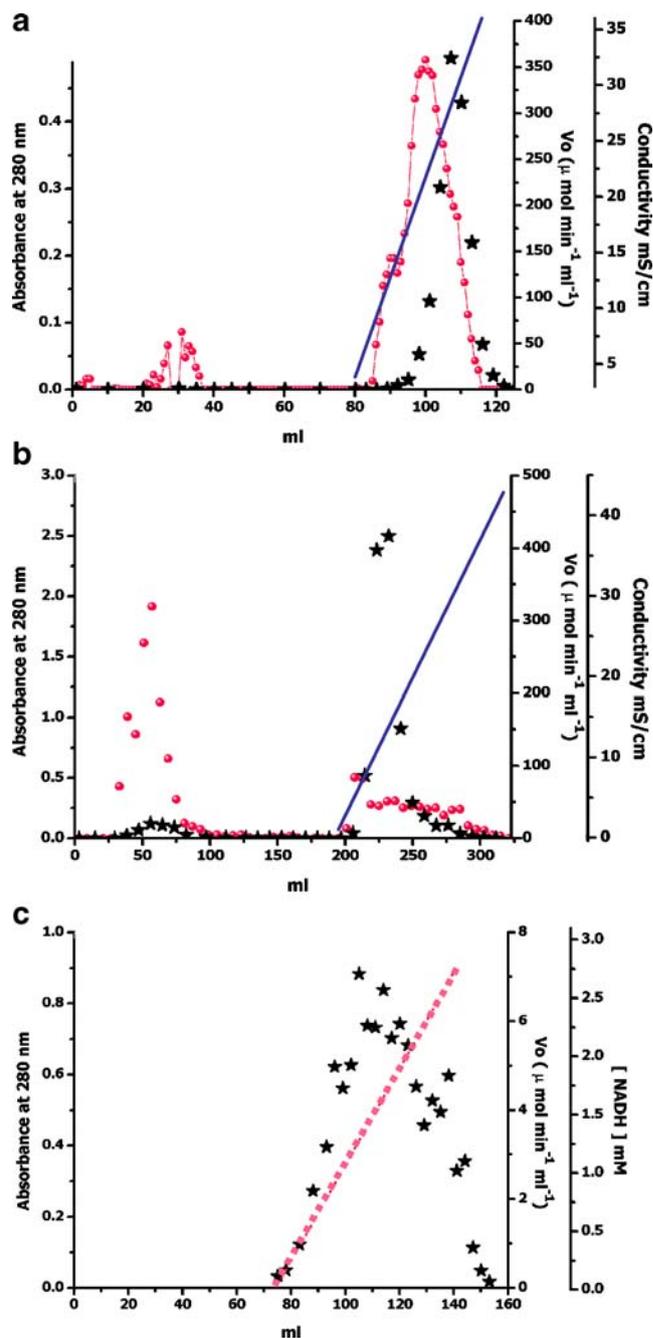


Fig. 1 a–c Purification of cMDHTs from *T. solium* cysticerci. **a** CM-Sephacryl chromatography of the cMDHTsAS. **b** Blue Sepharose chromatography of the cMDHTsCM eluted with NaCl. **c** Blue Sepharose chromatography of the cMDHTsBS eluted with NADH. Protein concentration (circles), enzyme activity (stars), conductivity (full line), NADH concentration (broken line)

Amino-terminal sequencing and tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS)

In order to confirm the molecular nature of cMDHTs, the N-terminal amino acid sequence was determined (20 residues, from the second to the 21st). When compared with data base

Table 1 Purification of malate dehydrogenase from *Taenia solium*

Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Total activity (mU)	Yield (%)	Purification (folds)
Crude extract	71	489.9	54	26,552	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 50–70%	8.7	119.63	146	17,513	66	2.7
CM ^a	4.5	26.55	343	9,130	34.4	6.34
Blue Sepharose ^b	2.5	7.625	368	2,197	8.3	7.3
Blue Sepharose ^c	9.5	0.0475	2615	124	0.5	48.3

Starting from 30 g cysticerci. One MDH unit is defined as that amount of enzyme required to oxidize 1 μmol coenzyme $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

^a CM-Sepharose chromatography

^b Blue Sepharose chromatography, saline gradient

^c Blue Sepharose chromatography, NADH gradient

sequences (NCBI-BLAST), a 100% match with MDH from the related *Echinococcus granulosus* was found (Table 2). In addition, peptide mass spectrometric analysis was carried out with cMDHTs in order to obtain supplementary amino acid sequence information. Table 2 shows six different peptide amino acid sequences that matched the LDH-MDH superfamily amino acid sequence of *E. granulosus* reported in GenPept data base (NCBI-BLAST).

Effect of pH and temperature

The optimum pH of cMDHTs with oxaloacetate as substrate was 7.6. When malate was used as substrate, the optimum pH was 9.6. The cMDHTs pH stability was in the range 6.8–8.5 (evaluated in the forward reaction).

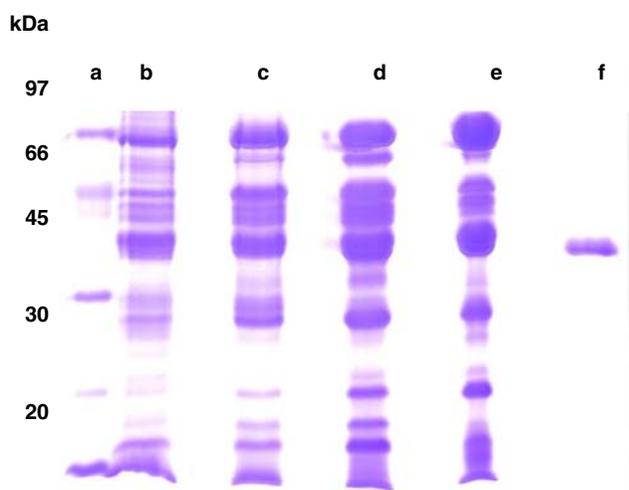


Fig. 2 cMDHTs purification procedure analysis by SDS-PAGE in 15% slab gels as described by Laemmli (1970). (a) Low M_w markers; (b) 60 μg of crude supernatant; (c) 80 μg of ammonium sulfate fraction; (d) 80 μg of CM-Sepharose chromatography; (e) 80 μg of affinity chromatography on Blue Sepharose cMDHTs eluted with NaCl; (f) 10 μg of affinity chromatography on Blue Sepharose cMDHTs eluted with NADH

The parasite enzyme activity was not affected in a broad temperature range (from 10°C to 45°C). The enzyme was also stable at 20°C and 37°C over a 30-min period.

Kinetic properties

Table 3 shows the K_m and V_{max} values obtained for both directions of the enzyme reaction at their respective pH optima. Additionally, reduced NADP (NADPH) at a similar concentration in the forward reaction assay cannot act as substitute for NADH and cannot replace NAD in the reverse reaction assay.

Activity toward NAD analogs

From the seven NAD analogs analyzed as cosubstrates for cMDHTs, only 3-acetyl pyridine adenine (APA) and nicotinamide guanine (NG) were reduced. The parasite enzyme had the least activity toward NG (4.2 $\mu\text{mol min}^{-1}$) in comparison to NAD (22.5 $\mu\text{mol min}^{-1}$); however, activity toward APA was very similar to the latter (25.8 $\mu\text{mol min}^{-1}$).

Inhibition studies

IC_{50} and K_i

The results of IC_{50} for cMDHTs toward its substrate and co-substrate were, from the highest to the lowest value, as follows: NADH, oxaloacetate, malate, and NAD at 0.0425, 0.319, 6.7, and 33.4 mM, respectively. Sodium arsenate, evaluated in the forward and reverse reaction, yielded values of 65.5 and 307 mM, respectively. Sodium arsenate inhibited the enzyme in an uncompetitive pattern in both reaction directions (figures not shown). The inhibition constants, obtained by replotting the intercepts from the primary plot versus inhibitor concentrations of sodium arsenate, were $K_i = 0.87$ and 3.68 M for the forward and reverse reactions, respectively.

Table 2 N-Terminal sequence and LC/MS/MS of the cMDHTs

N-Terminal sequence by Edman	Peptide sequenced obtained by LC/MS/MS	Matched peptide sequence to MDH of <i>E. granulosus</i>	Ions score
PGPLRVLITGAAGQIAYNLS		2–21	
	RDLLSSNVK	99–107	71
	YAPSIPK	143–149	43
	AIYQVAAK	163–170	39
	GAAVIGLR	231–238	49
	KLSSAASAAK	239–248	29
	DIYFSFPVTIK	283–293	19

A coverage of 17% of the amino acid sequence and a total score of 308 was obtained by LC/MS/MS according of *E. granulosus*

Product inhibition studies

Table 4 shows the $\text{app}K_{\text{is}}$ values and inhibition patterns for the eight products analyzed. Figures 3 and 4 show two of the several different types of inhibition obtained in the eight product inhibition catalytic reactions. The former illustrates the Lineweaver–Burk graph of product inhibition of cMDHTs by NADH as a function of NAD concentration, which is consistent with a competitive type inhibition. A similar inhibition pattern was observed for product inhibition of cMDHTs by NAD as a function of NADH concentration (graph not shown). Figure 4 illustrates the Lineweaver–Burk graph of product inhibition of cMDHTs by oxaloacetate as a function of NAD concentration, which suggests a noncompetitive type inhibition, as do the rest of the product inhibition reactions (graphs not shown). At a qualitative level, the results obtained are consistent with an Ordered–BiBi mechanism, in which the coenzymes combine with the free enzyme (Heyde and Ainsworth 1968).

Discussion

The pork tapeworm, *T. solium*, is a parasite that completes its life cycle in humans and pigs. The disease caused by the larvae form in the human brain is neurocysticercosis (NC), which is the most severe of the neurological parasite

diseases in human beings (Bern et al. 1999, Mafojane et al. 2003).

MDHs play an essential role in leading to ATP synthesis under anaerobic conditions and have a central position in aerobic respiration (Bryant 1975; Bryant and Flockart 1986, Lwin and Probert 1975). We therefore decided to investigate this *T. solium* cysticerci enzyme in order to purify, characterize, and study it kinetically.

The crude extract of *T. solium* cysticerci showed two peaks (excluded and eluted) of MDH activity when chromatographed on CM-Sepharose. Further purification of the eluted peak through two of the Blue Sepharose affinity chromatography columns yielded cMDHTs (Table 1). Comparison of the amino acid sequence for this homogenous protein (Fig. 2 f) with cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenases' amino acid sequences from *E. granulosus* shows a 100% match with the former and no significant similarity to the latter (NCBI-BLAST. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The cationic behavior of CM-Sepharose was considered as the cytoplasmic isozyme (cMDH). Studies performed by gel filtration and by SDS-PAGE showed the cMDHTs to be dimers with identical native molecular mass, composed of two equal (or very similar) subunits (Hagel 1998). The observed molecular weight of 64,000 for cMDHTs falls within the MDHs range (Siegel and Englard 1961; Thorne and Kaplan 1963).

Table 3 K_{m} and V_{max} values for the reactions catalyzed by the malate dehydrogenase from *Taenia solium*

Variable substrate	K_{m} (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
Oxaloacetate reduction		
Oxaloacetate (at 0.21 mM NADH)	2.4 \pm 0.71	1,490 \pm 104
NADH (at 0.2 mM oxaloacetate)	48 \pm 1.6	1,714 \pm 103
L-Malate oxidation		
L-Malate (at 0.52 mM NAD)	215 \pm 0.029	87.8 \pm 1.72
NAD (at 3 mM L-malate)	50 \pm 13	104 \pm 3.6

K_{m} and V_{max} values (\pm SE) were calculated by Origin Pro (Scientific and Analysis Software) 7SR2 Origin Lab Corporation, from values obtained at the co-substrate concentrations given in the table. The enzyme activity in the direction of oxaloacetate reduction or malate oxidation was determined as described in the “Materials and methods” section. N value for each and every assay was three

Table 4 Experimental conditions of various reactions mixtures in product inhibition assays and product inhibition patterns for cMDHTs and $\text{app}K_{is}$

Product inhibitor (mM)	Varied substrate range (mM)	Constant substrate (mM)	Observed patterns	Apparent K_{is} (mM)
NADH 0.0042, 0.042	NAD 0.2–0.6	Malate 3.0	C	0.0133 ± 1.34^{-5}
NADH 0.0042, 0.042	Malate 0.1–3.0	NAD 0.52	NC	0.0043 ± 1.78^{-5}
OAA 0.1, 0.4	NAD 0.2–0.6	Malate 3.0	NC	0.172 ± 0.0034
OAA 0.1, 0.4	Malate 0.1–3.0	NAD 0.52	NC	0.072 ± 0.0075
NAD 10, 50	NADH 0.06–0.42	OAA 0.2	C	2.07 ± 9.04^{-4}
NAD 10, 50	OAA 0.006–0.2	NADH 0.21	NC	14 ± 0.0055
Malate 5, 15	NADH 0.06–0.42	OAA 0.2	NC	4.5 ± 8.9^{-6}
Malate 5, 15	OAA 0.006–0.2	NADH 0.21	NC	3.35 ± 0.021

Each row represents the setting used to develop double reciprocal plots using two fixed product concentrations and varying one substrate and saturating concentration of the second substrate. N value for each and every assay was three.

C competitive inhibition, NC noncompetitive inhibition

The K_m values for substrate (Table 3) compare more favorably to those observed for the corresponding malate dehydrogenases of vertebrates (Kitto and Kaplan 1966) and nonparasitic invertebrates (Ozaki and Whitely 1970; McReynolds and Kitto 1970) than to *E. granulosus* (Agüero et al. 1995; Vessal and Bambea-Row 1994) or *Hymenolepis microstoma* (Pappas and Schroeder 1979). This suggests that the intracellular concentrations of substrates for cMDHTs in the tissues of *T. solium* are closer to the concentrations of the vertebrate's MDH substrates (Segel 1993).

cMDHTs activity toward oxaloacetate reduction had an optimum pH at 7.6. A similar optimum pH has been reported for cMDH from several sources, including

chicken heart (Kitto and Kaplan 1966), beef kidney (Dupurque and Kun 1969), and *Propionibacterium shermanii* (Allen and Feldman 1978). *Schistosoma mansoni* has similar optimum pH values to those observed for *T. solium* for reverse and forward reactions, and *E. granulosus* has an optimum pH of 8.0 in the forward reaction (Vessal and Bagher 1996).

A relatively high optimum temperature has been reported for the enzymes of several organisms: 50°C for the enzyme of *H. microstoma* (Pappas and Schroeder 1979) and *F. hepatica* (Probert and Lwin 1977), 55°C for chicken heart MDH (Kitto and Kaplan, 1966) and for *Toxocara canis* cMDH (Andrade et al. 1983), and 80°C for *Pyrobaculum islandicum* (Yennaco et al. 2007).

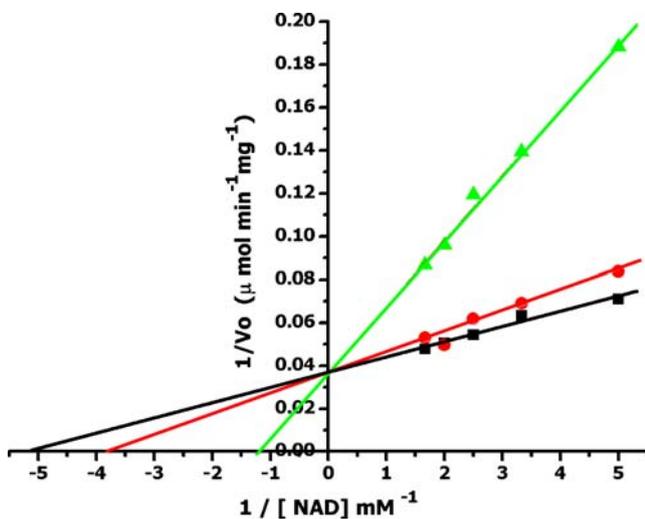


Fig. 3 Representative double reciprocal plot of the product inhibition of 0.5 μg of the cMDHTs by NADH as a function of NAD concentration at saturating concentration (3 mM) of malate. NADH concentrations were squares none, circles 4.2 μM , triangles 42 μM ; each point is the mean from three determination. The results show a competitive inhibition (see Table 1)

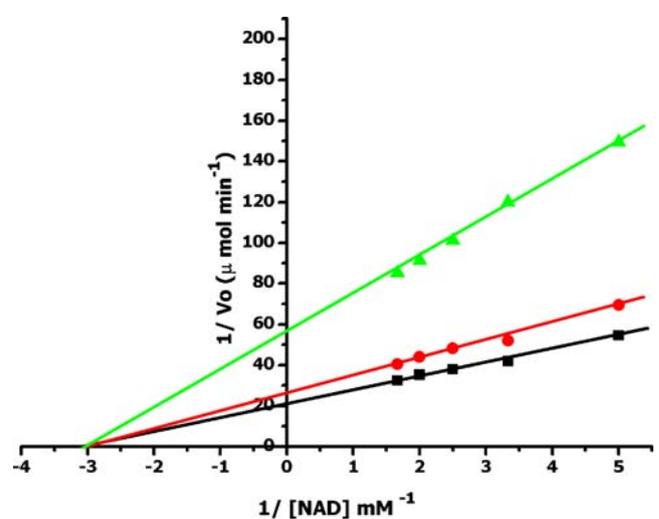


Fig. 4 Representative double reciprocal plot of the product inhibition of 0.5 μg of the cMDHTs by OAA as a function of NAD concentration at saturating concentration (3 mM) of malate. OAA concentrations were squares none, circles 0.1 mM, triangles 0.4 mM; each point is the mean from three determination. The results show a noncompetitive inhibition (see Table 1)

The purified parasite cMDHTs had a specific activity of about $2,615 \text{ U mg}^{-1}$. The specific activity of the purified parasite MDH is within the higher range of specific activities for purified MDHs from other species. For instance, the reported specific activity of ovine liver *E. granulosus* and Ox-heart, 4,167 and 1,416 respectively, (Vessal and Bambea-Row 1994) and $1,250 \text{ U mg}^{-1}$ for ox-heart mitochondria (Davies and Kun 1957), fall with a similar range.

The cMDHTs was absolutely specific to NAD, and substitution of equimolar concentration of NADP for NAD yields no results in the L-malate oxidation assay. Such specificity has been reported for hydatid cyst fluid, ovine liver cytoplasmic enzyme (Vessal and Bambea-Row 1994), and *Haemophilus influenza* enzyme (Yoon and Anderson 1988). The reactivity of the parasite enzyme with the analogs is in agreement with previous results obtained for vertebrate (Wigger and Ville 1964), plant (Mukerji and Ting 1963), and fungal (Atzpodien et al. 1968) systems. The relative reactivity with the analogs allows to distinguish between isoenzymes, thus providing important information.

The sensitivity of cMDHTs to sodium arsenate was studied in the reduction of oxaloacetate and the oxidation of malate reactions. The shape of the curves was typical of simple linear inhibition (data not shown). cMDHTs was more susceptible to this inhibitor in oxaloacetate reduction than in malate oxidation. Double reciprocal plots showed uncompetitive type inhibitions for both reactions. This kind of inhibition is in agreement with MDHs activity in that uncompetitive inhibition is common in steady-state multireactant systems as opposed to unireactant systems (Segel 1993).

Preliminary results of the reaction mechanism of the cMDHTs were qualitatively consistent with an Ordered Bi Bi reaction mechanism, in which only the coenzymes can react with the free enzyme. They were not consistent with a Ping Pong mechanism or a random mechanism, regardless of whether or not a rapid equilibrium condition applied. Nor were they consistent with a Theorel Chance mechanism, for this requires two competitive inhibitions in each reaction direction (between malate and oxaloacetate, and between NAD and NADH). The results obtained in all the reactions with the exception of NADH (whose inhibition type was competitive) is in agreement with Heyde and Ainsworth (1968).

It can be concluded that cMDHTs is a NAD specific cytoplasmic MDH from *T. solium*. Its physical and kinetic properties were consistent with those observed for many other malate dehydrogenases. In addition, the enzyme reaction mechanism proposed for cMDHTs is similar to those developed for other dehydrogenases (Heyde and Ainsworth 1968, Teixido et al. 1985). This information can be potentially useful in the parasite intermediary

metabolism understanding as in the development of pharmaceutical strategies in order to control *T. solium* (Behm and Bryant 1979).

Acknowledgments The present study was funded by grant from The Universidad Nacional Autónoma de México, DGAPA (PAPIIT-IN201906-3). All the experiments complied with the current laws of the Universidad Nacional Autónoma de México. The authors wish to thank Dr. Gerardo Medina for valuable English corrections.

References

- Agüero F, Repetto Y, Hellman U, Cazzulo JJ (1995) Purification and partial characterization of the cytosolic malate dehydrogenase from protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 72:247–251
- Albassam BA (1998) Inhibition of wheat leaves nitrate reductase activity by cibacron blue. *Biochem Mol Biol Int* 46(5):979–986
- Allen SH, Feldman HM (1978) A comparison of the malate dehydrogenase of the propionic acid bacteria with the mammalian soluble and mitochondrial isoenzymes. *Comp Biochem Physiol B* 60:287–293
- Andrade CM, Ferreira MF, Ribeiro LP (1983) Cytosolic malate dehydrogenase in muscle extracts of *Toxocara canis*. *Comp Biochem Physiol B* 75:147–152
- Andreassen J, Bennet-Jenkins EM, Bryant C (1999) Immunology and Biochemistry of *Hymenolepis diminuta*. *Adv Parasitol* 42:223–275
- Atzpodien WJ, Gancedo JM, Duntze W, Holzer H (1968) Isoenzymes of malate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 7:58–62
- Banaszak L, Bradshaw R (1970) Malate dehydrogenases. In: Boyer PD (ed) *The enzymes*, vol. II, 3rd edn. Academic Press, New York, pp 369–396
- Behm C, Bryant C (1979) Anthelmintic action-A metabolic approach (A review). *Veterinary Parasitol* 5:39–49
- Bern C, Garcia HH, Evans C, Gonzalez AE, Verastegui M, Tsang VC, Gilman RH (1999) Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clin Infect Dis* 29:1203–1209
- Bryant C (1975) Carbon dioxide utilization and the regulation of respiratory metabolic pathways in parasitic helminth. In: Dawes B (ed) *Advances in parasitology*, vol 13. Academic Press, New York, pp 35–69
- Bryant C, Flockart HA (1986) Biochemical strain variation in parasitic helminthes. *Advances in Parasitology* 25:276–319
- Das B, Tandom V, Saha N (2004) Anthelmintic efficacy of *Flemingia vestia* (Fabaceae): alteration in the activities of some glycolytic enzymes in the cestode, *Railietina echinobothrida*. *Parasitol Res* 93:253–261
- Davies DD, Kun E (1957) Isolation and properties of Malic dehydrogenase from Ox-heart mitochondria. *Biochemical J* 66:307–316
- Dupurque D, Kun E (1969) Malate dehydrogenase of ox kidney 2. Two substrate kinetic and inhibition analyses. *Eur J Biochem* 7:247–252
- Edman P, Begg G (1967) A protein sequenator. *Europ J Biochem* 1:80–91
- Englard S (1969) Extramitochondrial L-malate dehydrogenase of beef heart. *Meth Enzymol* 13:123–129
- Fukumoto S (1985) Pyruvate kinase isoenzymes and phosphoenolpyruvate carboxykinase during development of *Spirometra erinacei*. *Yonago Acta Medica* 28:89–105

- González R, Mendoza-Hernández G, Plancarte A (2002) Purification of *Taenia solium* cysticerci superoxide dismutase (SOD Ts) and myoglobin copurification. Parasitology Research 88:881–887
- Green AA, Huges WL (1955) Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) Methods in enzymology, vol 1. Academic Press Inc., New York, pp 67–90
- Hagel L (1998) Gel filtration. In: Janson JC, Ryden L (eds) Protein purification. Wiley, New York, pp 79–144
- Heyde E, Ainsworth S (1968) Kinetic studies on the mechanism of the malate dehydrogenase reaction. J Biol Chem 243:2413–2423
- Karlsson E, Ryden L, Brewer J (1997) Ion exchange chromatography. In: Janson JC, Ryden L (eds) Protein purification. Wiley, New York, pp 145–206
- Kitto GB, Kaplan N (1966) Purification and properties of chicken heart mitochondrial and supernatant malic dehydrogenases. Biochemistry 5:3966–3980
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227:680–685
- Lakhdar-Ghazal F, Blonski C, Wilson M, Michels P, Perie J (2002) Glycolysis and proteases as targets for the design of new anti-trypanosome drugs. Curr Top Med Chem 2:439–456
- Lineweaver H, Burk DJ (1934) The determination of enzyme dissociation constants. J Am Chem Soc 56:658–666
- Lowe CR, Pearson JC (1984) Affinity chromatography on immobilized dyes. Meth Enzymol 104:97–113
- Lowry O, Rosenbrough N, Lewis-Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275
- Lwin T, Probert AJ (1975) Effect of certain fasciolicides on malate dehydrogenase activity of *Fasciola hepatica*: a possible biochemical mode of action of hexachlorophene and oxytocyanide. Pestic Sci 6:121–128
- Mafojane NA, Appleton CC, Krecek RC, Michaelis LM, Willingham AL (2003) The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern Africa. Acta Trop 87:25–33
- McReynolds MS, Kitto GB (1970) Purification and properties of *Drosophila* malate dehydrogenases. Biochim. Biophys. Acta 198:165–175
- Montes CL, Zuñiga EI, Vazquez J, Arce C, Gruppi A (2002) *Trypanosoma cruzi* mitochondrial malate dehydrogenase triggers polyclonal B-cell activation. Clin Exp Immunol 127:27–36
- Muketji SK, Ting IP (1963) Malic dehydrogenase isoenzymes in green stem tissue of *Opuntia*: isolation and characterization. Arch Biochem Biophys 131:336–351
- Murphy W, Kitto G, Everse J, Kaplan N (1967) Malate dehydrogenases. I. A survey of molecular size measured by gel filtration. Biochem 6:603–609
- Ozaki H, Whitely A (1970) L-malate dehydrogenase in the development of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Develop Biol 21:196–215
- Pappas P, Schroeder L (1979) *Hymenolepis microstoma*: lactate and malate dehydrogenases of the adult worm. Exp Parasitol 47:134–139
- Prichard RK, Schofield PJ (1968) A comparative study of the tricarboxylic acid cycle enzymes in *Fasciola hepatica* and rat liver. Comp Biochem Physiol 25:1005–1019
- Probert AJ, Lwin T (1977) *Fasciola hepatica*: the subcellular distribution and kinetic and electrophoretic of malate dehydrogenase. Exp Parasitol 41:89–94
- Rodríguez JJ, Ferreira HB, Zaha A (1993) Molecular cloning and characterization of an *Echinococcus granulosus* cDNA encoding malate dehydrogenase. Mol Biochem Parasitol 60:157–160
- Sanchez-Moreno M, Salas JM, León P, Garcia-Ruiz MA, Monteoliva M (1987) Malate dehydrogenase in helminth parasites. Arzneim-Forsch Drug Res 37:1327–1331
- Saz HJ (1972) Effects of anthelmintics on 32-P-esterification in helminth metabolism. In: Van den Bossche H (ed) Comparative biochemistry of parasites. Academic, New York, pp 33–48
- Saz HJ, Lescure OL (1969) The functions of phosphoenolpyruvate carboxynase and malic enzymes in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*. Com Biochem Physiol 30:49–60
- Schantz PM, Wilkins PP, Tsang VC (1998) Immigrants, imaging and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. In: Scheld W, Craig A, Hughes JM (eds) Emerging infections, vol 2. ASM Press, Washington DC, pp 213–224
- Segel IH (1993) Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley, New York, p 957
- Shandera WX, Schantz PM, White AC (2002) *Taenia solium* cysticercosis; the special case of the United States. In: Singh G, Prabhakar S (eds) *Taenia solium* cysticercosis: from basic to Clinical Science. CABI, Cambridge, UK, pp 139–144
- Siegel L, Englard S (1961) Beef-heart malic dehydrogenases: I. Properties of the enzyme purified from extracts of acetone-dried powders. Biochim Biophys Acta 54:67–76
- Smith JD, McManus DP (1989) The adult: carbohydrate metabolism. In: Smith JD, McManus DP (eds) The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge, UK, pp 77–113
- Tahir and Mannervik (1985) Inhibitors for distinction of three types of human glutathione transferase. FEBS 181:249–252
- Teixido F, de Arriaga D, Busto F, Soler J (1985) Cytoplasmic malate dehydrogenase from *Phycomyces blakesleeanae*: kinetics and mechanism. Can J Biochem Cell Biol 63:1097–1105
- Thorne JR, Kaplan NO (1963) Physicochemical properties of pig and horse heart mitochondrial malate dehydrogenase. J Biol Chem 238:1861–1868
- Vessal M, Bagher MT (1996) Partial purification and kinetic properties of cytoplasmic malate dehydrogenase from ovine liver *Echinococcus granulosus* protoscolices. Comp Biochem Physiol 113 B:757–763
- Vessal M, Bambea-Row N (1994) Partial purification and comparison of the kinetic properties of ovine liver *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid malate dehydrogenase and the cytoplasmic enzyme from the host liver. Comp Biochem Physiol 107B:447–451
- Wigger BO, Ville CA (1964) Multiple molecular forms of malic and lactic dehydrogenases during development. J Biol Chem 239:444–451
- Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, Mendoza-Hernández G, Comini M, Spallek R, Singh M, Espitia C (2007) Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. Proteomics 7:3332–3341
- Yennaco LJ, Hu Y, Holden JF (2007) Characterization of malate dehydrogenase from the hyperthermophilic archeon *Pyrobaculum islandicum*. Extremophiles 11:741–746
- Yoon H, Anderson B (1988) Kinetic studies of *Hemophilus influenzae* malate dehydrogenase. Biochim Biophys Acta 955:10–18
- Zheng N, Xu J, Wu Z, Chen J, Hu X, Song L, Yang G, Ji C, Chen S, Gu S, Ying K, Yu X (2005) *Clonorchis sinensis*: molecular cloning and functional expression of novel cytosolic malate dehydrogenase. Exp Parasitol 109:220–227