

24/19



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

“ZARAGOZA”

**PROBABLE GLICATACION NO ENZIMATICA “IN VITRO”
DE LA CALMODULINA DE TESTICULO DE TORO**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

LICENCIADO EN QUIMICO-FARMACEUTICO-BIOLOGO

Presenta:

VALENTIN ISLAS PEREZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F. 1988



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 está 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.

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION.	3
1.- ANTECEDENTES CIENTIFICOS _	5
1.1.- Modificaciones Pstraduccionales de las protefnas.	
1.2.- Glicación no enzimática de las protefnas	
2.- CALMODULINA	II
2.1.- Estructura de la calmodulina	
2.2.- Propiedades de la calmodulina	
2.3.- Mecanismo molecular de las acciones mediadas por calmodulina	
2.4.- Relación estructura-actividad	
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
4.- HIPOTESIS	24
5.- OBJETIVOS	24
6.- DESARROLLO EXPERIMENTAL	25
6.1.- Obtención y purificación de calmodulina	
6.2.- Glicación "in vitro" de calmodulina	
6.3.- Eliminación de la glucosa libre de las mezclas	
6.4.- Detección y cuantificación de la protefna glicatada	
6.5.- Curva estándar de 5-hidroximetilfurfural	
7.- RESULTADOS	3I
7.1.- Obtención de calmodulina	
7.2.- Curva estándar de 5-hidroximetilfurfural	
7.3.- Detección y cuantificación de calmodulina glicatada por el método colorimétrico	

7.4.-Detección de calmodulina glicatada por espectroscopía	
8.-DISCUSION DE RESULTADOS	59
9.-CONCLUSIONES	68
10.-PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	70
II.-APENDICE 1 : Material y equipo	72
II.-APENDICE 2 : Esquemas de Incubación	74
II.-APENDICE 3 : Análisis Estadístico	80
14.-BIBLIOGRAFIA	93

RESUMEN

La modificación postraduccionaL de las proteínas es una reacción que sucede sobre la cadena peptídica cuando esta ya fue ensamblada en los ribosomas. Esta modificación puede alterar algunas funciones originales de la proteína para las cuales fue creada. Una de estas reacciones postraduccionales es la GLICACION DE PROTEINAS.

En esta reacción de glicación, que depende del tiempo de contacto y de la concentración de los reactantes, las proteínas plasmáticas se unen con glucosa para producir aductos de proteína-glucosa. Así, cualquier proteína que esté en contacto continuo con determinadas concentraciones de glucosa (iguales o mayores a la existente en el plasma humano), será susceptible de ser glicatada, como ha sido el caso de la albúmina, la colágena la hemoglobina y otras proteínas plasmáticas. Se ha descubierto que las proteínas de la membrana del eritrocito también pueden glicatarse bajo esas condiciones, como pudiera ser el caso de la calmodulina.

La calmodulina es una proteína de bajo peso molecular, termoestable y altamente acídica que se encuentra en la mayoría de las células de nuestro organismo. Por su capacidad de enlazar 2 iones Ca por molécula es considerada una proteína importante en el metabolismo de este ion y reguladora de las actividades de varias enzimas.

Las implicaciones fisiológicas de las proteínas que se glicatan "in vivo", han sido estudiadas y se ha especulado que pueden contribuir a la aparición y desarrollo de algunas secuelas patológicas que se manifiestan en la diabetes. Desde este punto

de vista, en una primera fase de investigación sobre este tema, el presente trabajo estudia la probable glicación "in vitro" no enzimática de la calmodulina de testículo de toro con glucosa 7, 10 y 20 mM durante diferentes tiempos de incubación (24, 72 y 120 hrs.) en presencia y ausencia de Ca 1 mM.

Los resultados obtenidos demuestran que la glicación "in vitro" de la calmodulina es mayor en presencia de iones Ca y proporcional con la concentración de glucosa y el tiempo de incubación.

Finalmente, el espectro en u.v. de la calmodulina glicatada con glucosa 20 mM durante 120 hrs. de incubación, presenta diferencias en el patrón de absorción con el de la calmodulina pura, que probablemente son debido a la reacción de glicación

Introducción

La incorporación de carbohidratos a gran número de proteínas del organismo (ejemplo las glicoproteínas), es una reacción que ocurre después que se realizó la síntesis de la cadena peptídica, es decir, es una modificación pos-traduccional. Cuando esta modificación ocurre en condiciones anormales o patológicas, modifica las funciones originales de la proteína en cuestión. Un ejemplo de lo anterior es la glicación* de diversas proteínas que se observa en el estado diabético, lo que tal vez ayude a explicar algunas de las secuelas que pueden aparecer en dicha enfermedad, como son:

- a) Los cambios microvasculares obliterativos en la retina. Algunos autores sostienen que estos son el resultado de la agregación de glóbulos rojos y que correlaciona con el aumento de los niveles de hemoglobina glicada (1,2). Sin embargo, no existen datos que apoyen la hipótesis de que este fenómeno de glicación juegue un papel relevante en la patogénesis de las secuelas microvasculares.
- b) La formación de cataratas. Experimentos "in vitro" demostraron que la opalescencia es producida por el agregado de proteínas del cristalino de alto peso molecular como resultado de la glicación no enzimática de las mismas (3).

*La IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature recomendó a principios de 1987 usar el término GLICACION en lugar de glicatación, glucosilación o glicosilación. El producto de una glicación será una proteína glicada (73,138).

c) Nefropatías. Se describe que en esta enfermedad la glicación no enzimática de las proteínas glomerulares está aumentada.

d) Trastornos de la perfusión homogénea y rápida de los eritrocitos dentro de la microcirculación. En estos casos hay mayor rigidez membranar de los glóbulos rojos y disminución de su capacidad de deformación (5, 6, 7).

Aunque no se han estudiado de manera exhaustiva las bases físico-químicas que expliquen la disminución de la deformabilidad y el aumento de la rigidez en los eritrocitos de los enfermos diabéticos, la correlación de ambos parámetros con el grado de control diabético sugiere una etiología metabólica. Un factor que tal vez se relacione con el trastorno anterior, es la elevada microviscosidad de la membrana del eritrocito observada en pacientes diabéticos con niveles plasmáticos de glucosa mayores de 140 mg/dl, la cual se atribuye a la glicación aumentada de las proteínas del glóbulo rojo (8).

Dentro del contexto anterior es importante mencionar que de las proteínas susceptibles de ser glicatadas y con implicaciones fisiológicas; esta la calmodulina la cual es considerada como la principal aceptora intracelular de iones calcio y la mediadora de numerosas funciones celulares dependientes de este ion. En el caso de los eritrocitos, la calmodulina puede regular la deformabilidad o forma global del eritrocito en respuesta a las modificaciones de la concentración de calcio intracelular y su función fallaría si estuviese inactivada, como pudiera suceder en el caso de que fuera glicatada, lo cual no ha sido todavía comprobado tanto "in vivo" como "in vitro".

1.-ANTECEDENTES CIENTIFICOS

1.1.-Modificaciones postraduccionales de las proteínas.

La síntesis de una proteína se realiza en cuatro etapas:

1.-Activación. En el citoplasma los aminoácidos solubles se unen a su ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) correspondiente por un enlace éster, formando un complejo aminoacil-ARNt.

2.-Iniciación. El ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que lleva el código genético que especifica la secuencia de aminoácido a enlazar y el complejo aminoacil-ARNt se unen a la subunidad ribosomal.

3.-Elongación. El polipéptido de reciente creación se alarga por adición secuencial de nuevos aminoácidos transferidos por el complejo aminoacil-ARNt.

4.-Terminación. En la última etapa de la síntesis, la cadena polipeptídica termina cuando el ARNm encuentra señales que así lo indican y el polipéptido es liberado de los ribosomas (1, 9).

Sin embargo, diversas clases de proteínas experimentan cambios en su molécula ya sea por alteración química de los aminoácidos, por la adición covalente de diversos substituyentes o por enlace no covalente con otra molécula no proteica. Estos cambios pueden ocurrir durante o después de la síntesis de la cadena polipeptídica, lo que implica que la polimerización de los aminoácidos sobre los ribosomas, que está genéticamente especificada, no constituye el proceso total de síntesis de una proteína (1, 2).

Uy y Wild (10) han propuesto el siguiente esquema de la síntesis de proteínas en donde, de manera más amplia, el producto final es una molécula biológicamente activa:

Etapa 1. Traducción :

Aminoácido + ARNt \longrightarrow Complejo aminoacil-ARNt

Etapa 2. Polimerización:

Complejo aminoacil1-ARNt1 + aminoacil2-ARNt2
+...aminoacil20-ARNt20 \longrightarrow Polipéptido + ARNm-ribosomas

Etapa 3. Procesamiento:

a) Polipéptido \longrightarrow Proteína activa

b) Proteína activa \longrightarrow Proteína inactiva.

Según el esquema anterior, un mecanismo celular que regula la actividad y la función de diversas proteínas es el que se refiere a las MODIFICACIONES COVALENTES POSTRADUCCIONALES DE LAS PROTEINAS. Estas modificaciones incluyen cualquier alteración "in vivo" que involucre la ruptura o la creación formal de enlaces covalentes en las proteínas y los péptidos de bajo peso molecular después de que se completa la etapa 1 del esquema anterior (10). En el primer caso, ruptura del enlace, se requiere la eliminación de un cierto número de aminoácidos a partir de un precursor generalmente inactivo, que dará una cadena polipeptídica más pequeña pero activa, como sucede con la tripsina, la pepsina y

la quimotripsina y en la activación de ciertas hormonas como la insulina (10). En el segundo caso, la formación de enlaces covalentes, diferentes grupos radicales o funcionales se unen químicamente a los aminoácidos de las proteínas. En general estas reacciones de modificación postraducciona se pueden agrupar en las siguientes categorías (2):

a) Glicosilación. Consiste en la introducción de monosacáridos oligosacáridos y polisacáridos a las proteínas. Incluye los glicosílderivados de los aminoácidos asparagina, serina, treonina, cisteína, así como de la hidroxilisina, hidroxifenilalanina y B-hidroxitirosina.

b) Fosforilación. Es el agregado de grupos fosfatos a residuos aminoácidos de proteínas. Engloba a los monoesteres de la serina, la treonina y la tirosina y las fosforamidas de lisina, histidina y arginina.

c) Metilación. Consiste en la incorporación de grupos metilos en algunos aminoácidos de las proteínas que da como resultado proteínas N-metiladas estables. Ejemplo de aminoácidos que experimentan esta reacción son la arginina, la histidina, la lisina y la glicina y en general los grupos alfa amino libre.

d) Acetilación. En este caso se produce la unión de grupos acetilos a residuos aminoácidos de las proteínas. En la mayoría de los casos se producen proteínas N-acetiladas y los principales aminoácidos que experimentan esta reacción son la alanina y la serina.

e) Halogenación. Se produce por la introducción de cloro,

bromo o iodo generalmente en los aminoácidos tirosina e histidina.

Todas estas reacciones son específicas, es decir son catalizadas por enzimas y se ha sugerido que se realizan en compartimientos celulares como el complejo de Golgi, el retículo endoplásmico o el núcleo (10, 13, 1).

Además de este procesamiento de las proteínas por vías enzimáticas bien definidas, éstas pueden experimentar otro tipo de modificaciones covalentes que pueden ocurrir espontáneamente sin catálisis específica. Estas modificaciones no enzimáticas incluyen las glicosilaciones de grupos N y N proteicos que pueden ocurrir en tejidos con altas concentraciones de glucosa, la deamidación de la asparagina y la glutamina en patata y glutamato respectivamente, la formación de enlaces cruzados en la colágena y la elastina, la racemización de L-aminoácidos y la hidrólisis de enlaces peptídicos (10, 2).

Este fenómeno resulta particularmente importante porque estudios "in vitro" han mostrado que la unión no enzimática de la glucosa a los grupos amino libres de ciertas proteínas, trae como consecuencia la inactivación total de su función tal y como sucede con la acetoacetato descarboxilasa (27), la alcohol deshidrogenasa (28), la asparaginasa (29), la lipoproteína de alta densidad (30), la 2-ceto-4-hidroxi-butarato aldolasa (31), la lipoproteína de baja densidad (31), la ribonucleasa (32), la uridindifosfato deshidrogenasa (33) lo que podría en algún momento contribuir a la explicación a nivel bioquímico, de algunas patologías que aun no se han aclarado totalmente.

1.2. GLICACION NO ENZIMATICA DE PROTEINAS

En 1966, Holmquist y Schroeder (15) descubrieron la presencia de un grupo bloqueador en el extremo amino terminal en la hemoglobina Hb A. Aunque se realizaron estudios posteriores para tratar de descubrir la naturaleza de dicho grupo, Únicamente se logró averiguar que se trataba de una base de Schiff sin identificarla con exactitud (15).

Fue a mediados de los años setenta en que se mostró que el grupo bloqueador involucrado era la glucosa (o un producto de ella), la cual se une por un proceso no enzimático a la hemoglobina originando una modificación postraducciona! de la misma (16, 17, 19, 20, 73). Originalmente, a esta reacción se le dió el nombre de glucosilación no enzimática de la hemoglobina, el cual fue corregido posteriormente por la IUPAC, recomendando el término glicación (137).

Estudiando el mecanismo de la reacción se descubrió que el grupo aldehído de la glucosa reacciona con el amino libre de la hemoglobina y forma una base de Schiff la cual experimenta un rearrreglo intramolecular, conocido como rearrreglo de Amadori, lo que origina una cetoamina más estable (19, 68, 37).

El mecanismo general propuesto para la glicatación no enzimática de las proteínas es el siguiente:

En el caso de la hemoglobina, esta reacción se lleva a cabo "in vivo" y la cantidad de hemoglobina glicatada se relaciona con la glucosa libre disponible y, por lo tanto, los niveles están elevados en pacientes con diabetes mellitus (19, 23, 37, 58).

Aunque este tipo de reacción se descubrió inicialmente en la hemoglobina, la glicatación no enzimática de proteínas no es específica de ella, puesto que también se ha demostrado que ocurre en otro tipo de proteínas como la colágena (22), la albúmina (23, 42), las proteínas del cristalino (23, 56), la tubulina (72) y las proteínas de la membrana plasmática del eritrocito (24, 44).

También se ha estudiado el fenómeno de glicación en experimentos "in vitro" con proteínas que, por su distribución tisular en el organismo, reaccionan fácilmente "in vivo" con la glucosa libre. Day y col. (1979) fueron los primeros en demostrar que la albúmina sérica humana y otras proteínas del suero, son glicatadas "in vitro" de manera no enzimática después de su incubación con glucosa (23, 58, 42). Además, en experimentos "in vivo" descubrieron que los niveles de albúmina glicatada están elevados en pacientes diabéticos mal controlados (23, 58).

Se ha sugerido que durante la hiperglucemia ocurre glicación de proteínas "in vivo" y que las alteraciones en sus propiedades físicas y bioquímicas pueden contribuir a las complicaciones progresivas y crónicas de la diabetes (20, 21, 25, 33, 43). Sin embargo, en la actualidad aún no se han logrado demostrar en forma categórica la existencia de correlaciones directas entre la

glicación de proteínas y la fisiopatología de la diabetes. Por ejemplo, se sabe que la vida media de los eritrocitos de pacientes diabéticos es más corta y presentan aumento de la rigidez membranar. Así mismo, se ha observado que las proteínas de la membrana están glicadas (24, 44) pero se necesita identificarlas y demostrar que su modificación es la causa de la alteración que presenta el eritrocito.

2. CALMODULINA

La calmodulina es una proteína considerada como la principal aceptora intracelular de iones calcio y mediadora de numerosas funciones celulares calcio-dependientes. Los principales procesos en los que interviene esta proteína son (67, 53):

- a) Metabolismo de los nucleótidos cíclicos a través de la activación de la fosfodiesterasa y la adenilciclasa.
- b) Fosforilación de proteínas de membranas citoplasmáticas.
- c) Ensamblaje y desensamblaje de microtúbulos
- d) Metabolismo de glucógeno, a través de la activación de la fosforilcinas
- e) Flujo de calcio, ya sea activando a la ATPasa (Ca - Mg), interviniendo directamente en el transporte de calcio o auxiliando a la bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$.
- f) Secreción intestinal de iones
- g) Liberación de neurotransmisores.
- h) Activación de la cinasa de cadena ligera de la miosina del músculo esquelético y el músculo liso.

1) Activación de otros sistemas enzimáticos como la NAD-cinasa, la triptofano 5-monooxigenasa y la fosfolipasa A2.

La calmodulina fue descubierta por W.Y.Cheung en 1970 en el cerebro de bovino (77). Posteriormente varios investigadores la aislaron y purificaron a partir de diversos tejidos de vertebrados según se observa en la tabla I (50, 86, 92, 127). Se le ha detectado en casi todas las células eucarióticas estudiadas, así como en varias especies de vertebrados incluyendo los peces, los reptiles y los anfibios (91, 92, 126, 127, 128). También se le ha aislado de varios invertebrados como lombriz de tierra, la anémona de mar, el pulpo (91, 92). En la tabla II se resumen los resultados obtenidos de esos estudios (127).

A nivel subcelular, la calmodulina está distribuida entre las fracciones particuladas y solubles (92, 127). En 1974, Smoake y colaboradores (92), descubrieron que el 90 % de la calmodulina demostrable en la sangre, se localiza en los eritrocitos y el 10 % en las plaquetas, aunque también se le ha encontrado en los leucocitos polimorfonucleares (93).

Es importante mencionar que el análisis secuencial de los aminoácidos de la calmodulina obtenida de diferentes fuentes demostró que se trata de una proteína con muy escasa variación a lo largo de la escala filogenética.

2.1.-ESTRUCTURA DE LA CALMODULINA

La secuencia peptídica de la calmodulina se divide en cuatro segmentos estructuralmente relacionados entre sí, conocidos como

TABLA I.-Niveles de calmodulina en tejidos vertebrados.

<u>Tejido*</u>	<u>Contenido**</u> (mg/kg)	<u>Concentración</u> <u>Relativa(%)***</u>	<u>% Total</u> <u>Prot.</u>
a)Cerebro	500	100	0.5
b)Testículo	450	100	0.15
-Cabeza de espermatozoide	--	--	12
c)Músculo			
-Útero	240	--	0.4
-Aorta	150	--	0.2
-Estómago(aves)	410	--	--
-Corazón	40	10	--
-Esquelético	38	7	--
d)Hígado	80	20	0.1
e)Riñón	90	15	0.24
-Médula	170	--	--
f)Páncreas	90	--	0.05
-Islote de Langerhans	400	--	--
g)Tiroides	30	--	0.02
h)Médula adrenal	110	30	--
i)Pulmónes	140	25	--
j)Bazo	80	14	--
k)Próstata	106	20	--
l)Timo	--	43	--
m)Médula osea	--	13	--
n)Eritrocitos	120	28	--
o)Plaquetas	--	320	--
p)Placenta	--	--	--
r)Epidermis	--	--	0.4

* Incluye tejidos de humano, rata, conejo, pollo, tortuga, rana, buey, carnero y ratones.

** Se basa en el rendimiento de calmodulina purificada de esos tejidos, corregido por el porcentaje de recuperación.

*** Es expresado como porcentaje de la actividad específica de extractos de cerebro (unidades/mg).

·TABLA II. Niveles de calmodulina en procariotes, hongos, plantas e invertebrados.

<u>Origen</u>	<u>Calmodulina detectada</u>	<u>Calmodulina (%Prot. total)</u>	<u>Rendimiento (mg/kg)</u>
I.-Procariotes			
-E.coli.	No detectada(ND)	--	--
-S.tiphimurium	ND	--	--
II.-Eucariotes			
a) Hongos			
1) Mohos (B.emersonii)	+	--	--
2) Neurospora crassa	+	--	--
b) Levaduras			
1) Saccharomyces cerevisiae	ND	--	--
2) Basidiomicetos			
-Rusulla sp.	+	--	20-50
-Agaricus bisporus	+	--	--
3) Mohos de limo			
-Physarum polycephalum	+	--	--
-Dictyostelium discidum	+	0.05	6
III.-Protozoarios			
a) Amoeba proteus	+	--	--
b) Paramecium tetraurelia	+	--	50-75

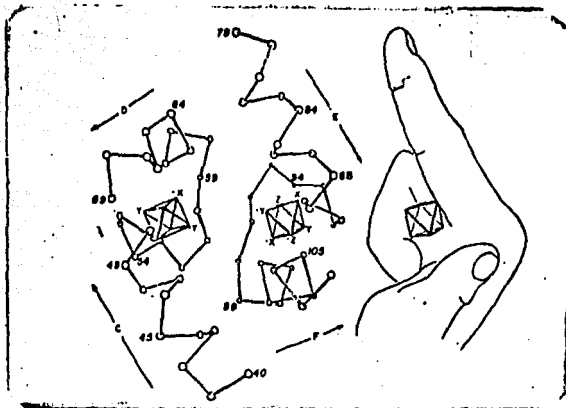
c)Tetrahymena pyriformis +	1.0	15-20
IV.-Plantas		
a)Chlamidomonas rein-		
hardtii +	--	--
b)Semillas de cacahuete +	0.12	7
c)Semillas de frijol +	--	--
d)Hojas de espinaca +	0.6	8
e)Cebada +	--	20-50
V.-Invertebrados		
a)Esponjas +	--	--
b)Renacuajo +	0.03	6
c)Lombriz de tierra +	0.15	17
d)Pulpo +	--	2
e)Insectos +	--	--

DOMINIOS. Cada uno de los dominios está formado por las porciones de la cadena que comprenden el siguiente número de aminoácidos :

Dominio I : 12-39
 Dominio II : 48-75
 Dominio III : 85-112
 Dominio IV : 121-148

Estructuralmente, cada dominio está compuesto por dos regiones alfa-helicoidales en medio de las cuales se encuentra un asa que es el sitio de alta afinidad que enlaza el calcio iónico (50, 52, 53, 63, 97). En el siguiente esquema de la calmodulina se ilustra lo antes dicho (los dominios están indicados con números romanos) :

MANO EF



Se dice que son de estructura "mano EF" porque tienen similitud con nuestra mano cuando los dedos meñique, anular y medio están doblados hacia adentro de la misma, simbolizando así a la alfa-hélice que conforma el asa del dominio. Los dedos índice y pulgar representan a las cadenas simbolizadas por los vectores E y F respectivamente.

La estructura primaria de la calmodulina posee una homología interna sobre todo en los cuatro dominios enlazantes de calcio y se observa cuando el primer dominio se alinea con el tercero y el segundo con el cuarto (52, 53, 67, 97).

Finalmente, es importante mencionar que al contrario de otras proteínas del grupo "mano EF", la calmodulina es una proteína ubicua que ha logrado conservar su estructura a lo largo de la evolución lo cual se refleja en sus múltiples funciones (49, 50, 52, 53).

2.2.-PROPIEDADES DE LA CALMODULINA

Tanto en ausencia como en presencia de calcio iónico, la calmodulina existe como un monómero termolabile de 16700 daltones de peso molecular y cuyo coeficiente de sedimentación es de 18-20 S (50, 52).

Es una proteína muy ácida, en la que aproximadamente el 30 % de sus aminoácidos son aspartato y glutamato y que no contiene cisteína, hidroxiprolina ni triptofano (49, 50, 52). En la tabla III se presenta la composición de aminoácidos de la calmodulina obtenida de varias fuentes. Su punto isoeléctrico es de 4.4, lo que explica su lenta migración en gel.

Posee cuatro sitios de alta afinidad de enlace de calcio por molécula ($K_d = 0.00001-0.000001$ M). Una vez ligada al calcio, la calmodulina experimenta una transición conformacional específica la cual afecta su contenido de alfa-hélice, la que aumenta hasta el 54 % y altera el microambiente de varios residuos de aminoácidos. Esto provoca que también se modifiquen sus propiedades hidrodinámicas y se formen dominios hidrofóbicos de interacción que son expuestos por la molécula.

En ausencia de calcio iónico, en esta proteína predomina la estructura secundaria. El 28-45 % de sus cadenas presentan una conformación alfa-helicoidal y el 15-20 % lo hacen en forma de hojas beta plegadas (49, 52, 63).

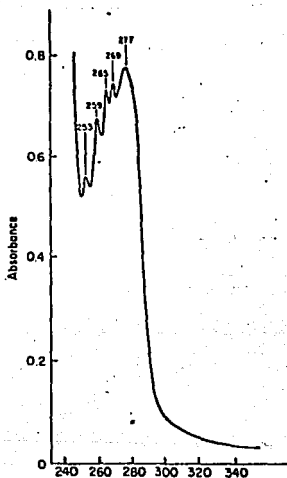
Su coeficiente de extinción (E) es de 2.1 (50, 52, 53, 54, 63, 129).

TABLA III.-Composición de aminoácidos (residuos/mol)

<u>Aminoácido</u>	<u>Calmodulina testículo rata</u>	<u>Calmodulina Corazón ovino</u>	<u>Calmodulina cerebro-bovino</u>
Acido aspartico	22	25	24
Treonina	11	12	12
Serina	4	3	5
Acido glutámico	28	30	29
Prolina	2	2	2
Glicina	12	12	12
Alanina	11	12	12
Cisteína	--	--	--
Valina	8	7	8
Metionina	9	9	10
Isoleucina	9	8	8
Leucina	10	10	10
Tirosina	2	2	2
Fenilalanina	8	9	8
Triptofano	--	--	--
Histidina	1	1	1
Lisina	7	9	8
Lisina trimetilada	1	1	1
Arginina	6	6	7

Por su composición de aminoácidos, la calmodulina exhibe un espectro de absorción en u.v. característico, en donde se observa un máximo a 276 nm y una meseta a 282 nm que corresponde al espectro de la tirosina. Los picos múltiples a 253, 259.5 y 260.5 son característicos de la banda de absorción de la estructura

fina de la fenilalanina (50, 52, 93). A continuación se muestra el espectro de absorción de la calmodulina obtenida por Yung Pin Liu y Way Yiu Cheung a partir de cerebro de bovino (136).



2.3. MECANISMO MOLECULAR DE LAS ACCIONES ENZIMATICAS MEDIADAS POR CALMODULINA.

La calmodulina por si misma no es activa . Su forma activa la constituye una estructura más helicoidal que resulta de la unión con el calcio, por lo que la forma activa es el complejo calmodulina-Ca. Conforme la molécula liga calcio, adopta una conformación más helicoidal hasta llegar a la forma más activa, la cual enlaza reversiblemente a la apoenzima correspondiente, lo que resulta en la formación de una holoenzima activa (52, 59, 136). Esquemáticamente tenemos:



E=Apoenzima

*=Nueva configuración.

Mediante un mecanismo similar al anterior, la calmodulina estimula a las siguientes enzimas : fosfodiesterasa de cerebro de bovino, adenilato ciclasa de cerebro, ATPasa-(Ca +Mg) de eritrocito, cinasa de cadena ligera de la miosina y la NAD cinasa. También regula a la fosfolipasa A2, la ATPasa-Ca sinaptosomal y fosforilasa cinasa; interviene en la fosforilación de la membrana del eritrocito y en el retículo endoplásmico y el desensamble de microtúbulos (50, 52, 67).

2.4.-RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Se han hecho varios intentos para relacionar la estructura y la función de la calmodulina. Uno de ellos consistió en la incorporación de un grupo químico sobre la arginina, la histidina y la tirosina sin afectar la capacidad de la proteína para estimular la fosfodiesterasa (61, 62, 63, 66, 116, 118). En contraste, la modificación de uno o más residuos de metionina ó lisina o el bloqueo de varios grupos carboxilo provocó la pérdida parcial o completa de su actividad (97, 116, 117).

Por otra parte, los estudios sobre la actividad de la interacción de fragmentos peptídicos de calmodulina obtenidos por la digestión con tripsina, indican que la actividad biológica de la hormona depende en alto grado de la integridad en la secuencia de aminoácidos de diferentes regiones de la molécula. Los péptidos involucrados en tal actividad son: El péptido I (residuos 1-77), el péptido II (residuos 78-149) y el péptido III (residuos 1-106). Individualmente ninguno activó a la fosfodiesterasa (118). Además existen resultados que indican que la eliminación de los fragmentos 71-106 de la cadena polipeptídica, anulan toda su actividad biológica (52).

Finalmente, como resultado de una modificación específica y altamente conservada de la molécula, la calmodulina experimenta una reacción postraduccionaI de metilación sobre la lisina en la posición 115, lo cual parece ser un prerrequisito para expresar alguna de sus funciones (62, 63, 97, 112, 120).

Otra modificación postraduccionaI de la proteína es la metilación reversible de los grupos carboxilo la cual ha sido propuesta como un regulador potencial de su acción (122).

3. -PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en los conceptos antes mencionados, se considera de importancia estudiar la regulación de la actividad de la calmodulina en condiciones normales y comprobar si su actividad se altera en procesos patológicos ya que, como principal aceptor de calcio y mediadora de numerosas funciones calcio-dependientes de la célula, la pérdida parcial o total de sus propiedades tendría múltiples efectos negativos en los procesos celulares en que participa.

En la diabetes provocada experimentalmente en ratas se observó que la actividad de la calmodulina, determinada indirectamente por la estimulación de la fosfodiesterasa, alcanzó solamente el 50 % del valor obtenido en animales normales (131). La posibilidad de que algunas alteraciones en la calmodulina hubieran sido la causa de esta menor estimulación no fue considerada por los autores, aunque la calmodulina posee siete grupos amino libres, además del grupo amino inicial, que la harían susceptible de glicarse en presencia de la alta concentración de glucosa inducida experimentalmente y de que existen evidencias de la pérdida parcial o total de la actividad de la calmodulina por modificaciones postraduccionales, ya sea en uno o más de sus residuos de metionina o lisina o el bloqueo de uno o varios de sus grupos carboxilo (97, 116, 117).

4.-HIPOTESIS

Si se incuba "in vitro" calmodulina con concentraciones de glucosa similares a las del estado diabético, ésta puede glicarse en forma no enzimática.

5.-OBJETIVO FINAL

Determinar si la calmodulina puede ser glicada "in vitro" por medios no enzimáticos.

Objetivos Intermedios

a) Extraer, aislar y purificar la calmodulina a partir de testículo de toro

b) Estudiar las condiciones experimentales adecuadas para que la glicación ocurra "in vitro".

c) Cuantificar por diferentes métodos la calmodulina glicada

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para la obtención y la purificación de la calmodulina se siguió un procedimiento basado en las técnicas de Dedman y col. (50), Gopalakrishna y Anderson (60) y Dedman y Kaetzel (64). El proceso global se resume en las siguientes etapas:

En el rastro local se obtuvieron testículos de toro a los que se les quitó la capa albúginea, se cortaron en trozos pequeños, se colocaron en bolsas de plástico de cierre hermético y se almacenaron en el congelador a temperaturas de 0 y -4 °C hasta su uso.

En una licuadora se homogenizaron 250 g. de testículo de toro con 500 ml. de solución amortiguadora (tris 0.04 M, E.D.T.A. 5 mM a pH=7.4) en períodos de 15 segundos, de tres a cinco veces. El homogenizado resultante fue centrifugado a 10000 r.p.m. (11000 g) durante 15 min. y se recuperó el sobrenadante.

Alicuotas de 200 ml. del sobrenadante se vertieron en un matríz erlenmeyer de 1 litro, el cual se colocó dentro de un horno de microondas que fue llevado a una temperatura de 90 °C durante 200 seg. Inmediatamente después el matríz fue retirado y sumergido en una mezcla de 2-propanol+hielo seco, agitándolo suavemente en forma rotatoria hasta que la temperatura del sobrenadante bajara hasta los 5 °C. La mezcla resultante se centrifugó a 10000 r.p.m. (11000 g) durante 30 min. El sobrenadante se dializó toda la noche en 18 litros de solución amortiguadora. La solución dializada fue centrifugada a 10000 r.p.m. durante 15 min., se extrajo el sobrenadante y se le agregó CaCl en cantidad suficiente para tener una solución 2 mM.

Purificación de Calmodulina: El sobrenadante se aplicó sobre una columna de fenilsepharosa y se eluyó con aproximadamente 500 ml. de solución de "Alta salinidad" (NaCl 0.5 M, Tris 0.04 M, CaCl₂ 2 mM, pH=7.4). Posteriormente se eluyó con 500 ml. de amortiguador de "Baja salinidad" (NaCl 0.075 M, Tris 0.04 M, CaCl₂ 2 mM, pH=7.4). Finalmente se eluye con una solución de NaCl 0.075 M, Tris 0.04 M, E.D.T.A. 4 mM, pH=7.4, y se colectaron 65 fracciones de 50 gotas y a cada una se le determinó la densidad óptica a 280 nm. Se reunieron las fracciones 40-60 con densidad óptica mayor de 0.1 y se dializaron en 4 litros de solución amortiguadora de boratos pH=8.4 (con azida de sodio 0.02 %) durante toda la noche. Se tomó una alícuota y se obtuvo el espectro de absorción en u.v. de la proteína extraída. La solución de calmodulina, libre de calcio, fue almacenada en el refrigerador hasta su uso.

La concentración de proteína se calculó en base al coeficiente de extinción (E) de la calmodulina y a la densidad óptica a 280 nm. de la solución:

$$[\text{GLUCOSA}] = D.O.280 \text{ nm.} / E$$

7.2.-GLICACION "IN VITRO" DE LA CALMODULINA

Según los esquemas de incubación seguidos por Day (23, 58) y Ney (127) se diseñó el siguiente esquema para la glicación de la calmodulina:

En solución salina de Dulbecco (D.P.D.S.)% a 37°C, se incubó 1 mg/ml de calmodulina con las siguientes concentraciones de glucosa: 7 mM, 10 mM y 20 mM tanto en presencia de Ca 1 mM como en su ausencia utilizando E.O.T.A.%% 1 mM. De cada mezcla de incubación se tomaron alícuotas a las 24, 72 y 120 horas respectivamente, y se detectó y cuantificó la proteína glicatada por espectroscopía en ultravioleta y por el método colorimétrico (Ver anexo 2).

El experimento se realizó con el objeto de analizar la influencia de la concentración de glucosa en la glicación de la calmodulina. Como el proceso es lento y depende en gran parte del tiempo de contacto de los reactivos, se evaluó hasta un máximo.

% D.P.D.S.: Sal 1 : 8g NaCl, 0.2g KCl, 0.2g KH₂PO₄, 1.15g NaHPO₄. Dissolver en 800 ml de agua destilada; Sal 2 : 0.0147g CaCl₂ en 100 ml de agua destilada; Sal 3 : 0.1g MgCl₂.6H₂O en 100 ml de agua destilada. Se mezclan las tres sales y se ajusta el pH=7.4; se disolvieron 5 mg de sulfato de estreptomicina y 3.8 mg de penicilina g-potásica por cada 100 ml de solución. La solución se esterilizó por filtración millipore y se almacenó en el refrigerador hasta su uso.

%% E.O.T.A.: Acido etilenglicol-bis-(B-amino-etileter)-N,N'-tetracético.

de 120 horas por considerarlas suficientes para determinar el tiempo mínimo necesario para que la reacción se lleve a cabo "in vitro" de manera óptima. También se trató de valorar el efecto del calcio iónico sobre la glicación de la calmodulina.

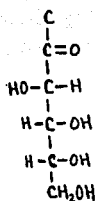
7.3.-ELIMINACION DE LA GLUCOSA LIBRE DE LAS MEZCLAS INCUBADAS

Una columna de sephadex G-25 se cargó con 2.5-3.0 ml de la mezcla incubada y se eluyó con 3.5 ml. de solución amortiguadora de Dulbecco. Se colectaron fracciones de 30 gotas y se les determinó su densidad óptica a 280 nm. Se recolectaron las fracciones con lecturas mayores de 0.1 y se les corrió un espectro en la región ultravioleta.

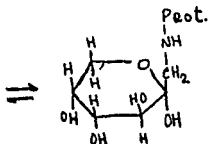
Por este método se separa la glucosa de la proteína glicatada debido a la diferencia en sus pesos moleculares.

7.4.-DETECCION Y CUANTIFICACION DE LA PROTEINA GLICATADA (SEGUN FLUKIGER Y WINTERHALTER (37)).

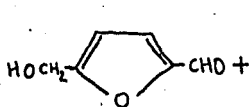
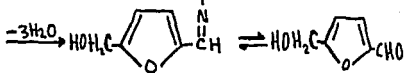
El método se basa en la detección colorimétrica del enlace cetoamina presente en la proteína glicatada. Consiste en hidrolizar el enlace cetoamina de los sitios glicatados de la proteína con ácido oxálico para liberar 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). El 5-HMF se cuantifica espectrofotométricamente haciendo reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para producir un compuesto colorido del 5-HF que posee un valor de absorción máxima a 443 nm. Las reacciones que ocurren son las siguientes:



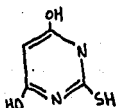
Enlace ceto-
amina



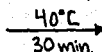
Proteína
Glicada



5-HMF



Acido tiobarbitúrico



Aducto
colorido
de 5-HMF

El procedimiento que se siguió se basó en la técnica de Pecoraro y col. (39).

Previa eliminación de la glucosa libre, 1 ml. de la mezcla incubada fue hidrolizado con 1 ml de ácido oxálico 1 M en baño de agua hirviendo durante 5 horas.

A 0.75 ml. del hidrolizado anterior se le agregó 0.25 ml. de ácido tricloroacético al 40 %, se agitó con vortex y se centrifugó a 3000 r.p.m. (1000 g). A 0.75 ml. del sobrenadante se le agregó 0.25 ml. de ácido tiobarbitúrico 0.05 M. y se le dejó reaccionar durante 30 min. en baño de agua a 40 C. Posteriormente se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min. e inmediatamente

se determinó la densidad óptica de cada muestra a 443 nm. A los valores obtenidos se les restó el del blanco de reactivos y los resultados son presentados como nmol de 5-HMF por ml. de solución ensayada obtenidos por extrapolación de una curva estándar de 5-HMF que se elaboró al mismo tiempo que los experimentos realizados por duplicado.

7.5-CURVA ESTANDAR DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL (5-HMF)

Se preparó una solución patrón de 5-HMF (P.M.=126 g/mol) 1 mM con agua desionizada y a partir de ella se realizaron diluciones por duplicado, usando como mezcla diluyente 3 partes de una solución 1:1 de DPBS-ácido oxálico 1 M más una parte de ácido tricloroacético al 40 %.

De cada dilución se midieron 0.75 ml. y se procesaron igual que los problemas, obviando la etapa de hidrólisis.

El análisis de los resultados se realizó mediante el estudio de las gráficas trazadas con los resultados de cada experimento.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente siguiendo el modelo lineal general:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \epsilon_{k(ij)}$$

Luego se aplicó un análisis de varianza de una sola vía y un análisis de contraste ortogonal cuya fórmula general es:

$$SCQ = Y/ni \quad C_i$$

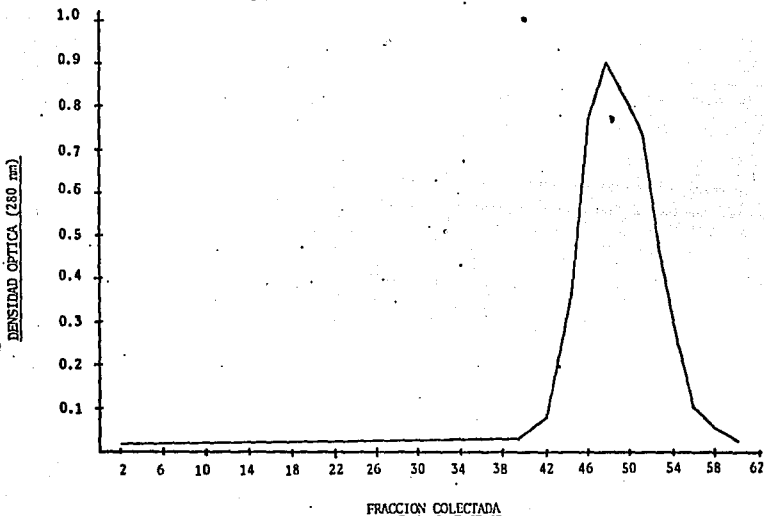
Sólo se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que $p < 0.05$.

7.- RESULTADOS

7.1.- OBTENCION DE CALMODULINA.

La siguiente gráfica nos muestra los resultados obtenidos al medir la densidad óptica a 280 nm. de cada fracción colectada durante la elución final :

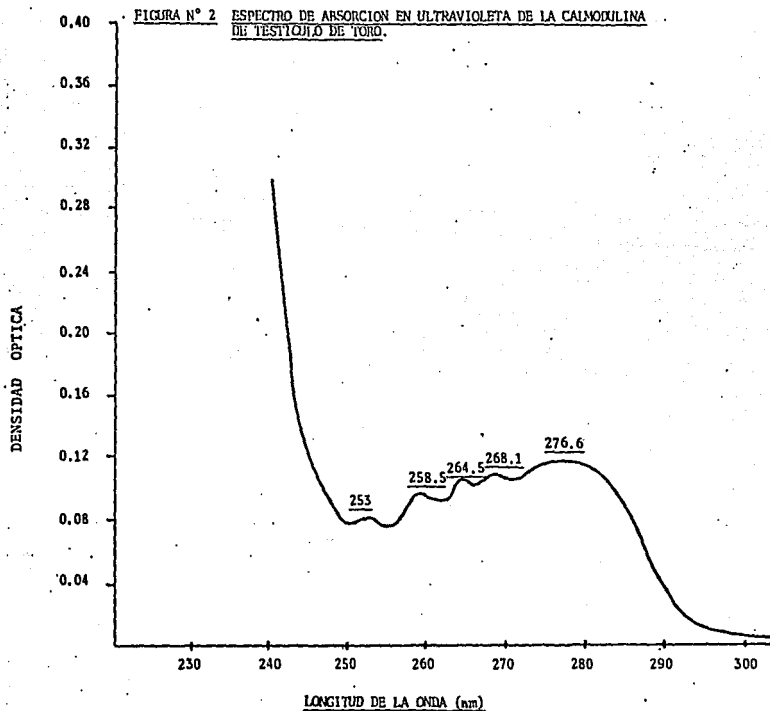
FIGURA N° 1 PERFIL DE ELUCION DE LA CALMODULINA



Como se observa en la figura 1, las fracciones iniciales poseen densidad óptica menor de 0.1 A partir de la fracción 40 se inicia un aumento notable de la absorbencia de cada fracción hasta llegar a un máximo de 0.9 i posteriormente hay una disminución de

la densidad óptica hasta llegar a los valores iniciales partir de la fracción 60.

La figura 2 muestra el espectro de absorción en u.v. de la protefna aislada :



Como se observa, el espectro de absorción de la proteína aislada presenta un pico de absorción máxima a 274.6 nm y una serie de picos múltiples a 253 nm, 258.5 nm y 260.1 nm que coinciden con los observados en los espectros de absorción de la calmodulina publicados por Watterson (84), Klee (49) y Liu y Cheung (136).

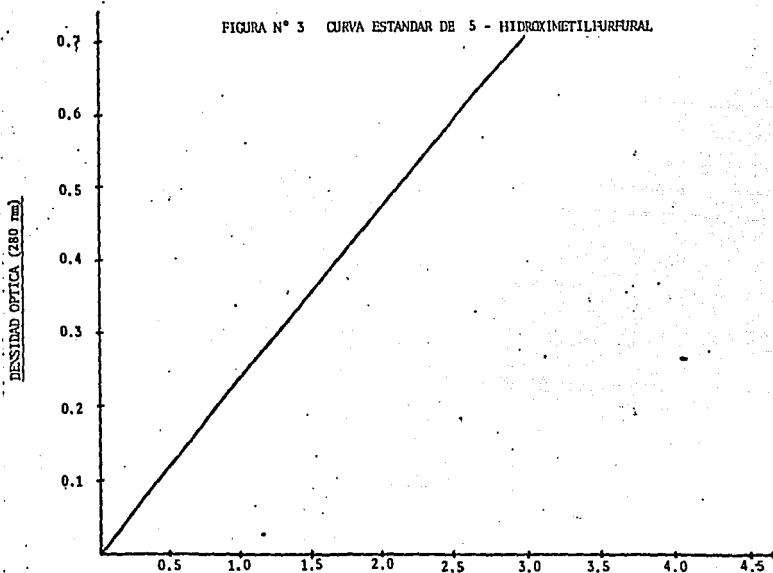
La densidad óptica a 280 nm. de la solución de proteína fue de 0.534. La concentración de calmodulina calculada es la siguiente:

$$[\text{CALMODULINA}] = 0.534 / 0.21 = 2.542 \text{ mg./ml.}$$

El rendimiento total fue de 45.756 mg. de calmodulina aislada a partir de 250 g. de testículo de toro (183 mg./ Kg.) que en términos porcentuales fue del 0.018 % .

7.2.-CURVA ESTANDAR DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL (5-HMF)

En la figura 3 se muestra la recta estándar de 5-HMF que se trazó con los puntos determinados por la concentración y la densidad óptica de cada dilución.



Según se observa en la figura, los puntos se ubican dentro de la recta trazada, lo que indica la linealidad y proporcionalidad adecuada de los parámetros gráficos.

7.3.-GLICACION DE LA CALMODULINA

8.3.1.-Detección y cuantificación de la proteína glicatada por el método colorimétrico.

En la tabla I se muestran los resultados obtenidos de la glicación de la calmodulina con glucosa 7 mM en presencia de Ca 1 mM durante diferente tiempo de incubación. El promedio final se expresa como ug de 5-HMF por ml. de mezcla de incubación.

TABLA No. 1 : INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LA GLICACION DE LA CALMODULINA CON GLUCOSA 7 mM y Ca.

<u>CALMODULINA</u> mg/ml	<u>GLUCOSA</u> mg/ml	mM	<u>TIEMPO DE</u> <u>INCUBACION</u> Hrs	<u>X HMF</u> ug/ml
I	1.26	7	24	0.239 [±] 0.017
I	1.26	7	72	0.356 [±] 0.033
I	1.26	7	120	0.371 [±] 0.0002

Como se puede observar, al aumentar el tiempo de incubación de las mezclas, la cantidad de 5-HMF que se detectó es mayor.

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos de la glicación de la calmodulina al incubarla con concentraciones constantes de glucosa 7 mM en un medio sin Ca usando EOTA 1 mM.

Los resultados se expresan en ug de 5-HMF por ml de mezcla de incubación.

TABLA No II : INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LA GLICACION DE LA CALMODULINA CON GLUCOSA 7 mM EN AUSENCIA DE Ca.

<u>CALMODULINA</u>	<u>GLUCOSA</u>	<u>TIEMPO DE</u>		<u>X HMF</u>
mg/ml	mg/ml	mM	<u>INCUBACION</u> Hrs	ug/ml
I	1.26	7	24	0.130 [±] 0.003
I	1.26	7	72	0.145 [±] 0.0001
I	1.26	7	120	0.138 [±] 0.008

En base a los datos mostrados en la tabla, la mayor cantidad de 5-HMF se detectó en la mezcla incubada durante 72 hrs. Los resultados de las tablas I y II se presentan en la figura 4.

FIGURA N° 4 GLICACION DE LA CALMODULINA
CON GLUCOSA 7 mM.

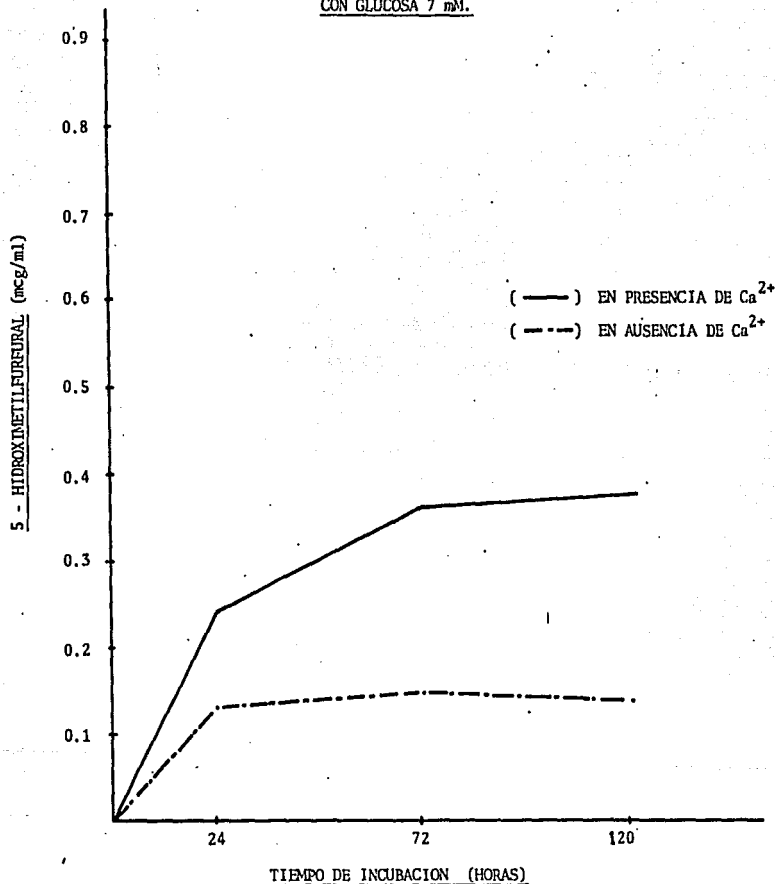


Figura No. 4 : ug/ml de 5-HMF a partir de las mezclas de calmodulina incubadas a 37 C y pH 7.4 durante diferentes tiempos en presencia de Ca 1 mM (—) y en su ausencia usando EGTA (- - -)

La tabla III nos muestra los ug de 5-HMF cuantificados en las mezclas de calmodulina con glucosa 10 mM incubadas en presencia de Ca 1 mM durante diferentes tiempos. El promedio se expresa como ug de 5-HMF por ml de mezcla de incubación.

TABLA No III :INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LA GLICACION DE LA CALMODULINA CON GLUCOSA 10 mM EN PRESENCIA DE Ca

<u>CALMODULINA</u> mg/ml	<u>GLUCOSA</u> mg/ml mM	<u>TIEMPO DE</u> <u>INCUBACION</u> Hrs	<u>X HMF</u> ug/ml
1.25	1,8 10	24	0.233 [±] 0.041
1.25	1,8 10	72	0.348 [±] 0.008
1.25	1,8 10	120	0.724 [±] 0.024

Según se puede observar, la detección de 5-HMF es proporcional con el tiempo de incubación de la mezcla.

La tabla IV muestra los resultados obtenidos de la glicación de la calmodulina con glucosa 10 mM en un medio sin Ca usando EGTA 1 mM, durante diferentes tiempos de incubación. El promedio final es expresado como ug de 5-HMF por ml de mezcla de incubación ensayada.

TABLA No IV : INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION
EN LA GLICACION DE LA CALMODULINA
CON GLUCOSA 10 mM EN AUSENCIA DE Ca.

<u>CALMODULINA</u>	<u>GLUCOSA</u>		<u>TIEMPO DE INCUBACION</u>	<u>X HMF</u>
mg/ml	mg/ml	mM	HRS.	ug/ml
1.25	1.8	10	24	0.334 [±] 0.033
1.25	1.8	10	72	0.304 [±] 0.0005
1.25	1.8	10	120	0.093 [±] 0.007

En este experimento, la máxima concentración de 5-HMF se observó a las 24 horas de incubación, la que disminuyó a las 72 horas, y alcanzó el mínimo a las 120 horas. Estos resultados, junto con los de la tabla III, se presentan en la figura 5.

FIGURA N° 5

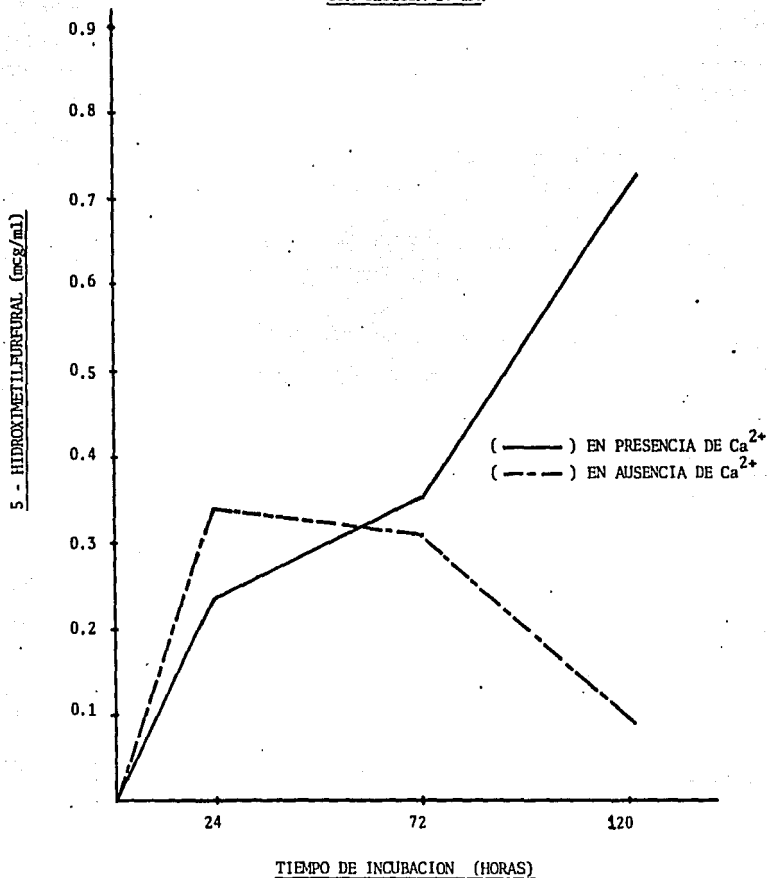
GLICACION DE LA CALMODULINA
CON GLUCOSA 10 mM.

Figura No. 5 : ug/ml de 5-HMF cuantificados a partir del procesamiento de las mezclas de calmodulina con glucosa 10 mM incubadas a 37° C y pH 7.4 a diferentes tiempos tanto en presencia de Ca 1 mM (—) como en su ausencia usando EDTA (- -).

La tabla No V muestra los resultados obtenidos de la glicación de la calmodulina al incubarla con concentraciones constantes de glucosa 20 mM en un medio con Ca 1mM durante diferente tiempo. El promedio final se expresa en términos de ug de 5-HMF por cada ml de mezcla incubada.

TABLA No V : INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LA GLICACION DE LA CALMODULINA CON GLUCOSA 20 mM EN PRESENCIA DE Ca.

<u>CALMODULINA</u>	<u>GLUCOSA</u>		<u>TIEMPO DE INCUBACION</u>	<u>X HMF</u>
mg/ml	mg/ml	mM	HRS.	ug/ml
1.25	3.6	20	24	0.465 [±] 0.008
1.25	3.6	20	72	0.355 [±] 0.032
1.25	3.6	20	120	0.850 [±] 0.050

Como se observa en los resultados, la concentración de 5-HMF aumenta con el tiempo de incubación a excepción de las 72 horas en donde se encontraron valores por debajo de los correspondientes a las 24 horas.

La tabla VI muestra los resultados obtenidos en la glicación de la calmodulina al incubarla con glucosa 20 mM en un medio sin Ca (usando EGTA 1 mM), durante diferentes tiempos.

TABLA No VI : INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LA GLICACION DE LA CALMODULINA CON GLUCOSA 20 mM EN AUSENCIA DE Ca.

<u>CALMODULINA</u> mg/ml	<u>GLUCOSA</u> mg/ml	mM	<u>TIEMPO DE INCUBACION</u> HRS.	<u>X HMF</u> ug/ml
1.25	3.6	20	24	0.404 [±] 0.0001
1.25	3.6	20	72	0.355 [±] 0.008
1.25	3.6	20	120	0.478 [±] 0.083

La mayor concentración de 5-HMF se obtuvo a las 120 horas y la mínima a las 72 horas de incubación.

En la figura 6 se presentan los resultados de los dos últimos experimentos.

FIGURA N° 6 GLICACION DE LA CALMODULINA

CON GLUCOSA 20 mM

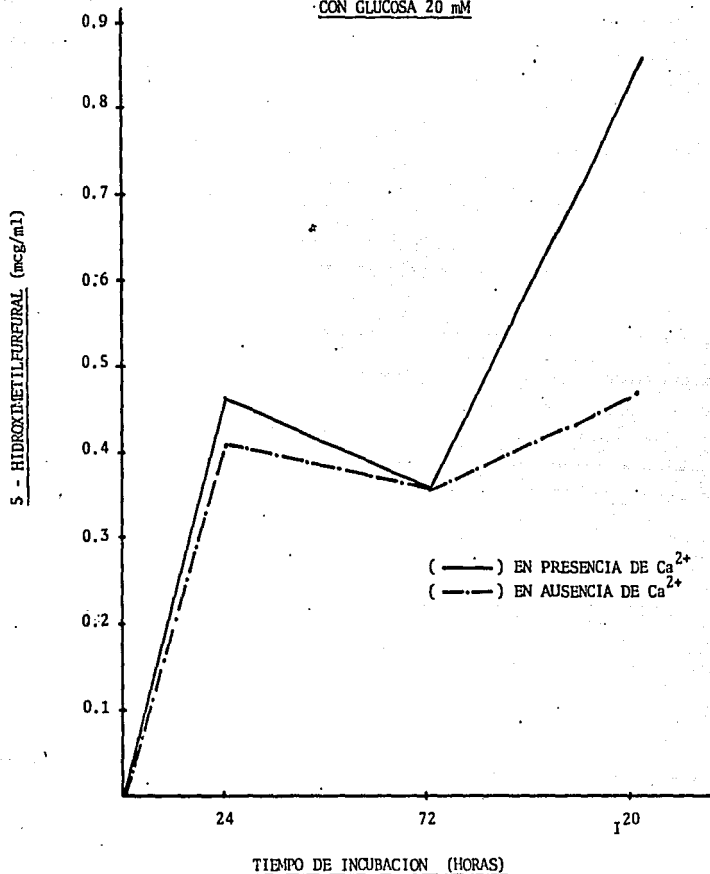


Figura No 6 : µg/ml de 5-HMF obtenidos del procesamiento de las mezclas de calmodulina con glucosa 20 mM incubadas a 37° C y pH 7.4 a diferentes tiempos tanto en presencia de Ca 1 mM (—) y en ausencia usando EDTA 1 mM (---).

La tabla VII agrupa los resultados mostrados en las tablas I, III y V que corresponden a los experimentos de glicación de la calmodulina con glucosa a diferentes concentraciones durante diferentes tiempos de incubación en presencia de Ca 1 mM.

TABLA No VII : INFLUENCIA DEL TIEMPO Y DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN LA GLICACION DE LA CALMODULINA EN PRESENCIA DE Ca.

CALMODULINA	GLUCOSA		TIEMPO DE INCUBACION (HRS)		
	mg/ml	mM	24 X HMF ug/ml	72 X HMF ug/ml	120 X HMF ug/ml
1	1.26	7	0.239	0.356	0.371
1.25	1.8	10	0.232	0.348	0.724
1.25	3.6	20	0.465	0.355	0.850

Como se observa, a las 120 horas de incubación la cuantificación de 5-HMF es proporcional a la concentración de glucosa lo que no ocurre a las 24 y 72 hrs. La concentración de 5-HMF siempre es mayor cuando la calmodulina se incuba con glucosa 20 mM independientemente del tiempo de incubación.

En la figura 7 se presentan estos resultados.

FIGURA N° 7 GLICACION DE LA CALMODULINA
EN PRESENCIA DE Ca.

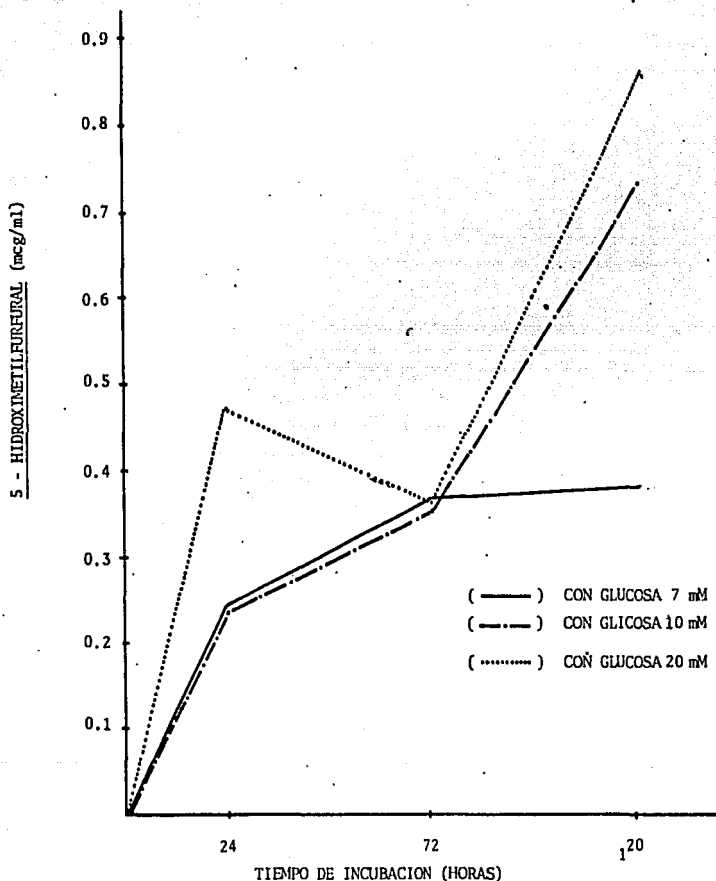


Figura No 7 : $\mu\text{g/ml}$ de 5-HMF cuantificados a partir de las mezclas de calmodulina con glucosa 7 mM (—), 10 mM (— · —) y 20 mM (·····), incubadas durante diferentes tiempos en presencia de Ca.

La tabla VIII agrupa los resultados mostrados en las tablas II, IV y VI donde se muestra la influencia de la concentración de glucosa y del tiempo de incubación sobre la glicación de la calmodulina cuando esta se realiza en un medio sin Ca .

TABLA No VIII : INFLUENCIA DEL TIEMPO Y DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN LA GLICACION DE LA -- CALMODULINA EN AUSENCIA DE Ca.

<u>CALMODULINA</u>	<u>GLUCOSA</u>		<u>TIEMPO DE INCUBACION (HRS)</u>		
			24	72	120
mg/ml	mg/ml	mM	X ⁻ HMF ug/ml	X ⁻ HMF ug/ml	X ⁻ HMF ug/ml
1	1.26	7	0.130	0.145	0.138
1.25	1.8	10	0.334	0.304	0.093
1.25	3.6	20	0.404	0.355	0.478

Como se observa en los resultados, a las 24 y 72 hrs. de incubación la cantidad de 5-HMF fué proporcional a la concentración de glucosa usada en la glicación de la calmodulina. A las 120 hrs. de incubación se detectó más 5-HMF con glucosa 7 mM que con glucosa 10 mM. Ahora bien, independientemente del tiempo de incubación, la detección de 5-HMF siempre es mayor cuando la calmodulina se incubó con glucosa 20 mM.

Estos resultados son presentados en la figura 8.

FIGURA N° 8 GLICACION DE LA CALMODULINA
EN AUSENCIA DE Ca.

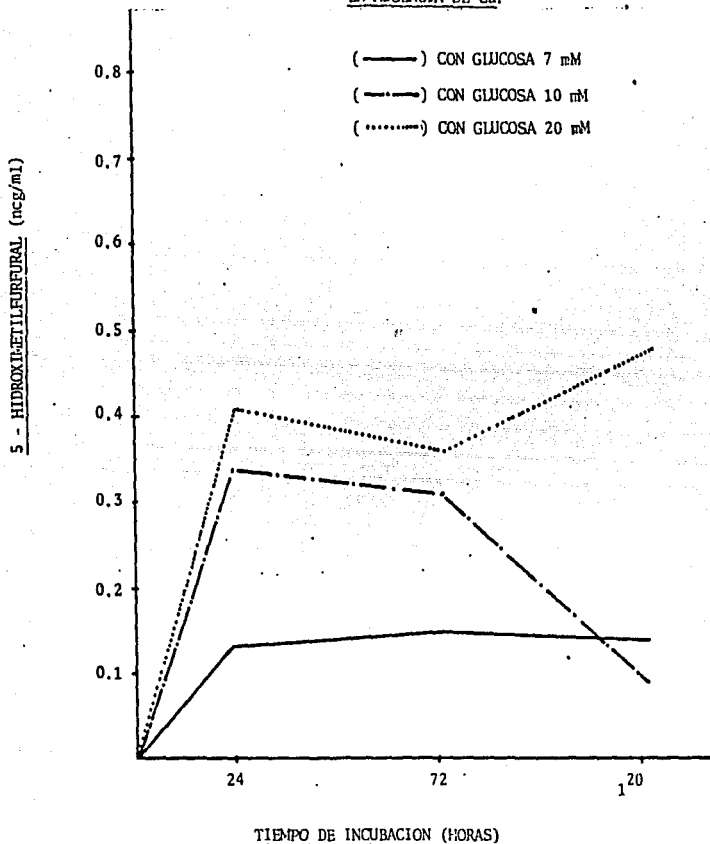


Figura No8: ug/ml de 5-HMF cuantificados a partir de las mezclas de incubación de calmodulina con glucosa 7 mM (——), 10 mM (- - -) y 20 mM (.....) incubadas durante diferentes tiempos de incubación en un medio carente de Ca usando E.O.T.A. 1 mM.

7.3.2.-Detección de la glicación de la calmodulina por espectroscopía.

En las figuras 9 a 13 se muestran los espectros de absorción en u.v. de la mezcla de calmodulina con glucosa a diferentes concentraciones (7, 10, y 20 mM) incubadas durante 120 hrs. y los efectos de la presencia o ausencia de calcio sobre la glicación.

FIGURA 9 : ESPECTROS DE ABSORCION DE CALMODULINA GLICATADA CON GLUCOSA 7 mM

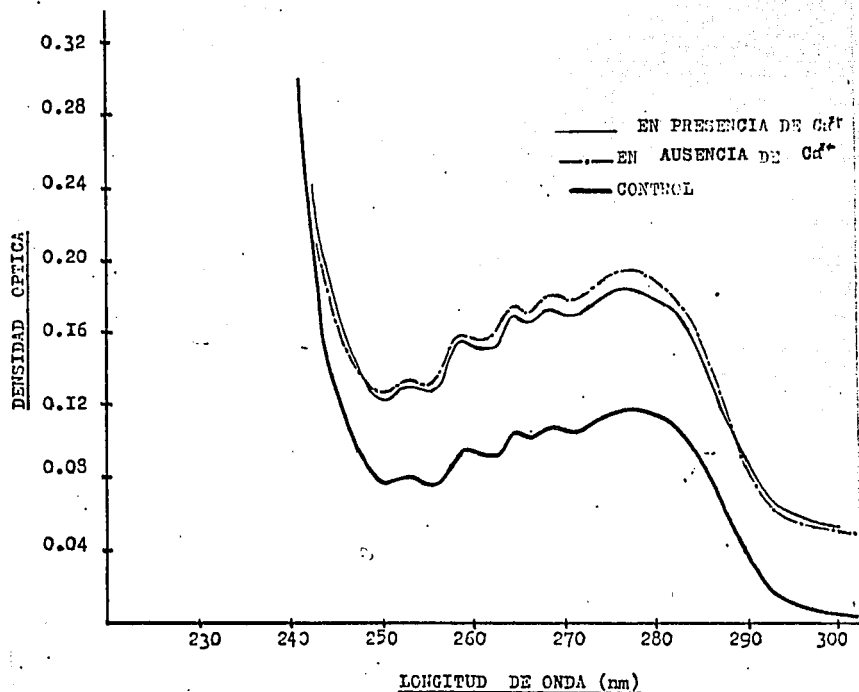


FIGURA No 9 : Espectros de absorción en u.v. de la calmodulina glicatada con glucosa 7 mM luego de 120 horas de incubación en presencia (—) y ausencia de Ca (---) comparados con el de la calmodulina pura (—).

Como se puede observar en la figura 9, los espectros de la calmodulina glicatada poseen el mismo patrón de absorción que el de la calmodulina pura. Los tres muestran los picos característicos de esta proteína, aunque no se pueden superponer con el de la calmodulina control.

FIGURA 10 : ESPECTROS DE ABSORCION
DE CALMODULINA GLICATADA
CON GLUCOSA 10 mM.

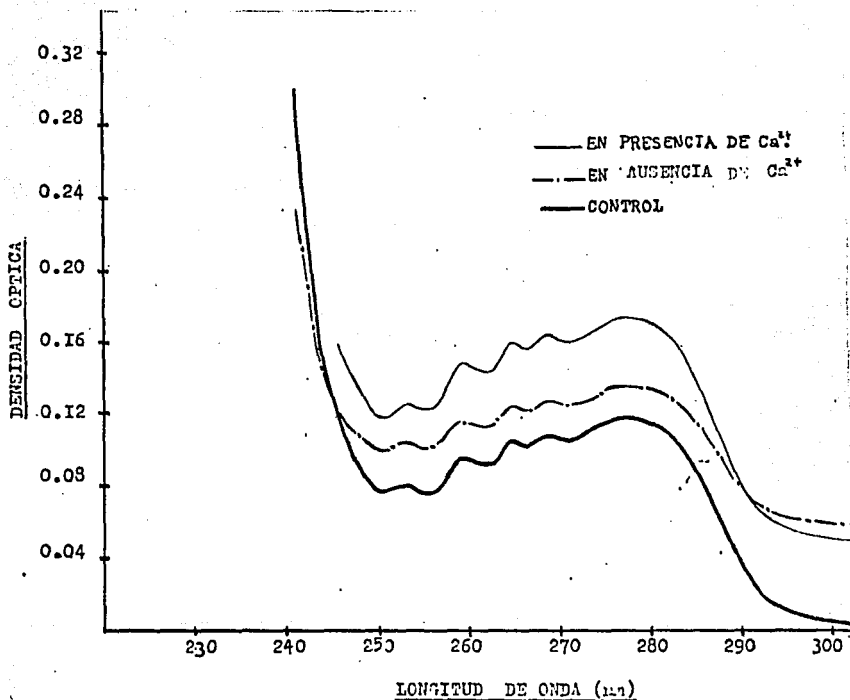


FIGURA No.10 : Espectros de absorción de la calmodulina glicatada luego de incubarla 120 hrs. con glucosa 10 mM, en presencia (—) y ausencia (---) de Ca comparados con el de la calmodulina pura (——).

Según se observa en la figura 10, el espectro de la calmodulina glicatada con glucosa 10 mM en ausencia de calcio es idéntico al de la calmodulina pura. En cambio el espectro de la calmodulina glicatada con glucosa 10 mM en presencia de Ca²⁺ varía ligeramente en la región de los 250 y 260 nm. En ambos casos, los espectros de la calmodulina glicatada no se pueden superponer con el control.

FIGURA II : ESPECTROS DE ABSORCION DE CALMODULINA GLICATADA CON GLUCOSA 20 mM.

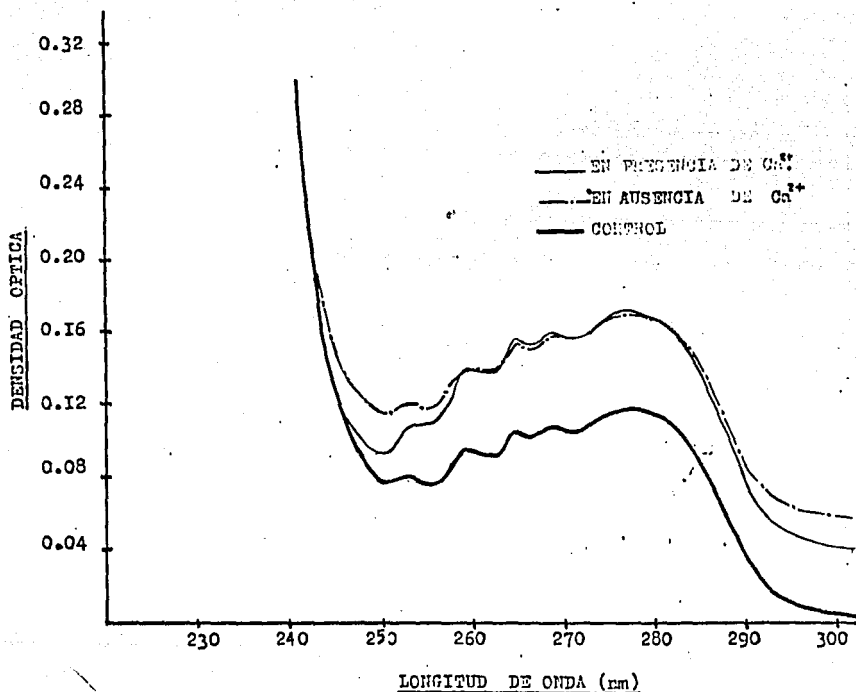


FIGURA No 11 : Espectros de absorción de la calmodulina glicatada luego de ser incubada durante 120 hrs. con glucosa 20 mM en presencia (—) y ausencia (-.-) de Ca 1 mM, comparados con el de la calmodulina pura (—).

En los espectros presentados en la figura 11, se observa que el de la calmodulina glicatada en presencia de EGTA es similar al control, no así el espectro de la calmodulina glicatada en presencia de Ca . Este último presenta una meseta de absorción en la región localizada entre los 250 y 260 nm. que lo diferencian del espectro de la calmodulina control.

FIGURA 12 : ESPECTROS DE ABSORCION DE CALMODULINA GLICATADA EN AUSENCIA DE Ca CON DIFERENTE CONCENTRACION DE GLUCOSA.

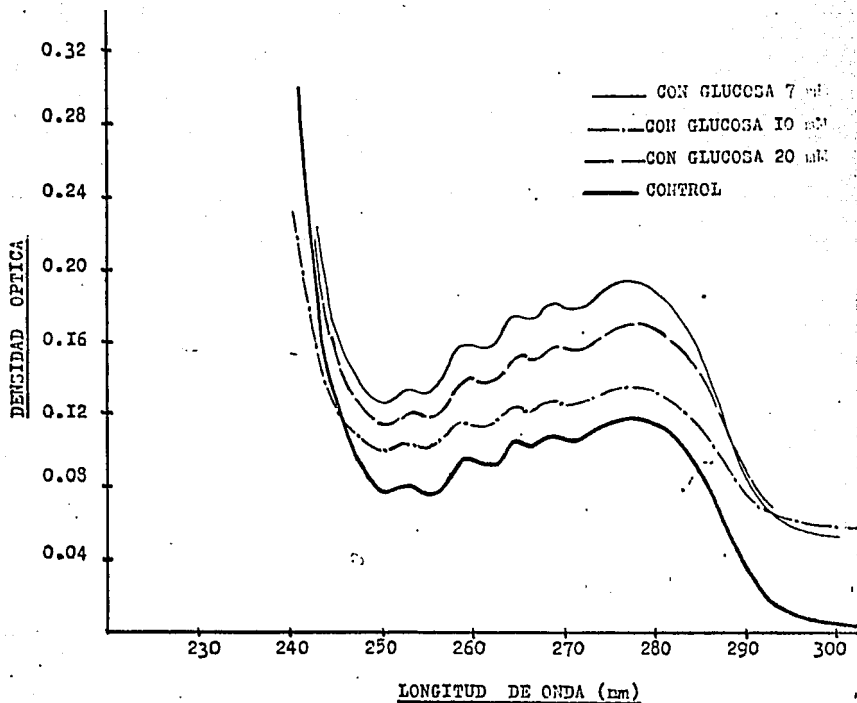


Figura No 12 : Espectros de absorción de calmodulina glicatada luego de su incubación durante 120 hrs. con glucosa 7mM (—), 10 mM (— · —) y 20 mM (— — —) en ausencia de calcio, comparados con el de la calmodulina pura (—).

Como se puede observar en la figura 12, los patrones de absorción de los espectros de calmodulina glicatada con diferentes concentraciones de glucosa en ausencia de Ca, son similares con el de la calmodulina control aunque no se pueden superponer totalmente.

FIGURA 13 : ESPECTROS DE ABSORCION DE CALMODULINA GLICATADA CON DIFERENTES CONCENTRACION DE GLUCOSA EN PRESENCIA DE Ca⁺

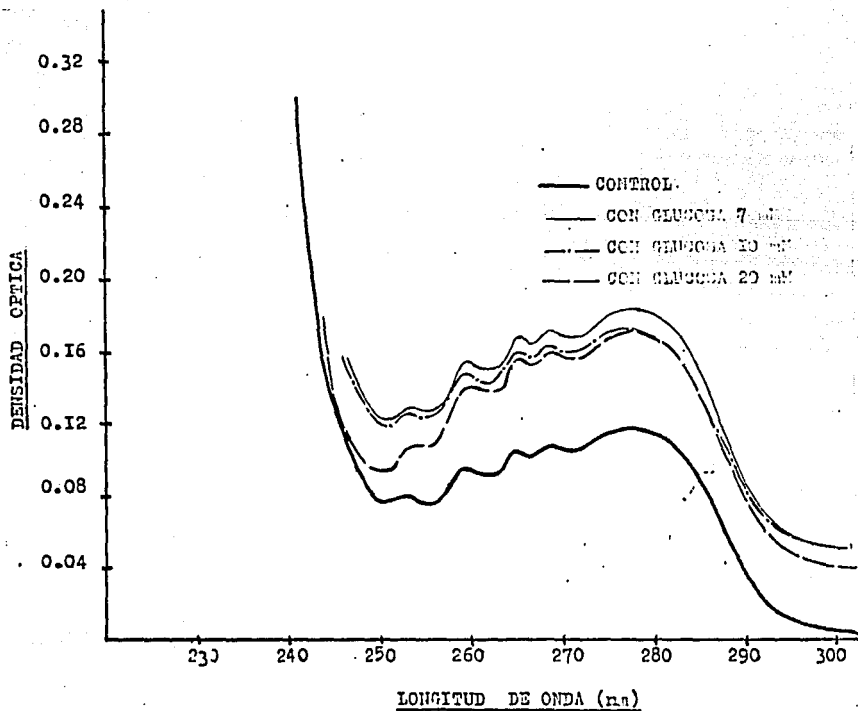


FIGURA No 13 : Espectros de la calmodulina glicatada luego de su incubación durante 120 hrs. con glucosa 7 mM (—), 10 mM (—) y 20 mM (—) en presencia de Ca, comparados con el de la calmodulina pura (—).

Como se puede observar en la figura 13, los espectros de la calmodulina glicatada con glucosa 7 y 10 mM en presencia de Ca poseen un patrón de absorción idéntico al de la calmodulina control. En cambio el espectro de la calmodulina glicatada con glucosa 20 mM en presencia del ion Ca, presenta una meseta entre los 250 y 260 nm. que no se observa en el espectro control.

9. DISCUSION DE RESULTADOS.

Las características físicoquímicas de la calmodulina que la distinguen de las demás proteínas (termoestable, de bajo peso molecular y altamente acídica) y su amplia distribución en los tejidos corporales (50, 52, 77, 78, 80, 92, 127), permitieron que su extracción y purificación fuese relativamente sencilla. El método de aislamiento y purificación de Dedman y col. (50, 44) se basa en la cromatografía con fenilsepharosa. En ésta, las propiedades hidrofóbicas de la calmodulina dependientes del ion calcio, hacen posible su obtención de manera más homogénea, por lo que se ahorra tiempo y costos en comparación con las demás técnicas que generalmente están diseñadas en dos etapas. La técnica no es recomendable para extraer la calmodulina de otros tejidos diferentes a los testículos, porque en la primer cromatografía también se purifican algunos contaminantes siendo necesario realizar una segunda cromatografía con DEA-celulosa para eliminarlos, además de que la concentración relativa de la calmodulina varía dependiendo del tejido de donde se extraiga.

En este estudio se obtuvo un rendimiento de 100.024 mg/Kg de tejido, es decir el 0.018 %. Aparentemente el rendimiento es bajo, pero se debe tener en cuenta que el porcentaje de calmodulina es del 0.15 % del total de proteínas de testículo (50,94), y además que hubo pérdida de proteína, no cuantificada, durante el proceso de extracción.

El rendimiento de calmodulina reportado en este estudio fue superior de otros autores en el testículo de rata (100 mg/Kg) (52), en el cerebro de bovino (40 mg/Kg) (97) y en corazón de

bovino (1 mg/Kg) (80). Lo anterior indica que el testículo de toro es un tejido adecuado para la obtención de la calmodulina.

Para el análisis de la identificación y determinación de la pureza de la proteína aislada, nos basamos en su patrón de elución y el espectro de absorción en el ultravioleta.

Analizando el patrón de elución de la proteína, se puede deducir que con la calmodulina no copurificó ningún contaminante de naturaleza proteica.

El espectro de absorción de la calmodulina obtenida mostró un pico de absorción máxima a 276.6 nm. y tres picos adicionales a 253 nm, 258.5 nm y 268 nm que coinciden plenamente con los obtenidos en los espectros de absorción de la calmodulina reportados por otros autores (91, 11, 132, 136), lo que confirma que la proteína extraída por nosotros es calmodulina. Además, la ausencia de picos de absorción adicionales demuestran su homogeneidad y pureza.

La detección de 5-hidroxi metilfurfural (5-HMF) en todas las mezclas de incubación es prueba de que la calmodulina experimentó un proceso de glicación "in vitro" de manera no enzimática similar al reportado para otras proteínas. Los datos de este estudio son congruentes con los de varios autores en relación al enlace cetoamina detectado en proteínas que fueron incubadas "in vitro" con altas concentraciones de glucosa (19, 20-26, 58, 133, 134).

Como la glucosa se enlaza reversiblemente a las proteínas a

través de los grupos amino de la valina y la lisina (17, 20-26), es probable que los principales sitios de glicación de la calmodulina sean valina y lisina, aunque no se puede descartar que otros aminoácidos poco reactivos puedan experimentar la misma reacción (21).

Nuestros resultados de glicación no enzimática "in vitro" de la calmodulina demuestran que la glucosa reacciona de manera inespecífica con las proteínas y coinciden con los de Dixon (17) sobre la valilhistidina de Fluckiger y Winterhalter (37) en hemoglobina; de Ney y col. (129) en transferrina humana, macroglobulina alfa-2 y fibrinógeno; de Day y col. (23, 58) en albúmina, y de Stevens y col. (3) quienes mostraron la presencia de glucosil-lisina en la proteína del cristalino posterior a su incubación con glucosa.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en presencia o ausencia de calcio muestran que la glicación de la calmodulina es mayor en presencia de dicho ion. Sin embargo, los efectos del ion calcio parecen depender de la concentración de la glucosa y del tiempo de incubación, aunque no parece existir una relación directa entre ambos factores.

El hecho de que la glicación de la calmodulina sea mayor en presencia de calcio puede explicarse por los cambios conformacionales provocados por la unión del calcio libre a la calmodulina lo que provocaría que se expongan mayor número de sitios hidrofóbicos altamente reactivos. Probablemente estos últimos involucren a la lisina y la valina (60, 61, 63, 65, 82), que son los principales aminoácidos que participan en la reacción de

glicación de proteínas (8, 21, 23, 50).

La facilitación de la glicación de la calmodulina en presencia del calcio es semejante a las observadas en las reacciones de acetilación y metilación de esta proteína (116, 117).

De manera general, los datos presentados en este trabajo muestran que la glicación de la calmodulina en presencia de calcio es proporcional al tiempo a determinada concentración de glucosa.

En ausencia de calcio, la glicación de la calmodulina fue menor, excepto cuando se le incubó con glucosa 10mM durante 24 horas.

En la mayoría de los experimentos sin calcio, a las 24 horas de incubación se presentó un efecto de saturación de los sitios primarios de glicación de la calmodulina y la reacción disminuyó o se mantuvo constante a las 72 y 120 horas de incubación.

Los efectos del E.G.T.A. sobre la glicación de la calmodulina pueden ser explicados por dos fenómenos:

- Inhibición parcial de la reacción por quelación del calcio y
- Reversión de la reacción.

Aunque la participación del calcio ya fue analizada previamente, es importante enfatizar que en presencia de este ion, la calmodulina expone pocos sitios de glicación altamente reactivos por lo que estos se glicatan rápidamente, de manera que a las 24 horas de incubación ya se detecta el efecto óptimo.

Posteriormente, a la 72 y 120 horas es muy probable que reaccionen sitios secundarios y se glicaten lentamente lo que explica que la reacción se mantenga constante o que apenas se incremente después de la 24 horas de incubación.

Si se considera que el grado y la extensión de la reacción de una amina con un grupo carbonilo depende en gran parte de factores estéricos que afectan su accesibilidad (48), existe también la posibilidad de que el E.G.T.A. bloquee directamente el acceso de la glucosa a los sitios de glicación de la calmodulina, lo que explicaría la disminución de la glicación en presencia de esta sal.

En el segundo caso, la unión de la glucosa con la calmodulina es afectada por el E.G.T.A. de manera que la vuelve más débil y fácilmente reversible, lo que produce disociación de la proteína glicatada una vez que se han saturado los sitios de reacción de la proteína, provocando la disminución en los niveles de glicación conforme transcurre el tiempo, lo cual coincide en parte con lo publicado por Means y Chang (48) quienes observaron que las reacciones entre grupos amino y aldehídos son reversibles en determinado grado.

Cuando la glicación ocurre en presencia de iones calcio, generalmente la reacción es proporcional al tiempo. La excepción ocurre al incubar la proteína con glucosa 20 mM durante 24 y 72 horas, ya que en ese intervalo la glicación disminuye en lugar de aumentar, tal y como se observa en la figura n. 7. Una posible

explicación del fenómeno, es la de considerar que a esa concentración de glucosa habrían factores estéricos que inhiben la reacción durante ese lapso.

La glicación máxima de calmodulina se obtiene siempre a las 120 horas de incubación, independientemente de la concentración de glucosa usada.

El hecho de que la glicación aumente conforme aumenta el tiempo de incubación y de que sea máxima a las 120 hrs., indica que la reacción es afectada por el tiempo de contacto o de interacción entre la glucosa y la calmodulina, lo cual coincide con los estudios sobre la glicación de la hemoglobina (19, 37) y de proteínas séricas (58, 129).

En ausencia del calcio, el efecto del tiempo de incubación sobre la glicación es impredecible: Mientras la reacción es proporcional con el tiempo al incubar con glucosa 7 mM, con glucosa 10 mM la reacción disminuye a partir de las 24 horas. Cuando la glicación se lleva a cabo con glucosa 20 mM, el efecto del tiempo no es siempre proporcional. La variación observada en los niveles de glicación en estas condiciones indica que el efecto del EDTA sobre la reacción varía impredeciblemente con el transcurso del tiempo según las condiciones intrínsecas de la mezcla de incubación. Lo anterior significa que en determinado momento, la sal puede poseer un efecto inhibitorio (total o parcial) sobre la reacción o un efecto de reversibilidad sobre la calmodulina glicatada.

Independientemente del tiempo y del efecto del calcio, la

glicación de la calmodulina es proporcional con la concentración de glucosa. Esto significa que para un mismo tiempo de incubación, la glicación siempre es mayor incubando a la proteína con glucosa 20 mM que con glucosa 7 mM ó 10 mM.

La glicación de la calmodulina es mayor cuando esta se incuba con glucosa 10 mM que con glucosa 7 mM, ya sea en presencia o en ausencia de calcio iónico. Una excepción a lo anterior son los resultados obtenidos a las 120 horas de incubación en ausencia de calcio (figura 8), en donde la glicación es mayor con glucosa 7 mM que con 10 mM.

La influencia de la concentración de la glucosa en la glicación de la calmodulina es lógica si consideramos que a concentraciones bajas de glucosa los sitios de glicación de la calmodulina no son saturados, tal y como ocurre al incubarla con glucosa 7 mM. Conforme aumentan las moléculas de glucosa en el medio de incubación, los sitios son glicatados hasta que se saturan y, de haberse incubado con concentraciones de glucosa mayores de 20 mM, hubieramos llegado al punto en que por más glucosa presente en el medio de incubación, la cantidad de proteína glicatada hubiera sido siempre constante.

La explicación anterior no coincide con los resultados obtenidos al glicatar calmodulina con glucosa 10 mM en ausencia de calcio. En estas condiciones, el E.G.T.A. inhibió parcialmente la reacción de glicación.

En general, nuestros resultados sobre el efecto de la concentración de glucosa en la glicación de calmodulina, coinciden con los obtenidos al estudiar la glicación "in vitro" del fibrinógeno (137), transferrina humana, macroglobulina alfa 2

(129), hemoglobina (21) y albúmina (23, 58).

Por otra parte, el análisis comparativo de los espectros de absorción en u.v de la calmodulina demuestra que no existen mayores diferencias entre el de la calmodulina pura y la glicatada. Sin embargo, los espectros de la calmodulina glicatada no se pueden superponer totalmente con el espectro de la calmodulina control, lo que implica que el efecto de la glicación sobre los espectros es imperceptible bajo estas condiciones y apenas si le provoca ligerísimos cambios en el patrón de absorción.

Los espectros de absorción de la calmodulina glicatada no se alteran por la presencia de el ion Ca a la concentración 1 mM, y aunque Klee (82) reporta que el calcio iónico altera las propiedades espectroscópicas de la calmodulina al unirse con ésta. Se sabe que dichos cambios no se manifiestan en presencia de calcio a la concentración 1 mM (136) lo cual es similar a nuestros resultados.

De todos los espectros obtenidos en este estudio, el más importante por su significado para las conclusiones, es el de la calmodulina glicatada con glucosa 20 mM durante 120 horas de incubación en presencia de calcio. En él aparece una meseta o pico de absorción entre los 253 y 258 nm, ausente en los demás espectros, esté o no glicatada la calmodulina. Este pico de absorción extra tampoco está reportado en la literatura (50, 52, 82, 93, 136).

El hecho de que éste pico de absorción aparezca en el espec-

tro de la calmodulina que se glicató en mayor grado, significa que la glicación de ésta proteína puede ser detectada espectralmente solamente cuando la reacción se realiza con glucosa 20 mM durante 120 horas de incubación y en presencia de calcio iónico.

Como la alteración espectroscópica se manifiesta hasta las 120 horas, los principales sitios de reacción ya fueron glicatados a las 24 y 48 horas de incubación sin producir cambios sustanciales en el patrón de absorción de la proteína. Posteriormente, sitios secundarios comienzan a ser glicatados y provocan cambios en el espectro.

Como el cambio espectral se manifiesta entre los picos de absorción producidos por la fenilalanina, es probable que éste aminoácido posea sitios secundarios de glicación de la calmodulina que son expuestos en presencia de calcio.

10.-CONCLUSIONES.

Con base al análisis y la discusión de los resultados, concluimos que :

a) Según los datos obtenidos en el presente estudio, el testículo de toro es una fuente abundante y adecuada para extraer calmodulina y que el método de Dedman y col. para la extracción de calmodulina es rápido y fácil de realizar y asegura la obtención homogénea y pura de la proteína.

b) Considerando la detección y cuantificación del 5-hidroximetilfurfural como una prueba de la glicación de proteínas, concluimos que :

- 1) La calmodulina de testículo de toro se glicata "in vitro" de manera no enzimática al ser incubada con glucosa 7 mM, 10 mM o 20 mM. La presencia de el ion Ca^{++} favorece la glicación y su ausencia, quelandolo con EGTA, la inhibe.
- 2) La glicatación de la calmodulina en presencia de iones calcio se caracteriza por :
 - El grado de glicación varía en proporción directa con la concentración de glucosa.
 - La glicación de la calmodulina depende directamente del tiempo de incubación a determinada concentración de glucosa.

La influencia combinada de el tiempo de incubación y la concentración de glucosa sobre el grado de glicación de la calmodulina es variable. Las condiciones de máxima glicación

son: [glucosa] = 20 mM y tiempo de incubación de 120 horas. La glicación es mínima cuando se incuba la proteína con glucosa a la concentración de 10 mM durante 24 horas.

3) La glicación de la calmodulina en presencia de EGTA se caracteriza por lo siguiente:

-El efecto de la concentración de glucosa sobre la glicación de glucosa no es proporcional como en presencia de Ca, aunque hay mayor glicación con glucosa 20 mM que con glucosa 10 mM o 7 mM.

-La cantidad de proteína glicada es igual a las 24 y 72 horas de incubación pero menor en comparación con 120 horas de incubación, excepto con glucosa 10 mM

-El efecto combinado de la [glucosa] y del tiempo sobre la reacción es variable: La máxima glicación de calmodulina se obtiene con [glucosa] = 20 mM y 24 horas de incubación; la glicación es mínima al incubar con [glucosa] = 10 mM y 24 horas de incubación.

c) La detección de la calmodulina glicada mediante el análisis espectroscópico, es un método poco adecuado para tal fin ya que se requiere de abundante glicación de la proteína para ser detectada espectroscópicamente.

Como la glicación altera el espectro en la región donde absorbe la fenilalanina, es probable que este aminoácido posea sitios secundarios de glicación.

11.-PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES.

Aunque los resultados obtenidos en este trabajo son concluyentes e indican claramente que la calmodulina de testículo de toro se glicata "in vitro" de manera no enzimática, debemos tomarlos con reserva ya que creemos que para reafirmar categóricamente nuestras conclusiones, deben repetirse nuevamente los experimentos realizados en este estudio porque consideramos que es susceptible de mejorarse cualitativamente en todos los aspectos. Por lo anterior, hacemos las siguientes recomendaciones enfocadas en tal sentido:

- 1) Repetir el trabajo experimental evaluando :
 - a) El efecto del calcio a diferentes concentraciones utilizadas en este trabajo.
 - b) El efecto de la concentración de glucosa desde 5 mM hasta 50 mM.
 - c) Cuantificar la reacción de glicación hasta los 21 días.
- 2) Cuantificar la proteína y la glucosa libres en el medio de incubación al principio y al final de cada tiempo de incubación con el objeto de realizar un estudio cinético de la reacción de glicación.
- 3) Hacer uso de técnicas cromatográficas y electroforéticas para la detección y la cuantificación de la calmodulina glicatada. También recomendamos el uso de técnicas radiactivas.
- 4) Realizar ensayos de actividad enzimática de la calmodulina glicatada para evaluar los efectos de la glicación

en dicha actividad.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de la glicación de la calmodulina "in vitro", la siguiente fase o etapa del proyecto sería la demostración "in vivo" de la glicación de la calmodulina, para lo cual hacemos las siguientes propuestas generales :

1) Demostrar la glicación de la calmodulina en un modelo animal siguiendo el esquema siguiente :

-Provocar hiperglicemia en el animal usando haloxan o estreptozotocina.

-Extraer y aislar la calmodulina de la sangre.

-Determinar si la calmodulina esta glicatada.

-Medir la actividad enzimática de la calmodulina y evaluar el efecto de la posible glicación en dicha actividad.

3) Demostrar la probable glicación en personas diabéticas bajo el esquema siguiente :

-Extraer y aislar calmodulina de la sangre del paciente.

-Cuantificar los niveles de la probable calmodulina glicatada

-Medir la actividad enzimática de la calmodulina glicatada y evaluar el efecto de la glicación.

Una vez demostrado que la calmodulina se glicata no enzimáticamente "in vivo" en personas con hiperglicemia y de evaluar el efecto del fenómeno sobre la actividad enzimática, será posible especular acerca del papel de la glicación de la calmodulina en relación a las secuelas patológicas manifestadas en los eritrocitos de estas personas.

II.- APENDICE No 1 : MATERIAL Y EQUIPO

EQUIPO:

- 1 licuadora "Waring" de 7 velocidades
- 1 Cronómetro o reloj segundero con alarma.
- 1 Centrífuga Sorvall RC-5B con rotor JA-14
- 1 horno de microondas (temperaturas 90 C)
- 1 Parrilla de calentamiento con agitación magnética
- 1 Potenciómetro Beckman de control digital (sensibilidad : 0.001)
- 1 Columna de cromatografía Bio-Rad de 25 cm de alto y 2.8 cm de ancho.
- 1 Colector de fracciones automático "Gilson"
- 1 Espectrofotómetro "Gilford 2600" de doble haz y con control digital
- 1 Balanza granataria
- 1 Balanza analítica
- 1 Campana de flujo laminar
- 1 Baño serológico para temperaturas de 100 C.
- 1 Pipeteador semiautomático "Gilson" (tipo pistola).
- 1 Plancha de calentamiento de acero con 20 compartimientos para tubos de ensayo (Multi-Block Heater 2090 Lab.Line Inst.Inc.)
- 1 Columna empacada con Sephadex G-25 M.
- 1 Refrigerador
- 3 Pipetas manuales autoajustables "Oxford" de 0.1, 1.0 y 2.0 ml.
- 2 Termómetros de 0-100 C .

MATERIAL

- 1 Martillo
- 3 Matraces erlenmeyer "Pyrex" de 200, 250, 500 y 1000 ml. respectivamente
- 3 Vasos de plástico "Pyrex" de 500 y 1000 ml. respectivamente.
- 2 Vasos "Pyrex" de 250 y 500 ml. respectivamente
- 3 Probetas "Pyrex" de 250, 500, 1000 y 2000 ml (2 c/u)
- 2 Cubetas de plástico de 20 lt.
- 1 Cuba de plástico
- 2 Embudos de plástico de tallo corto.
- 100 Pipetas Pasteur
- 3 Gradillas de acero inoxidable
- 1000 Tubos de ensayo de 8 x 100
- 20 Tubos de ensayo de plástico con fondo cónico de 30 mly tapón de rosca.
- 1 Metro de tubo de diálisis.
- 2 Espátulas de acero inoxidable.
- 5 Frascos de plástico con tapón de rosca de 100, 250 y 500 ml.
- 2 Columnas PD-10 marca "Pharmacia Fine Chemical" empacadas con sephadex G-25 M
- 50 Tubos "Corning" de polipropileno con tapón de rosca, estériles de 50 y 15 ml. (50 de c/u).
- 3 Gradillas de plástico con aerturas de 3-5 cm de dm.
- 500 Puntas de plástico estériles para pipetas manuales autoajustables.
- 100 Pipetas de plástico estériles de 10 y 1 ml. (100 de c/u).

20 Cartuchos de esterilización desechables de plástico

Marcadores

Etiquetas

1 Rollo sellador.

REACTIVOS

- Tris-Hidroximetil-aminometano (Sigma)
- Acido etilendiaminotetracético (Sigma)
- Acido etilenglicol-is-(D-aminoetileter)-tetracético (Sigma).
- Cloruro de sodio (Sigma).
- 2-Mercaptoetanol (Sigma)
- Cloruro de calcio (Sigma)
- Urea (Sigma)
- Hidróxido de sodio (Sigma)
- Fenilsepharosa para cromatografía en columna (Farmacia Fine Chemical).
- Acido Dórico (Sigma o Merck)
- Borato de sodio (Sigma o Merck)
- Cloruro de potasio (Sigma)
- Fosfato diácido de potasio (Sigma)
- Fosfato monoácido de sodio (Sigma)
- Cloruro de magnesio hexahidratado (Sigma)
- Cloruro de calcio (Sigma)
- Glucosa o dextrosa (Sigma o Merck)
- Sulfato de estreptomicina (Merck)
- Penicilina g-potásica (Lakeside)
- Acido oxálico (Sigma)
- Acido tiobarbitúrico (Sigma)
- 5-Hidroximetilfurfural (Sigma)
- Isopropanol (Sigma)
- Acido clorhídrico concentrado (Sigma)
- Acido tricloroacético (Sigma)
- Fibra de vidrio
- Hielo picado
- Hielo seco
- Agua desionizada.

APENDICE 2 : ESQUEMAS DE INCUBACION

GLICATACION DE LA CALMODULINA EN PRESENCIA DE GLUCOSA 7 mM y Ca^{2+} 1 mM. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION.

Con el objeto de demostrar que ocurre glicatación "in vitro" de la calmodulina y de establecer el tiempo mínimo para ella, la proteína pura se incubó a diferentes tiempos con -- glucosa 7mM en DPBS a 37°C y en presencia de Ca^{2+} 1 mM .

Tubo	Solución de Calmodulina	Medio de Incubación	Volumen (Calmodulina)		(Glucosa)		Tiempo de Incubación
			Final	mg/ml mM	mg/ml mM	mM	
B-1	0.5ml	0.5 ml	1 ml	1.05	1.26	7	0 hrs.
B-1'	"	"	"	"	"	"	"
B-2	0,5ml	0.5 ml	1 ml	1.05	1.26	7	24 hrs.
B-2'	"	"	"	"	"	"	"
B-3	0.5ml	0,5ml	1 ml	1.05	1.26	7	48 Hrs.
B-3'	"	"	"	"	"	"	"
B-4	0.5ml	0.5 ml	1 ml	1.05	1.26	7	72 Hrs.
B-4'	"	"	"	"	"	"	"
B-5	0,5ml	0,5ml	1 ml	1.05	1.26	7	120Hrs.
B-5'	"	"	"	"	"	"	"
BLANCO	0.5ml DPBS	0.5 ml	1 ml	-	1.26	7	
BALNCO	"	"	"	"	"	"	

(Calmodulina) = 2.1 mg/ml DPBS con glucosa 10mM y Ca^{2+} 1 mM , pH 7.4; Blanco reactivos (sin calmodulina)

GLICATACION DE LA CALMODULINA EN PRESENCIA DE GLUCOSA
7mM y EGTA 1 mM. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION.

Los objetivos del experimento son las mismas que el anterior solo que ahora se estudió el fenómeno de glicatación de calmodulina en ausencia de Ca^{2+} 1mM para lo cual la proteína y la glucosa se incuban a diferentes tiempos en DPBS+EGTA 1 mM a 37°C .

Tubo	Solución de Calmodulina	Medio de Incubación	Volumen Final	(Calmodulina) mg/ml	(Calmodulina) mM	(Glucosa) mg/ml	(Glucosa) mM	Tiempo de Incubación
C-1	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.05		1.26	7	0 Hrs.
C-1'	"	"	"	"		"	"	"
C-2	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.05		1.26	7	24 Hrs.
C-2'	"	"	"	"		"	"	"
C-3	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.05		1.26	7	48 Hrs.
C-3'	"	"	"	"		"	"	"
C-4	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.05		1.26	7	72 Hrs.
C-4'	"	"	"	"		"	"	"
C-5	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.05		1.26	7	120 Hrs.
C-5'	"	"	"	"		"	"	"
BLANCO	0.5 DPBS	0.5 ml	1 ml	1.05		1.26	7	
BLANCO	" DPBS	"	"	"		"	"	

(Calmodulina) = 2.1 mg/ml; DPBS con glucosa 10 mM y EGTA 1 mM
 PH 7.4; Blanco Reactivos.

GLICATACION DE LA CALMODULINA EN PRESENCIA DE GLUCOSA
10 mM y Ca²⁺ 1 mM . INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION.

Para demostrar que la posible glicatación de la calmodulina "in Vitro" es mayor con glucosa 10mM en relación a la glucosa 7mM y establecer el tiempo de incubación necesario para ello, se incubaron en DPBS estéril a 37°C por tiempos diferentes. 1 mg/ml Calmodulina con glucosa 10mM en presencia de Ca²⁺.

Tubo	Solución Calmodulina	Medio de Incubación	Volumen Final	(Calmodulina) mg/ml	(Glucosa) mM	mg/ml	mM	Tiempo de Incubación
F-1	0.5 ml.	0.5 ml	1 ml	1.251	1.8	10		24 hrs.
F-1'	"	"	"	"	"	"	"	"
F-2	0.5 ml	0.5 ml.	1 ml	1.251	1.8	10		72 hrs.
F-2'	"	"	"	"	"	"	"	"
F-3	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.251	1.8	10		120 hrs.
F-3'	"	"	"	"	"	"	"	"
BLANCO	0.5 DPBS	0.5 ml	1 ml	-	1.8	10		
BLANCO	" DPBS	"	"	-	"	"		

(Calmodulina) = 2.542 mg/ml ; DPBS+ Ca²⁺ 1mM y glucosa 20mM
 pH 7.4 ; Blanco de reactivos(sin calmodulina) :

GLICATAACION DE LA CALMODULINA EN PRESENCIA DE GLUCOSA
10 mM y EGTA 1mM. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION.

Para valorar la ausencia del Ca^{2+} en la posible glicatación de la calmodulina en relación al experimento anterior, - la calmodulina y la glucosa 10mM se incubaron diferentes tiempos en una mezcla estéril de DPBS + EGTA 1mM a 37°C.

Tubo	Solución Calmodulina	Medio de Incubación	Volumen Final	(Calmodulina) mg/ml	(Glucosa) mM	Tiempo Incubación
D-1	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.251	1.8 10	24 hrs.
D-1'	"	"	"	"	" "	"
D-2	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.251	1.8 10	72 hrs.
D-2'	"	"	"	"	" "	"
D-3	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.251	1.8 10	120 hrs.
D-3'	"	"	"	"	" "	"
BLANCO	0.5 ml DPBS	0.5 ml	1 ml	-	1.8 10	
BLANCO	" ml DPBS	"	"	-	" "	

(Calmodulina)= 2.542 mg/ml; DPBS + EGTA y Glucosa 20 mM,
 pH 7.4; Blanco de reactivos (sin calmodulina)

GLICATACION DE LA CALMODULINA EN PRESENCIA DE GLUCOSA
20 mM y Ca²⁺ 1 mM, INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION.

Con el objeto de demostrar la posible glicatación "in - Vitro " de la calmodulina en presencia de Ca²⁺ 1 mM y el tiempo necesario para ello, se incubó la proteína pura con glucosa 20mM en DPBS+Ca²⁺ 1mM a diferentes tiempos.

Tubo	Solución Calmodulina	Medio de Incubación	Volúmen Final	(Calmodulina) mg/ml mM	(Glucosa) mg/ml mM	Tiempo Incubación
G-1	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.251	3.6 20	24 hrs.
G-1'	"	"	"	"	" "	"
G-2	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.251	3.6 20	72 hrs.
G-2'	"	"	"	"	" "	"
G-3	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	1.251	3.6 20	120 hrs.
G-3'	"	"	"	"	" "	"
BLANCO	0.5 ml DPBS	0.5 ml	1 ml	-	3.6 20	
BLANCO	" ml DPBS	"	"	-	" "	

(Calmodulina) = 2.542 mg/ml ; DPBS + Ca²⁺ 1mM y glucosa 40mM
 pH 7.4 ; Blanco de reactivos (sin calmodulina) .

GLICATACION DE LA CALMODULINA EN PRESENCIA DE GLUCOSA
20 mM Y EGTA 1mM . INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION.

Con el fin de valorar la ausencia del Ca^{2+} en la supues -
 ta glicatación de la calmodulina en presencia de altas concen -
 traciones de glucosa, 1.2 g/ml de calmodulina y 3.6g/ml de -
 glucosa se incuban diferentes tiempos en una mezcla estéril -
 de DPBS + EGTA 1 mM a 37° C .

Tubo	Solución de Calmodulina	Medio de Incubación	Volumen Final	(Calmodulina) mg/ml	(Glucosa) mM	mg/ml	mm	Tiempo de Incubación
E-1	0.5ml	0.5 ml	1 ml	1.251	3.6	20		24 hrs.
E-1'	"	"	"	"	"	"	"	"
E-2	0.5ml	0.5 ml	1 ml	1.251	3.6	20		72 hrs.
E-2'	"	"	"	"	"	"	"	"
E-3	0.5ml	0.5 ml.	1 ml	1.251	3.6	20		120 hrs.
E-3'	"	"	"	"	"	"	"	"
BLANCO	0.5ml DPBS	0.5 ml	1 ml	-	3.6	20		
BLANCO	"	"	"	-	"	"		

(Calmodulina) = 2.542 mg/ml; DPBS + EGTA 1 mM y Glucosa
 40 mM . H 7.4 ; Blanco de reactivos (sin calmodulina)

1.- APENDICE 3 : ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS

Los resultados son analizados por el siguiente modelo lineal general:

$$Y_{ijk} = \mu + O_i + T_j + OT_{ij} + E_k(ij)$$

en donde Y_{ijk} es la k -ésima repetición sujeta al j -ésimo tiempo de incubación con la i -ésima concentración de glucosa.

μ = media de mayor grado de generalidad.

O_i = concentraciones de glucosa

T_j = tiempos de incubación

OT_{ij} = interacción posible entre una determinada concentración de glucosa y un tiempo de incubación.

$E_k(ij)$ = error experimental.

Para evaluar el efecto de las fuentes de variación, se resuelve el modelo por la técnica del ANALISIS DE LA VARIANZA (ANADEVIA), haciendo uso de la siguiente tabla:

<u>Fuente de variación</u>	<u>Grados de libertad(g)</u>	<u>Suma de cuadrados(SC)</u>	<u>Media cuadrática</u>
O_i	$(i-1)$	$\sum Y_i^2 / jk - Y_{...}^2 / ijk$	SC/g
T_j	$(j-1)$	$\sum Y_j^2 / ik - Y_{...}^2 / ijk$	"
OT_{ij}	$(i-1)(j-1)$	$\sum \sum Y_{ij}^2 / ik - \sum Y_i^2 / jk - \sum Y_j^2 / ik + Y_{...}^2 / jkk$	"
$E_k(ij)$	$(k-1)(ij)$	$\sum \sum \sum Y^2_{ijk} - \sum \sum Y_{ij}^2 / k$	"

GLUCOSA (j) (mM)	7	10	20	Y.j.
TIEMPO (j) (hrs.)				
24	0.239 0.469	0.232 0.462	0.465 0.925	1.856
72	0.356 0.706	0.348 0.688	0.355 0.705	2.109
120	0.371 0.741	0.724 1.444	0.850 1.700	3.885
ΣY_i	1.916	2.594	3.330	7.850
ΣX	0.634	1.386	2.122	

A partir de los datos anteriores, obtenemos:

$$\Sigma Y_{i.../jk} = 3.582 \quad \Sigma Y^2_{j.../ik} = 3.832 \quad Y^2_{.../ijk} = 3.424$$

$$\Sigma \Sigma Y_i^2 /jk = 4.142 \quad \Sigma \Sigma Y_i^2 /k = 4.142$$

Substituyendo en la tabla de ANADCOVA y efectuando las respectivas operaciones, se obtienen los siguientes resultados:

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados (MC)	Media de cuadrados (MC)
Oi	2	0.1581	0.07905
Tj	2	0.4078	0.2039
OTij	4	0.152132	0.03803
Ek (ij)	9	0.0003	0.000033

Efecto de las fuentes de variación (F).

a) Efecto de la glucosa (F calculada):

$$MC \text{ glucosa} / MC \text{ error} = 2395$$

b) Efecto del tiempo de incubación (F calculada)

$$MC \text{ tiempo} / MC \text{ error} = 6718$$

c) Efecto de las interacciones (F calculada)

$$MC \text{ glucosa-tiempo} / MC \text{ error} = 1152$$

Regla de Decisión

Si F calculada es mayor que la F de tablas, entonces hay efecto estadísticamente significativo del parámetro estudiado. En nuestro caso tenemos lo siguiente:

a) Glucosa : F calculada = 2395

$$F \text{ tablas} = 4.26 \quad (P = 0.05, 2/9 \text{ gl})$$

como F calculada > F tablas entonces el efecto de la concentración de glucosa sobre la glicación de calmodulina es significativo.

b) Tiempo : F calculada = 6718

$$F \text{ tablas} = 4.26 \quad (P = 0.05, 2/9 \text{ gl})$$

como F calculada > F tablas entonces el efecto del tiempo de incubación sobre la glicación de calmodulina es significativo.

c) Interacciones glucosa-tiempo :

$$F \text{ calculada} = 1152$$

$$F \text{ tablas} = 3.63 \quad (P = 0.05, 4/9 \text{ gl})$$

como F calculada > F tablas, entonces el efecto de la interacción de glucosa-tiempo sobre la calmodulina es estadísticamente significativo.

En resumen, de acuerdo a los resultados anteriores, la concentración de glucosa y el tiempo de incubación afectan significativamente el grado de glicación de la calmodulina; así mismo, el efecto combinado de la concentración de glucosa y el tiempo de incubación afectan también el grado de glicación de la calmodulina.

Para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de glucosa para glicar a la calmodulina independientemente del tiempo de incubación, usaremos la técnica estadística conocida como de CONTRASTES ORTOGONIALES, la cual consiste en dividir la suma de cuadrados en fragmentos, con adecuados errores muestrales

independientes de acuerdo a sus grados de libertad. La fórmula general es la siguiente:

$$SCq = Y^2 / \sum n_i C_i^2$$

$$Y = \text{contraste} = \sum Y_i C_i$$

en donde C_i = coeficiente específico de contraste

n_i = número de muestras.

Para la resolución del modelo anterior, elaboramos la siguiente tabla:

Glucosa mM	7	10	20
Y_i	1.916	2.5942	3.3304
n	6	6	6
C_i	1	1	-2
C_2	-1	1	0

CONTRASTE 1 : glucosa . 20 mM vs. glucosa 7 y 10 mM

Substituyendo en el contraste $Y = \sum Y_i C_i$ tenemos:

$$Y = (3.3304)(-2) + (2.5942)(1) + (1.916)(1)$$

$$Y = -2.1506$$

$$Y^2 = 4.6250$$

Substituyendo en la sumatoria $\sum C_i^2 n_i$, tenemos :

$$\sum C_i n_i^2 = 6(1)^2 + 6(1)^2 + 6(-2)^2 = 36$$

Substituyendo en la fórmula general:

$$SCq_1 = Y^2 / \sum C_i n_i^2 = 4.6250 / 36 = 0.1284$$

CONTRASTE 2 (SCq_2): Para evaluar el efecto de la concentración de glucosa 7 y 10 mM seguimos el mismo procedimiento :

$$Y = \sum Y_i C_i = (2.5942)(1) + (1.916)(-1)$$

$$Y = 0.6782$$

$$Y^2 = 0.4599$$

$$\sum ni Ci^2 = 12$$

Substituyendo en la fórmula general:

$$SCQ2 = 0.4599 / 12 = 0.03832$$

Substituyendo los contrastes 1 y 2 en la tabla de ANADEV A :

Fuente de variación	g.l	SC	MC	Fcalc.	Ftabla
glucosa	2	0.1581	0.07905		
20 mM vs 7,10 mM		0.1204	0.1204	3070	5.12
7 mM vs 10 mM		0.0383	0.0383	11575	5.12
Error			0.000033		

Si F calculada $>$ F tablas, entonces tenemos efecto de contraste. Como así sucede en nuestro caso, tenemos:

$$20 \text{ mM} \neq 7 \text{ mM} \neq 10 \text{ mM}$$

por lo que la glicación de calmodulina no se realiza de la misma forma a 7, 10 y 20 mM. Se obtiene mayor glicación incubando con glucosa 20 mM en relación a 10 mM y 7 mM. Entre estas dos últimas, glucosa 10 mM glicata en mayor grado que glucosa 7 mM.

De igual manera que para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de glucosa, evaluaremos el efecto del tiempo de incubación de la calmodulina con una concentración de glucosa conocida con el objeto de determinar la influencia de cada uno de los tiempos usados sobre la glicación de la calmodulina.

Usando la técnica de Contraste Ortogonal, se elabora la siguiente tabla:

Tiempo(hrs.)	24	72	120
Y.j	1.9561	2.1087	3.9956
n	6	6	6
C1	1	1	-2
C2	+2	-1	

CONTRASTE 1 (120 hrs. vs. 72 y 24 hrs.):

$$SCq1 = Y^2 / \sum ni Ci = 14.4871/36 = 0.4024$$

CONTRASTE 2 (72 hrs. vs. 24 hrs.):

$$SCq2 = Y^2 / \sum ni Ci = 0.06454 / 12 = 0.00537$$

Substituyendo los contrastes en la tabla de ANADEVVA, tenemos :

Fuente de variación	g.l.	SC	MC	Fcalc.	F tablas
tiempo (Tj)	2	0.4078	0.2039		5.12
	120 vs 72,24 hrs.	0.4024	0.4024	12193	5.12
	72 vs 24	0.0053	0.0053	160	5.12
error		0.00034	0.000033		

Regla de decisión: Si F calculada es mayor que F tablas, hay efecto de contraste. Es decir, de acuerdo al análisis de contrastes, tenemos que el efecto de el tiempo de incubación sobre la glicación de calmodulina es diferente a las 120 hrs. que a las 72 y a las 24 hrs.

En resumen, la calmodulina se glicata conforme aumenta el tiempo de incubación cuando se tiene en el medio de incubación una determinada concentración de glucosa.

Hasta aquí hemos encontrado un tiempo de incubación y una concentración de glucosa óptimas para la glicación de la calmodulina en presencia de calcio. Sin embargo el análisis de contrastes se realizó considerando cada parámetro de manera independiente, por lo que ahora analizaremos los datos experimentales considerando el efecto de los dos parámetros. Para tal fin realizaremos un análisis de contraste ortogonal, igual que en los casos anteriores, a partir de la siguiente tabla:

Condición	20 mM 120 h	10mM 120h	20 mM 24 h	7 mM 120h	7 mM 72	20 mM 72 h	10 mM 72 h	7 mM 24 h	10 mM 24 h
Y _j	1.7004	1.444	0.925	0.741	0.706	0.705	0.688	0.469	0.62
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6
C1	1	1	1	1	1	1	1	1	-8
C2	1	1	1	1	1	1	1	-7	

C3	1	1	1	1	1	1	-6
C4	1	1	1	1	1		-5
C5	1	1	1	1	1	4	
C6	1	1	1				-3
C7	1	1					-2
C8	1		-1				

Aplicando la fórmula general de contraste:

$$SCq = Y^2 / \sum n_i C_i$$

y substituyendo para cada uno de los contrastes, tenemos:

$$SCq_1 = 0.0313703$$

$$SCq_2 = 0.0391$$

$$SCq_3 = 0.01740$$

$$SCq_4 = 0.00042$$

$$SCq_5 = 0.047$$

$$SCq_6 = 0.1610$$

$$SCq_7 = 0.07056$$

$$SCq_8 = 0.005469$$

Para cada contraste substituímos en la siguiente fórmula:

$$SC_i / M_{Error}$$

y obtenemos la F calculada del contraste.

Contraste	F calculada	F tablas
C1	940	5.12
C2	1101	"
C3	515	"
C4	1.20	"
C5	1404	"
C6	4040	"

Habr  diferencia estadísticamente significativa si F calculada es mayor que F tablas. De acuerdo a lo anterior, tenemos que la influencia de los parámetros combinados sobre el grado de glicación, es diferente y sigue el orden descendiente que a continuación se muestra:

(20 mM-120 hrs.) \neq (10 mM-120 hrs.) \neq (20 mM-24 hrs.) \neq (7 mM-120 hrs.) \neq (7 mM-72 hrs.) \neq (20 mM-72 hrs.) \neq (10 mM-72 hrs.) \neq (7 mM-24 hrs.) \neq (10 mM-24 hrs.)

Finalmente, para terminar este análisis, las consideraciones finales que podemos plantear son las siguientes:

A las condiciones de [glucosa] = 7, 10 y 20 mM y tiempo de incubación de 24, 72 y 120 hrs., en presencia de calcio, se concluye que:

- 1.-A diferente concentración de glucosa hay diferente grado de glicación de calmodulina.
- 2.-Para una misma concentración de glucosa, la glicación de calmodulina aumenta en proporción directa con el tiempo de incubación
- 3.-De acuerdo a nuestro esquema de incubación, las condiciones de glicación máxima de la calmodulina son con [glucosa] = 20 mM y 120 horas de incubación en presencia de Ca. La calmodulina se glicata ligeramente cuando se incuba con glucosa 10 mM durante 24 hrs.

B) ANALISIS DE GLICACION DE CALMODULINA EN AUSENCIA DE CALCIO

De manera similar que para el análisis de la glicación en presencia de Ca, los datos de glicación de la calmodulina en ausencia de Ca son analizados estadísticamente por el modelo lineal general:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + T_j + GT_{ij} + E_{k(ij)}$$

Igual que para el análisis anterior, para evaluar el efecto de las fuentes de variación el modelo se resuelve por la técnica de análisis de varianza (ANAEVA), haciendo uso de la siguiente tabla:

Fuente de Variación	grados de libertad (q1)	Suma de Cuadrados (SC)
[glucosa] (G1)	$(i - 1)$	$\sum j^2 / jk - y^2 \dots / ijk$
Tiempo de Incub. (Tj)	$(j - 1)$	$\sum y \cdot j^2 / ik - y^2 \dots / ijk$
[glucosa] - tiempo (GTij)	$(i-1)(j-1)$	$\sum \sum y_{ij}^2 / h - \sum j^2 / ik - \sum y \cdot j^2 / ik$
Ek (ij)	$(h-i)(k-j)$	$+ y^2 \dots / ijk$ $\sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \sum \sum y_{ij}^2 / h$

D) Análisis de la glicación de calmodulina en ausencia de Ca.

Con los datos obtenidos experimentalmente se construye la siguiente tabla :

[glucosa] (i)	7	10	20	$\sum Y \cdot j$
Tiempo en hrs. (j)				
24	0.130 0.260	0.334 0.664	0.4044 0.0044	1.7284
72	0.1453 0.2053	0.3036 0.6036	0.3547 0.7047	1.5934
120	0.130 0.260	0.0730 0.1030	0.4781 0.7401	1.3491
$\sum y_i$	0.0133	1.4504	2.4572 Y... = 4.6707	
$\sum y^2$	0.1104	0.4173	1.02133	

$$\sum Y_i^2 / jk = 1.46725 \quad Y \cdot j^2 / ik = 1.2334 \quad Y \dots / ijk = 1.222$$

$$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 = 1.55100 \quad \sum \sum Y_{ij}^2 / k = 1.54$$

Substituyendo en la tabla de ANADEVIA y resolviendo para la suma de cuadrados y la media cuadrática, tenemos:

Fuente de variación	grados de libertad (q1)	Suma de cuadrados (SC)	Media cuadrática (MC)
G1	2	0.2475	0.12375

Tj	2	0.0114	0.0057
GiTj	4	0.06135	0.0153
Ek(ij)	7	0.0111	0.00123

Estimación de los Efectos

Si F calculada es mayor que F de tablas, hay efecto significativo del parámetro estudiado.

a) En el caso del efecto de la concentración de glucosa tenemos que :

$$F \text{ calculada} = MC-Gi / MC-E = 0.12375 / 0.00123 = 100$$

y F de tablas se obtiene considerando g.l. de Gi y E (2 y 4 respectivamente) y $p = 0.005$:

$$F \text{ tablas} = 4.26$$

b) Para el efecto del tiempo de incubación tenemos :

$$F \text{ calculada} = MC Tj / MC Ek = 0.0057 / 0.00123 = 4.63$$

$$F \text{ tablas} = 4.26$$

c) Para evaluar el efecto de la interacción de ambos parámetros sobre la glicación de calmodulina, tenemos :

$$F \text{ calculada} = MC GiTj / MC \text{ error} = 12.43$$

$$F \text{ tablas} = 3.63$$

Como en los tres casos la F calculada es mayor que la F de tablas, podemos establecer que :

1.- El efecto de la concentración de glucosa sobre la glicación de calmodulina es significativo y no es el mismo.

2.- El efecto del tiempo de incubación sobre la glicación de calmodulina es estadísticamente significativo y es diferente para cada tiempo.

3.- El efecto combinado del tiempo de incubación y la glucosa es estadísticamente significativo.

Para evaluar el efecto de la concentración de glucosa de manera independiente y específica sobre la glicación de la calmodulina en ausencia de Ca, realizaremos un análisis de

contraste ortogonal siguiendo la fórmula :

$$\text{Suma de cuadrados} = SC1 = Y^2 / \sum n_i C_j^2$$

en donde $Y = \sum (Y_i) (C_i)$

Para resolver el contraste haremos uso de la siguiente tabla

[glucosa] mM	7	10	20
Y _i	0.8133	1.4506	2.4572
n _i	6	6	6
C ₁	1	1	-2
C ₂	1	1	0

Sustituyendo en cada contraste y resolviendo :

$$SC1 = 0.1751$$

$$SC2 = 0.523$$

La F calculada para el contraste se calcula de la siguiente manera : F calculada = SC contraste / MC error

para SC1 tenemos $0.1751 / 0.00123 = 159$

para SC2 tenemos $0.0523 / 0.00123 = 42.56$

Habr  efecto de contraste si F calculada es mayor que F de tablas. Como en ambos caso la F de tablas es de 5.12, entonces el efecto de la concentración de glucosa sobre la glicación es diferente en cada contraste ya que las F calculadas son mayores. Tenemos que : [glucosa] 7mM = [glucosa] 10 mM = [glucosa] 20 mM.

Resolviendo de la misma manera para evaluar de manera específica el efecto del tiempo de incubación sobre la glicación de calmodulina en ausencia de Ca , tenemos :

Tiempo hrs.	24	72	120
Y _j	1.7204	1.5734	1.3691
n _i	6	6	6
C ₁	1	1	-2
C ₂	1	1	0

	<u>F calculada</u>	<u>F tablas</u>
SC1 = 0.00946	7.671	5.12
SC2 = 0.001510	1.2347	5.12

En el primer contraste (120hrs. vs 72 y 24 hrs.) como F calculada es mayor que F de tablas, hay efecto de contraste, no así en el segundo contraste (72 hrs. vs 24 hrs.) en donde F calculada es menor que F de tablas por lo que no hay efecto de contraste. Dicho de otra manera, el efecto del tiempo de incubación sobre la glicación de calmodulina en ausencia de Ca es diferente a las 120 hrs. que a las 72 y 24 hrs. En cambio el efecto del tiempo sobre la glicación de calmodulina es igual a las 72 y 24 hrs. pero menor que a las 120 hrs.

Procediendo de la misma manera que en los casos anteriores, realizaremos un análisis de contraste ortogonal para evaluar el efecto de la interacción glucosa-tiempo en ausencia de calcio, para lo cual se construye la tabla siguiente:

Condición	20 mM 120 h	20 mM 24 h	20 mM 72 h	10 mM 24 h	10 mM 72 h	7 mM 72 h	7 mM 120 h	7 mM 24 h	10 mM 120
Yij	0.9481	0.804	0.7047	0.664	0.6036	0.2053	0.260	0.260	0.10
ni	6	6	6	6	6	6	6	6	6
C1	1	1	1	1	1	1	1	1	-0
C2	1	1	1	1	1	1	1	1	-7
C3	1	1	1	1	1	1	1	1	-6
C4	1	1	1	1	1	1	1	1	-5
C5	1	1	1	1	1	1	1	1	-4
C6	1	1	1	1	1	1	1	1	-3
C7	1	1	1	1	1	1	1	1	-2
C8	1	1	1	1	1	1	1	1	-1

Obteniendo la suma cuadrática (SC) y la F calculada y la F de tablas para cada contraste tenemos:

<u>Contraste</u>	<u>SC</u>	<u>F calculada</u>	<u>F tablas</u>
C1	0.0225	10.29	5.12
C2	0.0179	14.55	.
C3	0.003013	3.1	.

C4	0.003163	2.57	"
C5	0.0031	2.52	"
C6	0.0245	20	"
C7	0.033	27	"
C8	0.017	14	"

*MC error = 0.00123

Si consideramos que hay efecto de contraste si F calculada es mayor que F de tablas, tenemos la siguiente situación:

El mayor efecto sobre la glicación de calmodulina se muestra incubando la calmodulina con glucosa 20 mM durante 120 hrs., siguiéndole en orden descendente glucosa 20 mM y 24 hrs., glucosa 20 mM y 72 hrs., glucosa 10 mM y 24 hrs.

La glicación de calmodulina en ausencia de Ca es igual incubando con glucosa 10 mM durante 72 hrs., que con glucosa 7 mM durante 72 hrs. ó con glucosa 7 mM y 120 hrs. de incubación. El mínimo efecto sobre la glicación de calmodulina se presenta con glucosa 10 mM durante 120 hrs. de incubación

14 - BIBLIOGRAFIA

1. - C.J.Epstein. "Structural alteration after of the synthesis of the peptide". En : "Aspects of protein biosynthesis" Editado por C.D. Anfisen Academic Press (1970), pp. 115-130.
2. - Wod Finn. (1981). Ann. Rev. Biochem. 50, 703.
3. - Stevens, U. L.; Rouzer, C. A; Monnier, U. M. & Cerami, A. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 2918
4. - Brownlee, M.; Cerami, A. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 385
5. - Mc.Millan, D. E.; Utterback, N. G. & La Puma, J. (1970). Diabetes. 27, 895.
6. - Rougafogalis, D. (1979). Canad. J. Physiol. & Pharmacol. 57, 1331.
7. - Caretaud, A.; Ozon, R.; Walsh, M. P.; Halech, J. & Demaille, J.G. (1980). J. Biol. Chem. 255, 9404.
8. - Miller, J. A.; Gravaliese, E. & Dunn, J. W. (1980). J. Clin. Invest. 65, 896.
9. - Lehninger. "Biochemistry". Second edition. (1975). Worth Publisher.
10. - Uy, R. & Wald, F. (1977). Science. 198, 890
11. - Jackson, R. L; Dedman, J. R.; Schreiber, W. C.; Bhatnagar, P. K.; Knapp, R. D. & Means, A. R. (1977). Biochem. Biophys. Res. Commun. 77
12. - Vaechter, C. & Lennarz, W. J. (1975). Annu. Rev. Biochem. 45, 95
13. - Rubin, C. S. & Rosen, O. M. (1975). Annu. Rev. Biochem. 44, 835
14. - Cantoni, G. L. (1975). Ann. Rev. Biochem. 44, 435.
15. - Holmquist, W. R. & Schroeder, W. A. (1966). Biochemistry. 5, 2487.
16. - Bookchin, R. H. & Gallop, P. M. (1968). Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 86.
17. - Dixon, H. B. F. (1972). Biochem. J. 129, 203.
18. - Mc.Donald, M. J.; Shapiro, R.; Bleishman, M.; Solway, J. & Bunn, H. F. (1978). J. Biol. Chem. 253, 2327.

19. - Bunn, H. F.; Haney, D. M.; Kamin, S.; Gabbay, K. H. & Gallop, P. M. (1976). *J. Clin. Invest.* 57, 1652.
20. - Bunn, H. F.; Shapiro, R.; McManus; Garrick, L.; McDonald, M. J.; Gallop, P. M. & Gabbay, K. H. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 3892.
21. - Gabbay, K. H.; Sosenko, J. M.; Banuchi, G. A.; Mininsonh, M. J. & Fluckiger, R. (1979). *Diabetes.* 28, 337.
22. - Robert, H.; Modrak, J. B.; Hasing, J. M. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
23. - Day, J. F.; Thorpe, S. R. & Daynes, J. W. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 595.
24. - Paick, J. W. & Kin, S. (1971). *Science.* 174, 114.
25. - Monnier, U. M.; Stevens, U. L. & Cerami, A. (1979). *J. Exp. Med.* 150, 1098.
26. - Mach, B.; Faust, C. & Vasalli, P. (1973). *Procl. Natl. Acad. Sci.* 70, 451.
27. - Fridovich, I. & Westheimer, F. H. (1962). *J. Am. Chem. Soc.* 84, 3203.
28. - Tsal, C. S. (1980). *Biorganic. Chem.* 9, 176.
29. - Chow, W. S. (1980). Thesis P. D. Ohio University.
30. - Weisgraber, K. H.; Inerarity, T. L. & Mahley, R. W. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 9053.
31. - Lane, R. S. & Dekker, E. E. (1968). *Fed. Proc.* 27, 585.
32. - Means, G. E. & Feeney, R. E. (1968). *Biochemistry.* 7, 2192.
33. - Ordman, A. B. & Kirkwood, S. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 1320.
34. - Curtis, L. K. & Witzum, J. L. (1983). *Am. Soc. Clin. Invest.* 72, 1427.
35. - Witzum, J. L.; Steinbrecher, U. P.; Fisher, M. & Kesanie mi, A. (1983). *Procl. Natl. Acad. Sci.* 80, 2757.
36. - Allen, D. U.; Schroeder, W. A. & Baloy, J. (1958). *J. Am. Chem. Soc.* 80, 1923.
37. - Fluckiger, R. & Winterhalter, K. H. (1976). *F.E.B.S. Letters.* 71, 356.
38. - Gantl, U.; Stevens, V. J. & Peterson, C. M. (1982). *Diabetes.* 31, 15.

- 39.- Pecoraro, C. R.; Oraff, J. R.; Halter, D. J.; Deiter, H. & Porte, D. (1979). *Diabetes*. 28, 1120.
- 40.- Abraham, E. C.; Hufe, T. Cope, N.; Wilson, J.; Dransome, C. & Huisman, T. (1978). *Diabetes*. 27, 931.
- 41.- Goldstein, D. E. (1982). *Diabetes*. 31, 70.
- 42.- Kennedy, L. (1982). *Diabetes*. 31, 52.
- 43.- Monnier, M. V. & Cerami, A. (1982). *Diabetes*. 31, 57.
- 44.- Mc.Millan, E. D. & Cerami, A. (1982). *Diabetes*. 31, 64
- 45.- Mc.Farland, F. K. (1979). *Diabetes*. 28, 1011.
- 46.- Davis, R. E. & Nicol, D. J. (1978). *The Lancet* 350.
- 47.- Kynoch, P. A. M. & Lehman, H. (1977). *The Lancet* 16.
- 48.- Hawort, W. N. & Jones, W. G. M. (1944). *J. Am. Chem. Soc.* 66.
- 49.- Klee, C. B.; Vanaman, Thomas, C. (1982). *Advan. Prot. Chem.* 35, 2132.
- 50.- Dedman, J. R.; Potter, J. D.; Jackson, R. L.; Johnson, J. D. & Means, A.R. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 8415.
- 51.- Cheung, W. Y. (1979). *J. Biol. Chem.* 246, 2859.
- 52.- Cheung, W. Y. (1980). *Science*. 207, 19.
- 53.- Kretzinger, R. H. (1980). *C.R.C. Crit. Rev. Biochem.* 8, 119.
- 54.- Mc.Millan, Donald, E. J.; Nyle, G. V. (1978). *Diabetes*. 27, 201
- 55.- Mc.Donald, M. J.; Shapiro, R. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 2327.
- 56.- Kenneth, H. G. (1979). *Diabetes*. 28, 152
- 57.- Haney, D. N.; Bunn, H. F. (1976). *Biochemistry*. 3, 3534.
- 58.- Day, J. F. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 7394.
- 59.- Cos, J. A. (1982). *Metal Ions*. 17, 215.
- 60.- Gopalakrishna, R. & Anderson, W. B. (1981)
- 61.- Tanaka, T. & Hidaka, H. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 11070.
- 62.- Richman, P. G. & Klee, C. B. (1978). *J. Biol. Chem.* 254,

- 63.- La Porte, D. C.; Wierman, D. M. & Storm, D. R. (1980). *Biochemistry*. 19, 3314.
- 64.- Dedman, J. R. & Kaetzel, M. A. (1985). *Methods in Enzymology*. 102, 1.
- 65.- Fisher, R. W.; C. de Jong; Voight, E.; Berger, W. & Winterhalter, K. H. (1980). *Clin. Lab. Haematol.* 2, 129.
- 66.- Pederson, P. L. & Hüllinhen, J. (1981). *J. Biol. Chem.* 259, 15148.
- 67.- Means, A. R. & Dedman, J. R. (1980). *Nature*. 285, 73.
- 68.- Means, G. E. & Chang, M. K. (1982). *Diabetes*. 31 suppl.3, 1.
- 69.- Nicol, D. (1983). *Pathology*. 15, 443.
- 70.- Lloyd, D. & Harpless, J. (1984). *Clin. Chem.* 30, 1686.
- 71.- Roth, M. (1983). *Clin. Chem.* 29, 1991.
- 72.- Williams, S. K.; Howart, M. L.; Devenny, J. J.; Bitensky, M. U. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 21, 6546.
- 73.- Holmquist, U. R. & Schroeder, U. A. (1966). *Biochemistry*. 5, 2504.
- 74.- Klagsbrun, M. & Furano, A. V. (1975). *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 529.
- 75.- Ebashi, S. & Kodama, A. (1965). *J. Biol. (Tokio)* 58, 107.
- 76.- Ebashi, S.; Endo, M. & Ohtsuri, I. (1969). *Q. Rev. Biophys.* 2, 139.
- 77.- Cheung, W. Y. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 533.
- 78.- Kakiuchi, S. & Yamazaki, R. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1104.
- 79.- Teo, T. S. & Wang, J. H. (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 595.
- 80.- Teo, T. S. & Wang, J. H. (1973). *J. Biol. Chem.* 249, 503.
- 81.- Lin, Y. M.; Li, Y. P. & Cheung, W. Y. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 4993.
- 82.- Klee, C. D. (1977). *Biochemistry*. 16, 1017.
- 83.- Wolff, D.; Pairier, P. G.; Brostrom, C. O. & Brostrom, M.

- A. (197). *J. Biol. Chem.* 252, 4100.
84. - Watterson, D. M.; Mendel, P. A & Vanaman, T. C. (1980). *Biochemistry.* 19, 2672.
 85. - Jarret, H. U. & Penniston, J. T. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 4676.
 86. - Kobayashy, R.; Tavata, M. & Hidaka, H. (1979). *Metabolism.* 28, 169.
 87. - Yaqir, Yazawa, M.; Kakiuchi, S.; Oshima, M. & Venishi K. (1970). *J. Biol. Chem.* 853, 1330.
 88. - Nairn, A. C.; & Perry, S. V. (1979). *Biochem. Journal* 179, 89.
 89. - Grand, R. J. A. & Perry, S. V. (1979). *Biochem. Journal.* 103, 205.
 90. - Morgan, D. W.; Kim, S.; Campbell, B. J.; Cheung, U. Y. & Lynch, T. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 205, 510.
 91. - Waisman, D.; Stevens, F. C. & Wang, J. H. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 75.
 92. - Waisman, D.; Stevens, F. C. & Wang J. H. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 1106.
 93. - Smoake, J. At Song, S. Y. & Cheung, U. Y. (1974). *Biochem. Biophys. Acta.* 341, 402.
 94. - Chafouleas, J. G.; Dedman, J. R.; Munjaal, R. P. & Means, A. R. (1977). *J. Biol. Chem.* 254, 10262.
 95. - Drabikowski, U.; Kusnicki, J. & Grabarek, Z. (1977). *Biochim. Biophys. Acta.* 485, 1244.
 96. - Watterson, D. M.; Sharief, F. & Vanaman, T. C. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 962.
 97. - Watterson, D. M.; Harrelson, W. G.; Keller, P. M.; Sharief, F. Vanaman, T. C. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 4501.
 98. - Shenolikar, S.; Cohen, P. T. U.; Cohen, P.; Nairn, A. C. & Perry, S. V.. *Eur. Jour. Biochem.* 100, 329.
 99. - Jackson, R. L.; Dedman, J. R.; Schreiber, W. E.; Bhatnagar, P. K.; Knapp, R. D. & Means, A. R. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 723.
 100. - Bornstein, P. (1974). *Annu. Rev. Biochem.* 43, 567.
 101. - Cavallini, P.; Frederici, G.; aroni, E. (1970). *Eur. J. Biochem.* 14, 169.

- 102.- Gardos, G. (1956). *Acta Physiol. Hung.* 10, 105.
- 103.- Simons, T. J. D. (1976). *J. Physiol.* 256, 22.
- 104.- Dunn, M. J. (1974). *J. Physiol.* 35, 97.
- 105.- Chau-Wong & Seeman, P. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 241, 473.
- 106.- Copinath & Vincenzi. (1977). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 77, 1203.
- 107.- Jarret & Penniston. (1977). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 77, 1210.
- 108.- Jarret & Penniston. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 46474.
- 109.- Jarret & Kite. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 0207.
- 110.- Mac Intyre & Green (1978). *Biochem. Biophys. Acta* 510, 373.
- 111.- Larsen, F. L.; Raess, B. U.; Hinds, T. R. Vincenzi, F. F. (1978). *J. Supramol. Struct.* 9, 269.
- 112.- Hinds, T. R.; Larsen, F. L. Vincenzi, F. F. (1978). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 81, 455.
- 113.- Larsen & Vincenzi. (1977). *Science.* 204, 306.
- 114.- Huytack & Castéels. (1980). *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 88, 1.
- 115.- Waisman, D. M.; Gimble, J. M.; Goodman, D. D. P. & Rasmussen, H. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 409.
- 116.- Walsh & Stevens (1977). *Biochemistry.* 16, 2742.
- 117.- Walsh & Stevens (1978). *Biochemistry* 17, 3942.
- 118.- Kusnicki, J.; Ofabarek, Z.; Breska, H.; Drabikowski, U. & Cohen P. (1981). *F.E.B.S. Letters* 130, 141.
- 119.- Thyri, P.; Vandermeers, A. & Vandermeers-Piret, M. C. (1980). *Eur. J. Biochem.* 103, 409.
- 120.- Van El Dick, L. J.; Groosman, A. R.; Iverson, D. D. & Watterson, D. M. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 1912.
- 121.- Sitaramayya, A.; Urigh, L. S. & Siegel, F. L. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 0094.
- 122.- Oagnon, C.; Kelly, S.; Manganiello, V. & Vaughan, M. (1981). *Nature.* 291, 515.

- 123.- Tager, H. S. & Steiner, D. F. (1974). *Annu. Rev. Biochem.* 43, 507.
- 124.- Chang, C. N. & Chang, F. N. (1975). *Biochemistry* 14, 468.
- 125.- Neurath, H. & Walsh, K. A. (1976). *Procl. Natl. Acad. Sci.* 73, 3825.
- 126.- Childers & Siegel. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 405, 77.
- 127.- Vanaman, T. C.; Sharief, F.; Awramik, J. L. & Watterson, D. M. (1976) En: "Contractil Systems in non-muscle" Elsevier pp. 53-72.
- 128.- Ord, H. G. & Stocken, L. A. (1977). *Biochemical Journal* 161, 533
- 129.- Ney, K. A.; Pasqua, J. J.; Colley, K. J.; Guthrow, C. E. & Pizzo, S. V. (1985). *Diabetes* 34, 462.
- 130.- Tietz. "Química Clínica". Primera edición. Edit. Interamericana (1972).
- 131.- Solomon, S. S. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* 611, 112
- 132.- Stevens, C. F.; Walsh, M.; Ho, H. C.; Teo, T. G. & Wang, J. H. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 4495.
- 133.- Truel Holnstein, C. G.; Fisher, R. W. & Winterhalter, K.H. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 6717.
- 134.- Agarwal, K. C.; Parks, R. E.; Widness, J. A.; Schwartz, R. (1985). *Diabetes* 34, 251.
- 135.- Klee, C. B. (1977). *Biochemistry* 16, 1017.
- 136.- Liu, Y. P. & Cheung, W. Y. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 4193.
- 137.- Brownlee, M.; Vlassara, H. & Cerami, A. (1983). *Diabetes* 32, 692.