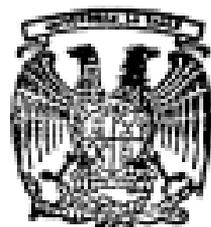


300627



Universidad La Salle

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

" INFLUENCIA DE LAS UNIDADES DE CARBOHIDRATOS SOBRE
LA ESTABILIDAD TERMICA DE LA GLICOPROTEINA ALFA-I "

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el Titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

CLAUDIA ROSAURA CASTRO GUTIERREZ

Director de Tesis: M. en C. José Domingo Méndez F.



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

Introducción	i
Objetivos	ii
Abreviaturas	iii
1. GENERALIDADES	
1.1 Glicoproteínas	1
1.1.1 Carbohidratos	3
1.1.2 Tipos de enlaces	8
1.1.3 Heterogeneidad de las unidades de carbohidratos	13
1.1.4 Funciones	17
1.2 Glicoproteína α_2	21
1.2.1 Propiedades químicas	22
1.2.2 Carbohidratos	
a) Composición química	23
b) Número de cadenas de heteropolisacáridos	34
c) Estudios con enzimas	35
1.2.3 Porción polipeptídica	37
1.2.4 Metabolismo	39

2. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Reactivos	32
2.2 Pruebas de homogeneidad	32
2.3 Analisis cuantitativo de carbohidratos	33
2.4 Hidrolisis enzimatica de las cadenas de oligosacáridos de la glicoproteína α_1	33
2.5 Analisis estructural por Dicroismo Circular	35
2.6 Termestabilidad de la glicoproteína α_1 y de su derivado desializado	
2.6.1 Tratamiento termodinámico de la desnaturalización de una proteína	36
2.6.2 Espectroscopia Diferencial Ultravioleta	40
2.6.3 Desarrollo experimental	41
3. RESULTADOS Y DISCUSION	43
4. CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	55
Apéndice 1	56
Apéndice 2	61
REFERENCIAS	67

INTRODUCCION

Las proteínas constituyen sin duda uno de los grupos de moléculas de particular trascendencia en los seres vivos y se caracterizan, entre otras cosas, por su enorme diversidad funcional. Sin embargo esta diversidad funcional depende de un único fenómeno: la capacidad de las proteínas para interactuar específicamente con un ligando. Esta interacción es estereocómicamente específica y, por tanto, requiere la ordenación espacial precisa y determinada de los grupos de la proteína. A esa conformación particular, biológicamente activa, se le denomina nativa.

La estructura nativa de una proteína se encuentra estabilizada por diversas interacciones: puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas de grupos con carga, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y la interacción recíproca de grupos aromáticos.

El estudio de las glicoproteínas se ha enfocado principalmente a las funciones biológicas de sus unidades de carbohidratos y poco se sabe de la capacidad que éstas tienen para modificar las propiedades físicoquímicas de las proteínas y de qué manera contribuyen para que adquieran su conformación correcta.

1.2.3 OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar la influencia de las unidades de carbohidratos sobre la estabilidad térmica de la glicoproteína α_1 de plasma humano.

Objetivos Particulares.

a) Eliminar enzimáticamente las unidades de carbohidratos presentes en la glicoproteína α_1 .

b) Determinar los parámetros termodinámicos de la desnaturalización térmica de la glicoproteína α_1 y de su derivado libre de carbohidratos.

ABREVIATURAS

- GLNAc** - N-acetilglucosamina
- GalNAc** - N-acetilgalactosamina
- ANA** - Ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico)
- Gal** - Galactosa
- Man** - Manosa
- GP** - Derivado decilizado de la glicoproteína α_1
- GP** - Glicoproteína α_1

I. GENERALIDADES

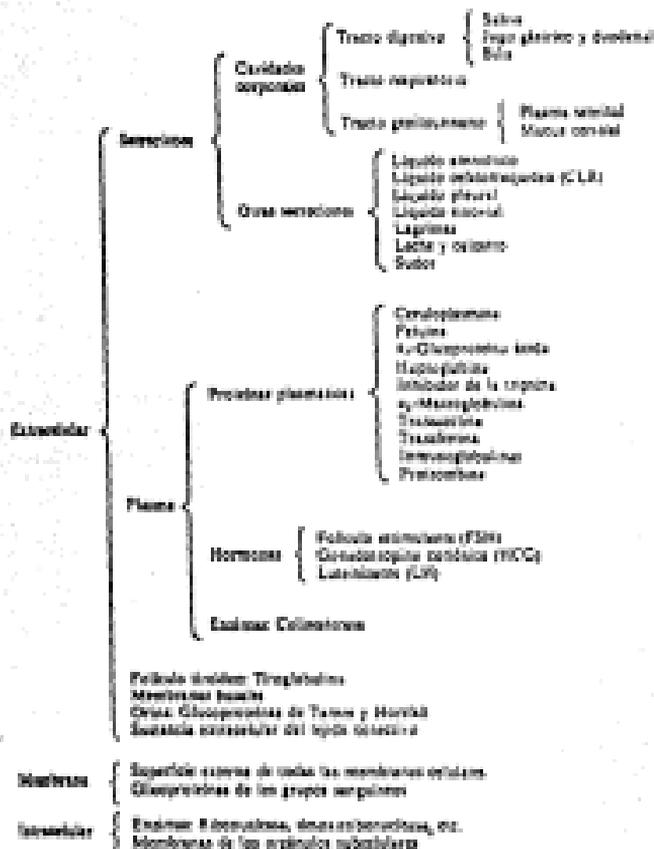
1.1 GLICOPROTEINAS.

Las glicoproteínas son proteínas que se caracterizan por tener cadenas de carbohidratos unidas covalentemente al polipeptido. Estas cadenas forman parte de la estructura molecular de la proteína. Las glicoproteínas se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos vivos, presentándose en hongos, plantas, virus, bacterias y células animales. Estas moléculas son componentes comunes en la superficie de células animales, también se encuentran como constituyentes de los lisosomas y junto a productos que exporta la célula. Los productos secretados funcionan como enzimas, hormonas, inmunoglobulinas y factores de transferencia del suero (Tabla I). Los carbohidratos en las glicoproteínas están implicados también en el transporte de metabolitos a través de la membrana celular, inserción y orientación adecuada de las glicoproteínas en la membrana plasmática, en la secreción y en la protección contra la degradación proteolítica (II).

Aunque las glicoproteínas son abundantes en las células eucarióticas, las funciones biológicas de sus cadenas de oligosacáridos no se han elucidado. Sin embargo, tal abundancia sugiere su importancia en algún proceso fisiológico universal no definido aún.

Se ha demostrado que muchas estructuras constituidas de unidades de carbohidratos en glicoproteínas se han conservado a

Tabla 3— DISTRIBUCION DE LAS GLICOPROTEINAS



través de la evolución y que la glicosilación es un proceso costoso para el organismo en términos de energía y materiales, reforzando la creencia de que estas unidades tienen funciones biológicas importantes (2).

1.1.1 CARBOHIDRATOS

Una proteína que contenga un monosacárido unido covalentemente, puede ser considerada una glicoproteína. Considerando una proteína con el peso molecular de la seroalbúmina que contenga una molécula de hexosa, su contenido de carbohidratos sería del 0.28 % . Sin embargo, las glicoproteínas contienen más que esta cantidad. El intervalo es muy amplio, y varía desde menos del 1 % hasta más del 80 % de la masa de la glicoproteína (3).

Tabla II—Tamaño, Número y Tipo de Oligosacáridos en algunas Glicoproteínas.

Proteína	carbo- hidra- tos (%)	oligo- sacáridos unidades/ moléculas	residuos por oligosacárido	Tipo de oligo- sacáridos (No.)
Droscucoide	41.4	5	18	1
Haptoglobina	19.6	19	14	1
Fetúna	23.9	3	3 - 20	2
Ribonucleasa B	11.3	1	8	1
Transferrina	5.9	2	12	1
Tiroglobulina	10.6	24	6 - 25	2
Ovalbúmina	3.2	1	8	1
Mucina submaxilar de ovino	39.4	800	2	1
Glicoproteína de acebrera de eritrocito	64.5	20	4 - 12	2

En la Tabla II, se presenta el porcentaje de carbohidratos de varias glicoproteínas bien caracterizadas. Los carbohidratos que se encuentran principalmente son : dos hexosas (D-galactosa y D-manosa), dos N-acetilhexosaminas (N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-galactosamina), una pentosa (L-fucosa) y un ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico o ácido N-glicolilneuramínico). La glucosa puede presentarse en algunas glicoproteínas, como en la colágena. Las estructuras de estos azúcares se muestran en la figura 1.

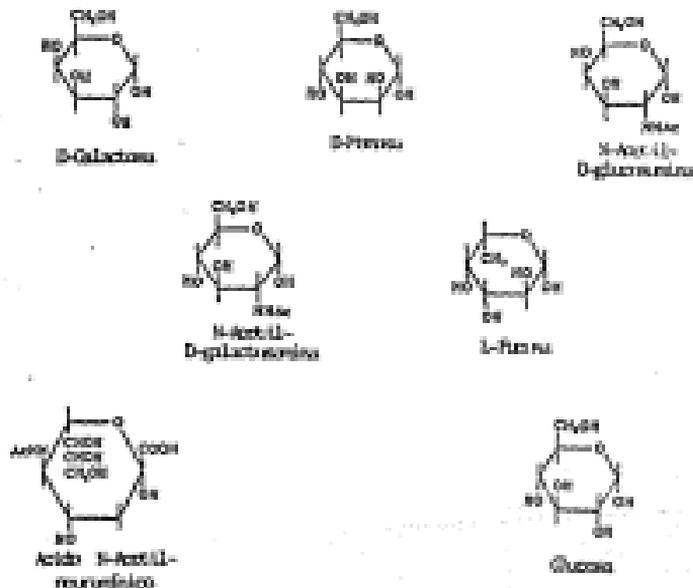


Fig. 1

Los carbohidratos en las glicoproteínas pueden encontrarse formando un oligosacárido relativamente largo o en varios oligosacáridos pequeños unidos a la cadena peptídica. El número de unidades de oligosacáridos por molécula de glicoproteína varía de 1 a 200. (Tabla II). Algunos de estos son simples disacáridos. La mucina submaxilar de ovino, por ejemplo, contiene un disacárido que consta de N-acetilneuraminil-N-acetilgalactosamina unida a los grupos hidroxilo de serina o treonina de la cadena peptídica. Otras glicoproteínas como el orosomucoide, contiene cadenas largas de oligosacáridos muy ramificadas, compuestas de ácido N-acetilneuramínico (ANAN), fucosa, galactosa, manosa y N-acetilglucosamina (GluNAc). En la Tabla II, se muestra también la variación en el número de residuos que hay por oligosacárido en las diferentes proteínas.

La mayoría de las glicoproteínas consisten en unidades de carbohidratos con un solo patrón estructural. Sin embargo, algunas proteínas tienen cadenas de oligosacáridos de más de un tipo (Tabla II).

Hasta ahora se conocen las estructuras, ya sea completas o parciales, de unidades de carbohidratos de algunas proteínas. La elucidación de la estructura de oligosacáridos en glicoproteínas puede llevarse a cabo por eliminación secuencial de azúcares con glicosidasas específicas, oxidación con periodato, degradación secuencial alternando con periodato, reducción con borohidruro

acompañada de una hidrólisis ácida suave (degradación de Smith), y la metilación e identificación de metil éteres de monosacáridos seguida de una hidrólisis ácida (Tabla III). En la Tabla IV, se enlistan algunas glicoproteínas cuyas estructuras de oligosacáridos se han caracterizado completamente.

Tabla III

DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA		
Muestra	Reactivos	Observación
Carbón activo	ácido clorhídrico (HCl) o H ₂ SO ₄ o ácido de poliacrilato clorhídrico	Clasificación de azúcar
Carbón activo (poliacrilato)	ácido clorhídrico débil y compuestos relacionados	Cuando glicoproteína separada de la proteína
Carbón activado	Fluorhidruro Fluorborato Fluoruro (Ag) glicofluorhidruro relacionados	ácido oxálico Cianuro Cloruro Ioduro
Carbón con ácido perclórico (degradación suave de Smith)	1° Ácido perclórico (O ₂) 2° Ácido de Lewis y ácido de Lewis 3° Ácido clorhídrico	Polimerización de azúcar a la proteína ↓ Metilación de azúcar ↓ Clasificación de azúcar
Metilación	Yodo de metilo o yodo de metilo	Metilación de azúcar
Amidación	ácido acético en estado sólido	Acetilación y conversión de proteína a O ₂ libre
Hidroximetil- formosol	Formosol	Formosol para hidrólisis
Cloruro	ácido clorhídrico (HCl) 0.5% - 1%	ácido oxálico Cianuro Ioduro

Tabla IV— Glicoproteínas cuyas estructuras de oligosacáridos han sido caracterizadas completamente (3).

Glicoproteína	Fuente
α -2 Macroglobulina	Suero humano
Substancias de grupos sanguíneos	Ovario humano
Bario α -2 glicoproteína	Suero humano
Gonadotropina coriónica	Orina humano
Colágena de la membrana basal	Varias
Desoxirribonucleasa	Páncreas bovino
Glicoproteína de eritrocitos	Eritrocitos humanos.
Fetucina	Suero bovino
Fibrinógeno	Plasma bovino
IgG inmunoglobulinas	Suero humano
IgM inmunoglobulinas	Suero mieloma humano
Oncoembrión	Suero humano
Ovalbumina	Huevo gallina
Ribonucleasa B	Páncreas bovino
Mucina submaxilar	Submaxilar de ovino
Mucina submaxilar	Submaxilar de porcino
Tiroglobulina	Tiroides de bovino
Ceruloplasmina	Suero humano

La comparación de estructuras de algunos oligosacáridos, revela que hay ciertos enlaces que aparecen frecuentemente en las glicoproteínas de mamíferos. La estructura común es el heteropolisacárido con la siguiente secuencia: ácido siálico (o fucosa) - galactosa - GluNAc - manosa. Esta estructura, que se muestra en la figura 2 está presente en la fetucina, macroglobulina α_2 , oncoembrión, tiroglobulina, fibrinógeno, gonadotropina coriónica, glicoproteína α_2 bario, en las membranas basales del glomerulo, inmunoglobulinas y otras (3).

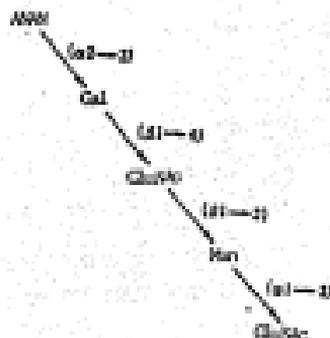


Fig. 1 Estructura común presente en el glicopéptido.

1.1.2 TIPOS DE ENLACES

Un rasgo estructural característico en las glicoproteínas es el tipo de unión de la porción carbohidrato a la cadena peptídica. En las glicoproteínas de mamíferos se han encontrado tres tipos de enlaces entre el polipeptido y los glucidos (3). El primero de estos constituye un enlace glicosídico entre el carbono anómérico de la GluNAc y el grupo amida de la asparagina, figura 3. Este tipo de enlace se encuentra en proteínas de plasma que son sintetizadas en el hígado, así como en las inmunoglobulinas. También se encuentra en la ovalbumina, ribonucleasa B y en muchas otras proteínas, incluyendo las hormonas que son glicoproteínas.

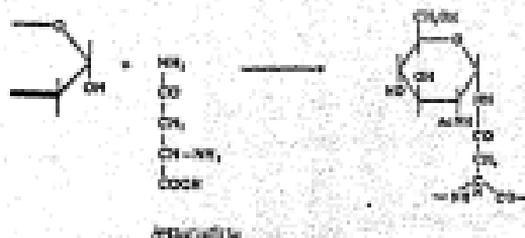


Fig. 3 Enlace N-glicosídico

El segundo tipo de enlace entre carbohidrato y proteína es el α -O-glicosídico, entre el carbono anomérico de un azúcar (generalmente GalNAc en glicoproteínas de mamíferos) con el grupo hidroxilo de serina y treonina, figura 4. Este enlace está presente en la mayoría de mucinas epiteliales, incluyendo las mucinas submaxilares, las sustancias del grupo sanguíneo y también en la glicoproteína principal de los eritrocitos humanos. Algunas glicoproteínas tienen ambos tipos de enlace (el N-glicosídico y el tipo O-glicosídico), por ejemplo la glicoproteína principal de los eritrocitos humanos, la fetuina, la gonadotropina coriónica humana y algunas inmunoglobulinas.

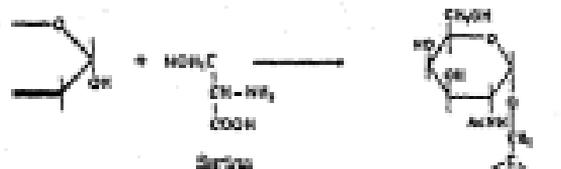


Fig. 4 Enlace O-glicosídico

El tercer tipo de enlace se ha encontrado en la colágena y en la membrana basal del glósculo. Este consiste en un enlace β entre el grupo reductor de la galactosa y el grupo hidroxilo de la hidroxilisina.



Fig. 5 Enlace O-glicosídico con hidroxilisina

No todos los residuos de aminoácidos potencialmente enlazanti con carbohidratos (asparagina, serina, treonina, hidroxilisina) en una glicoproteina dada, estan unidos a oligosacáridos. Por consiguiente debe existir algún sitio en la cadena peptidica que sirva de reconocimiento y dirija la ubicación de las cadenas de oligosacáridos. Después de que las unidades de oligosacáridos comienzan a sintetizarse por la adición de monosacáridos a la cadena creciente de carbohidratos, el primer paso de la glicosilación involucra a los sitios de reconocimiento en la cadena peptidica. La secuencia de aminoácidos alrededor de la asparagina unida a GluNAc, se ha estudiado en numerosas glicoproteinas. En la Tabla V se muestra que la secuencia Asn-X-Ser (o Thr) puede ser la señal para la formación de este tipo de glicopéptido. La secuencia en el extremo amino terminal del enlace de asparagina no parece llevar ningún patrón específico (3).

Tabla V.— Secuencia de aminoácidos alrededor del enlace Asparagina-Oligosacárido de algunas glicoproteínas (30).

CNO			
	↓		
Glu-Lys-Tyr-	Asn	-Leu-Thr-Ser	Ovalbúmina
Leu-Ile-His-	Asn	-Arg-Thr-Gly	Ovotransferrina
Leu-Gly-Ser-	Asn	-Met-Thr-Ile	Avidina (Asn-17)
Gln-Gln-Phe-	Asn	-Ser-Thr-Ile	IgG, cadena H, conejo
Ala-Ser-Gln-	Asn	-Ile-Ser-Asn	IgG, cadena H, ratón
Ala-Leu-Glu-	Asn	-Ala-Thr-Arg	Tiroglobulina humana
Ser-	Asn	-Ala-Thr	BHase, bovino
Lys-Ser-Arg-	Asn	-Leu-Thr-Lys	BHase B, bovino (Asn-34)
Ser-Ser-Ser-	Asn	-Ser-Ser-Asn	BHase, porcino (Asn-21)
Ser-Arg-Arg-	Asn	-Met-Thr-Gln	BHase, porcino (Asn-34)
Tyr-Gln-Ser-	Asn	-Ser-Thr-Met	BHase, porcino (Asn-76)
Pro-Ile-Thr-	Asn	-Ala-Thr-Leu	Orosomucoide
	Asn	-Lys-Ser	Orosomucoide
	Asn	-Lys-Thr	Orosomucoide
	Asn	-Thr-Thr	Orosomucoide
	Asn	-Gly-Thr	Orosomucoide

1.1.3 HETEROGENEIDAD DE LAS UNIDADES DE CARBOHIDRATOS

Las cadenas de carbohidratos de las glicoproteínas presentan heterogeneidad estructural, también denominada microheterogeneidad.

La microheterogeneidad puede ser de varios tipos. Un tipo que aparece en la mayoría de las glicoproteínas estudiadas, consiste en que algunas moléculas presentan cadenas incompletas de los oligosacáridos constituyentes. Algunas moléculas que presentan esta microheterogeneidad son la macroglobulina α_2 de plasma humano, las mucinas submaxilares de porcino, la ovalbúmina y el orosomucoide humano (4). Es probable que en la mayoría de las glicoproteínas, incluyendo las que son hormonas, exhiban una microheterogeneidad de este tipo (3).

Otro tipo de microheterogeneidad es el isomerismo posicional, sirva como ejemplo el orosomucoide de plasma humano (glicoproteína α_1), que puede contener ANAN unido a galactosa en enlaces 2-3, 2-4 o 2-6. No se sabe todavía, si este isomerismo es al azar o es un fenómeno estructural específico con un enlace dado, que aparece solamente en ciertas unidades de oligosacáridos (5).

No hay evidencias claras para una heterogeneidad en la que haya substitución de un azúcar por otro, esto es consistente con la alta especificidad de las glicosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de las glicoproteínas. La microheterogeneidad se presenta tanto en moléculas que contienen una cadena de carbohidratos como en aquellas que contienen varias. Mientras que en algunas glicoproteínas esta heterogeneidad pueda ser identificada en

la molécula intacta por diferencia de carga (si el Acido siálico es una variante), en otras puede establecerse por diferencia de tamaño, si la porción de carbohidratos representa una parte substancial del peso total (5).

La causa fundamental de la heterogeneidad de las unidades de carbohidratos de las glicoproteínas puede encontrarse en el mecanismo operativo de su biosíntesis. La biosíntesis de la cadena peptídica de las glicoproteínas indudablemente comienza a nivel ribosomal a través de la operación del RNA mensajero (mRNA) que transfiere directamente los aminoácidos del aminoácil RNA de transferencia (tRNA). Está bien establecido que la formación de las cadenas de oligosacáridos de las glicoproteínas son el resultado de la transferencia secuencial de grupos glicosil del azucar-nucleótido a acepciones específicas en la cadena creciente de oligosacáridos. La terminación de la cadena se lleva a cabo por la adición de fucosa o ANAN en el extremo no reductor de la cadena (3). Como las proteínas pasan a través de los canales del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, donde la glicosilación se lleva a cabo, ahí no siempre existe la oportunidad de que todas las transferasas actúen en una cadena de carbohidratos que se va sintetizando. Si no se requiere que las unidades de carbohidratos se completan antes de que la glicoproteína pueda abandonar la célula, moléculas con diferentes estados de síntesis podrían ser exportadas y el grado de terminación dependería de la rapidez con la que el precursor de la proteína pasa a través de la membrana del retículo (5).

También es posible que el ataque de un azúcar cargado, como el ácido silílico, a una ramificación de la cadena de oligosacáridos, antes de que se complete la cadena principal de sacáridos, provoque un impedimento estérico a la acción de las glicosiltransferasas. En las unidades de carbohidratos de las glicoproteínas de las glándulas submaxilares, por ejemplo, tal ataque prematuro de un residuo silílico en la GluNAc interna, podría evitar la unión de los azúcares externos. Similarmente, el ataque inicial de residuos silílicos en las cadenas de oligosacáridos unidos a asparagina, por impedimento estérico, podría interferir en la terminación de las cadenas similares en la misma unidad. Esto sin embargo, ocurriría solamente si las glicosil transferasas ubicadas en la membrana no están efectivamente segregadas, actuando sobre las unidades de carbohidratos en diversos estados de síntesis (3).

Como se ha indicado, el sitio de ataque del primer azúcar a la cadena peptídica es aún controvertido. Los estudios de la secuencia temporal de ensamble de las cadenas de oligosacáridos de una inmunoglobulina y otra glicoproteína, sugieren que algunas de las unidades de glucosamina y todas las de manosa se unen a la glicoproteína al inicio del proceso de síntesis de la proteína, y se lleva a cabo en el retículo endoplásmico liso, en el aparato de Golgi y posiblemente en la membrana plasmática (3).

Hay evidencias que indican que la mayoría de las transferasas involucradas en esta transglicosilación están unidas a la membrana

(3). Podría ser que la GlNAc y manosa internas se unen primero a la cadena creciente de oligosacáridos y como la glicoproteína se mueve a través de los canales del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, las transferasas unidas a la membrana a veces agregan un azúcar a las unidades de oligosacáridos.

La secuencia de los azúcares y la naturaleza de los enlaces, por lo tanto depende de la especificidad de las glicosiltransferasas y la disponibilidad de una fuente apropiada de azúcar-nucleótidos, que son moléculas donadoras. Se concluye a partir de estudios realizados con antígenos de grupos sanguíneos que, la estructura de las unidades de carbohidratos se determina por la disponibilidad de las glicosil transferasas específicas, de modo que estas estructuras son productos secundarios de los genes, siendo los productos primarios las enzimas antes mencionadas. Varios alteraciones hereditarias del metabolismo, son debidas a deficiencias de enzimas específicas cuya función es hidrolizar las cadenas de sacáridos de los proteoglicanos; una clase de glicoproteínas de tejido conectivo (2).

La posibilidad de que la maquinaria catabólica de las glicoproteínas sea responsable de la heterogeneidad de las unidades de carbohidratos, no puede ser descartada, en particular porque el conocimiento de este proceso es escaso. Las glicosidasas están ampliamente distribuidas en los tejidos y participan en el metabolismo de las glicoproteínas. Se cree que estas enzimas están situadas únicamente en los lisosomas, pero estudios recientes

indican que se pueden encontrar también unidas a la membrana plasmática de las células. Estas enzimas podrían degradar las unidades de carbohidratos de una glicoproteína en su paso hacia la célula o fuera de ella (3).

1.2.4 FUNCIONES.

Existe mucha incertidumbre sobre el significado biológico de los carbohidratos en las glicoproteínas. Está claro que la actividad biológica de ciertas glicoproteínas se modifica por la eliminación de los carbohidratos. Así, la actividad *in vivo* de la eritropoyetina, la gonadotropina coriónica y la FSH de pituitaria es virtualmente destruida por un tratamiento con neuraminidasa. Por otro lado, la actividad de varias glicoproteínas de transporte y de enzimas que son glicoproteínas, no son modificadas por la reacción enzimática del ácido siálico. Algunos ejemplos incluyen la haptoglobina, transferrina, fosfatasa alcalina, colinesterasa de suero y ribonucleasa (3).

El trabajo de Morell (6) demuestra que la desialización de varias glicoproteínas del plasma y hormonas que son glicoproteínas, provoca que se eliminen rápidamente de la circulación. Esta reacción parece que se debe a la exposición de una galactosa que se une a las membranas de las células del parénquima hepático. Dicha eliminación rápida, podría causar la pérdida de actividad de la FSH, gonadotropina coriónica y hormonas eritropoyéticas, si son tratadas con neuraminidasa. Sin embargo se ha demostrado que la gonadotropina

eritrocítica y la eritropoietina, después de este tratamiento, conservan su actividad biológica cuando se prueban *in vitro*. Puesto que la actividad se conserva, es posible que la protección sea una función de los carbohidratos en las glicoproteínas (3).

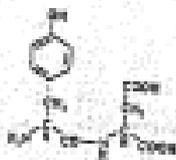
Exler en 1965 sugirió que la unión de los carbohidratos a las glicoproteínas es un paso necesario para la secreción de la glicoproteína de la célula. Señaló que la mayoría de las proteínas intracelulares no contienen cantidades significantes de carbohidratos, mientras que aquellas que son extracelulares si los contienen. Aunque esta hipótesis es atractiva, la información disponible no proporciona evidencias suficientes para comprobar esto (3).

Está bien establecido que ciertas proteínas como el caseína, son relativamente resistentes a la hidrólisis por enzimas proteolíticas y que su resistencia decrece con la eliminación enzimática del ácido siálico. Por esta razón, debe ser considerada la posibilidad de que el papel de los carbohidratos sea proveer resistencia a dicha proteólisis (3).

La presencia de grandes cantidades de carbohidratos con muchos grupos de ácido siálico, cargados negativamente, como ocurre especialmente en las mucinas y en ciertas glicoproteínas de la membrana, produce una proteína extendida cuyo destino difiere al de una proteína compacta de peso molecular comparable. Una proteína ácida extendida, como lo señaló Ogston (7) en el estudio de mucopolisacáridos ácidos, es el resultado de transfer dominicos, son

en concentraciones muy bajas. Esto podría formar una matriz con las propiedades de un gel de exclusión altamente cargado. Es posible que dichas propiedades tengan un significado importante en las mucinas y en la periferia de las células.

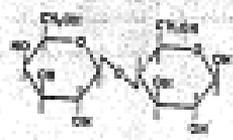
Otra suposición considera la posibilidad de que los carbohidratos actúan como sitios de reconocimiento. La cantidad de información que puede ser llevada en un simple disacárido es mayor que en un péptido simple. Esto se ilustra en la fig. 6. Un par de aminoácidos puede ser combinado de una sola forma. Sin embargo, dos azúcares pueden combinarse en 16 diferentes formas. Como el anillo de los azúcares es rígido, cada uno de éstos es de forma distinta y los grupos hidroxilo están orientados en direcciones completamente diferentes formando puentes de hidrogeno con otras macromoléculas. Es posible que la especificidad de las glicoproteínas por tejidos blanco implique la alta selectividad inherente en la estructura de sus carbohidratos (3).



No. cit. freem.

Diapylid.

L-citrullin-L-arginate



10

- 1-4
- 1-6
- 2-3
- 2-6

Diapylid.

D-glucosyl-D-glucoside

Fig. 6

1.2 GLICOPROTEINA α_1

La glicoproteína α_1 , es una globulina presente en el plasma humano y se distingue de las otras proteínas del plasma por las propiedades siguientes :

- (1) alto contenido en carbohidratos (45% de su peso)
- (2) un elevado número de residuos de ácido siálico
- (3) microheterogeneidad periférica, probablemente debida a los diferentes enlaces entre el ácido siálico-galactosa
- (4) punto isoeléctrico muy ácido
- (5) solubilidad elevada en agua y en ciertos solventes polares en los que otras proteínas serían desnaturalizadas por completo
- (6) elevado número de sustituciones en los aminoácidos
- (7) homología significativa con las inmunoglobulinas

El punto isoionico de la glicoproteína α_1 se encuentra a pH 3.59 (9). Este valor considerablemente bajo, probablemente el más bajo de las proteínas de plasma humano se debe al elevado número de residuos de ácido siálico. Los puntos isoionicos de las formas poliédricas parcialmente separadas de esta proteína se encuentran de pH 3.54 a 3.32 (9).

El punto isoelectrico de la glicoproteína α_1 , teniendo la capacidad de unir aniones de la proteína, depende, por lo tanto, del tipo de concentración de aniones presente en el sistema usado para

el análisis y podría ser tan bajo como pH 1.0 (10). La glicoproteína α_1 desializada, también fue estudiada en función de alguna de sus propiedades fisicoquímicas (11) obteniendo un punto isoelectrico a pH 5.4.

1.2.1 PROPIEDADES QUÍMICAS.

La glicoproteína α_1 está compuesta de una porción de carbohidratos y de un polipéptido, sus constituyentes aproximadamente el 45 y 55% de su peso, respectivamente. El contenido de carbohidratos es muy elevado, el de nitrógeno es bajo (10.7 %), tabla VI. Esta globulina está libre de colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos y ácido hialurónico.

Tabla VI— Composición Química de la Glicoproteína α_1 de Plasma Humano (8).

Propiedades	Valores
Nitrógeno, %	10.7
Proteína, %	55
Aminoácidos Terminales	
Amino terminal	Ácido pirrolidino-carboxílico (1 mol/mol)
Carboxilo terminal	Serina (1 mol/mol)
Carbohidratos, %	45
Ácido siálico	11-12
Hexosas neutras	12-17
Hexosamina	12-15
Fucosa	0.7-1.5

1.2.2 CARBOHIDRATOS.

a) Composición química.

Jasson en 1972 (12), identificó los cinco monosacáridos de la glicoproteína α_1 . La variación en el contenido de carbohidratos de esta glicoproteína (tablas VI y VII) puede deberse a los diferentes métodos y técnicas de análisis para su cuantificación. El contenido de ácido siálico, varía muy poco mientras que el contenido de fucosa varía en un 100%. Como se puede observar en las tablas VI y VII, la porción de carbohidratos está constituida aproximadamente por 11% de ácido siálico, 14% de hexosas neutras, 14% de hexosamina y el 1% de fucosa. Es decir que un mol de proteína (Mr 40,000) contiene 14 residuos de ácido siálico, alrededor de 34 residuos de hexosas neutras, 31 residuos de GluNAc y 2 residuos de fucosa. Las hexosas neutras, galactosa y manosa, se encuentran en relación 1:1 a 2:1 (13) con un promedio de 1.4:1.0, i.e., 6% de galactosa y 6% de manosa (Tabla VII). Solamente se encontró un tipo de hexosamina, la glucosamina. De los derivados del ácido neuramínico conocidos presentes en las glicoproteínas de mamíferos, solamente el derivado N-acetil está presente en la glicoproteína α_1 (13,14).

Tabla VII— Composición de los Carbohidratos presentes en la Glicoproteína α_2 de Plasma humano.

Referencia ^a	Acido Hexosámi- neuramínico (%)	Total de			
		Polisacáridos D-Hexosa	Hexosas Neutras (%)	D-Glucos- amínico (%)	L-Fucosa (%)
Yasashima (1960)	10.0	1.95	14.2	1.3	1.0
Berkovainy y Minzler (1960)	12.5	ND ^b	14.4	1.3	1.5
Schultze (1960)	12.1	2.00	14.7	1.9	0.7
Huges y Jeanloz (1960)	10.9	1.39	13.1	1.2	0.7
Issura y Schmid (1960)	11	1.40	15	1	ND ^b
Promedio	11.4	1.40	14.3	1.1	1.0

^a ND, no determinado.

^b Ver 100

b) Número de cadenas de heteropolisacáridos.

Satake y colaboradores (15) después de la digestión proteolítica de la glicoproteína α_2 , separaron 5 glicopéptidos en su forma pura y concluyó que esta proteína posee 5 unidades de heteropolisacáridos.

c) Estudios con enzimas.

Un número considerable de hidrolasas específicas eliminan secuencialmente los monosacáridos de las glicoproteínas. Las investigaciones con dichas enzimas no solamente precisan la secuencia de los monosacáridos sino que también el tipo de enlace (α ó β -glicosídico) entre dos azúcares consecutivos.

Los estudios realizados sobre las unidades de carbohidratos de la glicoproteína α_1 se dirigieron a la elucidación del grupo de heteropolisacáridos que constituyen esta glicoproteína.

Estudios que incluyeron desradación enzimática y reconstitución (18), presentan evidencias sólidas de la estructura completa de los carbohidratos de la glicoproteína α_1 (fig.7). En investigaciones posteriores (17,18) se concluyó que, por lo menos cuatro de las unidades de heteropolisacáridos de la glicoproteína son idénticas. También se destaca que, cuando la glicoproteína sea usada como material de partida, la estructura propuesta en la fig. 7 representa un promedio, con un cierto grado de microheterogeneidad.

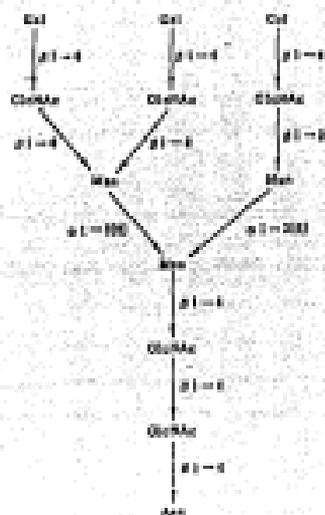


Fig. 7

Fig. 7 Estructura principal de los unidades de carbohidratos de la glicoproteína.

1.2.3 PORCIÓN POLIPEPTÍDICA.

La glicoproteína α_1 posee una única cadena polipeptídica con ácido pirrolidín-carboxílico en el extremo amino terminal y en el extremo carboxilo terminal. Serina (19,20). Tiene dos enlaces disulfuro. El primero se forma con los residuos 8-147 y el segundo con los residuos 72-164, fig. 8. Además presenta múltiples sustituciones, todos los aminoácidos excepto la glicina, histidina, prolina y triptófano son reemplazados, el total de sustituciones de aminoácidos es de 22.

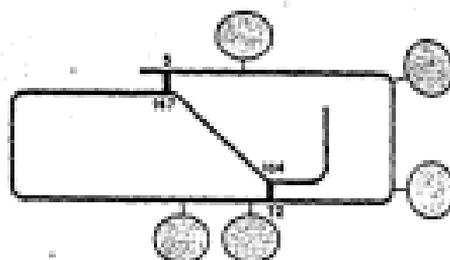


Fig. 8 Representación esquemática de la glicoproteína α_1 .

El peso molecular de la glicoproteína α_1 es alrededor de 40,000. Debe notarse que este valor es considerablemente bajo, comparado con el reportado originalmente (21) y el cual es aún citado en la literatura. Recientemente se ha determinado indirectamente la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína α_1 a partir de la estructura primaria del gen correspondiente, encontrándose un total de 183 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 21,536 (22).

1.2.4 METABOLISMO Y PAPEL BIOLÓGICO DE LA GLICOPROTEÍNA α_1 .

La glicoproteína α_1 se sintetiza en el hígado. La síntesis de los carbohidratos se inicia por la transferencia de un residuo GluNAc a un residuo de asparagina a la nascente cadena polipeptídica mientras se encuentra aún en el ribosoma. Este residuo asparaginil está predeterminado por el tripeptido señal Arg-X-Ser (o Thr). Durante el paso de la glicoproteína nascente a través del retículo endoplásmico rugoso y liso, los residuos adicionales se van incorporando. La terminación de las unidades de heteropolisacáridos se lleva a cabo en el aparato de Golgi por la transferencia de residuos aialil (23) seguida por la secreción de la glicoproteína hacia la circulación. Estudios *in vitro* demuestran que la biosíntesis de las unidades de carbohidratos de esta proteína es una síntesis secuencial post-ribosomal (24) y que la microheterogeneidad en las unidades de carbohidratos puede explicarse como "errores" posibles en la biosíntesis de los heteropolisacáridos en el momento

de unirse. La glicoproteína α_1 aislada del plasma normal contiene 11% de ácido N-acetilglucosámico, mientras que el contenido del mismo en la glicoproteína obtenida del suero de pacientes con ciertas enfermedades crónicas es mucho más bajo. Un caso comparable de deficiencia parcial de ácido siálico se encontró en el estudio de ciertas membranas de eritrocitos (25). Sin embargo no se ha presentado ningún caso natural de alguna glicoproteína α_1 libre de ácido siálico. Sobre el catabolismo de la glicoproteína α_1 , se demostró que la vida media de esta globulina cuando se marca con ^{125}I era de 5.5 días, mientras que en otros estudios primero se reportó un valor de 1 a 2 días (26). Un descubrimiento importante realizado por Morall y colaboradores (8) revelaron que la proteína desializada tiene un periodo de vida media de solamente alrededor de 2 min. Se demostró también que las células del parénquima del hígado selectivamente eliminan la proteína modificada. Así, parece ser que la galactosa terminal juega el papel más importante en el reconocimiento hepático de esta y sin duda otras glicoproteínas desializadas del plasma (8).

Se sabe desde hace mucho tiempo que los niveles en la sangre de la glicoproteína α_1 aumentan, así como el total de la fracción de seroide, durante el embarazo, por inflamación y diferentes enfermedades incluyendo el cáncer, neumonía y artritis reumatoide. Además de estas condiciones, en los individuos normales que se someten a una cirugía mayor, se observa un aumento de la concentración de esta globulina α_1 en el plasma hasta que la herida

sana. El parámetro común en estos estados parece ser la proliferación de células. Sarcioni demostró que esos tejidos con una elevada proliferación de células liberan un factor hacia la circulación cuyo efecto es aumentar la síntesis de la glicoproteína α_1 en el hígado. No se ha establecido todavía la función o funciones de los niveles elevados de esta glicoproteína y de otras proteínas seroalcooides. Dado que la glicoproteína α_1 presenta gran homología con las inmunoglobulinas, podrían hacerse las siguientes preguntas: ¿se requieren altas concentraciones de estas proteínas como una ayuda para proteger las células? ¿estimulan las células, y/o ellas proveen ciertos nutrientes para la división rápida de las células? (2).

Una hipótesis interesante establece que la glicoproteína α_1 podría actuar como agente anti-infeccioso no específico, inactivando bacterias al unirse a sus paredes a través de sus oligosacáridos.

Friedl y asociados (27) observaron que las plaquetas transportan una cantidad suficiente de glicoproteína α_1 unida fuertemente a sus membranas. Como esta glicoproteína con su alto contenido de carbohidratos y un elevado número de residuos siamili interactúa en una forma relativamente específica en este mecanismo, es necesario un estudio más detallado sobre el mismo. También se ha observado que la glicoproteína α_1 interviene en la formación de las fibras de colágeno (8).

El estudio de la glicoproteína α_2 continúa siendo de gran interés. En la Universidad Autónoma Metropolitana se han realizado trabajos que contribuyen al conocimiento de sus propiedades (28, 29). El objetivo de éste es estudiar la glicoproteína α_2 desprovista de las unidades de carbohidratos. Finalmente es importante notar que el estudio de las glicoproteínas se ha enfocado principalmente a las funciones biológicas de sus unidades de carbohidratos y poco se sabe de la capacidad que éstas tienen para modificar las propiedades físicoquímicas de las proteínas y de qué manera contribuyen para que adquieran su conformación correcta.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Reactivos.

La glicoproteína α_1 humana se obtuvo de SIGMA Chemical Co. Esta preparación contiene alrededor del 1% de impurezas de acuerdo con el proveedor y según el método de purificación empleado. Sin embargo, al analizar la homogeneidad de una disolución de la glicoproteína se observó un solo componente protéico. El resto de los reactivos utilizados fueron grado analítico (excepto enzimas).

2.2 Pruebas de homogeneidad

En estudios estructurales de carácter cuantitativo es necesario verificar que la preparación de proteína en estudio esté constituida por una sola especie molecular. En este caso la homogeneidad de la glicoproteína α_1 se verificó utilizando cromatografía de intercambio iónico y de filtración en gel.

Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Se utilizó una columna MicroPac TSC, SP-3PW, con un diámetro interno de 7.5 mm y una longitud de 7.5 cm, usando como eluyente regulador de fosfatos 0.01 M, pH 7.4 con un flujo de 0.5 ml/min.

Filtración en gel de alta resolución. Se utilizó una columna TSK-2000 SW, con un diámetro interno de 7.5 mm y una longitud de 30 cm, con un guarda columna TSK-GMP de 7.5 cm de longitud, usando como eluyente regulador de fosfatos 0.01 M, pH 7.4 con un flujo de 0.5 ml/min.

Estas mismas técnicas se utilizaron para comprobar la homogeneidad del derivado de la glicoproteína α_1 libre de residuos de ácido siálico.

2.3 Análisis Cuantitativo de Carbohidratos.

Se realizó un análisis cuantitativo de los azúcares presentes en la glicoproteína α_1 : ácido siálico (ácido N-acetil neuramínico), hexosas neutras (galactosa y manosa) y hexosamina (N-acetilglucosamina), empleando los métodos descritos en el Apéndice I.

2.4 Hidrólisis enzimática de las cadenas de oligosacáridos de la glicoproteína α_1 .

Para llevar a cabo la eliminación secuencial de los carbohidratos presentes en la glicoproteína α_1 se emplearon las enzimas específicas presentadas en la tabla VIII. Todas las enzimas se obtuvieron de SIGMA Chemical Co.

Se trabajó con un volumen de solución de glicoproteína de 1 ml con una concentración de 12 mg/ml en regulador de acetatos 0.1 M pH 5.0. Este valor de pH se eligió por ser intermedio para la acción óptima de todas las enzimas, ya que por el tamaño del electrodo disponible, no era posible hacer el ajuste de pH en volúmenes pequeños. El tiempo de incubación con cada enzima fue de 12 horas, agregándose de manera secuencial en el orden presentado en la tabla VIII. Cada incubación se realizó a la temperatura señalada en la

misma tabla.

Terminando el último periodo de incubación, se hizo una filtración en gel de alta resolución, utilizando una columna TSK-2000 SW, con un diámetro interno de 7.5 mm y una longitud de 30 cm, acoplada a un guarda columna TSK-GSWP de 7.5 cm de longitud. Esto con el fin de eliminar los azúcares liberados y las enzimas. El eluyente empleado fue fosfato 0.01 M, pH 7.4 con un flujo de 0.5 ml/min.

Tabla VIII

Enzima	Fuente	pH óptimo	T° óptima	Ug. enz. mg prot.
α (L) Fucosidasa	Hígado de Bovino	6.5	25°C	0.16
Neuraminidasa	<i>Clostridium perfringens</i>	5.0	37°C	2.00
β -Galactosidasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	4.5	30°C	5.200
β -Galactosidasa	<i>Saccharomyces fragilis</i>	7.2	37°C	2.05
β -N-acetilglucosaminidasa B	Hígado de Bovino	4.25	25°C	0.70
α -manosidasa	Chicharo	4.5	25°C	2.25

2.8 Análisis estructural por Dicroísmo Circular.

El Dicroísmo Circular (DC) es una técnica empleada para el análisis de sustancias ópticamente activas tales como: esteroides, complejos metal-ligando, peptidos y proteínas. En el estudio de proteínas el DC proporciona información sobre la estructura secundaria y ciertas regiones de la estructura tridimensional (30), dependiendo de la región espectral analizada.

El DC consiste en medir las variaciones que la luz circularmente polarizada sufre al atravesar la muestra que contiene estructuras ópticamente activas. La luz circularmente polarizada representa una onda que forma una espiral alrededor de la dirección de propagación del haz de luz, ya sea en sentido de las manecillas del reloj o en sentido contrario. Las estructuras secundarias de proteínas son configuraciones asimétricas que interactúan con esta luz.

En este estudio se obtuvo el espectro de DC de la glicoproteína α_2 en la región comprendida entre 190 y 310 nm. A partir del espectro de DC en la zona del ultravioleta lejano (190-250 nm) puede estimarse el contenido de estructuras secundarias de la proteína: hélices, hojas β , giros, etc. En esta región se utilizó una celda con longitud de paso óptico de 0.1 cm, la concentración de las muestras fue de 0.1 mg/ml en regulador de fosfatos 0.01 M, pH 7.4.

Analizando el espectro en la región U.V. cercano (250-310 nm) se pueden observar cambios en el ambiente de los residuos aromáticos y enlaces disulfuro (31). En esta región se utilizó una celda con

longitud de paso óptico de 1.0 cm. la concentración de las muestras fue de 0.5 mg/ml en regulador de fosfatos 0.01 M, pH 7.4 .

2.6 Termostabilidad de la elicitorina α_1 nativa y de su derivado detoxificado.

2.6.1 Termodinámica de la desnaturalización térmica de una proteína.

Al estudiar la estabilidad térmica de una proteína se requiere del empleo de una técnica experimental que posea varias características : ser sensible a los cambios en la conformación de las moléculas de proteína, permitir el control adecuado de la temperatura de la muestra y tener suficiente sensibilidad como para poder detectar los cambios en una solución muy diluida (del orden de 0.1 mg/ml) de proteína, esto último debido a los problemas de agregación que se presentan a concentraciones mayores y que modifican los parámetros termodinámicos obtenidos del experimento (32).

Algunas técnicas usuales en estos estudios son la espectroscopia diferencial ultravioleta (33), el diáscopio circular, la reactividad de algún grupo químico de la molécula, la pérdida de actividad biológica, etc.; en cualquier caso, experimentalmente se siguen los cambios de algún parámetro en función del cambio conformacional de la proteína. Usualmente y a este parámetro que puede ser la magnitud de bandas de absorción diferencial, la

elipticidad, la reactividad química, etc. En todos los casos se obtiene una curva de la variación de Y en función de la temperatura, en la que cada punto experimental puede tener una incertidumbre alta debido, entre otras razones, a las condiciones de baja concentración de la muestra en estos experimentos (34).

Desarrollo :

Si la curva obtenida (Y en función de T) se analiza asumiendo que la transición conformacional de la proteína sigue el modelo de una etapa (35), también conocido como de dos estados, en el cual se considera la existencia de sólo dos especies, la nativa (N) y la denaturalizada (D), se obtiene lo siguiente:

El parámetro Y se considera aditivo de tal forma que a una temperatura T su valor es la suma de las contribuciones del estado N más el estado D

$$Y = f_N Y_N + f_D Y_D \quad (11)$$

en donde f_N y f_D representan las fracciones de proteína en cada uno de esos estados, cumpliéndose que $0 \leq f_N$, $f_D \leq 1$ y $f_N + f_D = 1$. Los símbolos Y_N y Y_D representan el valor de Y para la muestra en estado nativo y en estado denaturalizado respectivamente. Estos valores en general cambian con la temperatura y para satisfacerlos comúnmente se extrapola la tendencia observada experimentalmente a temperaturas bajas a toda la zona de la transición, en el caso de Y_N , y análogamente en las temperaturas altas para Y_D . De las

ecuaciones anteriores se encuentra que para cada temperatura del experimento

$$f_B = \frac{[Y - Y_M]}{[Y_D - Y_M]} \quad (12)$$

Al construir la curva de transición, f_B contra T , se observa una dependencia sigmoidal de la fracción desnaturalizada con tres zonas bien diferenciadas: la inicial y la final con pendientes pequeñas, y una región intermedia donde los cambios son abruptos y corresponden al grueso del cambio conformacional.

Conociendo f_B , la constante del equilibrio N es D pueda calcularse fácilmente pues:

$$K = \frac{[B]}{[D]} = \frac{f_B}{1 - f_B} = \frac{f_B}{1 - f_B} \quad (13)$$

Como que podemos conocer el valor de f_B para cada temperatura del experimento, tenemos una serie de valores para la constante de equilibrio a diferentes temperaturas. Puesto que:

$$K = \exp \left[\frac{-\Delta G}{RT} \right] \quad \text{y} \quad \ln K = \frac{-\Delta G}{RT} \quad (14)$$

$$\text{como} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (15)$$

$$\text{se tiene que} \quad \ln K = \frac{-\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (16)$$

La capacidad calorífica de una solución de proteína aumenta con la desnaturalización, debido a la exposición de residuos hidrofóbicos al solvente acuoso. Se ha observado que el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) de proteínas globulares pequeñas es independiente de la temperatura (35,36) de manera que

$$\Delta H = \Delta H_m + \Delta C_p (T - T_m) \quad (7)$$

donde T_m es la temperatura a la cual $f_D = f_N = 0.5$, es decir la temperatura media de la transición y ΔH_m es la entalpia de la desnaturalización calculada en la T_m .

A fin de obtener los parámetros termodinámicos de la transición conformacional, utilizando las ecuaciones (3) a (7), es posible deducir la siguiente expresión (ver Apéndice 2) :

$$f_D = \frac{\exp \left\{ \left[\frac{\Delta H_m}{RT} - \frac{\Delta C_p}{R} \right] \left[1 - \frac{T_m}{T} \right] \right\} \left[\frac{T}{T_m} \right]^{\frac{\Delta C_p}{R}}}{1 + \exp \left\{ \left[\frac{\Delta H_m}{RT} - \frac{\Delta C_p}{R} \right] \left[1 - \frac{T_m}{T} \right] \right\} \left[\frac{T}{T} \right]^{\frac{\Delta C_p}{R}}} \quad (10)$$

De acuerdo con esta ecuación y a partir de los datos experimentales de f_D a diferentes temperaturas, es posible determinar los valores de los parámetros T_D , ΔH_D y ΔC_p , mediante un método de regresión no lineal.

Para facilitar los cálculos se propuso un modelo con el siguiente mecanismo: no transformar los puntos experimentales, sino encontrar una ecuación donde la relación f_D y T sea a través de los parámetros termodinámicos. Este modelo se describe detalladamente en el Apéndice 2.

2.6.2. Espectroscopia de Absorción Diferencial Ultravioleta.

Para la aplicación de este método se requiere que la estructura nativa posea cromóforos en su interior, ya que el espectro de absorción de un cromóforo puede modificarse con el ambiente molecular que lo rodea (33). Cuando una proteína cambia conformacionalmente del estado nativo al desnaturalizado, varios grupos de cromóforos son expuestos al solvente acuoso, es decir que pasan de un ambiente predominantemente no-polar a uno polar. Este hecho lleva a un desplazamiento del espectro de absorción de los cromóforos a longitudes de onda menores (37). Por tanto, en un espectro diferencial de proteína desnaturalizada contra nativa, se presentan en general varias bandas negativas que reflejan las variaciones del ambiente local de diferentes cromóforos, principalmente residuos de tirosina y triptófano; tales mínimos son el resultado del corrimiento al azul del espectro de proteína

desnaturalizada en relación al de la nativa.

2.6.3 Desarrollo Experimental.

Para el estudio de desnaturalización térmica se utilizó un espectrofotómetro de doble haz, VARIAN DM2 80 con registrador de escala expandida y portaceldas con camisas de circulación de agua. Se emplearon celdas de 1 cm de recorrido óptico, con control de temperatura independiente. La celda de referencia se mantuvo a una temperatura constante de 15°C mientras que la otra celda se calentó gradualmente, con velocidades inferiores a 1°C por minuto. El tiempo de incubación de la celda fue de 10 min. en cada temperatura de trabajo.

En un experimento típico, se colocan soluciones idénticas de proteína en ambas celdas, en concentración de 0.05 mg/ml, determinada espectrofotométricamente con un valor de $E_{280,1\%}^{1\text{cm}}$ de 0.90, para la glicoproteína α_1 (B). El aumento de temperatura en una de las celdas provoca cambios conformacionales en la molécula. Estos cambios involucran la pérdida de estructura nativa y la exposición al solvente acuoso de grupos aromáticos, que se encuentran inicialmente en un entorno predominantemente hidrofóbico. De esta manera se generan bandas diferenciales negativas cuya intensidad es proporcional a la fracción de proteína desnaturalizada.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Analisis Cuantitativo de Carbohidratos.

Los resultados del analisis de la composicion glucosidica de la glicoproteina α_1 realizado en el laboratorio, se presentan a continuacion (Tabla IX) junto con los valores reportados en la literatura.

Tabla IX

	MANH	Hexosas neutras	MAGN
	10.36 %	13.61 %	13.57 %
Reportado (8)	11 %	14 %	14 %

Como se puede observar estos valores confirman los resultados reportados por otros investigadores, e igualmente nos permiten suponer que se parti6 de una muestra intacta.

3.2 Hidrolisis Enzimatica.

Despues de someter a la glicoproteina α_1 a la accion enzimatica de las diferentes glicosidasas, el producto se separa por filtracion en gel de alta resolucion. Esta preparacion mostro ser homogénea usando la técnica ya descrita. Posteriormente, se realizo el analisis cuantitativo de N-acetilglucosamina, hexosas neutras y

ácido siálico, para valorar la acción de las enzimas sobre la glicoproteína. Los resultados obtenidos de este análisis fueron los siguientes (tabla X) :

Tabla X

Azúcar	n eliminada	n encontrada
Ácido siálico	99	-
Hexosas neutras	-	100
N-acetilglucosamina	-	100

Esto indica que la hidrólisis se llevó a cabo únicamente sobre el azúcar terminal (ácido siálico) y que el resto de las enzimas no actuaron sobre la glicoproteína. Como la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* fue la enzima que no permitió que la hidrólisis se llevara a cabo por completo, se probó otra β -galactosidasa de *Saccharomyces fragilis* bajo otras condiciones de pH y temperatura, utilizando la muestra desializada. La preparación final se filtró en HPLC con regulador de fosfatos 0.01 M, pH 7.4 como eluyente. Posteriormente se hizo el análisis cuantitativo de hexosas neutras, encontrando nuevamente que la enzima no actuó sobre el sustrato.

Debido a la alta especificidad de las enzimas y a que ninguna de las dos β -galactosidasas fue efectiva, se obtuvo solamente el derivado desializado de la glicoproteína α_1 .

3.3 Espectroscopia diferencial Ultra-Violeta.

Los estudios de desnaturalización térmica se hicieron con el derivado desializado (GPD) y con la glicoproteína α_2 nativa (GP) a pH fisiológico (pH 7.4).

En la fig. 9 se muestran los espectros diferenciales obtenidos a diferentes temperaturas para el caso de la GP, los espectros de la GPD fueron cualitativamente similares. Se observan tres bandas, 2 bandas negativas a 292 nm y 284 nm, y una banda positiva a 300 nm.

Las bandas negativas son típicas de la desnaturalización y aumentan con la intensidad de la temperatura. Como se mencionó anteriormente, estas bandas surgen de la exposición de los residuos aromáticos, principalmente triptofánicos y tirosínicos, al solvente acuoso.

Los espectros diferenciales pueden exhibir bandas cuyo origen es distinto a el de las bandas negativas, por lo que se les conoce como bandas anómalas. Una banda anómala típica es la que aparece en la región cercana a los 300 nm. Puede ser positiva o negativa, y se ha interpretado como debida a cambios en la orientación de residuos de triptofano con respecto a un dipolo, una carga o un grupo polarizable (26,39); o a la pérdida de interacción entre grupos indólicos inicialmente cercanos (40).

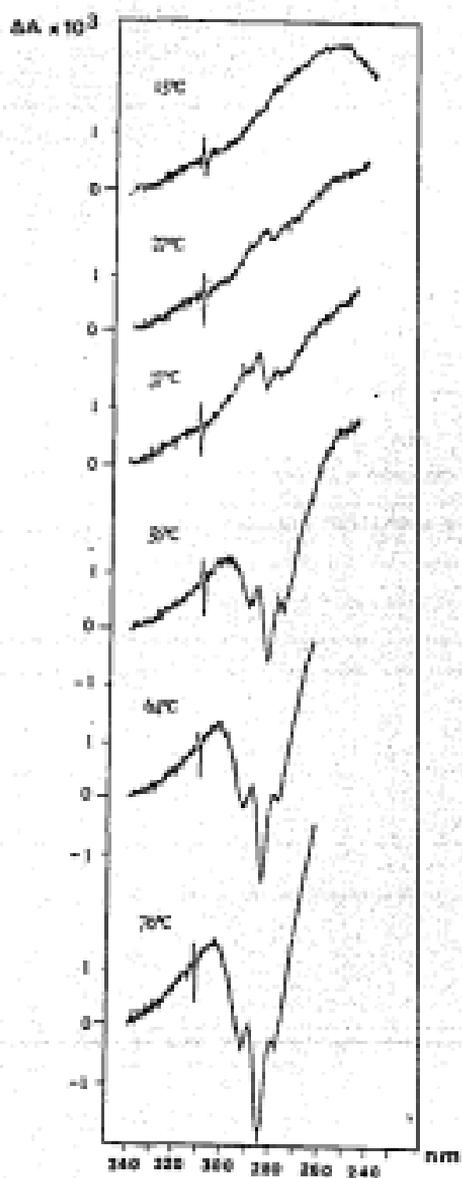


Fig. 3 Spectra diferenciales de clorofila *a* a diferentes temperaturas.

En las figuras 10 y 11 se grafican las dos bandas negativas de los espectros diferenciales, para la GP y la GPD respectivamente. Las fracciones de proteína desnaturalizada (f_D) se calcularon a partir de la banda negativa mayor presente a 294 nm. En esta figura se muestran también las extrapolaciones utilizadas para calcular la magnitud de las bandas correspondientes a la conformación nativa y desnaturalizada, de acuerdo con la sección 2.3.

En la fig. 12 se representan las curvas de las transiciones conformacionales para la GP y la GPD. Los puntos representan los valores de f_D obtenidos a partir de los datos experimentales representados en las figuras 10 y 11, mientras que las líneas continuas representan la función ajustada con los valores experimentales según la ecuación (13) descrita en el Apéndice 2, utilizando el método de regresión no-lineal implementado en el laboratorio de Biofísicoquímica. También se obtuvieron los parámetros termodinámicos para cada transición conformacional, estos valores se observan en la tabla XI :

Tabla XI

Proteína	T_m (°C)	ΔH_m (Kcal/mol)	ΔCp (cal/mol K)
Desnaturalizada	64.4	188.0	2132
Nativa	68.4	46.6	790

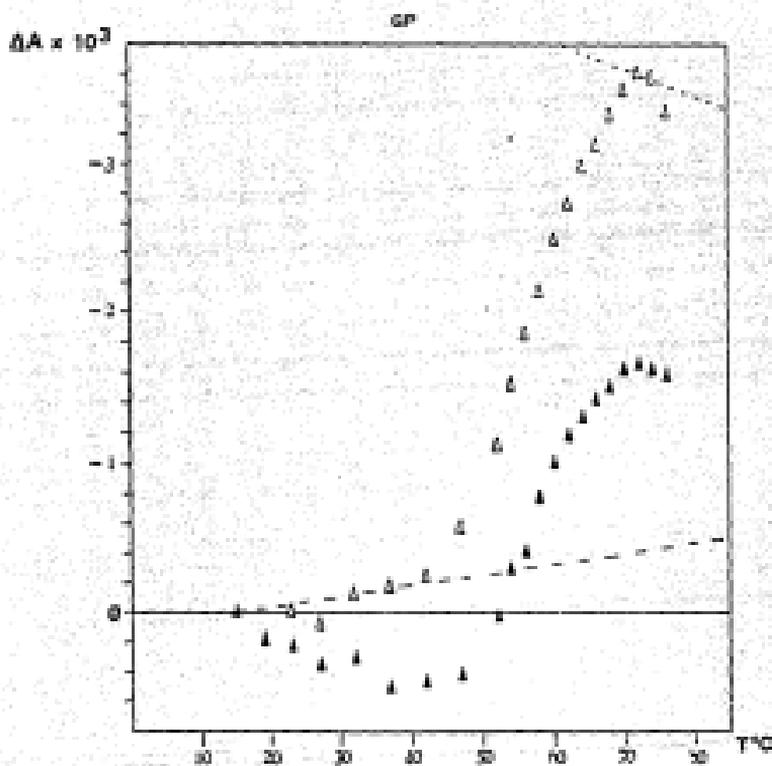


Fig. 10 Variación de la señal en las espectros diferenciales para las dos bandas negativas.

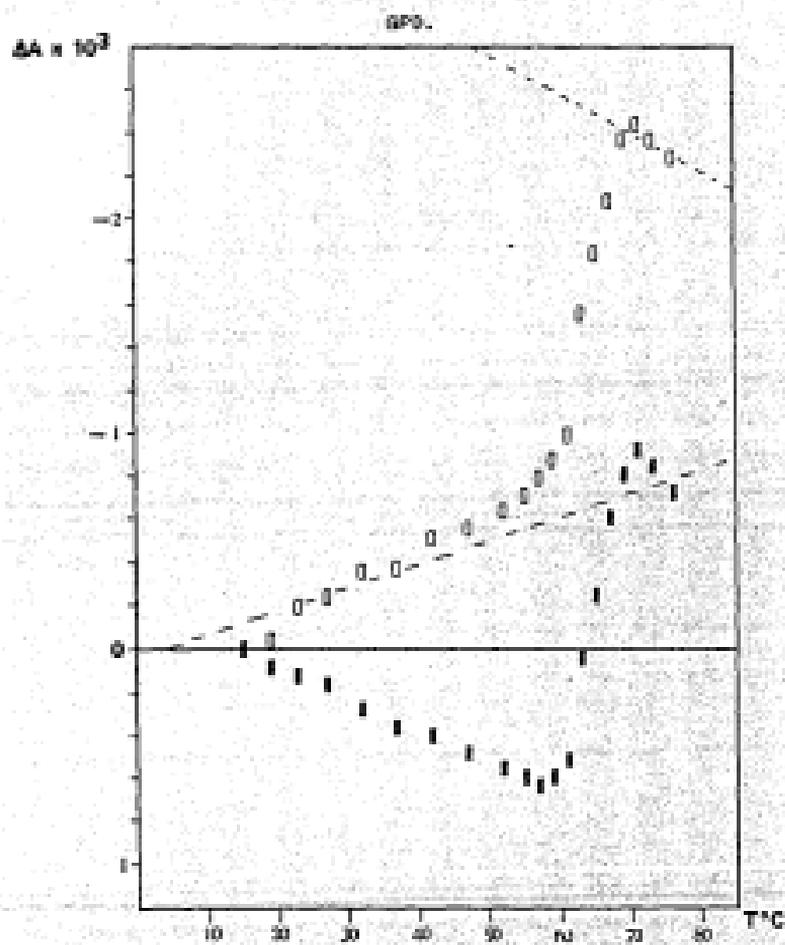


Fig. 11 Variación de la señal en los espectros difraccionados para las dos bases negativas.

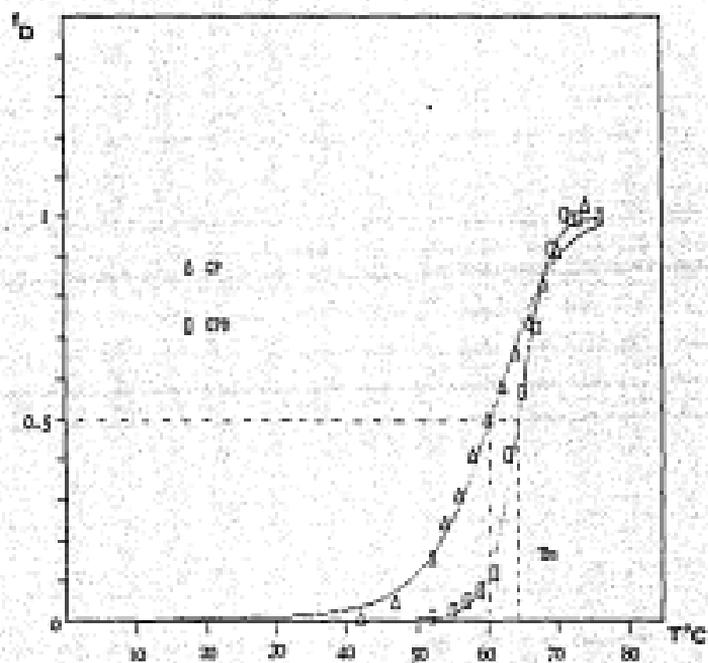


Fig. 12 Variación de la fracción f_b de la GP y la GPD desnaturalizadas en función de la temperatura.

En esta misma figura puede observarse que la transición de la GPD se lleva a cabo a temperaturas superiores a las de la GP, es decir que, es necesario aumentar más la temperatura para llegar al 50 % del proceso. La temperatura de transición media (T_m) para la GPD es 64.4°C y la correspondiente a GP es de 60.4°C , esto indica que la GPD es más estable.

La desnaturalización térmica es un proceso cooperativo lo cual indica que la proteína está conformada de tal manera que si un enlace se rompe favorece el rompimiento del siguiente. Por otra parte, se trata de un fenómeno endotérmico por lo que la entalpía (ΔH) de la reacción, es positiva.

El ΔH_m para la GPD es de 185.0 Kcal/mol y para la GP es de 46.6 Kcal/mol. Analizando estos valores de ΔH_m obtenidos, se deduce que los procesos de desnaturalización son endotérmicos para ambas muestras ($\Delta H_m > 0$) y que es necesario aplicar mayor energía para la desnaturalización de la GPD, por lo que se confirma que éste es más estable. Además puede observarse en la fig. 12 que el proceso de desnaturalización para la GPD es más cooperativo. Esto es, que ocurre en un intervalo de temperatura más reducido.

Para determinar la dirección en que ocurre un proceso es necesario conocer la dirección de los cambios de energía del mismo. La energía libre o energía de Gibbs, permite conocer la espontaneidad de un proceso, si $\Delta G = 0$ el proceso está en el equilibrio, si por el contrario $\Delta G < 0$ el proceso es espontáneo y si $\Delta G > 0$ la reacción no es espontánea. Una de las características más

útiles de la energía libre es la de su relación con el equilibrio químico. Este hecho permite el cálculo del cambio de energía libre (ΔG) de una reacción, si se conoce la constante de equilibrio. De esta manera, ΔG_0 es el parámetro termodinámico que se relaciona directamente con la estabilidad relativa de las dos especies conformacionales en equilibrio. La fig. 13 muestra los valores de ΔG_0 obtenidos a partir de los valores de f_0 de la fig. 12, para la GP y la GPB. Puede observarse que la curva para la especie GPB se encuentra por encima de la correspondiente a la GP en casi todo el intervalo de temperatura, hasta 69°C aproximadamente. Esto indica que en definitiva que la GPB es más estable que la GP.

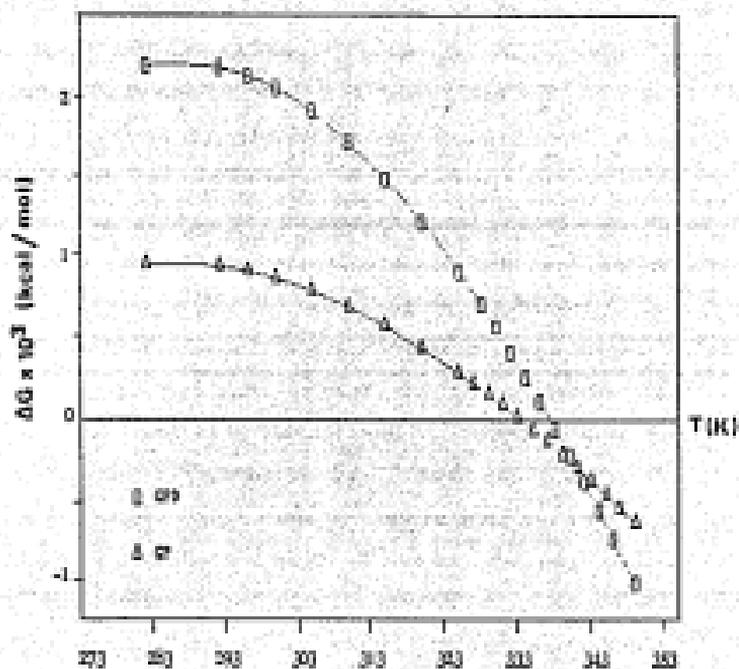


Fig. 13 Dependencia del ΔG con la temperatura.

Comparando los espectros obtenidos del estudio por Dicroísmo Circular para la GP y la GPD, en la región de absorción de los residuos aromáticos (250-310 nm), no se observó ningún cambio significativo. Por otro lado, en la región del U.V. lejano (250-190 nm) los espectros de ambas especies moleculares también fueron iguales, dentro del error experimental. Esto confirma las observaciones hechas por otros investigadores (41) en el sentido de que las cadenas de oligosacáridos no alteran de manera significativa las estructuras secundarias de la cadena polipeptídica de la GP.

El que el derivado desializado sea más estable no se debe a un cambio estructural importante a juzgar por los espectros de DC, pero podría explicarse por una posible eliminación de repulsiones electrostáticas superficiales debidas a las cargas negativas del ácido siálico terminal, lo cual podría ocasionar que aumente el número de contactos entre grupos hidrofóbicos internos de la molécula (42), haciéndola más compacta. Esta suposición se ve apoyada por los valores de ΔC_p obtenidos para la GP y la GPD, ya que existe una correlación entre el valor de ΔC_p con el número de contactos entre residuos hidrofóbicos internos (43). La glicoproteína α_3 tiene un valor de ΔC_p relativamente bajo con respecto al de otras proteínas, además existe evidencia de que la GP presenta una región poco compacta en su cadena polipeptídica, que podría ser una cavidad apropiada para unir y transportar moléculas no polares (44). Puede observarse en la tabla XI que el valor de ΔC_p para la GPD es mayor que el de la GP, esto parece indicar que efectivamente la proteína sin el ácido siálico es más compacta.

4. CONCLUSIONES

1) La eliminación del ácido siálico en la glicoproteína α_2 aumenta la estabilidad de la molécula, presentando mayor resistencia a la denaturalización térmica con un cambio notable en los parámetros termodinámicos del proceso con respecto a los de la glicoproteína α_2 nativa.

2) La estructura secundaria del derivado desializado, no cambia con respecto a la de la proteína nativa. Es posible, sin embargo que haya ligeros cambios conformacionales, que hagan a la molécula más compacta, debido a la eliminación de posibles repulsiones electrostáticas entre los residuos de ácido siálico.

PERSPECTIVAS

Con base en los resultados de este estudio en el que se propone que la estructura de la GPD es más compacta que la de la GP, se esperaría que la capacidad de unir ligandos no polares se encuentre disminuida en el derivado desializado. Por ello sería interesante analizar comparativamente la unión de progesterona y otros esteroides en ambas especies.

APENDICE I

I Determinación de ácido N-acetilneuramínico por el método del ácido tiobarbitúrico.

PRINCIPIO

Los ácidos siálicos, como los ácidos N-acetil o N-glicolil son constituyentes de glicoproteínas, mucinas y glicolípidos.

Los métodos para el análisis químico del ácido siálico se hacen con resorcinol o con el ácido tiobarbitúrico. El método del ácido tiobarbitúrico es aproximadamente 12 veces más sensible que el método del resorcinol y es también más específico. En una modificación reciente al método del ácido tiobarbitúrico se obtiene una solución en la que el cromóforo es estable por lo menos un día eliminando la extracción del cromóforo con ciclohexanona según el procedimiento original. Estimaciones del contenido de ácido siálico en glicoproteínas y otros compuestos que contienen ácido siálico se obtienen con una sensibilidad de 1-15 $\mu\text{g/ml}$. El siguiente procedimiento fue propuesto por Skora y Mohr (43).

REACTIVOS

Arsenito de sodio al 2% (p/v) en HCl 0.5 N. Ácido tiobarbitúrico al 6% (p/v) en H_2O ajustada a pH 9 con NaOH. Metaperyodato de sodio 25 mM en H_2SO_4 0.125 N. Dimetil sulfoxido. H_2SO_4 de concentración apropiada, para llevar a cabo la hidrólisis de la muestra en H_2SO_4 0.025-0.05 N.

Hidrólisis : 0.2 ml de muestra se calientan a una temperatura de 90°C, por 60 min en H₂SO₄ 0.025-0.05 N. Asegúrese que el pH de la solución de hidrólisis esté entre 1.6 y 2.0. Enfriar en baño de hielo después de la hidrólisis y dejar a temperatura ambiente para la adición de los reactivos siguientes. Las muestras usadas para la construcción de la curva standard deben ser tratadas bajo las mismas condiciones de hidrólisis para la proteína.

PROCEDIMIENTO

Se agregan 50 µl de la solución de metaperiodato 25 mM a cada muestra. La oxidación se lleva a cabo a 37°C por 30 min. Al término de este periodo de oxidación, se para la reacción agregando 50 µl de arsenito de sodio al 2% en HCl 0.5 N. Se agregan 100 µl de ácido tiobarbitúrico 6% a pH 9.0 y se mezcla en un vortex. Caliente las muestras, hidrolizadas a 100°C por 7.5. Después de este tiempo de reacción, se enfría rápidamente en un baño de agua helada. Se agregan 400 µl de dimetilsulfóxido y se mezcla bien en el vortex. La absorbancia se lee a 549 nm.

II Determinación de hexosas neutras por la reacción del Fenol-ácido sulfúrico

PRINCIPIO

Un procedimiento rápido y reproducible para la determinación de azúcares simples y sus derivados fue descrito por Dubois et al (46), el cual utiliza el fenol como el agente que desarrolla el color.

Además de la sencillez y sensibilidad, este método tiene la ventaja de que la reacción no es afectada por la presencia de proteínas. Por lo tanto, es una técnica útil para estimar directamente el contenido de carbohidratos en glicoproteínas (47).

REACTIVOS

H_2SO_4 concentrado, grado reactivo, (densidad específica 1.84). Fenol, 80% en peso, con 20 g de agua destilada. Esta solución es estable por varios meses a temperatura ambiente, desarrolla un color amarillo pálido con el tiempo, pero no interfiere con el ensayo.

PROCEDIMIENTO

Para la determinación se requieren de 10-70 μ g del azúcar en 2 ml de solución acuosa. Se agregan 0.05 ml de fenol seguido de la adición rápida de 5.0 ml de ácido sulfúrico concentrado. Después de 30 min a temperatura ambiente, el color se ha desarrollado por completo y permanece estable por varias horas. La densidad óptica se lee a 485-490 nm. El ensayo se hace por triplicado y se lee contra un blanco que contenga agua destilada en lugar de muestra.

III Determinación de Hexosaminas por el método de Nelson.

PRINCIPIO

El método para la determinación cuantitativa de hexosaminas elaborado por Nelson-Morgan se basa en que estas sustancias cuando son tratadas con acetilacetona en solución alcalina se convierten en un derivado del mirrol, el cual se condensa con el

endimetilaminobenzaldehído (DMAB) dando un producto color púrpura (49).

La estimación del contenido de amino azúcares en proteínas presenta algunas dificultades, ya que los métodos para su determinación se aplican a los amino azúcares que han sido liberados previamente de la proteína por una hidrólisis ácida y temperatura alta; esto trae como consecuencia que la hexosamina se destruya, debido a que el enlace del grupo amino es muy lábil bajo las condiciones de hidrólisis. La glucosamina en solución puede convertirse cuantitativamente en N-acetilglucosamina en pocos minutos, simplemente agregando anhídrido acético a la solución acuosa del amino azúcar, la cual es muy estable. El análisis se hace directamente por el método de Reissig et al (49). Este método puede emplearse también para la cuantificación de galactosamina.

REACTIVOS

Tetraborato de potasio : se prepara una solución 0.6 N de borato y el pH se ajusta a 5.1 con KOH.

p-Dimetil aminobenzaldehído (DMAB) : 10 gr de DMAB se disuelven en 100 ml de ácido acético glacial grado analítico al cual contiene 12.5% (v/v) de HCl 10 N (grado analítico). Este reactivo puede guardarse a 2°C por un mes sin que sufra un deterioro significativo. Antes de usar este reactivo debe diluirse con 3 volúmenes de ácido acético glacial (49).

PROCEDIMIENTO

A 5.5 ml de hexosamina en solución (libre de base) se agregan 0.1 ml de anhídrido acético al 1.8% (v/v) en acetona (preparación fresca), seguida de 0.5 ml de tetraborato de potasio 0.0 M. Se coloca un tapón de vidrio en la boca del tubo, el cual se calienta en un baño de agua hirviendo por 3 min exactamente. Después de que se enfría el tubo, se agregan 6 ml de DMAB. El tubo se tapa nuevamente y se mezcla el contenido. El desarrollo del color se lleva a cabo por 20 min a 97°C. La densidad del color se lee inmediatamente después de que se enfría el tubo en agua, a una longitud de onda de 544 ó 585 nm. Sin embargo se prefiere la longitud de onda de 585 nm por ser más sensible, ya que el color debido a otras sustancias que pudieran interferir se reduce considerablemente a esta longitud de onda.

APENDICE 2

MODELO MATEMÁTICO

La ventaja que presenta este programa de cómputo es que hace el trabajo en 1 ó 2 minutos en una microcomputadora estándar que además de estimar ΔH_m , ΔC_p y T_m puede calcular los puntos teóricos de la transición.

De la ecuación (3) obtenemos :

$$F_D = \frac{K}{K + 1} \quad (8)$$

sustituyendo (4) en (8)

$$F_D = \frac{\exp[-\Delta G/RT]}{1 + \exp[-\Delta G/RT]}$$

aplicando (5) :

$$F_D = \frac{\exp \left[\frac{-\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \right]}{1 + \exp \left[\frac{-\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \right]} \quad (9)$$

por otro lado

$$\Delta H = \Delta H_m + \Delta C_p(T - T_m) \quad (17)$$

$$\Delta S = \Delta S_m + \Delta C_p \ln(T/T_m) \quad (18)$$

y dado que $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ (11)

y a la T_m , $\Delta G = -RT_mK = 0$ se tiene que $0 = \Delta H_m - T_m \Delta S_m$

donde finalmente $\Delta S_m = \frac{\Delta H_m}{T_m}$ (12)

Al sustituir (7), (10) y (12) en (9) obtenemos :

$$f_a = \frac{\exp \left[\frac{\Delta H_m}{RT} + \frac{\Delta C_p(T-T_m)}{RT} + \frac{\Delta H_m}{RT_m} + \frac{\Delta C_p \ln(T/T_m)}{R} \right]}{1 + \exp \left[\frac{\Delta H_m}{RT} + \frac{\Delta C_p(T-T_m)}{RT} + \frac{\Delta H_m}{RT} + \frac{\Delta C_p \ln(T/T_m)}{R} \right]}$$

factorizando el argumento de las exponenciales :

$$f_a = \frac{\exp \left[\frac{\Delta H_m}{RT} \left[1 + \frac{T_m}{T} \right] - \frac{\Delta C_p}{R} \left[1 - \frac{T_m}{T} \right] + \ln \left[\frac{T}{T_m} \right] \frac{\Delta C_p}{R} \right]}{1 + \exp \left[\frac{\Delta H_m}{RT} \left[1 + \frac{T_m}{T} \right] - \frac{\Delta C_p}{R} \left[1 - \frac{T_m}{T} \right] + \ln \left[\frac{T}{T_m} \right] \frac{\Delta C_p}{R} \right]}$$

Finalmente

$$f_D = \frac{\exp \left\{ \left[\frac{\Delta H_m}{RT} - \frac{\Delta C_p}{R} \right] \left[1 - \frac{T_m}{T} \right] \right\} \left[\frac{T}{T_m} \right]^{\frac{\Delta C_p}{R}}}{1 + \exp \left\{ \left[\frac{\Delta H_m}{RT} - \frac{\Delta C_p}{R} \right] \left[1 - \frac{T_m}{T} \right] \right\} \left[\frac{T}{T_m} \right]^{\frac{\Delta C_p}{R}}} \quad (13)$$

Esta expresión es simplemente la dependencia de f_D con la temperatura en función de los parámetros termodinámicos por determinar: ΔH_m , T_m y ΔC_p . Es en este punto donde se realiza la regresión no lineal con los puntos experimentales, de acuerdo con la ecuación (13), determinando los valores de las magnitudes termodinámicas que minimizan a la diferencia entre los puntos experimentales y la función que se acaba de deducir (13).

Este método tiene la ventaja de que los puntos experimentales no requieren pasar a la serie de transformaciones que se emplean comúnmente para la construcción de la curva de van't Hoff, la obtención de las derivadas de ese gráfico y la regresión lineal de estas últimas para estimar ΔC_p .

Al sustituir las ecuaciones (7), (10) y (12) en (11) se obtiene

$$\Delta G = \Delta H_m - T \frac{\Delta H_m}{T_m} + \Delta C_p [T - T_m - T_m (T/T_m)]$$

es decir, la dependencia de la energía libre de Gibbs con T de donde puede calcularse el valor a 25°C para compararlo con el de otras

proteínas, o bien toda la curva en el intervalo del estudio e incluso su extrapolación fuera de esa zona.

El efecto de cada uno de los tres parámetros termodinámicos por determinar sobre la forma de la curva de transición no es sencillo de determinar pues la dependencia de f_D con cada uno de ellos es compleja como puede verse en la ecuación (13). Sin embargo podemos decir de manera aproximada que un aumento en T_m principalmente desplaza la curva de transición a la derecha, además de hacer ligeramente menos cooperativo el proceso, esto es hacer que la curva sea más ancha. Si ΔH crece, la pendiente de la curva aumenta siendo así el proceso de desnaturalización más cooperativo, sin embargo en el intervalo de valores típicos para este parámetro (60 a 200 kcal/mol) la variación no es muy marcada. Finalmente, un aumento en ΔC_p incrementa la asimetría de esa curva sigmoidea, pero el cambio en la forma de la gráfica es prácticamente imperceptible en el intervalo de 0 a 3 kcal mol⁻¹K⁻¹ que es el observado comúnmente en estos procesos.

Discusión :

Las incertidumbre en los parámetros ΔH_m , T_m y ΔC_p obtenidos por el programa de regresión no lineal dependen de la incertidumbre en los valores de f_D con que el programa se alimenta. De una incertidumbre en f_D de 10.05, razonable en estos estudios, se obtiene una precisión en T_m de alrededor de medio grado centígrado, un valor de ΔH_m con variaciones del 10% pero una incertidumbre muy

grande en ΔC_p , incluso arriba del 70%, esto es debido a que, según el modelo termodinámico que describe el proceso, variaciones pequeñas en ese parámetro no afectan sensiblemente a la distancia procedida de los puntos experimentales a la curva teórica; quedando en el ajuste no lineal, según el criterio de χ^2 mínima (59), una zona amplia de valores de ΔC_p para un conjunto de valores experimentales.

Dentro de las limitaciones de este método también se encuentra que las variaciones en el conjunto de puntos experimentales pueden arrojar valores muy diferentes de ΔC_p . Por las razones propuestas anteriormente y cambios moderados en ΔH_m y T_m . Por otra parte, las extrapolaciones de la entalpía, entropía y energía libre de Gibbs son fuertemente dependientes del valor de ΔC_p , disminuyendo la confiabilidad de las estimaciones. El valor de ΔC_p puede depender ligeramente de la temperatura, sin embargo la variación es suficientemente pequeña para considerarlo constante en el intervalo de temperaturas del estudio.

El presente modelo toma como premisa inicial que el proceso de desnaturalización ocurre en una etapa. Para algunas proteínas globulares pequeñas esto es cierto, pero no para la totalidad de los casos, en los que pueden presentarse desviaciones importantes a este mecanismo. Sin embargo aún para mecanismos en los que existen uno o más intermediarios termodinámicamente estables en concentraciones apreciables, los valores obtenidos con este modelo arroja cifras aparentes que resultan ser una cota inferior de los valores reales (32,34).

Un requisito necesario, aunque no concluyente para que el mecanismo se lleve a cabo en una etapa es que la curva de transición sea sigmoideal y monofásica, es decir que no presente escalones o mesetas entre el estado inicial y el final. Además, las curvas obtenidas siguiendo diferentes parámetros y deben ser coincidentes (32).

Un criterio que se considera prácticamente concluyente es la coincidencia, dentro del error experimental, entre el valor de ΔH obtenido de estos estudios y el medido directamente de estudios calorimétricos (32), destacando una nueva utilidad del presente modelo para obtener el primero de estos valores.

Una posibilidad alternativa en estos estudios es el empleo del valor del ΔC_p obtenido calorimétricamente para disminuir la incertidumbre en este parámetro ajustar el modelo matemático optimizando la entalpía y la temperatura media de transición.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Kenneth Oiden, J. Brian Parent y Sandra L. White. (1982) *Biochimica et Biophysica Acta* 650, 209-232.
- 2.- Sharon, M. (1984) *Trends Biochem. Sci.* 9, 190-202.
- 3.- Hinzler, R.J. (1973) en "Hormonal proteins and peptides" (Choh Hao Li, ed.), p. 1. Academic Press, New York.
- 4.- Yasashina, I., Makino, K., Sani, K., y Kojima, T. (1965) *J. Biochem. (Tokyo)* 59, 168.
- 5.- Spiro, R.G. (1973) *Adv. Prot. Chem.* 27, 349.
- 6.- Morell, A.G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I.H., Hickman, J. y Ashwell, G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1461.
- 7.- Ogston, A.G. (1970) en "Chemistry and Molecular Biology of the Intracellular Matrix" (E. A. Balazs, eds.), vol. 3, p. 1231. Academic press, New York.
- 8.- Scheid, K. (1975) en "The Plasma Proteins" (Frank M. Putnam, ed.) vol. 1, p. 183-228. Academic Press, New York.
- 9.- Scheid, K., Binette, J. P., Kaniyama, S., Pfister, V. y Takahashi, S. (1962) *Biochemistry* 1, 959.
- 10.- Scheid, K. (1953) *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 68.
- 11.- Scheid, K., Polis, A., Hungiker, K., Fricke, R., y Yayoshi, H. (1967) *Biochem. J.* 104, 361.
- 12.- Jeanloz, R. M. (1972) en "Glycoproteins" (R. Gottschalk, ed.), Part A, p. 597. Amer. Elsevier, New York.
- 13.- Odin, L. (1955) *Acta Chem. Scand.* 9, 862.
- 14.- Eylar, E. H. (1958) Thesis, Harvard University, Cambridge, Massachusetts.
- 15.- Satake, H., Okurama, T., Ichihara, K. y Scheid, K. (1965) *Biochem. J.* 95, 749.
- 16.- Schwarzmann, G. D. G., Hatcher, W. B. y Jeanloz, R. M. (1975) *J. Biol. Chem.*

- 17.- Jeanloz, R. W. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 303.
- 18.- Jeanloz, R. W. y Grosse, A. (1963) Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 22, 538.
- 19.- Krotoski, M. A., y Weiser, H. E. (1967) Can. J. Biochem. 45, 1577.
- 20.- Krotoski, M. A. y Weiser, H. E. (1967) Biochim. Biophys. Acta 133, 276.
- 21.- Scheid, K., Rosa, E. C. y MacNair, R. B. (1956) J. Biol. Chem. 219, 769.
- 22.- Sente, L., Ciliberto, G., Cortese, R. (1985) Nucleic Acids Res. 13, 3941-3952.
- 23.- Jansson, J. G. y Ashton, F. E. (1973) Can. J. Biochem. 51, 1281.
- 24.- Roseman, S. (1968) en "Biochemistry of Glycoproteins and Related Substances" (E. Rossi y E. Stoll, eds.), Part II, p. 244. Karger, Basel.
- 25.- Chien, S., Cooper, B. W., Jan, K-M., Miller, L. H., Howe, G., Usami, S. y Lalezari, P. (1974) Blood 43, 445.
- 26.- Boström, H., Rodén, L., y Yamashina, I. (1958) J. Biol. Chem. 236, 381.
- 27.- Triandis, D., Meis, J.W., Barnes, P.E. y Pollack, W. (1971) Transfusion (Philadelphia) 11, 139.
- 28.- Zubillaga, R. A., Rojas, A. y Hernández, A. (1986) "Denaturalización Térmica de la Glicoproteína α_2 ". Trabajo presentado en el XXI CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA PURA Y APLICADA.
- 29.- Zubillaga, R. A. "Estudio Conformational de la Glicoproteína α_2 de plasma humano". (1987) TESIS M. en Q., UAM-Iztapalapa.
- 30.- P. Crabbe. "Actividad Óptica, Dispersión Rotatoria Óptica y Dicroísmo Circular en Química Orgánica", monog. No. 11 G.E.A. Washington D.C. 1974.
- 31.- Strickland, E. H. (1974) CRC Crit. Rev. Biochem. 2, 113.
- 32.- Ghella, C. y Yan, J. (1982) protein Folding, Academic Press.

- 23.- Donovan, J. M. (1973) *Methods in Enzymology*, vol. XXXII p. 497.
- 24.- Cantor, C. y Schimmel, P. (1967) *Biochemical Chemistry*, Part II, W. H. Freeman and Co.
- 25.- Privalov, P. L. (1979) *Adv. Protein Chem.* 33, 167-241.
- 26.- Herskovits, T. T. (1967) en "Enzyme Structure" (C. H. W. Hirs, ed.), *Methods in Enzymology*, vol. II, p. 748-775, Academic Press, New York.
- 37.- Donovan, J. M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 1961-1967.
- 38.- Ananthanarayanan, U. S. y Bigelow, C. C. (1969) *Biochemistry* 8, 3717-3723.
- 39.- Ananthanarayanan, U. S. y Bigelow, C. C. (1969) *Biochemistry* 8, 3723-3728.
- 40.- Andrews, L. J. y Foster, L. S. (1972) *Biochemistry* 11, 1875-1879.
- 41.- Aubert, J. P. y Loucheur-Lafabvre, M. H. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 489-489.
- 42.- Halgall, H. B. y Kirley, T. L. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* 216, 292-299.
- 43.- Privalov, P. L. y Khechinashvili, N. N. (1974) *J. Mol. Biol.* 66, 685-684.
- 44.- Rojo-Dominguez, A., Zubillaga-Luna, R. y Hernández Arana, A. (1963) *Biochemistry* vol. 29, no. 37, 8689-8695.
- 45.- Niaga, L. y Nykos, S. (1976) *Biochem J.* 159, 457-462.
- 46.- Dubois, M., Gillies, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350.
- 47.- Lee, Y. C. y Montgomery, R. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 292.
- 48.- Blix, G. (1948) *Acta Chem. Scand.* 2, 467.
- 49.- Reissis, J. L., Strominger, J. L. y Leloir, L. F. (1955) *J. Biol. Chem.* 217, 959.

50.- Bevington, P. R. (1969) Data reduction and Error Analysis For the Physical Sciences, RC. Graw Hill.