

ASPECTOS METABOLICOS DEL LATEX DE

Hevea brasiliensis Muell.

"Identificación y Estudio de la Deshidrogenasa Láctica
del Suero de Hevea brasiliensis Muell."

TESIS

QUE PRESENTA

SATOKO TODA WATANABE

para obtener el título de

BIOLOGO

en la Facultad de Ciencias

UNAM.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL
INSTITUTO DE QUIMICA
DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO,
BAJO LA DIRECCION DEL
Dr. BARBARIN ARREGUIN L.

8373/

RECONOCIMIENTO

Mi sincera gratitud al señor Ingeniero Angel Vergara C., Ingeniero Jefe del Campo Experimental del Hule "El Palmar", en el Palmar, Veracruz, y al señor Ingeniero Nicolás Aguilera por su desinteresado servicio al velar por el envío periódico del látex, sin el cual no hubiera sido posible la realización de este trabajo; al señor Dr. Félix Córdoba por sus atinadas observaciones y su valiosa ayuda técnica, así como a la señorita Dra. María Cristina Pérezamador por sus acertadas modificaciones al texto.

I N D I C E

- 1.- INTRODUCCION.
- 2.- GENERALIDADES.
- 3.- PARTE TEORICA.
- 4.- PARTE EXPERIMENTAL.
 - a) Materiales y Métodos.
 - b) Resultados.
- 5.- DISCUSION.
- 6.- BIBLIOGRAFIA.

I N T R O D U C C I O N

La Hevea brasiliensis es una planta de zona tropical, perteneciente a la familia de las Euforbiáceas, cuyo látex posee un alto porcentaje de hule. El látex se extrae haciendo incisiones semicirculares en un ángulo aproximado de 30° en la corteza del tronco, donde las canales laticíferos son más abundantes.

Los canales laticíferos de este árbol son tubos ciegos articulados, esto es, que se originan de la reabsorción de los tabiques adyacentes de una cadena de células y que, por lo tanto, crecen no por alargamiento de cada una de las células, sino por la adición constante de nuevos primordios. Estos tubos se anastomosan lateralmente con otros canales formando una especie de red.

Los canales que dan el mayor rendimiento de hule se localizan en el floema secundario, alternando concéntricamente con los vasos cribosos y están interrumpidos radialmente por los radios medulares.

El látex es un coloide lechoso que contiene sustancias tanto en solución como en suspensión; se le considera como un producto de excreción (1) cuya función se desconoce. Contiene hidratos de carbono, ácidos orgánicos, sales, alcaloides, esteroides, grasas, taninos y mucílagos (2). Las partículas más abundantes son las de hidrocarburos del tipo de los terpenos como el hule, los carotenos, las resinas y los aceites esenciales.

Un componente característico del látex de H. brasiliensis es el hule, que químicamente es un politerpeno lineal constituido de isoprenos polimerizados "cabeza" con "cola"

en posición "cis". Hay evidencias de que el látex crudo consume moléculas de acetato (3), las cuales son transformadas en hule, y se conoce que los terpenoides se sintetizan biológicamente por condensación de moléculas de acetil coenzima A formando un producto intermediario, el ácido mevalónico, que por fosforilación y condensación sucesivas constituye los terpenoides (4).

Las proteínas que contiene el látex se encuentran adsorbidas en las partículas coloidales permitiendo su suspensión, o bien en forma libre en el suero.

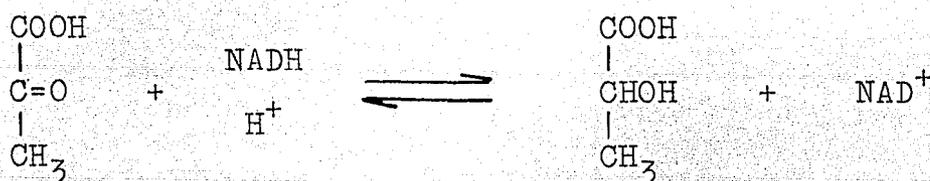
Del suero del látex de H. brasiliensis se han aislado varias enzimas: la fosfatasa (5), la peroxidasa (6); muy recientemente se ha reportado la quinasa mevalónica (7) y ahora la deshidrogenasa láctica, que hemos aislado.

En el presente trabajo se llevó a cabo la identificación de la Deshidrogenasa láctica, y se emitió una hipótesis que explicara su presencia en el seno del látex de Hevea brasiliensis.

GENERALIDADES

El látex de Hevea brasiliensis posee en su porción soluble en agua, por lo menos, una de las enzimas de deshidrogenación dependientes del Dinucleótido de Nicotinamida-Adenina*. La observación que respaldó esta afirmación fue la siguiente: el suero de H. brasiliensis consume NADH sin suministro de sustrato alguno, por lo que hipotéticamente se pensó en la posible presencia de enzimas pertenecientes al ciclo de Krebs o al proceso de Glicolisis que tuvieran alguna relación con la biosíntesis del hule.

La deshidrogenasa láctica es una enzima soluble en agua, que a un pH fisiológico cataliza la transformación del ácido pirúvico en láctico en presencia del NADH. La reacción en sentido inverso se realiza fácilmente en un pH alcalino.



Es una enzima abundante en los tejidos animales, especialmente en el músculo esquelético; ha sido aislada de bacterias** (14), levaduras** (8) y de varios tejidos animales y en algunos de los casos ha sido cristalizada (tabla 1).

*Abreviaturas usadas en este trabajo:

NAD - Dinucleótido de Nicotinamida-Adenina.

NAD⁺ - Dinucleótido de Nicotinamida-Adenina oxidado.

NADH - Dinucleótido de Nicotinamida-Adenina reducido.

**Se ha obtenido en forma cristalizada.

T A B L A 1

	Hígado	Riñón	Bazo	Músculo cardíaco	Músculo esquelético
Conejo	+ (8)	+		+	+ (13)
Rata	+ (9,10)	+**		+	+
Paloma	+ (8)	+		+	+
Ratón	+ (8)	+	+	+	+
Buey				+**(11,12)	

Por lo que respecta a las plantas superiores, sólo se ha reportado la acumulación de ácido láctico en algunas de ellas como en el tubérculo maduro de papa, de bajo contenido en azúcar, en condiciones anaeróbicas y a 10° C.

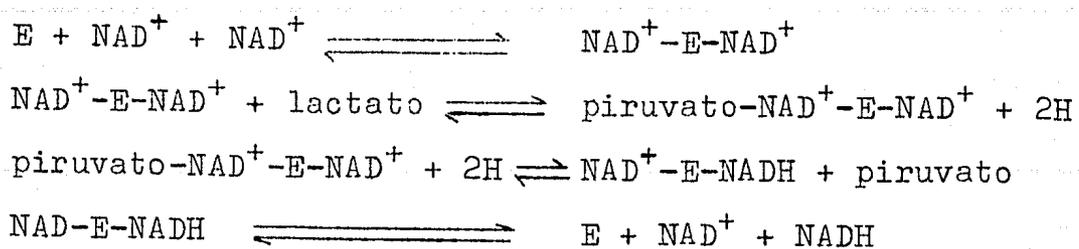
Se le asigna un peso molecular de 135,000 en miocardio de buey (12) y de 126,000 en hígado de rata (9), con un número de recambio de 32,900 moles de NADH por minuto y por mol de enzima, a 24° C., en una solución amortiguadora de veronal de pH 8.8 (9).

La constante de Michaelis-Menten reportada para la deshidrogenasa láctica del hígado de conejo es de 2.6×10^{-6} M. (16) y de 5.2×10^{-6} M (13).

Kubowitz y Ott reportan una constante de Michaelis, para el piruvato de 9.0×10^{-5} M y de 5.0×10^{-6} M para la coenzima (17).

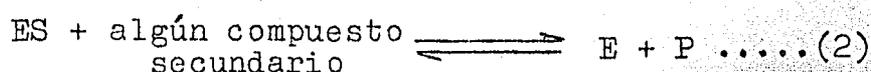
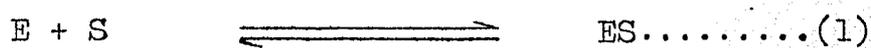
De la deshidrogenasa láctica de tejidos humanos y de conejo se han reportado hasta 5 isoenzimas (formas electroforéticamente distintas) (18).

El mecanismo de reacción propuesto para las deshidrogenasas (19) dependientes del NAD es el siguiente:

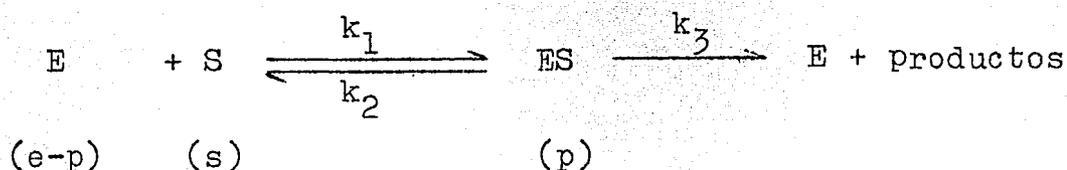


P A R T E T E O R I C A

1.- Teoría Enzimática. (20) Michaelis y Menten propusieron en 1913, que una reacción enzimática se lleva a efecto por la formación de un complejo entre el sustrato y la enzima, que más tarde se descompone en los productos de la reacción y la enzima libre. Tomando las iniciales de los componentes de la reacción podemos escribir los siguientes equilibrios:



Supusieron que el equilibrio en (1) se alcanza más rápidamente que la descomposición en la reacción (2). Observando que la constante de catálisis de la mayoría de las enzimas era muy alto, Briggs y Haldane introdujeron una modificación basándose en el postulado de que en cualquier momento la velocidad de formación y descomposición del complejo enzima-sustrato es constante y lo expresaron en los términos de un equilibrio químico,



donde k_1 , k_2 y k_3 son las constantes de velocidad de formación y descomposición del complejo; así que la concentración de enzima puede considerarse constante en períodos muy cortos.

Si llamamos e la enzima total; p la concentración del complejo y s la concentración de sustrato libre, tendremos que: la velocidad v_1 de formación del complejo será $k_1(e-p)s$; la velocidad v_2 de descomposición de ES en E + S

será k_2p y la velocidad de v_3 de descomposición de ES en E + S será k_3p . El cambio neto de p en un instante dado será:

$$\frac{dp}{dt} = k_1(e-p)s - (k_2 + k_3)p \quad \dots\dots (3)$$

al establecerse el equilibrio, cuando

$$\frac{dp}{dt} = 0 \text{ y despejando } p \text{ en (3):}$$

$$p = \frac{\frac{es}{k_2 + k_3}}{k_1} + S \quad \dots\dots (4)$$

La velocidad v de formación de productos será:

$$v = k_3p = \frac{k_3es}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + S} \quad \dots\dots (5)$$

Se obtendrá la velocidad máxima V cuando toda la enzima esté en forma de complejo, es decir:

$$V = k_3e \quad \dots\dots (6)$$

Substituyendo (6) en (5) tenemos:

$$v = \frac{Vs}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + S} \quad \dots\dots (7)$$

$$\text{Si } K_m = K_s + \frac{k_3}{k_1} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad \dots\dots (8)$$

podemos escribir la ecuación (7) en la forma:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{S}} \quad \dots\dots (9)$$

que es la ecuación de Michaelis y Menten.

Lineweaver y Burke transformaron la ecuación (9), a la forma siguiente:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \frac{1}{S} + \frac{1}{V} \quad \dots\dots (10)$$

Al trazar $\frac{1}{v}$ en las ordenadas y $\frac{1}{S}$ en las abscisas se obtiene la gráfica de una recta cuya pendiente es $\frac{K_m}{V}$ y la ordenada en el origen $\frac{1}{V}$. Este es uno de los métodos para obtener el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m) a partir de los datos experimentales.

2.-Filtración en Geles de Sephadex. (21) El Sephadex es un material hidrófilo insoluble en agua y soluciones salinas, estable en soluciones alcalinas y en ácidos débiles. Está constituido por moléculas de dextrana unidas por puentes transversales de epíclorhidrina, formando una red tridimensional del polisacárido.

a) Sephadex G 100. Este gel no es iónico y sus propiedades polares se deben, casi en su totalidad, al alto contenido en grupos hidroxilo. La filtración que efectúa el Sephadex es semejante a la que se realiza al través de un tamiz y se debe a la capacidad del Sephadex de rechazar los solutos de peso molecular alto y ser accesible a la difusión, al través de su malla, de moléculas pequeñas; en el caso del Sephadex G 100, aquellas de peso molecular menor de 100,000.

El gel usado fue de alto contenido en enlaces transversales (G 100) y de porosidad media. De esta última depende el grado de hidratación del gel que en nuestro caso fue de + 1 g de agua por g de gel.

b) DEAE Sephadex A 50. Este es un tipo de Sephadex intercambiador de aniones, al cual se le han introducido grupos dietilaminometilo y que posee una gran capacidad, aunque no específica, de adsorción.

El alto contenido en grupos amino terciarios e hidroxi

lo del DEAE Sephadex hace que sea muy afín al agua. Su grado de hidratación está determinado por la proporción de enlaces transversales entre sus moléculas, la fuerza iónica y el pH del medio. Los intersticios dejados por las ligaduras transversales permiten que los grupos iónicos del gel sean accesibles a moléculas bastante más grandes que 10,000

3.- Efecto de pH. Todas las reacciones enzimáticas se efectúan dentro de un rango limitado de pH, existiendo una concentración de iones hidrógeno determinada, en la cual la actividad es máxima. El pH óptimo puede deberse a un efecto real reversible sobre la velocidad máxima, a un efecto sobre la afinidad entre sustrato y enzima o a un efecto sobre la estabilidad de la enzima.

El efecto del pH sobre la afinidad enzima-sustrato puede eliminarse usando concentraciones altas de sustrato para saturar la enzima. El efecto de la concentración de los hidrogeniones sobre las enzimas se debe a cambios en el estado de ionización del sistema a medida que el pH cambia y, por lo tanto, pueden sufrir alteraciones tanto la enzima como el complejo enzima-sustrato.

Puesto que la actividad catalítica está confinada comúnmente a un rango pequeño de pH y las enzimas son proteínas que contienen muchos grupos ionizables que dan origen a una serie de formas ionizadas de la enzima a medida que cambia el pH, se deduce que una sola de estas formas ionizadas de la enzima es la activa (22).

4.- Efecto de Concentración de Enzima. Si el sistema enzimático de una reacción dada se encuentra libre de reacciones secundarias que lo modifiquen, se observará que dos

moléculas de enzima transformarán dos veces más sustrato que una sola molécula de enzima; por lo tanto, la velocidad deberá ser proporcional a la concentración de enzima:

$$v = kE$$

y si graficamos la velocidad contra la concentración de enzima, nos dará una función lineal.

5.- Gradiente de Sedimentación o Determinación del peso molecular por ultracentrifugación, usando un gradiente de sacarosa. (23). La viscosidad y la densidad de una solución de sacarosa es tal que, al menos entre 3 y 15 grados centígrados, se observa una emigración lineal de la mayoría de los materiales biológicos, por lo que la relación de las distancias recorridas por 2 sustancias a partir del menisco es siempre constante.

$$R = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia 1}}{\text{distancia recorrida por la sustancia de referencia 2}}$$

la constante de sedimentación S_1 de dos sustancias es:

$$\frac{S_1}{S_2} = \left(\frac{PM_1}{PM_2} \right)^{\frac{2}{3}}$$

y en la mayoría de las proteínas es igual a R, de donde:

$$R = \left(\frac{PM_1}{PM_2} \right)^{\frac{2}{3}}$$

En esta forma puede hacerse la estimación aproximada del peso molecular de una proteína, refiriéndola a otra de peso molecular conocido.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

A) MATERIALES Y METODOS

1.- Obtención del material enzimático. El látex de Hevea brasiliensis que se usó en el desarrollo del trabajo, nos fue enviado periódicamente desde el campo experimental del hule "El Palmar", en El Palmar, Ver., donde se colectó directamente del árbol en frascos de polietileno colocados en termos con hielo seco para evitar la desnaturalización de la proteína..

2.- Separación del suero. Por centrifugación del látex descongelado en una centrífuga Spinco modelo L, a 29,000 rpm durante 45 minutos, se separó éste en 4 capas: una superior de hule semisólido de color blanco marfil, que constituye aproximadamente el 44% del volumen total; una segunda capa delgada, adherida a la del hule, de color naranja fuerte y que en el látex congelado y descongelado por dos ocasiones consecutivas tiende a desaparecer, transformándose aparentemente en hule; la tercera capa es un líquido opalescente (suero) que forma mas o menos el 50% del látex y que fue la fuente de enzimas usada en el presente trabajo; finalmente, una cuarta capa constituida por un residuo pastoso ligeramente amarillo.

3.- Preservación de la Actividad Enzimática. Para evitar la pérdida de la actividad enzimática que se observaba al mantener en congelación prolongada el suero del látex, se sometió éste a una liofilización. El polvo obtenido se conservó en un desecador a 5° C.

4.- Aislamiento y Purificación de la Enzima. El suero

liofilizado se reconstituyó a su volumen original (90 mg de suero liofilizado por ml de agua) y se llevó a un pH de 5 con una solución de ácido acético al 10%, con lo cual precipitó una buena parte de la proteína inactiva.

La enzima se purificó por métodos de filtración en geles de Sephadex.* Primero a través de una cama filtrante de Sephadex G 100 de 2.7 cm de diámetro por 24 cm de largo con un volumen total de 137 ml. Para montar la columna se pusieron 7.5 g de gel seco en un vaso de precipitados con agua destilada, se dejó sedimentar y se decantó varias veces para eliminar las partículas finas; la suspensión se virtió por porciones y a través de un embudo, sobre una columna de cromatografía llena de agua, cuyo extremo estaba empacado con lana de vidrio y perlas de cristal. Cuando las partículas de gel se sedimentaron formando una capa de 3 a 4 cm de espesor, se abrió la llave de la columna, manteⁿniéndose un flujo lento del agua, repitiéndose esta operación hasta la adición total del gel. Una vez empacada la columna se colocó un papel filtro circular sobre ella y se enfrió a 5° C.

Eluyentes. Se probaron como eluyentes soluciones amortiguadoras 0.02 y 0.05 M de fosfatos de sodio y de potasio a pH 6.0, 6.6 y 7.0; en todos los casos se observó pérdida considerable de la actividad. El mejor resultado se obtuvo eluyendo con agua bidestilada (destilada en vidrio).

La segunda filtración se efectuó a través de una columna de DEAE Sephadex A 50 de grano mediano. El tamaño de la columna o cama filtrante fue de 1.4 cm de diámetro por

*Los geles de Sephadex se adquirieron de Pharmacia, Uppsala, Suecia.

14 cm de largo, con un volumen total de 21.5 ml. Se utilizaron 1.5 g de gel seco que se hidrataron en un exceso de agua; se dejó sedimentar y se decantó varias veces para eliminar las partículas finas. Este gel hidratado se sometió a un lavado por filtración, con ácido clorhídrico 0.5 N cuyo exceso se eliminó con agua; en seguida se trató con hidróxido de sodio 0.5 N en una cantidad similar a la del ácido, se lavó nuevamente con agua y se neutralizó con ácido acético diluido al 5%, suspendiéndolo finalmente en la solución amortiguadora que se usó para eluir. La columna de cromatografía llena de eluyente se cargó vertiendo la suspensión de DEAE Sephadex A 50 en la forma descrita anteriormente para el Sephadex. Se colocó la muestra con una pipeta, dejándola resbalar por las paredes y se eluyó, en un caso, con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01 M, pH 6.0 con concentraciones crecientes de cloruro de sodio; en otro caso, se eluyó con soluciones amortiguadoras de fosfatos de potasio con concentraciones crecientes de cloruro de potasio. En ninguna de las dos ocasiones se pudo recuperar la actividad. La elución con agua destilada fue, si no satisfactoria, la que dio los mejores resultados.

Todas las filtraciones y eluciones se llevaron a cabo en un cuarto frío a 5° C. colectándose en tubos de ensaye porciones de 4 ml, en el caso del Sephadex y de 3 ml en el del DEAE Sephadex; esta operación se hizo en un colector automático. La presencia de proteínas se hizo evidente en las diferentes porciones (tubos) midiendo la absorción de los aminoácidos aromáticos de la proteína a una longitud de onda de 280 mμ.

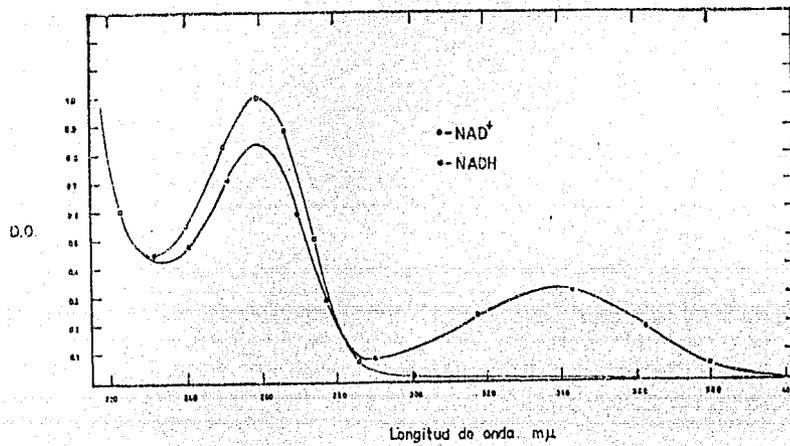


Fig. 1.- Espectro de Adsorción del NAD.
Nótese que el NAD⁺ no absorbe a 340 mμ

Al graficar el número de los tubos contra su correspondiente densidad óptica, se obtuvieron varias fracciones de peso molecular diferente. Todos los tubos correspondientes a una misma fracción se reunieron y liofilizaron para evitar la desnaturalización de la enzima.

Se trató de purificar la enzima por filtración a través de una columna filtrante de Sephadex G 200, pero el rendimiento fue tan bajo que se descartó el método.

5.- Medición y Cuanteo de la Actividad Enzimática.

Warburg observó que el NAD reducido, a diferencia de su forma oxidada, absorbía fuertemente la luz a 340 m μ . La figura 1 muestra el espectro de absorción de las 2 formas de dicha coenzima.

Aprovechando este medio de distinción entre las 2 formas del NAD, se realizó la medición de la actividad de nuestra enzima en un espectrofotómetro Beckmann, Modelo D. U., con lámpara de cuarzo y siguiendo la transformación del NADH en NAD⁺ por desaparición de la banda de absorción a 340 m μ . Las lecturas se hicieron a intervalos de 15 segundos en el primer minuto y de 30 segundos en los siguientes.

En nuestra reacción se consume una molécula de NADH por cada molécula de sustrato (piruvato) transformado; conociendo la absorción molar que en las 2 formas de la coenzima es la misma (6.22×10^3), puede cuantearse la velocidad de la reacción en moles de NADH consumidos, que corresponden exactamente al número de moles de sustrato transformado. La fórmula aplicada es:

$$\Delta c = \frac{\Delta D \cdot 0.01}{\epsilon}$$

donde Δc : cambio de concentración de NADH en el primer minuto

to

$\Delta D.O.$: cambio de densidad óptica en el primer minuto.

ϵ : absorción o extinción molar.

Para el cálculo de la velocidad de la reacción, se tomaron en cuenta las velocidades iniciales, o sean, las que se observarían a tiempo cero, cuando el sistema carece de productos y de otros factores que modifican la velocidad de la transformación del sustrato. Estas velocidades iniciales se obtuvieron trazando la tangente al origen en las gráficas correspondientes.

Definiciones:

Unidad de actividad: cantidad de enzima que produce un cambio de densidad óptica de 1.0 en un minuto.

Actividad Específica: Número de unidades de actividad por ml de enzima.

Pureza: Unidades de actividad por mg de proteína.

Rendimiento: Porcentaje de unidades totales.

6.- Condiciones de la Incubación. La mezcla para incubarse contenía:

0.4 ml de solución amortiguadora de fosfatos de potasio 0.2 M, pH 7.0.

1.0 ml de enzima (0.34 mg/ml de agua).

1.0 ml de piruvato de sodio 0.16 M.

0.1 ml de NADH disuelto en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.005 M, pH 8.7, en cantidad suficiente para dar una densidad óptica inicial de la mezcla de 0.60 a 0.65 ó 0.40 a 0.48 según el caso.

0.5 ml de agua destilada para un volumen total de 3.0 ml.

El blanco o control contenía todas las sustancias excepto el NADH, en cuyo lugar se puso la solución reguladora en la que se disolvió éste. La reacción se puso en marcha con la adición del NADH; la temperatura se mantuvo constante a 21° C. y las celdas usadas fueron de cuarzo con 1 cm de espesor.

7.- Determinación de la Proteína. Para calcular la concentración proteica en las incubaciones se usaron 2 métodos, a saber: el de Biuret y el de absorción espectrofotométrica a 280 m μ .

El reactivo de Biuret se preparó según el método descrito en Methods in Enzymology (24). En casi todas las determinaciones se pusieron: 0.2 ml de la solución problema, 1.8 ml de agua y 4.0 ml de reactivo de Biuret, que se añadió con agitación; se leyó en un espectrofotómetro Beckmann D. U. a 540 m μ , contra un blanco que consistió en 4.0 ml de reactivo de Biuret y 2.0 ml de agua. La concentración de proteína de la muestra se calculó con la curva de calibración obtenida previamente con albúmina de suero humano, por el método de Biuret.

En algunos casos se determinó la proteína por el método espectrofotométrico leyendo la absorción a 280 m μ y haciendo la corrección de Kalckar (24) por presencia de ácidos nucleicos que absorben en esta región con máximo a 260 m μ :
 Concentración de proteína = $1.45 \text{ D.O.}_{280} - 0.74 \text{ D.O.}_{260}$ mg/ml, donde D.O._{280} y D.O._{260} son las densidades ópticas a 280 y 260 m μ , respectivamente.

8.- Determinación del pH Optimo. En las incubaciones para determinar el pH óptimo se usaron las siguientes solu

ciones amortiguadoras:

- a) De fosfatos 0.2 M para un rango de pH de 5.7 a 8.0
 Solución A: KH_2PO_4 (6.802 g/l)
 Solución B: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (11.411 g/l)
- b) De Tris-HCl 0.2M, en un rango de pH de 5.8 a 8.7
 Solución A: Tris (trihidroximetil amino metano)
 (24.2 g/l)
 Solución B: HCl (16.85 ml/l)
- c) De citratos 0.1 M, en un rango de pH de 3 a 6.2
 Solución A: Acido cítrico (21.01 g/l)
 Solución B: Citrato de sodio $2\text{H}_2\text{O}$ (29.4 g/l)

Mezclando volúmenes variables de las soluciones A y B, en cada caso, se obtuvieron las soluciones amortiguadoras que se emplearon en las incubaciones.

9.- Determinación del Peso Molecular Aproximado de la Enzima. Esta determinación se hizo por el método de centrifugación con un gradiente de sacarosa (23), comparando el comportamiento de sedimentación de la enzima, con el de la albúmina de suero humano cuyo peso molecular es de 68,000.

Gradiente de Sacarosa. Se prepararon soluciones al 5 y 20% de sacarosa en solución amortiguadora 0.05 M de fosfatos a un pH de 7.0, las que se pusieron en los 2 compartimientos del aparato descrito por Martin y Ames (23); éste permite mezclar ambas soluciones en proporciones variables, directamente en los tubos de centrífuga. En esta forma se hicieron 3 soluciones con el mismo gradiente, con densidad creciente a partir del menisco y con un volumen, en cada caso, de 4.6 ml.

En los tubos 1 y 2 se pusieron 3.3 mg y 1.65 mg, res-

pectivamente, de la fracción 1 obtenida de la filtración por Sephadex G 100 y 1.20 mg de albúmina en el tubo 3. Cada una de las muestras estaba disuelta en un volumen de 0.2 ml, lo que hace un total de 4.8 ml por tubo.

Se centrifugaron en una centrífuga Spinco con "cabeza balanceante", durante 16 horas a 35,000 rpm y a una temperatura de 0° C.; terminada la centrifugación se perforó cuidadosamente el extremo inferior de los tubos con una aguja, colectándose de 24 a 25.5 fracciones de 12 gotas cada una.

A todas las fracciones de los tubos con muestra de enzima se les midió la actividad enzimática, se localizó la porción más activa, que corresponde a la de mayor concentración de enzima, y se calculó su distancia al menisco.

En las fracciones del tubo que contenía la albúmina se localizó la fracción de mayor concentración de proteína por el método espectrofotométrico, leyendo la absorción a 280 m μ .

10.- Constante de Michaelis-Menten. Se determinó la constante de Michaelis, de la deshidrogenasa láctica del látex Hevea, tanto para el piruvato como para la coenzima. En el primer caso se mantuvo constante la concentración de NADH y se varió la concentración de piruvato de sodio, usando diluciones 10, 20, 30 y 40 veces la solución madre, en cada experimento. Se obtuvieron las velocidades iniciales de cada caso en moles de NADH consumidos. El recíproco de estas velocidades se graficó contra el recíproco de la concentración de sustrato correspondiente y de la gráfica se obtuvo la Km. de la enzima para el piruvato. En el caso de la Km para la coenzima se procedió de la misma manera, sólo

que se mantuvo constante la concentración de piruvato y se varió la de NADH.

B) RESULTADOS.

Dado que el sistema enzimático del suero consumía NADH sin suministro de sustrato, se supuso la existencia de un tipo de deshidrogenasa dependiente del NAD y la presencia en el mismo látex, del sustrato o los sustratos adecuados.

1.- Liofilización. El suero liofilizado conserva durante meses la misma actividad de la deshidrogenasa láctica que el suero recién obtenido por centrifugación del látex fresco; por el contrario, si el suero se conserva congelado, va perdiendo paulatinamente su actividad.

2.- Modificación del pH. Al modificar el pH original del suero que es de 6.6 a 5.0 por adición de una solución diluida de ácido acético, se precipitó parte de la proteína inactiva que se eliminó junto con los residuos de hule, por filtración en Buchner sobre celita de grado analítico. La proteína precipitada fue de mas o menos el 30% del total.

3.- Filtración en Sephadex G 100. Los 1.740 g de suero liofilizado y precipitado a pH 5, se filtraron por una columna de Sephadex G 100 y se separaron 3 fracciones bien definidas (Fig. 2) con un peso total de 1.680 g que corresponde a un rendimiento del 96.5%. De estos 1.680 g, 455 mg corresponden a la fracción 1, que fue la única que tuvo actividad enzimática y la que se usó en los experimentos posteriores.

Las fracciones que se obtuvieron de la filtración por Sephadex G 100 no consumieron NADH cada una por separado.

En la mezcla de las tres sí se observó actividad, no así en las combinaciones de las fracciones 1 y 2 y las fracciones 2 y 3. En la mezcla de las fracciones 1 y 3 se observó un consumo similar al de la mezcla de las 3 fracciones (tabla 2).

T A B L A 2

CONSUMO DE NADH SIN SUMINISTRO DE SUSTRATO

Material Enzimático	Actividad o Velocidad de reacción (Δ D.O. a 340 m μ en el primer minuto)
1.- Suero total	0.0310
2.- Suero dializado 1h y 15 min.(parte no dializable)	0.0250
3.- Fracción 1 de la Filtración por Sepha dex G 100	0.0000
4.- Fracción 2 de la Filtración por Sepha dex G 100	0.0007
5.- Fracción 3 de la Filtración por Sepha dex G 100	0.0005
6.- Mezcla de las Fracciones 1, 2 y 3 del Sephadex	0.0140
7.- Mezcla de las Fracciones 1 y 2 de la filtración por Sephadex G 100	0.0066
8.- Mezcla de las Fracciones 2 y 3, ídem ..	0.0030
9.- Mezcla de las Fracciones 1 y 3, ídem...	0.0140

En el suero dializado con agua destilada a través de una membrana de celulosa, se observó un descenso en el consumo de NADH, que se pensó se debía a que el sustrato era dializable, por lo que se procedió a dializar tanto la fracción 1 como la 3 y se midió el consumo de coenzima en todas las combinaciones posibles de ellas. En la combinación de la fracción 1, sometida a dialisis, y la fracción 3, parte sin dializar, bajó notablemente la actividad enzimática.

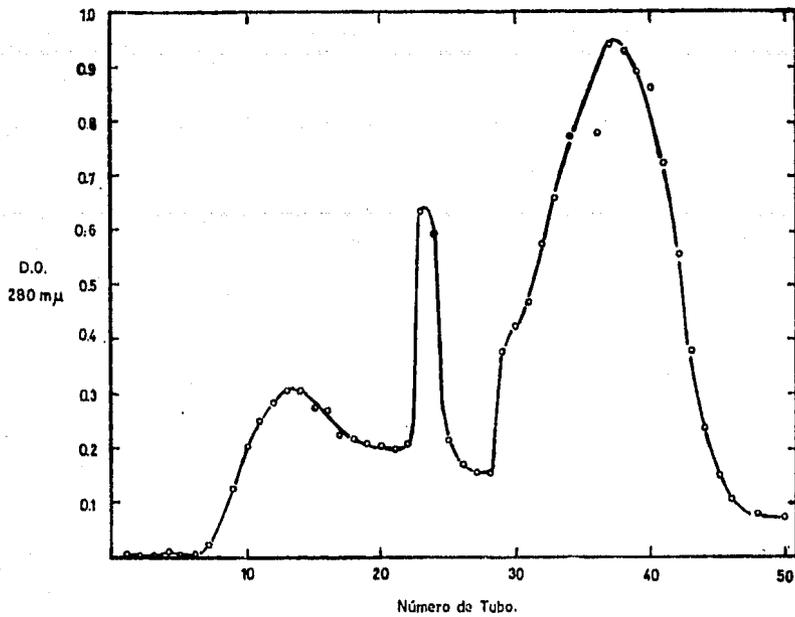


Fig. 2.- Fracciones de la Filtración del Suero a través de Sephadex G 100. De izquierda a derecha; fracciones 1, 2 y 3.

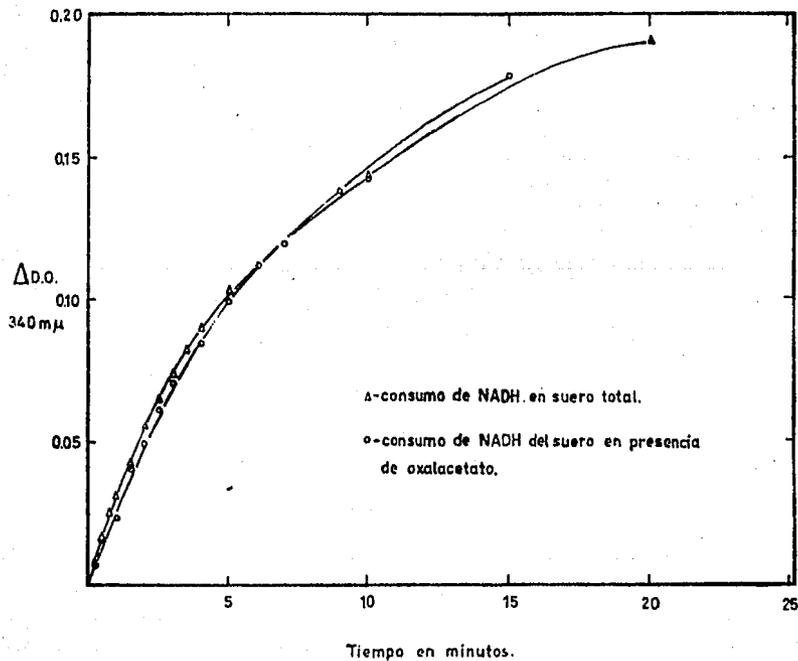


Fig. 3.- Consumo de NADH en presencia y ausencia de oxalacetato.

Las mezclas de la fracción 1, parte no dializable, con la fracción 3, parte no dializable, a distintos tiempos de diálisis, mostró consumos cada vez menores de NADH.

La substancia dializable de la fracción 3 se concentró 5 veces su volumen original, por evaporación en baño de vapor, se combinó con la fracción 1, parte no dializable, y se incubó. La actividad enzimática fue bastante grande como puede leerse en la tabla 3.

T A B L A 3

CONSUMO DE NADH EN LA COMBINACION DE LAS FRACCIONES 1 Y 3 DE LA FILTRACION POR SEPHADEX G 100

Material Enzimático. Mezclas de:	Δ D.O. a 340 m μ en el primer minuto
La parte no dializable de la fracción 1 y la fracción 3 sin diálisis	0.012
La porción no dializable de la fracción 1 y la porción no dializable de la fracción 3, después de 15 min. de diálisis ..	0.058
La porción no dializable de la fracción 1 y la porción no dializable de la fracción 3, después de 35 min. de diálisis ..	0.038
La porción no dializable de la fracción 1 y la porción dializable de la fracción 3, concentrada 5 veces su volumen..	0.038

Todos estos experimentos nos indican que:

a) la fracción 3 contiene un cristalóide que actúa como sustrato y que es termoestable.

b) la enzima está presente en la fracción 1, parte no dializable.

c) el hecho de que la enzima esté presente en la fracción 1 obtenida por filtración en Sephadex G 100, y que haya salido en los primeros tubos de la elución sugiere que,

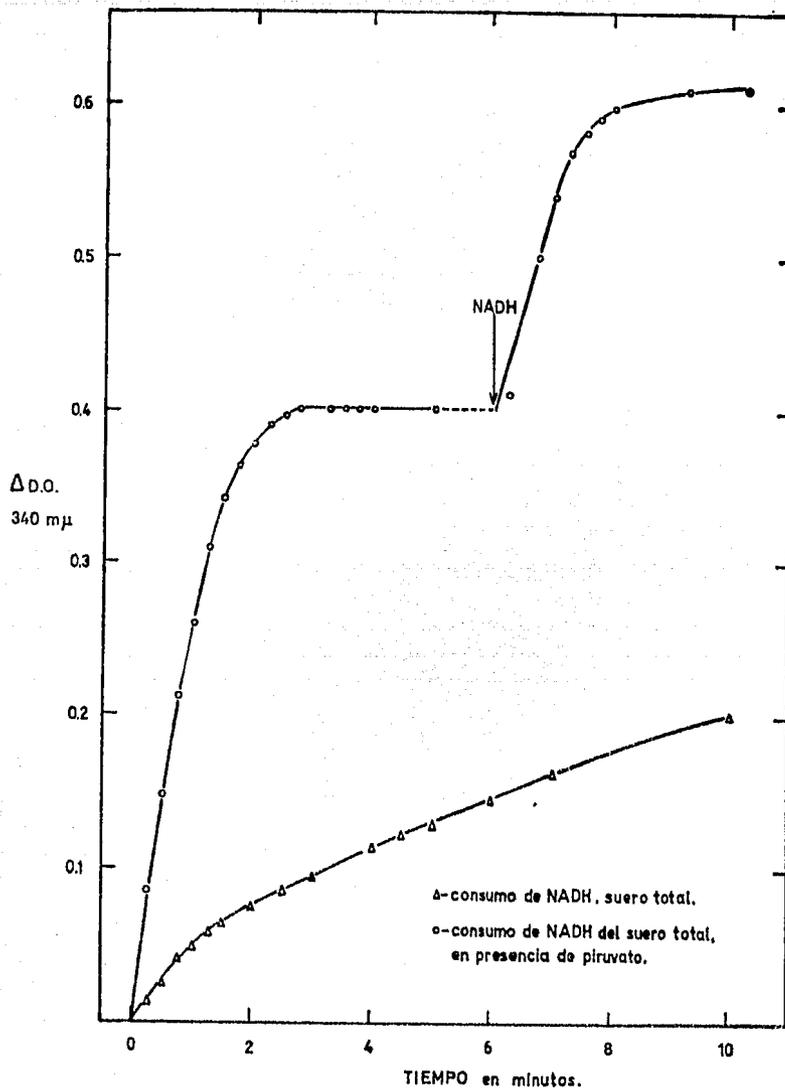


Fig. 4.- Consumo de NADH en presencia y ausencia de piruvato.

debe ser mayor de 100,000.

4.- Identificación de la Enzima. Para identificar la o las deshidrogenasas presentes en el suero del látex se puso el suero en presencia de varios sustratos:

a) Oxalacetato de Sodio. La actividad enzimática del suero en presencia del oxalacetato no sobrepasó a la basal (la observada sin sustrato), como se ve en la Fig. 3, por lo que se descartó la posibilidad de que existiera deshidrogenasa málica!

b) Piruvato de Sodio. El suero en presencia del piruvato de sodio y de la coenzima tiene una actividad que sobrepasa varias veces la basal. Una vez agotado el NADH del sistema, la actividad enzimática puede manifestarse nuevamente por una segunda adición de NADH, como puede verse en la Fig. 4, lo que indica sin lugar a dudas la presencia de deshidrogenasa láctica en el suero.

5.- Filtración por DEAE Sephadex A 50. La purificación lograda en la filtración por Sephadex G 100 fue de 3.5 veces la original (tabla 4). Para obtener una mayor purificación se pasó por una columna de DEAE Sephadex A 50. Por elución de 1.18 mg de la fracción 1 de la filtración anterior, en una columna de DEAE Sephadex A 50, se separaron 3 fracciones que llamamos A, B y C, respectivamente (Fig. 5). Todas ellas presentaron actividad, siendo la fracción A la más activa (tabla 4). La purificación lograda en la fracción A fue de 7.86 con respecto al suero original, pero el rendimiento fue muy bajo, perdiéndose casi la totalidad de la proteína (tabla 4), por lo que no fue posible hacer uso de ella en los experimentos posteriores.

T A B L A 4

Material Enzimático	Volumen ml	Unidad de actividad	Unidades de actividad/ml.	Unidades totales.	Proteína mg/ml.	% de proteína.	Pureza unidades/mg prot.	Rendimiento % de unidades totales.	Purificación
Suero	20	0.175	5.685	113.70	24.75	100	0.229	100	1
Sobrenadante a pH 5	20	0.236	4.66	93.20	17.9	81.9	0.260	81.9	1.1
Fracción 1	20	0.223	4.48	89.60	5.56	22.4	0.804	78.8	3.5
Fracción A	6	2.22	0.450	2.7	0.25	1.01	1.8	0.092	7.86
Fracción B	3	4.80	0.208	0.624	0.175	0.70	1.1	0.0216	4.80
Fracción C	3	9.43	0.105	0.315	0.187	0.75	0.56	0.0112	2.44

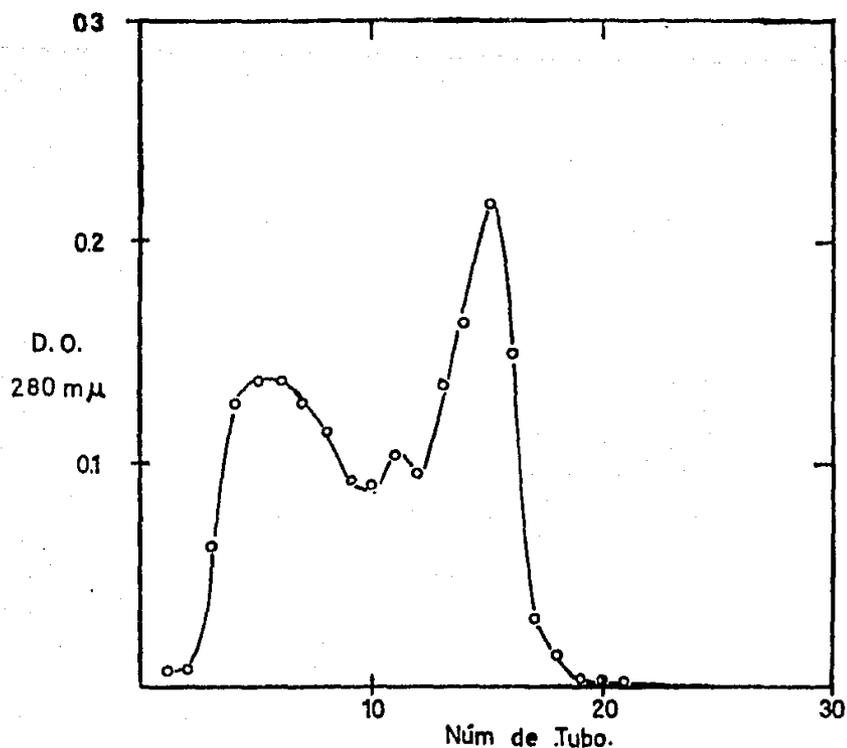


Fig. 5.- Fracciones A, B y C de la Filtración por DEAE Sephadex A 50. La mayor actividad se observó en la fracción A.

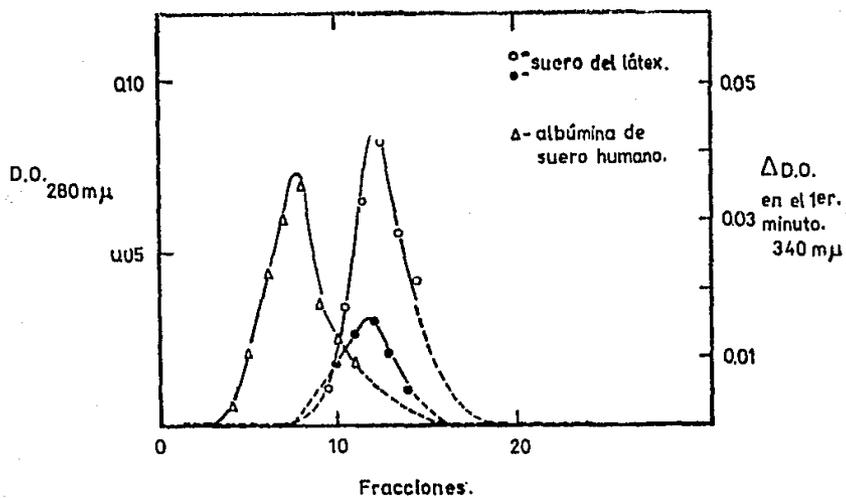


Fig. 6.- Gráfica de Sedimentación de la Deshidrogenasa láctica del Suero y de la Albúmina de Suero Humano.

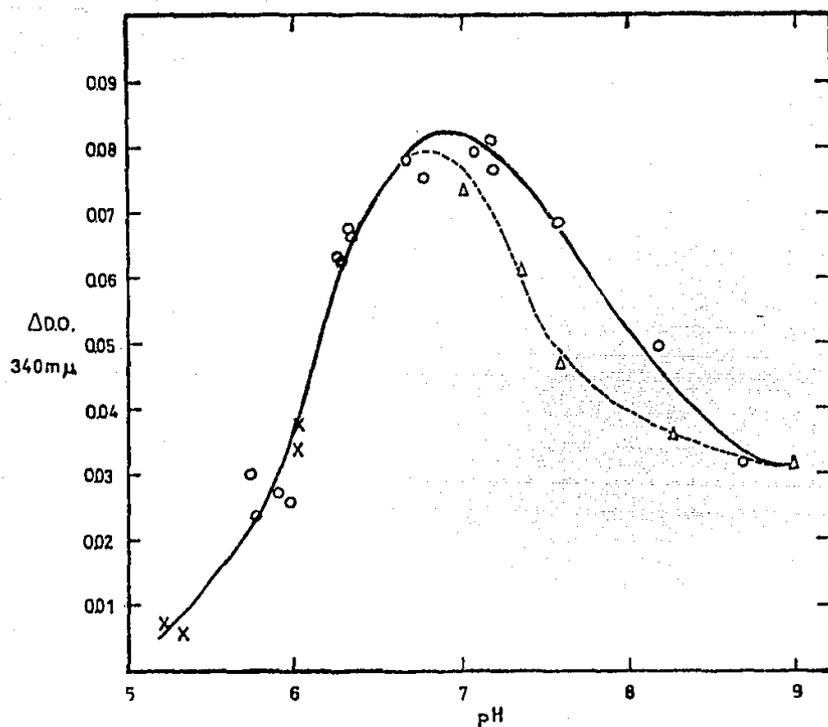


Fig. 7.- Efecto de $\bar{p}H$ sobre la actividad de la Deshidrogenasa láctica del Suero del Látex de Hevea brasiliensis. Soluciones amortiguadoras de: (X) - citrato 0.1M, (O) - fosfatos 0.2 M y (Δ) - Tris-HCl 0.2 M.

6.- Coefficiente de Sedimentación o Peso molecular Aproximado. En los tubos de centrífuga 1 y 2 con muestra enzimática, se encontró la mayor actividad en la fracción 12 a partir del menisco. La mayor concentración de albúmina en el tubo 3 se localizó en la fracción 8 (Fig. 6).

La distancia del menisco al fondo del tubo fue de 4.15 cm en el primero y de 4.13 cm en el segundo y tercer casos.

La relación de las distancias al menisco de la deshidrogenasa láctica y de la albúmina fue de 1.53177, que es también la relación de los pesos moleculares:

$$R = \frac{\text{Distancia al menisco de la Deshidrogenasa láctica}}{\text{Distancia al menisco de la albúmina de suero humano.}}$$

$$R = \frac{1.88624 \text{ cm}}{0.94162 \text{ cm}} = 1.53177$$

$$\frac{\text{P.M. de la Desh. láctica}^{\frac{2}{5}}}{\text{P.M. de la albúmina (68,000)}} = 1.53177$$

El peso molecular de la deshidrogenasa láctica del látex calculado de esta manera es de 129,000 \pm 15%, bastante parecido al reportado para deshidrogenasa láctica de mamíferos (buey) 135,000 \pm 15,000.

7.- Efectos de pH. La máxima actividad de la deshidrogenasa láctica del látex de H. brasiliensis, se observó en un rango de pH de 6.8 a 7.1 (Fig! 7).

8.- Número de recambio. Tomando como peso molecular de la enzima 129,000, con un solo centro activo por molécula, se calculó el número de recambio de nuestra enzima que fue de 29,000 moles de sustrato por minuto y por mol de enzima a 21° C. en una solución amortiguadora 0.2 M de fosfatos pH 7.0.

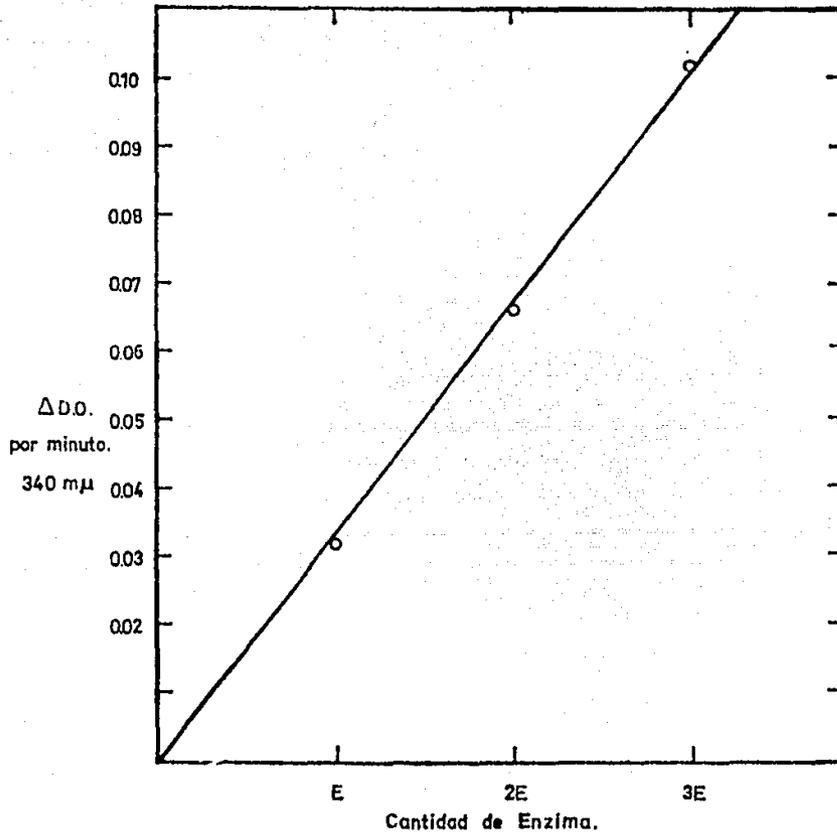


Fig. 8.- Efecto de Concentración de Enzima.

9.- Isoenzimas. Se hizo la electroforesis en gel de almidón para separar las isoenzimas, pero la fracción 1 de la filtración por Sephadex G 100 mostró una banda única, lo que indica la ausencia de isoenzimas.

10.- Efecto de Concentración de Enzima. La actividad de la deshidrogenasa láctica del suero del látex de H. brasiliensis aumenta proporcionalmente a la cantidad de enzima (Fig. 8), lo que indica que el látex carece de inhibidores o activadores que modifiquen el comportamiento de la enzima que nos ocupa.

11.- Constante de Michaelis-Menten (Km). Aplicando la ecuación modificada por Lineweaver y Burke (ecuación 10) a los datos experimentales, se calculó el valor de la Km de la reacción de la deshidrogenasa láctica con respecto al piruvato, observándose que la Km variaba dependiendo de la concentración del NADH, es decir, que a una determinada concentración de NADH se obtenía una Km distinta, a la calculada para otra concentración de NADH, habiéndose mantenido constantes las condiciones restantes.

Este fenómeno es similar al observado en las reacciones enzimáticas con dos sustratos (20), lo que quiere decir que el NADH se comporta como otro sustrato que compite con el piruvato, por la enzima.

También se calcularon las Km de la reacción para el NADH a dos distintas concentraciones de piruvato.

Las Km calculadas son las siguientes:

Para piruvato:

9.53×10^{-5} M a una concentración de NADH de 8.63×10^{-5} M y 8.22×10^{-5} M a una concentración de NADH de 6.47

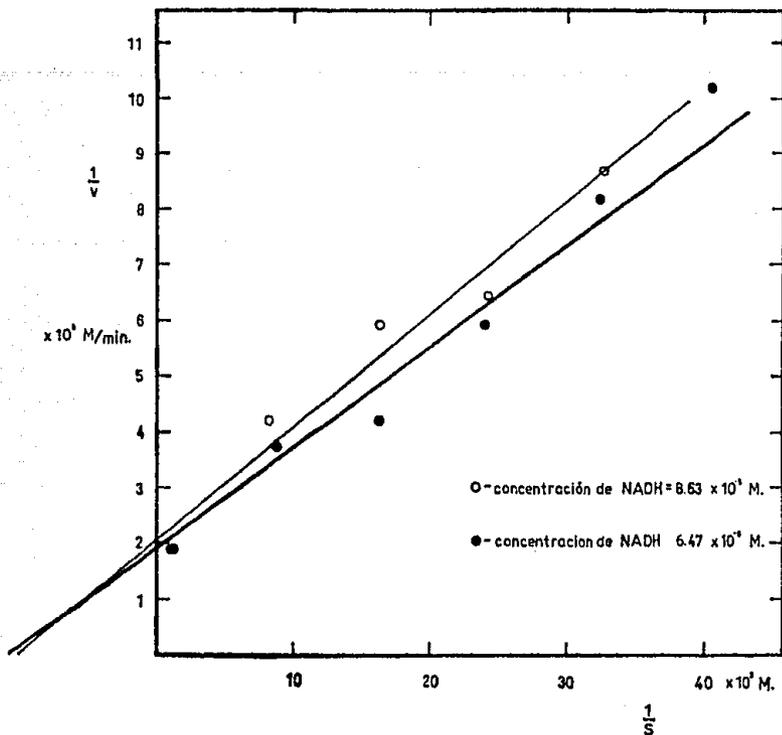


Fig. 9.- Gráfica de la Ecuación de Michaelis y Menten modificada por Lineweaver y Burke, para el Cálculo de la K_m para el Piruvato a partir de los Datos Experimentales.

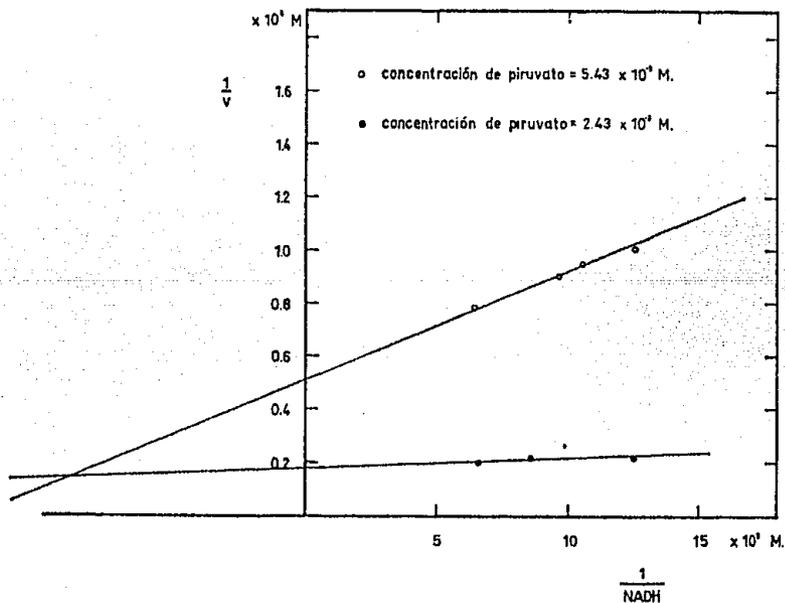


Fig. 10.- Gráfica de la Ecuación de Lineweaver y Burke para el Cálculo de la K_m de la Deshidrogenasa láctica del Suero del Latex de Hevea brasiliensis con respecto al NADH.

$\times 10^{-5}$ M (Fig. 9).

Para el NADH:

7.89×10^{-5} M y 2.071×10^{-6} M, para una concentración de piruvato de 5.43×10^{-3} M y 2.43×10^{-3} M, respectivamente (Fig. 10).

Todos los experimentos se realizaron a 21° C. en una solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M de pH 6.8.

DISCUSION

El espectro de absorción del suero del látex de la Hevea brasiliensis, muestra un máximo de absorción a 259 m μ , el cual es característico de bases púricas, pirimídicas y sustancias que las contienen (ácidos nucleicos). También se demostró que la sola adición de NADH al suero del látex pone en marcha una reacción enzimática en la que se oxida la coenzima en NAD⁺, de lo que se deduce que existe el sustrato oxidado en el suero.

Se sabe que la forma oxidada del NAD es más abundante en la mayoría de los tejidos que su forma reducida (25) y mostrando el suero una absorción a 259 m μ se pensó en la probable existencia de NAD⁺ en el suero del látex.

Para comprobar lo anterior se midió la conversión de lactato en piruvato sin adicionar NAD⁺. La incubación se efectuó a pH 8.95 (Tris-HCl, 0.2M) en presencia de cianuro de potasio para bloquear las moléculas de piruvato ya existentes o que se formaran en el transcurso de la reacción.

Los resultados muestran claramente que la reacción, aunque lenta, sí tiene lugar. La cantidad de NAD⁺ que existe en el látex, calculado a partir de la aparición de la banda de absorción correspondiente al NADH, fue de: 48.07×10^{-3} moles de NAD⁺ por ml de suero.

Es posible, por cuanto existe NAD⁺ en el suero, que la deshidrogenasa láctica se encuentre en él no para convertir el pirúvico en láctico como hemos estado haciendo nosotros, sino para transformar el láctico en pirúvico que puede ser transformado fácilmente en Acetil Coenzima A y ésta en hule a través de varios intermediarios.

Es probable que el piruvato presente en el suero, pudiera provenir de la deshidrogenación del propionato para dar acrilato que, a su vez, por hidratación, daría lactato (26), cuya conversión en piruvato cataliza la deshidrogenasa láctica. A pesar de ello, lo anterior no explica en modo alguno el origen del propionato.

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

- 1) K. Esau, Plant Anatomy, John Wiley, pág. 321 (1960).
- 2) M. J. Dijkman, Hevea, Thirty Years of Research in The Far East. Cronica Bot. Waltham Mass. (1951).
- 3) R. B. Park y J. Bonner, J. Biol. Chem. 233, 340 (1958).
- 4) M. W. Miller. The Pfizer Handbook of Microbial Metabolites, pág. 155 (1958).
- 5) B. Arreguín. Encyclopedia of Plant Physiology. Rushland Vol. X, 223 (1958).
- 6) L. N. S. Haan Homans, Trans. Inst. Rubber Ind. 25, 346-363 (1950).
- 7) I. P. Williamson y R. G. O. Kekwick, Biochem. Jour. 88, 18 p. (1963).
- 8) M. Dixon y E. C. Webb, Enzymes. Longmans, pág. 645 (1959).
- 9) D. M. Gibson et al, J. Biol. Chem. 203, 706 (1953).
- 10) M. T. Hakala, A. J. Glaid, G. W. Schwert, J. Biol. Chem. 221, 191 (1956).
- 11) G. W. Schwert, M. T. Hakala. Arch. Biochem. et Biophys. 38, 55 (1952).
- 12) J. B. Niellands, J. Biol. Chem. 199, 373 (1952).
- 13) A. Meister, J. Biol. Chem. 184, 117 (1950).
- 14) D. Dennis y N. O. Kaplan, J. Biol. Chem. 235, 910 (1960)
- 15) J. Barker y A. F. El Saifi, Proc. Roy. Soc. B. 140, 363 y 385 (1952).
- 16) M. T. Hakala, A. J. Glaid, Fed. Proc. 12, 213 (1953).
- 17) K. Kubowitz y P. Ott, Biochem. Z. 314, 94 (1943).
- 18) P. G. W. Plagemenn, K. F. Gregory, F. Wroblewski. J. Biol. Chem. 235, 2282 (1960).
- 19) A. G. Hilvers. Biochem. et Biophys Acta 54, 186-187 (1961).
- 20) M. Dixon y E. C. Webb, Enzymes. Longmans págs. 75 y 97 (1959).
- 21) P. Flodin, Dextran Gels and Their Applications in Gel Filtration. Pharmacia, Uppsala, Suecia.
- 22) M. Dixon y E. C. Webb. Enzymes. Longmans, pág. 122 (1959).
- 23) R. G. Martin, B. N. Ames, J. Biol. Chem. 236, 1372 (1961).
- 24) Methods in Enzymology. Vol. III. 450-451.
- 25) The Enzymes. Academic Press, New York, Londres. Vol. III, pág. 154 (1960).
- 26) W. W. Shreeve. J. Biol. Chem. 195, 1 (1952).