



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

"PURIFICACION DE LA HISTIDASA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

GRISelda DIAZ CASTRO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" Purificación de la Histidasa. "

Realizado por Griselda Díaz Castro

Con número de cuenta 8959128-4, de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M en C Nimbe Torres y Torres.

Propietario Q.F.B. Ma. Mercedes Zamudio Durán.

Propietario Q.F.B. Ma. Luisa Delgado Briseño.

Suplente Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera.

Suplente Q.F.B. Angel Barajas Chavarria.

AGRADECIMIENTOS

A la M en C Nimbe Torres y Torres, por ser parte fundamental en la asesoría para la realización de este trabajo, por compartir conmigo su tiempo y sobre todo sus conocimientos.

Al Dr. Armando Roberto Tovar Palacio, jefe del laboratorio de Nutriología Molecular, por su imprescindible ayuda en este trabajo y sus valiosos conocimientos para la realización del mismo.

Al MVZ Octavio Villanueva, por su asesoría en el manejo de animales de laboratorio.

A todos mis maestros revisores de este trabajo por sus buenos comentarios.

A mis amigos del laboratorio de Nutriología Molecular, por su ayuda y apoyo.

DEDICATORIAS

A DIOS: por darme la oportunidad de vivir y permitirme hacer realidad uno más de mis sueños.

A mis padres: por ser parte fundamental en mi vida, por la confianza y el apoyo que me brindaron y por estar siempre a mi lado.

A todos mis hermanos, en especial a mi hermana Mary y a su esposo, por su ayuda y por haberme soportado tantos años.

A mi prima Francis, por haber estado conmigo en los momentos difíciles y sobre todo por su valiosa amistad.

A mis mejores amigas de la facultad: Katya, Luisa, Claudia, Adriana, Sara, Mary, Aurelia y a mi amigo Arturo, por todo lo que compartimos.

INDICE GENERAL

Página

I. MARCO TEORICO

1.1. Generalidades de proteínas.	1
1.1.1 Funciones.	1
1.1.2 Estructura.	2
1.2. Proteínas enzimáticas.	4
1.2.1. Clasificación.	6
1.2.2. Actividad enzimática.	8
1.2.3. Regulación de la actividad enzimática.	11
1.3. Purificación de enzimas.	12
1.3.1. Generalidades.	12
1.3.2. Procedimientos de purificación.	14
1.3.2.1. Separación por precipitación.	15
1.3.2.2. Cromatografía de intercambio iónico.	15
1.3.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	16
1.3.2.4. Isoelectroenfoco.	17
1.3.3. Propiedades que se deben considerar en la purificación.	18
1.4. Antígenos proteicos y esquema de inmunización.	24
1.5. Histidasa.	26
1.5.1. Propiedades.	27
1.5.2. Estudio del gen de la histidasa.	29
1.5.3. Metabolismo de la histidina.	31
1.5.4. Importancia clínica del estudio de la histidasa.	35

II. JUSTIFICACION	37
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
IV. OBJETIVOS	38
V. HIPOTESIS	39
VI. MATERIALES Y METODOS	
6.1. Determinación de la actividad enzimática de la histidasa de hígado de rata.	40
6.2. Purificación de la Histidasa.	42
6.2.1 Preparación del homogenado.	42
6.2.2. Primera precipitación con sulfato de amonio.	45
6.2.3. Cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sephadex.	45
6.2.4. Segunda precipitación con sulfato de amonio.	46
6.2.5. Cromatografía de intercambio iónico QAE-Sephadex.	46
6.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS - PAGE).	48
6.4. Obtención de anticuerpos anti-histidasa.	50
6.5. Purificación de anticuerpos anti-histidasa (IgG) por precipitación con sulfato de amonio.	50
6.6. Determinación de la concentración de histidasa utilizando el método de Western Blot.	51
6.7. Determinación de proteínas totales por el método de biuret.	53
6.8. Determinación de proteínas totales por el método BCA.	54

VII. RESULTADOS Y DISCUSION	
Purificación de la histidasa.	56
7.1. Homogenado.	56
7.2. Primera precipitación con sulfato de amonio.	58
7.3. Cromatografía de intercambio iónico DEAE - Sephadex.	58
7.4. Segunda precipitación con sulfato de amonio.	60
7.5. Cromatografía de intercambio iónico QAE - Sephadex.	60
7.6. Análisis electroforético del proceso de purificación de la histidasa.	62
7.7. Actividad enzimática de la histidasa en diferentes tejidos de rata.	73
VIII. CONCLUSIONES	74
IX. PROPUESTAS O SUGERENCIAS	75
X. REFERENCIAS	76
XI. ANEXOS	81

INDICE DE FIGURAS

Número	Página
1. Principales rutas de degradación de la histidina.	33
2. Formación de ácido urocánico	40
3. Diagrama de flujo que describe los principales pasos en la purificación de la histidasa de hígado de rata.	44
4. Actividad enzimática de la histidasa en una muestra del homogenado.	57
5. Cromatografía de intercambio aniónico DEAE-Sephadex	59
6. Cromatografía de intercambio aniónico QAE-Sephadex	61
7. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % de muestras en los diferentes pasos de purificación de la histidasa	63
8. Electroforesis de la histidasa pura de hígado de rata después de dos semanas	66
9. Determinación del peso molecular de la histidasa purificada de hígado de rata	68
10. Western Blot de la histidasa	70
11. Neutralización de la actividad enzimática de la histidasa por la adición de diferentes concentraciones de anticuerpo anti-histidasa	72
12. Actividad enzimática de la histidasa en diferentes tejidos de rata	73

INDICE DE TABLAS

Número	Página
1. Cantidad y pureza requerida de una proteína para diferentes usos	20
2. Curva estándar de proteínas por el método de Biuret	53
3. Curva estándar de proteínas por el método BCA	55
4. Purificación de la histidasa de hígado de rata	65

I. MARCO TEORICO

1.1. Generalidades de proteínas

La mayoría de los procesos que ocurren en la célula requieren de la intervención de una o más proteínas. Las proteínas proporcionan estructura, catalizan reacciones celulares (proteínas enzimáticas) y llevan a cabo una multitud de tareas. Su papel central en la célula queda reflejado en el hecho de que la información genética se expresa en último término en forma de proteínas. Existe para cada proteína un segmento de DNA que codifica la información que especifica su secuencia de aminoácidos. En una célula típica existen miles de proteínas diferentes, cada una codificada por un gen y encargada de realizar una tarea específica. Las proteínas se encuentran entre las macromoléculas biológicas más abundantes y son también extremadamente versátiles en sus funciones.

Una proteína es una entidad funcional que consiste de una o más cadenas polipeptídicas plegadas en una estructura tridimensional específica (conformación) que viene determinada por la secuencia de aminoácidos en la (s) cadena (s) polipeptídica (s).

1.1.1. Funciones

Las funciones de las proteínas [1] incluyen:

1. Catálisis de reacciones químicas.
2. Función estructural (proteínas del pelo, piel y tejido conectivo).
3. Transporte de iones y metabolitos (permeasas), gas (hemoglobina), electrones (citocromo), y lípidos (lipoproteínas) a través de membranas y entre órganos y tejidos.
4. Regulación metabólica (receptores de membranas celulares, hormonas).
5. Mecanismos contráctiles (actina y miosina en el músculo).

6. Transmisión de impulsos nerviosos (neurotransmisores, uniones excitables).
7. Mecanismos de defensa (anticuerpos).
8. Funciones de mantenimiento (factores de la regulación sanguínea).
9. Percepción (pigmentos visuales, quimio- receptores).

Clasificación de las proteínas.

Las proteínas se clasifican de acuerdo a formas que ilustran características diferentes de sus funciones estructurales.

Algunos sistemas de clasificación se basan en características como la solubilidad, forma, función, propiedades físicas y estructura tridimensional [2].

1.1.2. Estructura

Enlace peptídico.

Los polipéptidos son secuencias lineales de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. El enlace peptídico se forma entre el grupo alfa carboxílico de un aminoácido y el grupo alfa amino del siguiente aminoácido. La unión CO - NH del enlace peptídico, tiene un carácter parcial de doble enlace, como consecuencia, no existe libertad de rotación alrededor de ella. Esto con lleva a que el grupo peptídico sea un grupo planar. La libre rotación solamente es posible en la unión del átomo de carbono en la posición alfa que conecta dos grupos peptídicos consecutivos. De las dos posibles configuraciones, cis- y trans-, solamente los péptidos trans están presentes en las proteínas [1].

Conformación de las proteínas.

El plegado tri-dimencional (conformación) de una proteína natural viene determinado por la secuencia de aminoácidos y representa la conformación más estable (es decir, la de menor estado energético). Esto se demuestra por el hecho de

que muchas proteínas que han sido desnaturalizadas (perdido su estructura tridimensional), se renaturalizan de nuevo cuando se elimina el agente desnaturalizante.

Fuerzas intermoleculares.

Las fuerzas que contribuyen al mantenimiento de la estructura tridimensional de una proteína incluyen, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, uniones iónicas, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro.

Los aspectos de la estructura proteínica se consideran en términos de las cuatro divisiones u órdenes. La conformación se describe por los cuatro niveles de complejidad creciente, las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

Estructura primaria.

La estructura primaria, para péptidos, se refiere al orden de los aminoácidos en la(s) cadena(s) polipeptídica(s) y a la ubicación de los enlaces disulfuro, si están presentes.

Estructura secundaria.

Se origina por el plegado de la cadena de polipéptido en estructura ordenada tridimensionalmente que se mantiene por los puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilos (-CO-) de un enlace peptídico y el grupo imido (NH-) de otro. Hay tres tipos principales de estructuras secundarias la estructura de hélice, la triple hélice del colágeno y la estructura en beta.

Estructura terciaria.

La estructura terciaria de una proteína se refiere al modo en que la cadena polipeptídica, normalmente ordenada por la estructura secundaria, se pliega sobre

sí misma y es estabilizada por interacciones no covalentes entre las cadenas laterales de aminoácidos, tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, iónicas, interacciones hidrofóbicas; y enlaces covalentes como puentes disulfuro.

Estructura cuaternaria.

Las proteínas poseen estructura cuaternaria si están constituidas por dos o más cadenas polipeptídicas unidas mediante fuerzas diferentes a los enlaces covalentes (es decir no son enlaces peptídicos o puentes disulfuro). Las fuerzas que estabilizan estos agregados son los enlaces de hidrógeno, y los enlaces electrostáticos o salinos formados entre residuos sobre las superficies de las cadenas polipeptídicas. Estas proteínas se denominan oligómeros y las cadenas peptídicas individuales de las cuales están compuestos son denominadas de diversas maneras: protómeros, monómeros o subunidades [2].

1.2. Proteínas enzimáticas

La vida tal como la conocemos depende en gran parte de las propiedades de un grupo de proteínas notables llamadas enzimas. Para funcionar adecuadamente, el organismo vivo debe disponer de energía en cantidad variable según las necesidades y en condiciones relativamente estables de pH, temperatura y composición química.

Hasta ahora, todas las enzimas aisladas e identificadas han resultado ser proteínas; por lo tanto, las enzimas reaccionan como cualquier otra proteína al calor, agentes precipitantes de varios tipos cambios extremos de pH, inactivándose o desnaturalizándose.

Por esta razón, el organismo dispone de mecanismos complejos para mantener estas importantes condiciones relativamente constantes dentro de límites estrechos[3].

Las enzimas constituyen una de las claves para conocer de qué modo sobreviven y proliferan las células. Actuando en secuencias organizadas catalizan cientos de reacciones consecutivas en las rutas metabólicas mediante las que se degradan nutrientes, se conserva y transforma la energía química y se fabrican las macromoléculas biológicas a partir de precursores sencillos.

El estudio de las enzimas también tiene una importancia práctica inmensa. En algunas enfermedades, especialmente en las que son genéticamente heredables, puede haber una deficiencia, o incluso una ausencia total, de una o más enzimas en los tejidos. También se pueden producir situaciones anormales por la actividad excesiva de una enzima específica.

Las enzimas son las proteínas más notables y altamente especializadas, ya que actúan como catalizadores de los sistemas biológicos. Tienen un gran poder catalítico, a menudo muy superior a los catalizadores sintéticos. Poseen un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos, aceleran reacciones químicas específicas y funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH [4].

Cuando actúan como catalizadores, algunas enzimas se asocian a compuestos orgánicos relativamente pequeños, dializables. Estos compuestos orgánicos se llaman grupos prostéticos cuando están firmemente unidos a la proteína enzimática, y coenzimas cuando la combinación se disocia fácilmente. Estas combinaciones reciben el nombre de haloenzimas, en tanto que la porción proteínica se designa apoenzima [3].

1.2.1. Clasificación

Las enzimas en base a la función que desempeñan se clasifican en:

Oxidoreductasas: catalizan reacciones de óxido - reducción.

Transferasas: intervienen en la transferencia de varios grupos, que no se encuentran libres durante el proceso.

Hidrolasas: catalizan el desdoblamiento de compuestos, uniendo a nivel de varios enlaces los elementos que forman el agua.

Liasas: unen o suprimen varios grupos pero, a diferencia de las reacciones de la transferasa, los grupos cedidos están libres durante la reacción.

Isomerasas: intervienen en arreglos intramoleculares en los cuales no cambian la fórmula empírica (número de átomos de cada tipo).

Ligasas: catalizan el enlace de dos moléculas.

Todas las reacciones biológicas suelen tener una enzima específica que las cataliza. Esta especificidad de la acción enzimática se puede explicar en gran parte con la analogía de la llave y la cerradura. Cada complejo diferente enzima-sustrato podría representarse por una combinación diferente de llave y cerradura.

Los estudios experimentales muestran que la especificidad se debe a la naturaleza química de los grupos que intervienen en la reacción, a las características tridimensionales de estos grupos (tamaño, forma, situación y distribución de cargas eléctricas en estos grupos y alrededor de ellos).

Al parecer las enzimas poseen dos tipos de sitios fundamentales para su acción catalítica. El sitio que mantiene juntos la enzima y el sustrato se llama sitio de fijación, y la parte de la enzima directamente responsable de la transformación química del sustrato se llama sitio de activación (sitio catalítico). Estos sitios no siempre están físicamente separados sobre la enzima, pues el sitio de activación

debe poseer algunas propiedades de fijación del sustrato para llevar a cabo su función catalítica.

Las investigaciones sobre el orden de sucesión de los aminoácidos en moléculas enzimáticas a nivel de los focos de activación han mostrado ciertas similitudes entre diferentes enzimas. En particular, parecen ser importantes en las funciones de los focos de activación los aminoácidos serina e histidina [3].

Algunas enzimas necesitan para su actividad iones inorgánicos específicos que reciben el nombre de activadores. Los activadores que se necesitan más frecuentemente son los iones hierro, cobre, manganeso, magnesio, cobalto y zinc. Generalmente, sólo un ión funciona con una determinada enzima, pero en ciertos casos se pueden substituir ciertos iones por otros, persistiendo una actividad enzimática satisfactoria. Los iones metálicos pueden participar en cada uno de los cuatro mecanismos con los que se sabe las enzimas aceleran la velocidad de las reacciones químicas: (1) catálisis acidobásica general, (2) catálisis covalente, (3) aproximación de los reactantes y (4) inducción de rigidez o tensión en la enzima o el sustrato.

Los iones metálicos al igual que los protones son ácidos de Lewis (electrófilos) y pueden compartir un par de electrones para formar un enlace sigma. Pueden servir también como moldes tridimensionales para la orientación de los grupos básicos en la enzima o el sustrato. Por otro lado, los iones metálicos pueden aceptar electrones a través de los enlaces sigma o pi para activar electrófilos o nucleófilos (catálisis acidobásica general). Por donación de electrones, los metales pueden activar a los nucleófilos o actuar como nucleófilos ellos mismos. La esfera de coordinación de un metal puede atraer a la enzima y al sustrato (aproximación) o crear una distorsión que produce quelatos en los mismos (rigidez o tensión). Además, un ión metálico puede "enmascarar" a un nucleófilo y así prevenir una probable reacción secundaria.

Finalmente, el control estereoquímico del curso de una reacción catalizada por enzimas, puede lograrse por la propiedad de la esfera de coordinación del metal de actuar como un molde tridimensional para mantener los grupos reactivos en una orientación específica [2].

1.2.2. Actividad enzimática

La actividad enzimática se mide en condiciones en las cuales las variaciones de la velocidad sean directamente proporcionales a la concentración de la enzima. Esto ocurre a elevadas concentraciones de sustrato, donde la velocidad se hace máxima y el orden de reacción se aproxima a orden cero. Una concentración de sustrato adecuada para los ensayos enzimáticos es aproximadamente 10 veces el valor de su K_m . (Algunas enzimas tienen que determinarse a baja concentración de sustrato porque se produce inhibición por el propio sustrato).

Las actividades de las enzimas se expresan en unidades internacionales, una unidad internacional de actividad enzimática es la cantidad de enzima capaz de transformar un micromol de sustrato por minuto en condiciones de ensayo específicas (pH, temperatura, fuerza iónica). Con frecuencia es más fácil medir la velocidad de formación del producto que la desaparición del sustrato.

La actividad específica es el número de unidades enzimáticas por miligramo de proteína. Es una medida de la pureza de la enzima; su valor aumenta durante la purificación de la misma.

El número de recambio es el número de moléculas de sustrato que son transformadas en producto por una molécula enzimática por segundo [1].

Factores que afectan la actividad enzimática.

Cada enzima tiene un valor de pH característico en el cual presenta su actividad óptima. El pH óptimo de una enzima depende de los valores de pK de los

aminoácidos de su centro activo, los cuales son responsables de la unión del sustrato, de la catálisis, y de la estabilidad de la conformación proteica a diferentes valores de pH.

La temperatura afecta a la actividad enzimática por aumentar o disminuir la energía de activación. Generalmente, la actividad enzimática aumenta con la temperatura (aproximadamente se duplica por cada 10°C de aumento en la temperatura) hasta llegar a la temperatura óptima. A temperaturas elevadas la actividad enzimática disminuye por desnaturalización de la proteína.

Inhibición enzimática

Los inhibidores enzimáticos disminuyen la actividad de la enzima. Los estudios sobre inhibición enzimática proporcionan a menudo información sobre los mecanismos de acción y permiten formular conclusiones acerca de su centro activo. La inhibición enzimática puede ser reversible e irreversible.

Solamente la inhibición reversible puede explicarse por la teoría de Michaelis-Menten, en este tipo de inhibición, el inhibidor interactúa con la enzima o con el complejo enzima-sustrato de una manera reversible. La inhibición irreversible se produce generalmente con modificación covalente de la enzima.

Hay tres tipos de inhibición reversible: (1) Competitiva, (2) no competitiva, (3) acompetitiva. En la inhibición competitiva, el inhibidor está relacionado estructuralmente con el sustrato. Estos análogos del sustrato compiten con el sustrato real por el centro activo de la enzima.

El grado de inhibición depende de la relación inhibidor-sustrato más que de la concentración del inhibidor. La velocidad máxima de la reacción enzimática no se modifica por la presencia de este tipo de inhibidor. El efecto del inhibidor puede anularse aumentando la concentración de sustrato. O dicho de otra manera, un

inhibidor competitivo aumenta la K_m aparente para el sustrato. A menores valores de un inhibidor dado, mayor es su grado de inhibición.

En la **inhibición no competitiva** la unión del inhibidor con la enzima se realiza en un sitio diferente a su centro activo. El inhibidor puede reaccionar con la enzima libre o con el complejo enzima-sustrato. En esta inhibición la K_m permanece constante, mientras que la $V_{m\acute{a}x}$ disminuye al aumentar la concentración del inhibidor.

Una inhibición no competitiva se presenta, con frecuencia, en enzimas que contienen grupos $-SH$ esenciales para la actividad que se bloquean en presencia de iones de metales pesados, o también en enzimas Mg -dependientes al ser tratados con etilendiamino tetraacetato (EDTA).

En la **inhibición acompetitiva** el inhibidor reacciona solamente con el complejo enzima-sustrato. Ambos valores de K_m y V_{max} varían a diferentes concentraciones de inhibidor. Este tipo de inhibición se encuentra frecuentemente en reacciones bi-sustrato (por ejemplo en reacciones con dos sustratos diferentes, ambos pueden unirse a la enzima en el mismo sitio. Es muy poco frecuente en reacciones de un solo sustrato. En reacciones multisustrato, un inhibidor puede ser competitivo frente a un sustrato y no competitivo o acompetitivo frente otro.

Centro activo

La existencia del centro activo de las enzimas se puede demostrar, modificando de forma covalente los aminoácidos que lo forman y por el estudio posterior de los efectos de esta modificación sobre la unión del sustrato a la enzima, y sobre la catálisis. Las enzimas interaccionan con sus respectivos sustratos por diferentes vías. Por ejemplo el sustrato se une al centro activo de la enzima de forma

covalente. Los aminoácidos que pueden formar estos intermediarios covalentes son, serina, cisteína, histidina y lisina. Alternativamente, el sustrato puede unirse a los aminoácidos del centro activo de forma no covalente (ejemplo por puentes de hidrógeno). En estos casos, la unión del sustrato puede estar afectada por la proximidad de otros grupos dadores o aceptores de protones.

La conformación del centro activo puede inducir tensión o distorsión debilitando la unión del sustrato.

Emil Fischer comparó la interacción de la enzima con su sustrato como una llave y su cerradura. El propuso que el centro activo de una enzima es rígido, estrechamente ajustado a un patrón tridimensional del sustrato, y que no aceptará, por consiguiente, una molécula diferente en tamaño o carga. Esto podría explicar la alta especificidad de las enzimas por su sustratos.

Recientemente, Koshland formuló una teoría alternativa. El sugirió que la molécula de enzima puede sufrir cambios considerables de conformación al unirse a su sustrato. Los cambios, inducidos por el sustrato, del centro activo de la enzima colocan a los grupos catalíticos en la posición justa para la acción catalítica. Esta teoría de acoplamiento está apoyada por estudios de difracción de rayos-X sobre carboxipeptidasas. Muchas enzimas, sin embargo, presentan escasos cambios de un centro activo cuando se unen al sustrato, para ellas la teoría de llave-cerradura es razonable [1].

1.2.3. Regulación de la actividad enzimática

Para el funcionamiento normal de la maquinaria celular, es necesario coordinar todas las reacciones bioquímicas que en ella tienen lugar. Esto se consigue gracias al control de las actividades de las enzimas.

Hay, al menos, cinco mecanismos diferentes capaces de regular la actividad de las enzimas.

1. Inhibición por producto. Un tipo de inhibición muy simple, en el cual el producto de la reacción inhibe su propia formación. Este caso se presenta con cierta frecuencia en reacciones reversibles.
2. Variación de la cantidad de enzima. Va acompañada de la biosíntesis de "*ново*" de enzimas, puede considerarse como una regulación a largo plazo.
3. Modificación covalente de enzimas. La actividad de una enzima puede cambiar drásticamente por la unión covalente de algunos grupos específicos, tales como fosfatos, adenilatos.
4. Interacción proteína-proteína. En este tipo de regulación la especificidad de una enzima se modifica por la unión no covalente de una proteína reguladora a la enzima.
5. Regulación alostérica. Este es, probablemente, el mecanismo de control celular más extendido. Una enzima alostérica es una enzima cuya actividad se modifica por la unión no covalente de un efector o modulador de bajo peso molecular. Por regla general, la molécula moduladora se une a la enzima en un sitio diferente del sitio catalítico. El modulador puede tener un efecto positivo o negativo sobre la actividad enzimática. Algunas enzimas alostéricas interactúan con uno o más moduladores positivos y uno o más moduladores negativos simultáneamente, y cada modulador se une a la enzima en su propio centro específico [2].

1.3. Purificación de enzimas

1.3.1. Generalidades

La actividad catalítica de una enzima proporciona una prueba sensible y selectiva para su identificación. Las pequeñas cantidades de diferentes enzimas presentes en la célula obstaculizan la cuantificación para determinar la cantidad de una enzima

en líquidos o extractos de tejidos. Por fortuna, la actividad catalítica de una enzima provee un dispositivo sensible y específico para su propia medición.

Para medir la cantidad de una enzima en una muestra de extracto tisular o de algún líquido biológico, se mide la velocidad de la reacción catalizada por ella. En circunstancias apropiadas, la velocidad medida es proporcional a la cantidad de enzima presente.

Dado que es difícil determinar el número de moléculas o la masa de enzima presente, los resultados se expresan en unidades enzimáticas. Las cantidades relativas de la enzima se pueden entonces comparar en diferentes extractos. Las unidades enzimáticas son mejor expresadas en micromoles, nanomoles o picomoles de sustrato reaccionante o de producto formado por minuto.

Para comprender la estructura, función, mecanismo de reacción y regulación de las enzimas es esencial disponer de enzimas puras.

El conocimiento con respecto a las reacciones y de los intermediarios químicos en las vías metabólicas y el de los mecanismos reguladores que operan a nivel de la catálisis deriva en gran parte de los estudios de enzimas purificadas. La información fidedigna referente a la cinética, cofactores, sitios activos, estructura y mecanismo de acción también requiere de enzimas altamente purificadas.

El objetivo de la purificación de la enzima es aislar una proteína enzimática específica de un extracto crudo de células que contienen muchos otros componentes, logrando la actividad específica máxima (unidades de enzima por miligramo de proteína) con la mayor recuperación posible de la actividad inicial.

Las moléculas pequeñas pueden ser eliminadas por diálisis o por filtración en gel, los ácidos nucleicos por precipitación con el antibiótico estreptomycin. El problema es separar a la enzima deseada de una mezcla de cientos de proteínas química y físicamente semejantes [2].

1.3.2. Procedimientos de purificación

Antes de purificar una proteína se ensayan distintos métodos de separación y se valora la eficacia de cada uno mediante el análisis de una propiedad característica de la proteína que se busca. El ensayo típico de una enzima, por ejemplo consiste en determinar su actividad catalítica propia. El procedimiento de purificación que se elige se comprueba paso a paso mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida; si el procedimiento es adecuado, la proteína que se desea purificar irá incrementando progresivamente en las sucesivas tinciones sobre el gel.

También se puede medir la cantidad total de proteína, de modo que en cada etapa se deduce el nivel alcanzado en su purificación. Se han purificado varios millares de proteínas distintas atendiendo a características tales como tamaño, solubilidad, afinidad de enlace y carga [5].

Los procedimientos clásicos útiles de purificación incluyen la precipitación con concentraciones salinas variables (por lo general sulfato de sodio o de amonio) o solventes (etanol o acetona), desnaturalización diferencial por calor o pH, centrifugación diferencial, filtración en gel y electroforesis. La absorción selectiva y la elución de las proteínas de la celulosa de intercambio aniónico, dietilaminoetilcelulosa (DEAE), y de la de intercambio catiónico carboximetilcelulosa (CMC) también han sido extremadamente útiles para la purificación extensa y rápida. La separación de proteínas sobre tamices moleculares como Sephadex, que separan proteínas en la base a su tamaño es usada también con amplitud. Sin embargo, estos métodos son relativamente poco selectivos en el sentido de que no aíslan, excepto en combinación, una proteína sola de todas las demás. Esto se logra con más facilidad por cromatografía por afinidad. Las técnicas de cromatografía por afinidad utilizan ligandos inmovilizados que interactúan con regiones específicas de una enzima [2].

1.3.2.1. Separación por precipitación.

La distribución de residuos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos en la superficie de la molécula de proteína es la característica que determina la solubilidad en varios solventes.

La solubilidad es el resultado de la interacción polar de estos aminoácidos con el solvente acuoso, de interacciones iónicas con la sal presente y de las fuerzas electrostáticas repulsivas entre las cargas de las moléculas o pequeños agregados de moléculas [6].

La solubilidad de las proteínas disminuye frente a elevadas concentraciones de sales. Este efecto llamado desalado (salting out), resulta muy útil, y es grandemente dependiente de la hidrofobicidad de la proteína.

La dependencia de la solubilidad respecto a la concentración salina difiere de una proteína a otra. Por lo tanto, el efecto desalado puede utilizarse para el fraccionamiento de las proteínas. También resulta útil para concentrar disoluciones diluidas de proteínas.

1.3.2.2. Cromatografía de intercambio iónico.

Las proteínas pueden también separarse en función de su carga eléctrica. Si una proteína tiene a pH 7 una carga positiva, normalmente se unirá a una columna rellena de resina conteniendo grupos carboxilato, mientras que una proteína cargada negativamente no lo hará.

Una proteína con carga positiva, unida a la columna, puede ser eluida, (liberada) aumentando la concentración de cloruro de sodio u otra sal en el tampón eluyente. Los cationes de sodio compiten con los grupos positivos de la proteína en su capacidad de unirse a la columna. Las proteínas de baja densidad de cargas positivas se eluirán primero, seguidas por las de mayor densidad de carga.

Otros factores, aparte de la densidad de carga, son la afinidad por la matriz soporte, que también influye en el comportamiento de las proteínas en este tipo de columnas. Para separar las proteínas con cargas negativas (aniónicas) se utilizan columnas con relleno cargado positivamente, como, por ejemplo, dietilaminoetil celulosa. Inversamente, las proteínas positivas (catiónicas) pueden separarse por columnas negativas, como las de carboximetilcelulosa [5].

La afinidad de cada proteína por la resina está afectada por el pH (que determina el estado de ionización de la molécula) y la concentración de iones salinos que pueden competir con la resina por asociación con la proteína.

Se puede, por tanto, conseguir la separación óptima de las proteínas mediante un cambio gradual del pH o de la concentración salina de la solución que se pasa a través de la columna de manera que se cree un gradiente de pH o de sal [4].

1.3.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Además de la cromatografía existe otro conjunto importante de métodos para la separación de proteínas basado en el desplazamiento de las proteínas cargadas en un campo eléctrico, proceso denominado electroforesis.

Estos procedimientos no son utilizados normalmente para purificar proteínas en grandes cantidades dado que existen métodos alternativos más sencillos y que los métodos electroforéticos frecuentemente inactivan las proteínas.

No obstante, es muy útil como método analítico. Su ventaja es que al tiempo que se separan también se pueden visualizar, permitiendo hacer una estimación rápida sobre el número de proteínas en una mezcla o el grado de pureza de una preparación proteica determinada. La electroforesis también permite la determinación de propiedades cruciales de una proteína como su punto isoeléctrico y la masa molecular aproximada.

La electroforesis de proteínas se lleva a cabo normalmente en geles formados por el polímero entrecruzado de poliacrilamida. Este gel actúa como un tamiz molecular, retrasando el desplazamiento de las proteínas en una forma aproximadamente proporcional a su masa molecular. Un método electroforético comúnmente utilizado para la estimación de la pureza y la masa molecular utiliza el detergente dodecil sulfato sódico (SDS). El SDS se une a la mayoría de las proteínas (probablemente mediante interacciones hidrofóbicas) en una cantidad aproximadamente proporcional a la masa molecular de la proteína, alrededor de una molécula por cada dos residuos de aminoácidos. El SDS ligado incorpora una gran carga neta negativa, lo que hace que la carga intrínseca de la proteína sea insignificante. Además, la conformación nativa de la proteína se altera cuando se fija el SDS y la mayoría de las proteínas adoptan una forma similar y, de este modo, una razón similar de carga a masa. La electroforesis en presencia de SDS separa, por tanto, las proteínas casi exclusivamente en función de la masa (masa molecular relativa) de forma que los péptidos pequeños se desplazan más rápidamente. Después de la electroforesis las proteínas se visualizan añadiendo un colorante tal como el azul de Coomassie que se fija a las proteínas pero no al gel. Este tipo de gel proporciona un método para seguir el progreso en el aislamiento de una proteína ya que el número de bandas proteicas ha de disminuir a medida que transcurre la purificación. Cuando se compara con las posiciones a las que se desplazan en el gel proteínas de masa molecular conocida, la posición de una proteína desconocida puede proporcionar una medida excelente de su peso molecular. [4].

1.3.2.4. Isoelectroenfoque.

Las proteínas pueden también separarse electroforéticamente según sus contenidos relativos en aminoácidos ácidos o básicos. El punto isoelectrónico (pI) de

una proteína es aquel pH en el cual su carga neta es cero. A este pH, su movilidad electroforética es nula. Cuando una mezcla de proteínas se somete a electroforesis, en un gradiente de pH, en un gel carente de SDS, cada proteína se moverá en el gel hasta alcanzar una posición la que el pH del medio coincida con el pI de la proteína. Este método de separación de proteínas según sus puntos isoeléctricos se denomina isoelectroenfoque. El gradiente de pH del gel se consigue sometiendo a electroforesis previa una mezcla de polianfolitos (pequeños polímeros multicargados) con diferentes valores de pI.

Esta separación de las proteínas también se puede realizar en una cámara de isoelectroenfoque con una solución de anfolitos aplicando un voltaje. Este método permite distinguir proteínas que difieran en sus pI tan poco como 0.01, lo que significa que una sola carga neta basta para separarlas.

El isoelectroenfoque combinado con electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida permite tener resoluciones muy elevadas. La muestra se somete primero a isoelectroenfoque. Este gel se coloca ahora horizontalmente encima de un gel de SDS-poliacrilamida y se somete a electroforesis vertical para obtener una distribución bidimensional de las proteínas [5].

1.3.3. Propiedades que se deben considerar en la purificación

El límite y la escala de purificación de una proteína debe ser apropiada para el propósito de ésta, es decir, debe ser de acuerdo a el uso que se le dará a el producto final de la purificación. En general, lo que se desea es obtener un producto de la proteína libre de proteínas contaminantes y otros materiales. Sin embargo, un número de proteínas pueden ser usadas satisfactoriamente con un grado de purificación menor que una proteína completamente pura. Por ejemplo, cuando se preparan anticuerpos monoclonales contra una proteína, cantidades de microgramos son utilizados y no necesita ser completamente pura la proteína.

Estudios enzimáticos requieren cantidades de miligramos de enzima y estudios químicos de miligramos a gramos de una preparación de proteína de mayor grado de pureza, después las propiedades básicas físicas y enzimáticas pueden ser medidas. Cuando las enzimas son usadas para llevar una rutina de reacciones enzimáticas, por ejemplo, reacción de endonucleasas de restricción, no necesariamente la proteína debe ser 100% pura, simplemente que éste libre de enzimas activas contaminantes.

TABLA 1. Cantidad y pureza requerida para diferentes usos [6].

Uso	Cantidad necesaria	Pureza requerida
Inmunología	µg-mg	
Anticuerpos:		
Policlonales		Alta
Monoclonales		Media
Enzimología	mg	Alta (95%)
Propiedades físicas	mg-g	Alta
Enzimas y propiedades quím.	mg-g	Alta
Estructura	g	Alta
Farmacéutico	mg-kg	Muy alta (>99.99%)

Una de las razones por las que se puede purificar una proteína de una mezcla de millares de proteínas es que éstas varían tremendamente en un número de sus propiedades físicas y químicas. Para aprovechar la diferencia en propiedades entre la proteína de interés y otras proteínas en la mezcla, uno puede designar una serie racional de pasos de separación. Estas propiedades incluyen:

Tamaño y Forma.

Las proteínas pueden variar en tamaño desde péptidos de unos cuantos aminoácidos o unos cientos de daltons hasta proteínas muy grandes conteniendo por arriba de 3,000 aminoácidos con un peso molecular por encima de 300,000 daltons. La mayoría de las proteínas caen en el rango de 10,000 a 150,000 daltons. Proteínas que son parte de agregados de multisubunidades pueden alcanzar tamaños muy grandes. El movimiento de una proteína a través de una solución durante centrifugación o a través de pequeños poros de una membrana o geles es influenciada por la forma de la proteína, existe un rango de formas desde esférica (globular) hasta completamente asimétricas.

Carga.

La carga en una proteína es determinada por la suma de las cargas positivas y negativas de los residuos de aminoácidos. Si una proteína tiene muchos residuos de ácido aspártico y glutámico termina en una proteína ácida. Si ésta tiene una preponderancia de lisina, arginina y en el mismo caso histidina, puede ser considerada una proteína básica. Obviamente la carga en una proteína puede ser determinada por el pH de la solución.

Punto isoeléctrico.

El punto isoeléctrico (pI), es aquel pH al cual la carga de una proteína es cero y es determinado por el número y curvas de titulación de los residuos de aminoácidos cargados positiva y negativamente en la proteína. Generalmente el rango de puntos isoeléctricos de las proteínas es de 4.5 - 8.5.

Solubilidad.

La solubilidad de las proteínas varía dramáticamente en diferentes solventes, desde ser esencialmente insolubles a ser solubles a grandes cantidades por mililitro de solución. Las variables fundamentales que afectan la solubilidad de una proteína incluyen pH, fuerza iónica, naturaleza de los iones, y polaridad del solvente.

Densidad.

La densidad de muchas proteínas es aproximadamente 1.4 g/ml y no es generalmente una propiedad útil para fraccionamiento de proteínas. Sin embargo las proteínas contienen grandes cantidades de fosfato o lípidos que son substancialmente más o menos densos que el promedio, respectivamente, y pueden ser separadas de la masa de proteínas usando métodos de gradiente de densidad.

Hidrofobicidad.

El número y distribución espacial de residuos de aminoácidos presentes en la superficie de la proteína determina la habilidad de la proteína para unirse a una columna de otro material hidrofóbico, y por lo tanto puede ser aprovechada en la separación.

Ligando y unión a metales.

Muchas enzimas unen sustratos, moléculas efectoras, cofactores, patrones de DNA, y ciertos iones metálicos (por ejemplo, cobre, zinc, calcio, cobalto) completamente firmes. Estas uniones pueden ser usadas para que la enzima pueda unirse a una columna con el ligando apropiado, o con iones metálicos que pueden ser inmovilizados.

Agregación o asociación reversible.

Bajo ciertas condiciones de solución, muchas enzimas forman agregados en forma de dímeros, tetrámeros, etc. Esta habilidad para ser un dímero bajo una condición, por ejemplo, y un monómero bajo otra condición puede ser usada si dos separaciones basadas en tamaño son llevadas secuencialmente en estas dos condiciones diferentes.

Secuencia o estructura específica.

La presentación geométrica precisa de residuos de aminoácidos en la superficie de una proteína puede ser usada como la base de un procedimiento de separación si un anticuerpo que reconoce únicamente a un sitio particular en una proteína puede ser obtenido. Semejante a una columna, fijando un anticuerpo mono-específico que únicamente pueda unir a la proteína de interés, es llamada columna de inmunofinidad y puede ser más específica.

Otras propiedades.

Además de los tipos de propiedades mencionadas anteriormente, ciertas proteínas tienen propiedades extrañas que pueden ser aprovechadas durante una purificación. Un ejemplo es la extraña termoestabilidad. Muchas enzimas son inactivadas, coaguladas o precipitadas si se calientan a 95 °C. Una proteína que

permanece soluble y activa después seguramente con un tratamiento con calentamiento puede ser separada fácilmente de la masa de proteínas celulares. Otra propiedad semejante es la extraña resistencia a proteasas [6].

Todas estas propiedades mencionadas de las proteínas son potencialmente usadas en la designación de un eficiente protocolo de purificación de proteínas. El tipo de proceso de purificación que puede ser usado cae dentro de varias categorías generales. Un tipo de proceso lleva la ventaja de cambios en la solubilidad de una proteína con respecto a las otras. El segundo tipo de proceso desarrolla la partición de una proteína entre dos fases. La tercer categoría desarrolla la adsorción de la proteína de interés en una matriz sólida, frecuentemente una resina en columna, y subsecuente elución. La cuarta categoría desarrolla movimientos diferenciales de la proteína de interés, en un campo eléctrico, en un campo de centrifugación o a través de poros de tamaño cuidadosamente controlado en un filtro de membrana o una columna de filtración en gel. La combinación apropiada de una serie de pasos de purificación es suficiente en muchos casos para obtener una proteína pura [6].

1.4. Antígenos proteícos y esquema de inmunización

Todos los polipéptidos de peso molecular suficiente (como regla general, superior a 1000 dáltones) y sin excepción todas las proteínas, son inmunogénicos, pero en grados diversos. De acuerdo con la intensidad de la respuesta inmunitaria inducida, se habla de antígenos fuertes o débiles. Los inmunógenos más poderosos son proteínas macromoleculares o agregados de proteínas ya que son más fácilmente fagocitados, las proteínas solubles pueden ser convertidas en agregados por unión a sustratos sólidos tales como esferas de agarosa y funcionar así como buenos inmunógenos. La modificación de las proteínas por tratamientos físicos o químicos, que provocan cambios de conformación, pueden en algunos casos

modificar o reducir la inmunogenicidad [7]. Los dos mejores métodos usados en inmunoquímica para la identificación y caracterización de antígenos proteicos son la inmunoprecipitación y el Western blot.

La inmunogenicidad de una sustancia es, dentro de ciertos límites, una función de su tamaño molecular y su complejidad y depende además operacionalmente de las condiciones experimentales del sistema o esquema de inmunización, éstas incluyen formas del inmunógeno, vía de inmunización, uso de un adyuvante, organismo a inmunizar y la sensibilidad de los métodos utilizados para detectar la respuesta [8]. La forma del antígeno es muy importante, como ya se mencionó anteriormente los antígenos en forma de agregados son usualmente mejores inmunógenos que las moléculas solubles, además debe tomarse en cuenta también la dosis apropiada del antígeno para obtener una respuesta adecuada, para conejos si se trata de una proteína soluble pura la dosis usada es de 50 - 1000 μg por vía subcutánea. La vía de inmunización se puede elegir tomando en cuenta tres decisiones prácticas como son: que volumen va a ser administrado, con qué amortiguador u otro componente va a ser inyectado el inmunógeno y que tan rápidamente puede ser distribuido dentro de los nódulos linfáticos o en la circulación. Estas vías pueden ser intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica o intramuscular. La respuesta a un inmunógeno se puede incrementar si se administra como mezcla con sustancias llamadas adyuvantes que son estimuladores no específicos de la respuesta inmune. Los adyuvantes funcionan de una o más de las siguientes maneras: 1) al prolongar la retención del inmunógeno. 2) al incrementar su tamaño efectivo, o 3) al estimular el flujo de poblaciones de macrófagos o linfocitos, o ambos. Se ha utilizado un amplio número de adyuvantes en animales de experimentación, siendo el más poderoso el adyuvante completo de Freund (CFA), emulsión de agua en aceite que contiene micobacterias muertas. La elección del animal para la inmunización es

determinada por varios puntos como son, que cantidad de suero se necesita, de que especie es aislado el antígeno, si se necesitan anticuerpos monoclonales y que cantidad de antígeno es disponible. Un amplio rango de especies de vertebrados pueden ser usados para la producción de antisuero. Los cinco animales de laboratorio más comúnmente utilizados son conejos, ratón, ratas, hámster, y conejillo de Indias. Después de la inmunización, deben tomarse muestras de suero para checar la producción de anticuerpos específicos. El sangrado puede realizarse mediante punción cardíaca, corte de vena axilar, vena central de la oreja o plexo venoso oftálmico [9]. La cantidad de anticuerpo específico presente en el antisuero puede ser cuantificado por radioinmunoensayo (RIA) o por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) [10].

1.5. Histidasa

La histidasa (histidina amonio-liasa EC 4.3.1.3) es una enzima citoplásmica, es la primer enzima en la vía catabólica de la histidina y ha sido estudiada tanto en bacterias como en mamíferos.

En mamíferos, esta enzima es localizada principalmente en hígado y epidermis. La enzima del hígado y la epidermis son idénticas en estructura, ya que son producto del mismo gen, por lo que tienen propiedades similares. En base a la aparente identidad de la enzima de hígado con la epidermal, la actividad enzimática de la histidasa en humanos es clínicamente una medida de diagnóstico de histidinemia, y por la relativa dificultad de extraer suficiente enzima para su caracterización en el tejido epidermal, las propiedades cinéticas y moleculares de la enzima de hígado en mamíferos son de particular interés.

1.5.1. Propiedades

La histidina amonio-liasa de hígado de rata ha sido purificada a partir de homogenado, con un peso molecular nativo de aproximadamente 200 000 Daltons. La enzima tiene un pH óptimo de aproximadamente 8.5 y una K_m para el sustrato L-histidina de 0.5 mM a pH 9.0 y de 2.0 mM en el rango de pH fisiológico. El ácido D- α -hidrazinoimidazolpropiónico es un potente inhibidor competitivo de la histidasa de hígado ($K_{is} = 75\mu\text{M}$); el L- enantiomero de este compuesto es menos efectivo. La enzima es únicamente inhibida competitivamente por L-histidina hidroxamato ($K_{is}=0.4 \text{ mM}$) y en menor extensión por histidinol, D-histidina y glicina. Una gran variedad de análogos de la histidina han sido utilizados para inhibir la enzima pero no se han obtenido buenos resultados lo que indica una gran especificidad del sitio activo para la L-histidina. Sustratos alternos no han sido identificados para la enzima [11].

La enzima en eucariotes ha sido relativamente menos estudiada; sin embargo, la de origen bacterial ha sido purificada y estudiada extensamente. Las propiedades de la histidina-amonio-liasa de hígado de rata difieren significativamente de las de la enzima de *Pseudomonas fluorescens*. Se ha demostrado que la histidasa de *P. fluorescens* a diferencia de la de hígado de rata, existe como un tetrámero con un peso molecular de 213,000 Daltons, compuesta aparentemente de subunidades idénticas con un peso molecular de 55,000 D. La enzima se inactiva irreversiblemente por hidrazinas y bisulfito[11]. El valor de la K_m para la histidasa de *Pseudomonas* varía entre $9 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $2.4 \times 10^{-2} \text{ M}$ [12].

La histidina amonio liasa de hígado de rata y la de *P. fluorescens* aunque se consideran superficialmente similares, difieren substancialmente en estructura y propiedades cinéticas. El valor de K_m para la histidasa de hígado aumenta al aumentar o disminuir el pH; en contraste, la K_m de la histidasa de *P. fluorescens* tiene un valor mínimo entre pH 6.5 y 8.0 e incrementa progresivamente a

mayores valores de pH. Por lo tanto el sitio de unión al sustrato para los dos tipos de enzima es diferente por la presencia de un grupo ionizable, en la enzima de hígado de rata con un pKa entre 7.0 y 9.0, la protonación de este grupo da como resultado una pronunciada disminución en la afinidad del sitio activo por el sustrato y por lo tanto disminuye la actividad catalítica. Para la enzima de *P. fluorescens* el valor de pKa de este grupo ionizable está entre 7.9 y 10.2. Las dos enzimas contienen una fuerte modificación electrofílica de un aminoácido en el centro activo, referido como "dehidroalanina", el cual participa en la reacción de desaminación y sugiere por lo tanto un mecanismo catalítico común, este residuo de dehidroalanina en el centro activo no ha sido totalmente caracterizado [11].

La histidasa de hígado de rata así como la enzima bacteriana son inactivadas con nitrometano radiactivamente marcado, esto sugiere también que ambas enzimas deben poseer un centro electrofílico idéntico o al menos muy similar en el sitio activo [13]. Se ha reportado también que la inyección de nitrometano en ratones adultos causa la inactivación de la histidasa de hígado, el efecto del nitrometano *in vivo* es específico, por lo que puede permitir la producción de un modelo para el desorden genético conocido como histidinemia [13].

La actividad enzimática de la histidasa ha sido demostrada en muestras de homogenados de extracto córneo de la epidermis de la piel [14]. Estas muestras son obtenidas de la cutícula de las uñas de los dedos de las manos, de la superficie plantar del pie y del talón, áreas que contienen abundante histidasa [15].

La actividad de esta enzima ha sido estudiada también en células epiteliales y fibroblastos en cultivos de células de fluido amniótico. Las células epiteliales muestran una alta actividad de histidasa, en contraste con los fibroblastos derivados del mismo cultivo original en los cuales no se detecta actividad de la enzima. Esta observación indica que cultivos de células de fluido amniótico contienen células con diferentes propiedades bioquímicas además de características

morfológicas, por lo que se puede considerar el uso de la histidasa como un marcador en la caracterización de células de fluido amniótico [16].

1.5.2. Estudio del gen de la histidasa

Aparte de la fenilalanina amonio-liasa, que no se expresa en animales, la histidasa es la única enzima que demuestra tener un residuo de dehidroalanina en su sitio activo. Un paso inicial para estudiar el gen de la histidasa fué aislar una clona del DNA complementario (cDNA) funcional de una biblioteca de cDNA de hígado de rata usando la afinidad por el antisuero purificado. El cDNA tiene un tamaño de 2.2 kilobase, tiene 1,971 pares de bases que codifican para un polipéptido de 657 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 72,165 Da. Este cDNA fue unido a un vector de expresión de histidasa, células COS de riñon de mono (que no tienen actividad endógena de histidasa) fueron transfectadas con este vector de expresión produciendo histidasa activa, sugiriendo que el requisito de modificación para la enzima ésta presente en estas células o que el residuo de dehidroalanina se forma por un mecanismo autocatalítico, siendo ésto un primer paso para determinar el precursor de la formación del residuo de dehidroalanina en la histidasa y fenilalanina amonio liasa [17].

Las secuencias de aminoácidos de la histidasa de hígado de rata, de *Bacillus subtilis*, de *P. putida* y fenilalanina amonio-liasa de levaduras; presentan una región de homología que provee un punto de partida para la identificación del precursor de dehidroalanina y su papel en el sitio activo de la histidasa y fenilalanina amonio-liasa. La enzima de hígado tiene un 41 y 43% de aminoácidos idénticos con la de *P. putida* y *B. subtilis* respectivamente y un 20% con la fenilalanina de levaduras. La homología entre la histidasa y la fenilalanina amonio-liasa, la similitud de la reacción catalizada por ellas, y la presencia del residuo de dehidroalanina presente en el sitio activo de ambas enzimas sugiere

que los genes para estas dos enzimas son derivados de un gen ancestral común y que estos genes tienen evolución para codificar para enzimas con sitios activos similares, pero diferente especificidad por el sustrato [17].

Centro activo de la histidasa.

La inactivación de la histidasa por varios reactivos nucleofílicos revela la presencia de un fuerte centro electrofílico esencial para la catálisis. Este centro ha sido reportado como un residuo de dehidroalanina basándose en la identificación de varios derivados de la inactivación de la histidasa. Se ha reportado inactivación con la L-cisteína de la histidasa de *P. putida* purificada de un sistema de sobre expresión en *E. coli*. Posteriormente se aisló un péptido que representaba el sitio activo de la histidasa y se secuenció, encontrándose finalmente una modificación de masa de 184 Da localizada en Ser¹⁴³ y que por lo tanto este residuo de Ser (serina) representa el sitio para la unión del cofactor electrofílico en histidasa de *P. putida* [18].

Mutaciones de la secuencia de la histidina amonio liasa de cuatro serinas por alaninas en células COS da como resultado la producción de igual cantidad de la enzima pero con un menor porcentaje de actividad que la enzima normal de rata (control). La anulación de la actividad de histidasa por la sustitución de serina 254 por alanina, es una fuerte evidencia de que este residuo es el precursor de la modificación electrofílica esencial de la histidasa, y que por lo tanto este residuo de serina 254 en hígado de rata corresponde a la serina 143 en la histidasa de *P. putida* [19].

Secuencia del cDNA de la histidasa humana.

Los cDNAs de histidasa de hígado de rata y ratón han sido recientemente aislados [17]. Tomando en cuenta la importancia de caracterizar la estructura de la

histidasa humana y la investigación de histidínemia a nivel genética molecular se aisló y secuenciaron clonas de cDNA que codifican para la histidasa humana.

El DNA total fué preparado de una biblioteca de cDNA de hígado de rata, se amplificó un fragmento de este cDNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La secuencia de cDNA de histidasa humana muestra un 87% de identidad con la histidasa de rata y 87% de identidad con la histidasa de ratón sobre de la región codificante. A nivel de aminoácidos, la histidasa humana conserva un 93%, incluyendo los cuatro sitios de N-glicosilación con respecto a la histidasa de rata y ratón, presenta un peso molecular 72,651 Da [20].

Usando el cDNA de la histidasa como sonda, se tamizó una biblioteca genómica humana. El análisis de las clonas obtenidas reveló la existencia de 21 exones con sus respectivos intrones que en conjunto abarcan alrededor de 25 Kb. En la región promotora se demostró la existencia de sitios de unión para varios factores de transcripción específicos de hígado o epidermis como C/EBP, NFIL6, HNF5, AP2/KER1 y MNF entre otros. Consistente con la expresión hepática o epidérmica de la histidasa, esta información sugiere que la transcripción del gen de esta enzima está regulada por estos factores [21].

1.5.3. Metabolismo de la Histidina

La histidasa es la primera enzima en la ruta catabólica principal del metabolismo de la histidina.

La histidina se degrada en mamíferos por dos vías o rutas metabólicas (fig. 1). La histidina puede ser catabolizada por la histidasa dando como productos finales el ácido glutámico y el tetrahidrofolato de formimino o ser degradada por la histidina piruvato aminotransferasa dando como productos finales el piruvato de imidazol, lactato de imidazol y acetato de imidazol. Los dos primeros productos

pueden ser reconvertidos a histidina o excretados en la orina y el último sólo es excretado[22].

La Histidina-piruvato transaminasa (aminotransferasa) está presente en hígado de rata en dos formas, una asociada con mitocondria y la otra en forma soluble, mientras que la histidasa se encuentra en el citoplasma. La actividad de estas dos enzimas juntas es aproximadamente tres veces más grande que la de histidasa sola pero únicamente ésta última es inducida por la proteína dietaria. Las dos enzimas son inducidas por glucagon y cortisol [23], [24].

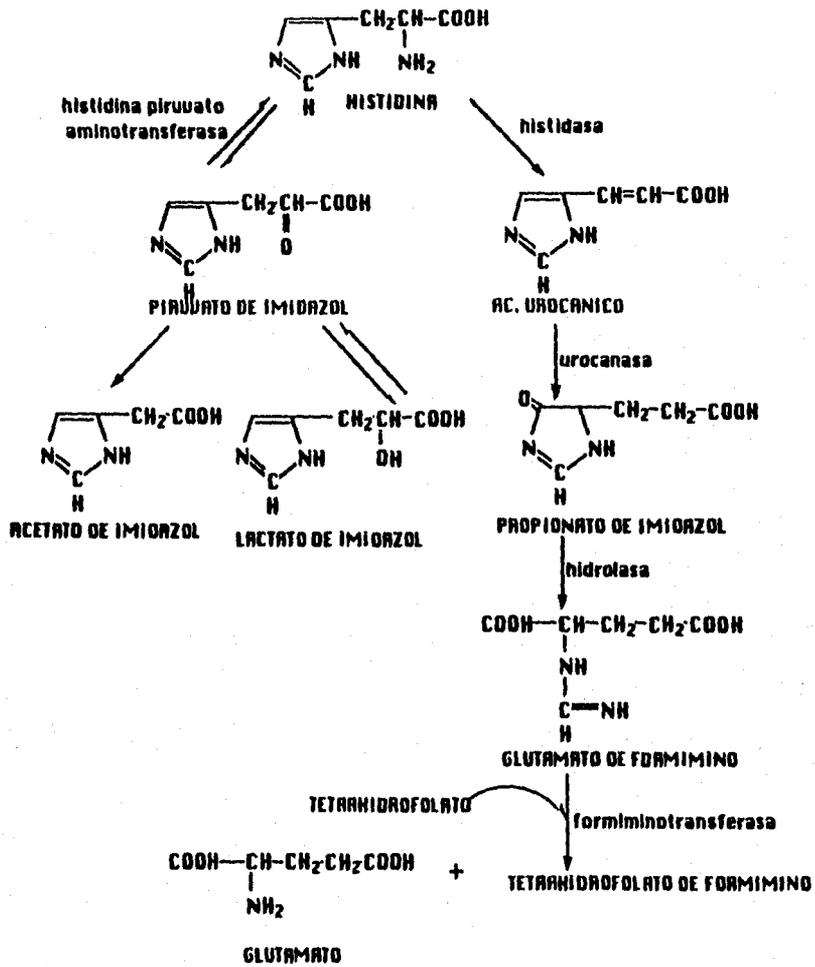


Figura 1. Principales rutas de degradación de la histidina [22].

La actividad de esta enzima no es afectada por la histidina contenida en la dieta pero sí por la proteína dietaria (caseína). Las ratas alimentadas con mayor porcentaje de caseína (80%) presentaron 3.5 veces más actividad de histidasa que las alimentadas con bajo porcentaje de caseína(15%) a pesar del contenido de histidina en la dieta [25].

También se ha reportado que los glucocorticoides, estrógenos y el glucagon estimulan la actividad enzimática de la histidasa en ratas, participando en la regulación del desarrollo de la enzima hepática en estados postnatales específicos de la rata, aumentando la velocidad de la biosíntesis de la histidasa y su actividad catalítica [26].

Las actividades de la histidasa, urocanasa e histidina piruvato transaminasa han sido estudiadas en ratas bajo condiciones de desnutrición proteica. Las actividades de las dos primeras son significativamente disminuidas en estas condiciones, mientras la actividad de la histidina piruvato transaminasa no es afectada. Estos cambios en las actividades de las enzimas son de naturaleza reversible y dependen de la proteína dietaria [27].

Histidina.

La histidina también puede ser descarboxilada para dar la amina correspondiente, histamina, esta descarboxilación tiene lugar en varios órganos, en particular en los mastocitos. La histamina tiene funciones tan diversas como la producción de ácido por la mucosa gástrica y la dilatación y contracción de vasos específicos. Una reacción excesiva de ésta provoca los síntomas de asma y otras reacciones alérgicas [28]. La histidina es indispensable para el crecimiento en la rata, ratón perro y pollo, y en ratas adultos únicamente es requerida para mantener el balance de nitrógeno. La histidina no es esencial en el hombre, esta observación es de interés considerable ya que sugiere que algunos tejidos humanos contienen la enzima

necesaria para la biosíntesis de la histidina. Además de que este aminoácido está presente en cantidades relativamente grandes en hemoglobina y en algunos péptidos como carnosina, anserina y ergotionina, de los cuales puede recuperarse [29].

1.5.4. Importancia clínica del estudio de la Histidasa

La histidinemia es un raro desorden metabólico hereditario descrito por Ghadimi en 1961 [30], al encontrar niveles elevados de histidina en sangre y orina de dos personas que mostraban defectos para hablar, concluyendo que este caso representaba un nuevo error en el metabolismo de la histidina. La histidinemia se detectó inicialmente como falsos positivos en los rastreos de la orina de niños con cloruro férrico. El color verde lo producía un análogo del fenilpiruvato, el imidazolpiruvato, compuesto que se forma por transaminación de la histidina [28].

Aunque la histidina es el único aminoácido que se excreta en cantidades notables durante la histidinemia, suele haber también un aumento moderado de la excreción de alanina, treonina y ácido glutámico [31].

Este desorden es causado por deficiencia en la actividad de la histidasa o ausencia de ésta que da como resultado un incremento en histidina e histamina, y disminución de ácido urocánico, además de elevar la excreción urinaria de histidina y sus productos de transaminación [32]. La concentración de histidina en sangre de individuos afectados varía de 290 a 1420 μM (normal de 70 a 120 μM), de trece a catorce veces mayor que el valor normal.

En pacientes con histidinemia, la actividad de histidasa es reducida en ambos tejidos, hígado y epidermis de la piel. La principal consecuencia del defecto de esta enzima en la epidermis es la disminución de ácido urocánico, al cual se le han asignado dos papeles diferentes a nivel de la epidermis, uno de ellos es el efecto

protector de la luz ultravioleta, específicamente protege al DNA de la fotomutagénesis y el otro como mediador de la inmunosupresión inducida por la luz ultravioleta.

Por lo tanto los pacientes histidinémicos tienen mayor posibilidad de incidencia de cáncer en la piel o de enfermedades a nivel de la piel. Sin embargo, no se han desarrollado investigaciones que prueben esta hipótesis [33]. La incidencia de casos de histidinemia es de 1 en 8,000 en Japón, 1 en 12,400 en Austria y 1 en 37,000 en Suecia, tales datos indican que la histidinemia es uno de los más frecuentes errores innatos del metabolismo de aminoácidos. El cuadro clínico de la histidinemia varía de completa normalidad a severa retardación mental o dificultad en el lenguaje debida tal vez a la falta de memoria auditiva, algunos casos pueden ser asintomáticos, la correlación entre los datos clínicos y los datos bioquímicos aún no ha sido definida, por lo que no se ha podido caracterizar definitivamente a la histidinemia humana como una enfermedad o como un modelo de una variante bioquímica [34].

II. JUSTIFICACION

Ciertos sustratos, nutrimentos u hormonas producen un aumento en la actividad de varias enzimas. Para conocer si este aumento es debido a una mayor síntesis de la enzima es necesario medir la concentración de ésta, para lo cual se necesita purificar la enzima de interés y producir anticuerpos contra ella.

La purificación de la enzima de interés así como la producción de anticuerpos contra la misma permitirá de una manera precisa cuantificar la concentración de la enzima en muestras bajo un tratamiento determinado. En este caso la proteína a purificar es la histidasa.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se realizará la purificación de una proteína enzimática (histidasa) de hígado de rata con el propósito de utilizarla como inmunógeno para la obtención de los anticuerpos específicos correspondientes (anti-histidasa) por inmunización en conejo, y cuantificar la concentración de esta enzima en sobrenadantes de hígado de rata.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Realizar la purificación de la histidasa y la obtención de anticuerpos anti-histidasa para medir la concentración de esta enzima en sobrenadantes de hígado de rata.

PARTICULARES

- 1) Purificar la enzima a partir de hígado de rata.
- 2) Determinar la concentración de la proteína, su actividad específica y verificar su pureza mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida.
- 3) Obtener anticuerpos anti-histidasa utilizando como antígeno la enzima purificada.
- 4) Purificar y aislar los anticuerpos contra la histidasa y probar su especificidad mediante la técnica de Western blot.

V. HIPOTESIS

La purificación de la enzima tomando en cuenta algunas de sus propiedades físicas y químicas se realizará con el propósito de obtener una proteína con la pureza requerida para ser utilizada como un inmunógeno y así obtener los anticuerpos específicos correspondientes que reconocerán específicamente una proteína que será la histidasa.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1. Determinación de la actividad enzimática de la histidasa de hígado de rata.

La determinación de la actividad enzimática de la histidasa se llevó a cabo mediante un ensayo espectrofotométrico basado en la aparición de ácido urocánico utilizando como sustrato la L-histidina, de acuerdo a la metodología descrita en la literatura [35] con algunas modificaciones (no se utilizó glutatión en la reacción ni para diluir la enzima).

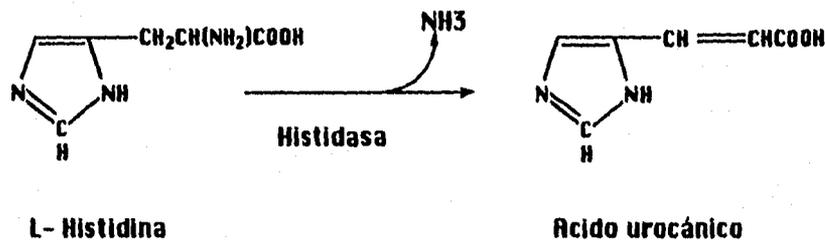


Figura 2. Formación de ácido urocánico.

En un tubo de ensayo marcado como blanco (sin sustrato) se añadieron 2.5 ml de agua desionizada, 300 μ l de amortiguador pirofosfato de sodio 0.1 M pH 9.2 y 200 μ l del sobrenadante de hígado de rata, para obtener un volumen final de 3 ml.

En otro tubo marcado como muestra se midieron 1.5 ml de agua desionizada, 300 μ l del amortiguador, 200 μ l del sobrenadante de hígado de rata diluido 1:5 en pirofosfato de sodio. El contenido de estos tubos fue vaciado a celdas de cuarzo e introducidas a un espectrofotómetro Beckman (mod. DU 640). La reacción se inició por la adición de 1 ml de una solución de L- histidina 0.1 M, pH 9.2 a la celda que

contenía la muestra. El cambio en la absorbancia se midió en intervalos de 30 segundos durante 10 minutos.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de transformar 1 μmol de sustrato en producto (ácido urocánico) por minuto a 25°C. Para los cálculos de actividad de histidasa se utilizó el coeficiente de extinción molar de 18,600 (a 277 nm) para el ácido urocánico de tal manera que:

$$A = \epsilon b C$$

$$C = \frac{A}{\epsilon \times b}$$

Donde: A = absorbancia, ϵ = coeficiente de extinción molar, b = dimensión de la celda y C = concentración (en moles/l).

$$C = \frac{(A - 1) \times 1000}{18,600 \times 3}$$

Donde 3 = volumen total del ensayo

1000 = conversión de moles a nmoles

Por lo tanto el factor para la obtención de nmoles/min. de ácido urocánico formado es = 161.3

O sea:

Actividad enzimática de la histidasa = Cambios en la Absorbancia \times 161.3
(nmoles de ácido urocánico/min).

Finalmente la actividad específica se determinó utilizando la concentración total de proteínas en cada muestra utilizando el método de Biuret y BCA dándonos como resultado la formación de ácido urocánico/min/mg de proteína.

De esta manera se determinó actividad enzimática específica para todas las muestras en cada uno de los pasos del proceso de purificación.

6.2. Purificación de la Histidasa

La purificación de la proteína fue realizada tomando como base la metodología descrita por Harper [11] con algunas modificaciones. La preparación de los reactivos utilizados para la purificación de esta proteína se encuentran en el anexo 1. En la figura 2 se presenta un diagrama de flujo indicando los principales pasos en la purificación de la histidasa de hígado de rata.

6.2.1. Preparación del homogenado.

Se utilizaron 4 ratas hembras raza Wistar con un peso entre 250 y 300 g alimentadas con una dieta para roedores (PMI FEEDS, INC). Los animales se decapitaron con una guillotina Harvard (mod. 55-0012), e inmediatamente se obtuvieron los hígados los cuales fueron lavados en solución salina al 0.9% fría para eliminar el exceso de sangre. Estos hígados fueron pesados y se les adicionó en una relación de 3 ml por gramo de tejido amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 que contenía $MgCl_2$ 14 mM y KCl 0.6 mM. Los hígados fueron homogeneizados a la velocidad mínima por 3 minutos en un Politrón Brinkman (mod. PT-2000). El homogenado se vació en tubos de polialómero de 35.5 ml y se centrifugaron a 35,500 rpm (92,734 xg) durante 50 minutos, a 4°C en una ultracentrífuga Beckman (mod. XL-90) utilizando un rotor tipo 70 Ti.

El precipitado obtenido se eliminó y el sobrenadante sin tomar la capa de grasa se aspiró con una pipeta Pasteur y se vació en un vaso de precipitado, se colocó en un baño maría a 65°C durante 5 minutos con agitación ocasional para eliminar algunas proteínas termolabiles.

El precipitado formado se pasó a tubos de polialomero de 50 ml y se centrifugó a 19,700 rpm (28,557 xg) durante 15 minutos a 4°C en una centrifuga Beckman (mod. J2-MC) utilizando un rotor JA-201.

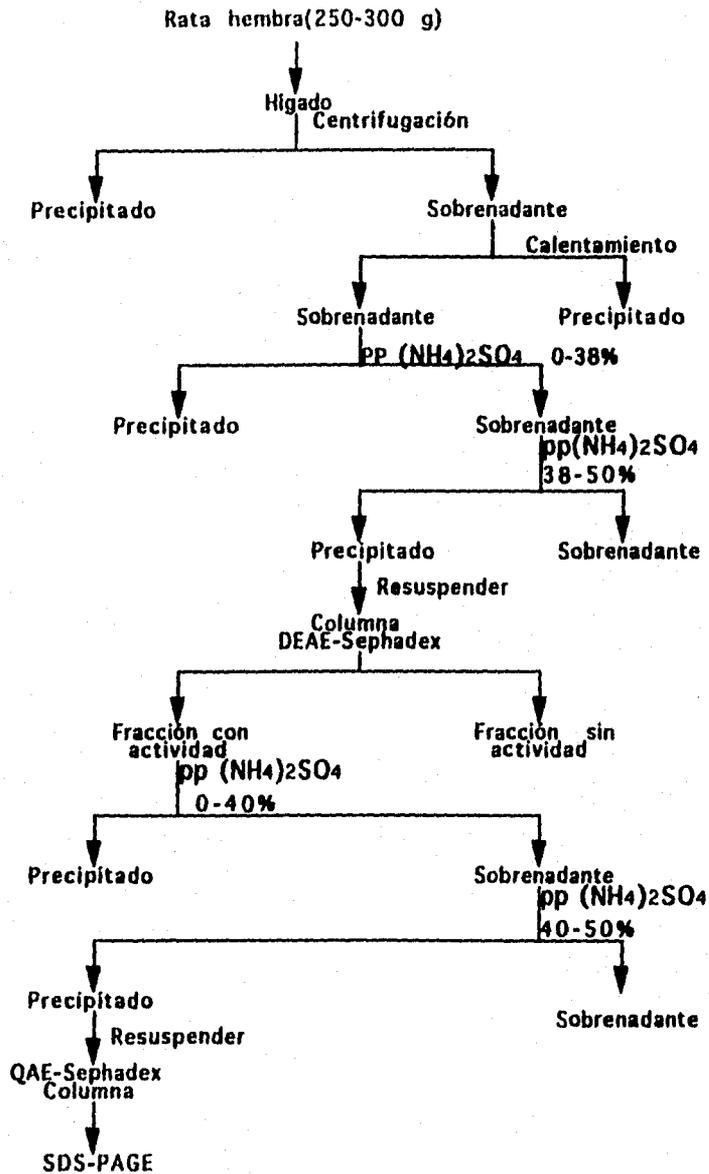


Fig.3 Diagrama de flujo que describe los principales pasos en la purificación de la histidasa de hígado de rata.

6.2.2. Primera precipitación con sulfato de amonio.

El precipitado obtenido en el paso anterior se eliminó y el sobrenadante se colocó en un vaso de precipitado, a este sobrenadante se le añadió lentamente una solución de sulfato de amonio al 38% (en una relación de 228.6 g de sulfato de amonio por litro) con agitación constante durante 30 minutos a 4°C para permitir la precipitación de algunas proteínas. Esta preparación se pasó a tubos de policarbonato de 10.4 ml los cuales fueron centrifugados a 19,700 rpm durante 20 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se desechó y el sobrenadante conteniendo la proteína de interés se pasó a un vaso de precipitado, se precipitó nuevamente con una solución de sulfato de amonio al 50% en una relación de 75.24 g/l la cual se adicionó lentamente con agitación constante durante 30 minutos a 4°C. Esta preparación se pasó a tubos de policarbonato de 10.4 ml los cuales se centrifugaron a 19,700 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.6 frío.

6.2.3. Cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sephadex.

Se preparó una columna de intercambio iónico DEAE Sephadex (dietilaminoetil - Sephadex) Sigma, de la siguiente manera: 1 g de la resina se mezcló con 30 ml de amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.6 conteniendo NaCl 0.1 M, se dejó reposar por una hora y se deaereo aplicando un vacío de 50 mm de Hg por 20 minutos.

La resina se vertió en una columna de vidrio de 2 x 30 cm, se lavó y se equilibró con el mismo amortiguador. La preparación conteniendo la proteína de interés (obtenida en el paso anterior) se añadió a la columna y se eluyó con el mismo amortiguador a 4°C, se colectaron 10 fracciones de 4.4 ml cada una, después de la aparición de una fracción de color rojo se encontraba la proteína de interés (fracción 4 y 5). Posteriormente todas las fracciones individualmente se colocaron en membranas de diálisis previamente hervidas y lavadas con bicarbonato de

sodio 10 mM, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 10 mM y agua desionizada y se dializaron en 4 litros de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.6 durante toda la noche con agitación constante a 4°C para eliminar el exceso de sal. Cada fracción dializada se pasó a tubos Falcon de poliestireno de 13 ml se les determinó la concentración de proteínas por el método de Biuret y actividad enzimática de histidasa. Las fracciones con mayor actividad enzimática se mezclaron y se les adicionó 2mg/ml de DTF (dithiotreitol) para mantener la actividad de la enzima, la preparación se agitó por 10 min a 4°C. Se tomó una muestra de 25 µl y se corrió una electroforesis en un gel de poliacrilamida.

6.2.4. Segunda precipitación con sulfato de amonio.

La preparación anterior se precipitó con una solución saturada de sulfato de amonio al 40% en una relación de 242.27 g/l durante 15 minutos con agitación constante a 4°C. Esta preparación se pasó a tubos de policarbonato de 10.4 ml, y se centrifugó a 25,000 rpm por 10 minutos a 4°C utilizando un rotor tipo 65 en una ultracentrífuga Beckman. El sobrenadante se separó con una pipeta Pasteur y se precipitó nuevamente con una solución saturada de sulfato de amonio al 50% en una relación de 62.7 g/litro con agitación constante por 15 min a 4°C. Este precipitado se pasó a tubos de policarbonato de 10.4 ml, se centrifugó a 25,000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en igual volumen de amortiguador de cloruro de imidazol 0.1 M, pH 6.8 frío (aproximadamente 1.5 ml).

6.2.5. Cromatografía de intercambio iónico QAE-Sephadex.

Se preparó una segunda columna de intercambio iónico QAE-sephadex A-50 (Diethyl[2-hidroxipropil]aminoetil Sephadex) de la siguiente manera: se pesó un gramo de esta resina y se mezcló con 25 ml de amortiguador de cloruro de

imidazol 0.1 M pH 6.8, se dejó reposar durante una hora y se deaereo por 20 min. aplicando un vacío de 50 mm de Hg. Esta resina se añadió a una columna de vidrio de 1.5 x 20 cm, la cual se lavó y equilibró con el mismo amortiguador. Posteriormente se adicionó la preparación que contenía la proteína de interés (obtenida en el paso anterior) y se eluyó con 10 ml de cada una de las siguientes concentraciones de NaCl 0, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 y 0.5M en amortiguador de cloruro de imidazol 0.1 M pH 6.8. Se colectaron 50 fracciones de 2 ml cada una, las fracciones que contenían la histidasa eluyeron con una concentración entre 0.2 y 0.3 M de NaCl (de la fracción 18 a la 22 aproximadamente). A todas las fracciones se les determinó la concentración de proteínas utilizando el método de BCA (ácido bicinónico) el cual se puede aplicar en un rango de concentración de 5 a 250 µg de proteínas por mililitro de muestra, y también se determinó la actividad enzimática de la histidasa.

Concentración de la enzima.

Las fracciones que presentaron mayor actividad enzimática se mezclaron y se colocaron en un concentrador Amicon centricon-50, que tiene como objeto concentrar la muestra eliminando sales y pequeños volúmenes de solutos cuyo peso molecular sea menor a 50 KDa a través de una membrana mediante ultracentrifugación, siguiendo las instrucciones del fabricante. A una muestra que contenía únicamente la proteína de interés se le determinó concentración de proteínas, actividad enzimática de la histidasa y se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 %. Esta proteína se guardó en congelación a -20°C por no más de dos semanas, se verificó su pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida y se utilizó para la obtención de anticuerpos anti-histidasa.

6.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS- PAGE)

El procedimiento utilizado para verificar la pureza de cada una de las preparaciones en los diferentes pasos de la purificación fue mediante electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida al 5 % (gel concentrador) y al 7.5 % (gel separador) en condiciones desnaturalizantes (con SDS, con β -mercaptoetanol y calentamiento a ebullición de las muestras durante 4 min.) con el objeto de romper todas las interacciones no covalentes en la proteína nativa y reducir los puentes disulfuro, de acuerdo a las técnicas descritas por [36], [37]. La cantidad de proteína que se aplicó en los geles fue de 100 μ g/pozo, en un volumen de 25 μ l de solución amortiguadora de la muestra (Tris-SDS-glicerol- β -mercaptoetanol), (anexo 2), usando azul de bromofenol al 0.5% como marcador del frente de corrida. En el mismo gel se depositaron 4 μ l de marcadores de bajo peso molecular (Low molecular weight markers, Bio-Rad Laboratories, USA) en 16 μ l del amortiguador de la muestra. Los marcadores de bajo peso molecular fueron las siguientes proteínas: fosforilasa B (97.2 kD), albúmina sérica bovina (BSA, 66.2 kD), aldosa (39.2 kD), triosa fosfato isomerasa (26.6 kD), inhibidor de tripsina (21.5 kD) y lisozima (14.4 kD).

La electroforesis se realizó en una cámara vertical Hoefer (mod. SE-600) con una corriente constante de 30 mA, durante 4 horas a temperatura ambiente y con recirculación de agua para evitar un sobrecalentamiento. El amortiguador de corrimiento fue una solución de Tris-glicina-SDS, pH 8.3. Los geles se realizaron por duplicado, uno de ellos se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 (Sigma Chemical Co.) al 0.025%, y el otro se utilizó para realizar el Western Blot.

Tinción de geles de poliacrilamida con azul brillante de Coomassie.

Para la detección de las bandas de proteínas en el gel se utilizó el colorante azul brillante de Coomassie, el cual se une a las proteínas de una manera no específica, el límite de detección es de 0.3 a 1 µg de proteína por banda [10].

Después de terminada la electroforesis, el gel conteniendo las proteínas separadas se colocó en un recipiente, se cubrió con 100 ml de la solución del colorante azul de Coomassie al 0.0025 % (anexo 2), y se agitó suavemente durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se desechó la solución colorante y se adicionaron 100 ml de solución decolorante (anexo 2), se agitó lentamente durante 2 horas a temperatura ambiente, se realizaron tres cambios de la solución decolorante de 100 ml cada uno y se continuó decolorando hasta que las bandas azules y un fondo claro en el gel fueron obtenidos. Después el gel se colocó en agua desionizada y se procedió a secarlo.

Secado de geles de poliacrilamida.

El gel se colocó entre dos hojas de poros de celofán las cuales fueron previamente humedecidas en agua desionizada, primero se puso una hoja de celofán sobre el papel filtro que cubría la placa de acero inoxidable, cuidadosamente el gel se colocó en el centro del celofán y se cubrió con la segunda hoja evitando que se formaran burbujas de aire. Se cubrió nuevamente con una capa de poros de polietileno para lograr que la superficie del gel quedara completamente lisa y se procedió a colocarlo en la base del secador de geles (Drygel jr. mod. SE540). Se aplicó vacío durante una hora a una temperatura de 80 °C para que el gel fuera deshidratado y se secase completamente.

Posteriormente con el gel que no se tiñó se procedió a realizar un Western blot utilizando los anticuerpos anti-histidasa obtenidos para determinar la concentración de la enzima.

6.4. Obtención de anticuerpos anti-histidasa

Para la obtención de anticuerpos anti-histidasa se utilizó un conejo macho de raza Nueva Zelanda de 3 Kg de peso y se siguió el protocolo descrito por D. Lane [9, 38].

Se realizó primero una sangría de prueba de 5 ml en la vena marginal de la oreja del conejo para la obtención de suero preinmune, este suero fue congelado a -20°C . Posteriormente se hizo una primera inmunización con 200 μg de la proteína pura mezclada con igual volumen de adyuvante completo de Freund en varios sitios por vía subcutánea con una jeringa de 3 ml y aguja de 22 x 32 mm, después de dos semanas de la primera inmunización se realizó una segunda inmunización con igual cantidad de la proteína pura pero mezclada con igual cantidad de adyuvante incompleto de Freund. A las dos semanas de la segunda inmunización se tomó una sangría de prueba de 5 ml en la vena marginal de la oreja y dos semanas después se realizó una tercera inmunización en las mismas condiciones que la segunda. A las dos semanas de esta tercera inmunización se realizó una sangría total mediante punción cardíaca con una jeringa de 60 ml y una aguja de 22 x 32 mm, anestesiando al conejo con éter.

Se obtuvieron 70 ml de sangre, la cual se dejó coagular y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm. Se separaron 30 ml de suero y se procedió a purificar la fracción de inmunoglobulina G por precipitación con sulfato de amonio.

6.5. Purificación de anticuerpos anti-histidasa (IgG) por precipitación con sulfato de amonio

La purificación de las inmunoglobulinas G (IgG) contenidas en el suero que se obtuvo del conejo inmunizado con la proteína purificada (histidasa), se realizó de acuerdo al método descrito por [10]. Los 30 ml de suero que contenían los anticuerpos anti-histidasa, se precipitaron con una solución saturada de sulfato de

amonio (SAS) al 33% en una relación de 1 volumen de esta solución por 2 volúmenes de antisuero, con agitación magnética constante a 4°C, durante toda la noche. Esta preparación se pasó a tubos de policarbonato de 50 ml y se centrifugó a 12,800 rpm (12000 x g) durante 20 minutos en una centrífuga Beckman refrigerada a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado resuspendiéndolo en un volumen de 30 ml de una SAS al 33%. Esta preparación se centrifugó a 12,800 rpm durante 20 minutos a 4°C, se repitió este lavado una vez más en las mismas condiciones descritas.

El precipitado resultante se resuspendió en un volumen de 3 ml de amortiguador PBS 0.1 M, pH 7.2 con agitación suave, se pasó a una membrana de diálisis de aproximadamente 8 cm de largo con un diámetro de 2.0 cm y un límite de exclusión de 12,000 a 14,000 Da (Spectra/Por) y se dializó en 4 litros del mismo amortiguador durante 48 horas a 4°C realizando tres cambios del amortiguador para remover completamente todo el sulfato de amonio presente. A este dializado se le determinó concentración de proteína por el método de Biuret y se congeló a -20°C hasta ser utilizado para la realización del Western Blot.

6.6. Determinación de la concentración de histidasa utilizando el método de Western Blot.

La especificidad de los anticuerpos obtenidos se probó utilizando la técnica de Western blot de acuerdo al método descrito por Towbin [39], [36].

Después de la electroforesis, una muestra de la proteína pura de 20 µg y 40 µl de sobrenadantes de hígado de rata fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm de poro (Bio-Rad Laboratories, USA) en una cámara vertical para transferencia (Hoefer mod. TE 50X) con una solución de Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% como amortiguador de transferencia. Esta transferencia se realizó con un voltaje de 100V y una corriente de 1.5 A, durante 2

horas a temperatura ambiente, con recirculación de agua y agitación magnética constante. Para verificar que la transferencia fuera del 100% se tiñó el gel con azul de Coomassie y no se observaron bandas de proteínas.

Después de la transferencia de las proteínas, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con una solución de leche descremada "Svelty"(Nestlé-México) al 10% en PBS-Tween, durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante; con el objeto de bloquear los sitios libres de la membrana en los cuales no se unieron las proteínas.

Después de la incubación la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween, 3 minutos por cada lavado, con agitación constante. Para la detección de los anticuerpos contra la histidasa (anti-histidasa), la membrana de nitrocelulosa se colocó en una bolsa de plástico (Kapak/Scotchpak) y se selló con calor después de la adición de 15 ml de una dilución 1:50 en PBS-Tween del suero que se obtuvo del conejo inmunizado, se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.

Como control negativo del Western Blot se utilizó el suero preinmune del conejo diluido 1:50 en PBS-Tween. Después de la incubación la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween en la forma descrita anteriormente.

Después del último lavado la membrana de nitrocelulosa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con 15 ml de una dilución 1:1000 en PBS-Tween del conjugado anti-IgG de conejo obtenido en cabra marcado con peroxidasa de rábano (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.).

La membrana se lavó 5 veces con PBS-Tween como se describió previamente. Para revelar el sitio donde había ocurrido la reacción antígeno-anticuerpo entre la proteína de interés (histidasa) y los anticuerpos presentes en el suero obtenido del conejo inmunizado, la membrana de nitrocelulosa se puso en la solución reveladora de la peroxidasa (4-cloro-1-naftol y H_2O_2), hasta la aparición de las bandas (5 a 10 minutos). La reacción enzimática de la peroxidasa se detuvo

colocando la membrana de nitrocelulosa en un recipiente con agua desionizada durante 10 minutos. La membrana se secó a temperatura ambiente y se guardó en una bolsa de plástico para su conservación.

6.7. Determinación de proteínas totales por el método de Biuret

La determinación de proteínas totales por el método de Biuret se basa en la aparición de una coloración púrpura que se produce al reaccionar el reactivo de cobre alcalino con la cadena peptídica de la proteína [40]. Se prepara una curva con diferentes concentraciones de proteína utilizando como estándar albúmina sérica bovina como se muestra en la tabla 2.

TABLA 2. Curva estándar de proteínas (Biuret).

[BSA]	Agua desionizada	Buffer	Albúmina (2 mg/ml)	React. de Biuret
mg/ml	ml.	μl	μl	ml.
0	1.480	20	-	2.5
0.25	1.350	20	125	2.5
0.50	1.230	20	250	2.5
0.75	1.100	20	375	2.5
1.00	0.980	20	500	2.5

Para medir la concentración de proteínas en la muestra, se colocan 20 μ l de muestra en un tubo de ensaye, se añaden 1.48 ml de agua desionizada y 2.5 ml de la solución de cobre alcalino (reactivo de biuret). Se agita en vortex y se deja reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se mide la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman (mod. DU-640).

6.8. Determinación de proteínas totales por el método BCA (ácido bicinconínico)

La determinación de proteínas por el método BCA se fundamenta en la aparición de un producto de color púrpura que se forma por la interacción de dos moléculas de ácido bicinconínico y el ión cobre en un medio alcalino con la cisteína, cistina, triptofano y tirosina presentes en la proteína. Este producto es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm (Protein assay reagent BCA. PIERCE).

Este método se utilizó para medir la concentración de proteínas en las fracciones de la última columna de purificación debido a que estas muestras contenían menor cantidad de proteínas que las de los pasos anteriores.

Se prepara una curva estándar de albúmina sérica bovina a partir de una concentración de 2 mg/ml como se muestra en la tabla 3.

TABLA 3. Curva estándar de proteínas (BCA).

Albumina (2 mg/ml)	volumen de agua (ml)	Conc. final del estandar ($\mu\text{g/ml}$)
50 μl	1.95	50
100 μl	1.90	100
150 μl	1.85	150
200 μl	1.80	200
250 μl	1.75	250

Se colocan 0.1 ml de cada estándar o muestra en un tubo de ensaye, se adicionan 2 ml de reactivo de trabajo (50 partes del reactivo A mezclado con una parte del reactivo B). Se agita en vortex y se incuban en un baño maría a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente se dejan enfriar a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro (Beckman mod. DU-640).

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

Purificación de la histidasa

La histidasa de hígado de rata fué purificada mediante la combinación de una serie de pasos establecidos de acuerdo a algunas propiedades de la misma, tales como solubilidad, carga y peso molecular. Inicialmente se intentó purificar la enzima mediante una cámara de isoelectroenfoque (Rotofor Cell) tomando como base el punto isoeléctrico de la proteína, la máxima actividad específica que se obtuvo con este procedimiento fue de 5.321 nmoles/min/mg de proteína con un porcentaje de purificación muy bajo lo cual se verificó al realizar la SDS-PAGE donde se observó la presencia de muchas bandas de proteínas contaminantes, por lo que no se continuó con este método debido a que las condiciones requeridas para realizarlo afectaban a la enzima de tal manera que perdía casi la totalidad de su actividad y además no lograba eliminar las proteínas contaminantes.

Se realizaron varios ensayos modificando las condiciones de trabajo hasta lograr controlar las variables que inflúan directamente en el proceso de purificación, de manera que la actividad enzimática de la proteína no se viera afectada y se lograra obtener una buena purificación. En cada uno de los pasos del procedimiento de purificación utilizado se midió la cantidad de proteínas totales, la actividad de la histidasa y se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida.

7.1. Homogenado

El homogenado presentó una actividad específica de histidasa de 0.685 nmoles/min/mg de proteína (fig. 4) y se puede observar en la electroforesis la aparición de un gran número de bandas (fig. 7), lo cual indica la presencia de todas las proteínas contaminantes que deben ser eliminadas durante el proceso de purificación.

Results file: A:/WORK_RES
 Data collected at 277.00nm at 25.2 C
 Curve fit: Linear Units: NMOL/MIN

Method name: A:/HISTIDAS
 Curve offset: [Ascending]

Sample #	Initial Time	Final Time	Factor	Rate dA/min	Variance	Results units/min	Sym
2	0.0000	10.000	161.30	0.0043	3.5826E-06	0.6936	0

Zoom ZoomOut Trace Autoscale Annotate Print

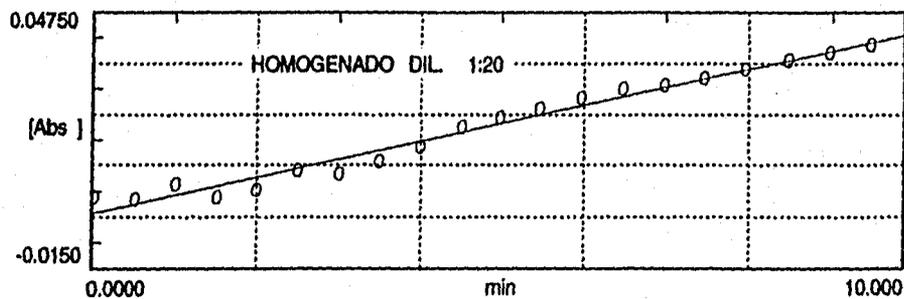


Figura 4. Actividad enzimática de la histidasa en una muestra de homogenado de hígado de rata.

Una muestra del homogenado se diluyó 1:20 en amortiguador de pirofosfato de sodio 0.1 M, pH 9.2 y se tomaron 200 μ l para la determinación de la actividad enzimática. Se midió el cambio en la actividad enzimática durante 10 minutos en intervalos de 30 segundos.

7.2. Primera precipitación con sulfato de amonio

La adición de una solución con sulfato de amonio se hace con el objeto de concentrar la enzima eliminando algunas proteínas contaminantes mediante precipitación en base a la solubilidad que éstas presentan frente a diferentes concentraciones de sales aniónicas multicargadas como el sulfato de amonio. El porcentaje de saturación utilizado se establece en base a pruebas realizadas con diferentes concentraciones de la sal de tal manera que se logre una buena recuperación de la enzima y un buen grado de purificación, en este caso el rango de porcentaje de saturación requerido es del 38 al 50 %. La muestra obtenida de esta primera precipitación presentó una actividad específica de 2.8 nmoles/min/mg de proteína y una recuperación del 72 % de la cantidad de proteína inicial (3.097 g). En la electroforesis se observa la eliminación de algunas proteínas contaminantes y la banda correspondiente a la histidasa se ve un poco más intensa.

7.3. Cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sephadex

Una vez que las muestras son tratadas con sulfato de amonio utilizando las propiedades de salting out de las proteínas es conveniente utilizar métodos de purificación de cromatografía de intercambio iónico para lograr una separación de las proteínas en base a su carga eléctrica a un determinado valor de pH o a una determinada concentración de iones salinos que son los factores que afectan la afinidad de cada proteína por la resina de intercambio iónico utilizada. En este caso se utilizó una resina de intercambio aniónico dietilaminoetil sephadex (DEAE-Sephadex), a la cual se adicionó la preparación que contenía la proteína de interés (histidasa). Se colectaron 10 fracciones de 4.4 ml cada una y después de ser dializadas toda la noche se les midió actividad enzimática de la histidasa,

encontrándose la mayor actividad enzimática únicamente en dos fracciones (fracción 4 y 5) como se observa en la fig 4.

Lo cual nos indica que en estas dos fracciones se encuentra presente la histidasa y que además con este paso se concentró más la enzima eliminándose otras proteínas como lo muestra la electroforesis (fig.7).

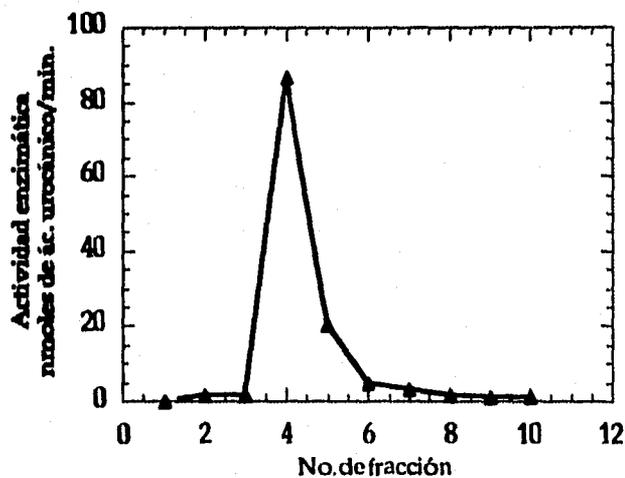


Figura 5. Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephadex).

Una muestra de 4 ml de la primera precipitación del sobrenadante de hígado de rata con sulfato de amonio fueron colocados en la columna de intercambio aniónico DEAE-Sephadex equilibrada con cloruro de sodio 0.1 M en Tris·HCl 0.1 M pH 7.6. Las fracciones 4 y 5 conteniendo la histidasa fueron eluidas con el mismo amortiguador.

7.4. Segunda precipitación con sulfato de amonio

La segunda precipitación de la enzima se realizó utilizando un porcentaje de saturación final del 50 % con sulfato de amonio. La muestra obtenida en este paso presentó una actividad específica de 80.1 nmoles/min/mg de proteína, con una recuperación del 14 % de la cantidad de proteína inicial (26.9 mg), en la electroforesis (fig. 7) se puede observar que la banda correspondiente a la enzima es la más marcada lo que indica que la proteína ha sido concentrada a través de los pasos utilizados en la purificación.

7.5. Cromatografía de intercambio aniónico QAE-Sephadex

Después de la segunda precipitación con sulfato de amonio la muestra conteniendo la enzima fue pasada a una columna de intercambio iónico utilizando una resina de intercambio aniónico dietil-2-hidroxipropilaminoetil sephadex o aminoetil cuaternario (QAE-Sephadex), a la cual se adicionó la preparación que contenía la histidasa. Se utilizó este tipo de columna por ser una resina de intercambio iónico fuerte debido a los grupos cargados que presenta lo cual es una propiedad fundamental para el intercambio iónico, es decir, que su grado de ionización varía muy poco en un rango ancho de pH, mientras que una columna de intercambio iónico débil (por ejemplo DEAE-Sephadex) presenta un grado de disociación y capacidad de intercambio que varía muy marcadamente con el pH, por lo que con este tipo de resinas se obtiene una mejor separación de las proteínas.

Se colectaron 25 fracciones de 2 ml cada una a las cuales se les determinó la actividad enzimática, encontrándose la actividad más alta únicamente en las fracciones (17, 18, 19, 20, 21), como se muestra en la figura 5, con una concentración total de proteínas de 232 µg. La pureza de esta preparación se verificó por medio de

electroforesis en gel de poliacrilamida confirmándose que todas las proteínas contaminantes fueron eliminadas (fig. 7).

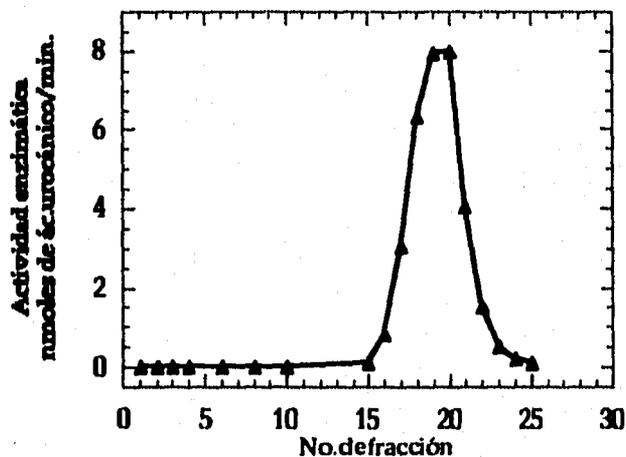


Figura 6. Cromatografía de intercambio aniónico QAE- Sephadex.

Una muestra de 15 ml de la segunda precipitación del sobrenadante de hígado de rata con sulfato de amonio al 50 % fueron cargados en una columna de intercambio aniónico (QAE-Sephadex) equilibrada con un amortiguador de cloruro de sodio 0.1 M en cloruro de imidazol 0.1 M pH 6.8. Las fracciones conteniendo actividad de histidasa son eluidas con cloruro de sodio entre 0.2 - 0.3 M en el mismo amortiguador.

7.6. Análisis electroforético del proceso de purificación de la histidasa de hígado de rata

Uno de los métodos utilizados para verificar el grado de purificación de una proteína es mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Originalmente se probaron diferentes porcentajes de acrilamida-bisacrilamida que variaban desde 6 % hasta 10 %. Con un gel al 6 % se separaban mejor las proteínas con un peso molecular de 68,500 a 254,000 Da y con el gel al 10 % proteínas con un peso de 21,500 a 200,000 Da. La mejor separación de nuestra proteína de interés fue con un gel al 7.5 % el cual presenta un rango de separación de proteínas con un peso de 45,000 a 200,000 Da. Este método detecta una concentración desde 0.3 a 1.0 μg de proteína por banda utilizando la tinción de azul de coomassie.

Como se puede observar en la figura 7, las proteínas contaminantes se van eliminando durante el proceso de purificación hasta lograr obtener una sola banda en el carril 8 y 9 correspondiente a la histidasa pura, la cual presenta un peso molecular de 71,752 Da.

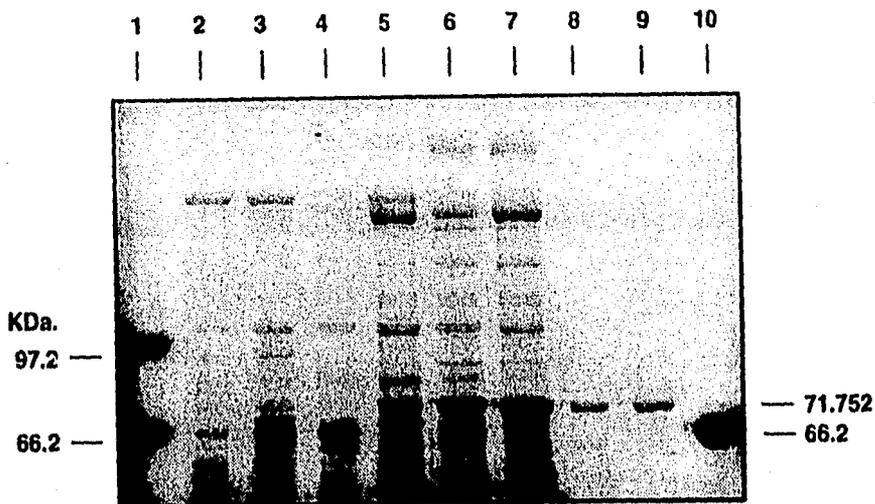


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % de muestras en los diferentes pasos de purificación de la histidasa.

En el carril 1 se colocaron 4 μ l de marcadores de bajo peso molecular (Bio-Rad Laboratories, USA) que contenían proteínas con pesos de 14.4 hasta 97.2 KDa. En el carril 2 se colocaron 100 μ g de proteínas del homogenado de hígado de rata. En el carril 3 se colocaron 100 μ g del sobrenadante resultante de la centrifugación a 35,500 rpm, en el carril 4 se colocaron 100 μ g del sobrenadante obtenido del calentamiento a 65 °C y de la primera centrifugación a 19,700 rpm, en el carril 5 se pusieron 100 μ g de la muestra resultante de la primera precipitación con sulfato de amonio del 38 al 50 %. En el carril 6 se colocaron 100 μ g de la fracción con actividad de histidasa obtenida en la columna DEAE-Sephadex, en el 7 se colocaron 100 μ g de proteínas de la muestra resultante de la segunda precipitación con sulfato de amonio al 50 %, en los carriles 8 y 9 se colocaron 20 μ g de las fracciones con actividad enzimática (histidasa) obtenidas de la columna QAE-Sephadex, y en el carril 10 se pusieron 30 μ g de albúmina sérica bovina la cual sirvió como referencia por su peso molecular para localizar la banda de la histidasa. La electroforesis se realizó en amortiguador TRIS - glicina 0.1 M, pH 8.3, con una corriente constante de 30 mA durante 4 horas. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

Para la obtención del porcentaje de recuperación, actividad específica y grado de purificación alcanzado en cada uno de los pasos del proceso se realizó la medición de la concentración de proteínas, la actividad enzimática de la histidasa y se midió el volumen de muestra obtenido en cada paso, de esta manera se obtienen varios parámetros que juntos nos proporcionan el grado de pureza de una proteína (tabla 4). La presencia de una sola banda demostrada en el gel de electroforesis es considerado como un indicador de pureza.

La proteína fue purificada 498 veces con el procedimiento utilizado, obteniéndose una actividad específica de 341.3 nmoles de ác. urocánico/min/mg de proteína. Esta actividad específica fue menor que la reportada por Harper y Okamura [11], [41] pero la purificación alcanzada fue más alta que la reportada por estos dos autores, con respecto a la actividad reportada por Lamartiniere [26] fue mayor pero el grado de purificación alcanzado fue menor. Una de las diferencias en los otros métodos fue la cantidad de animales utilizados en las purificaciones previas además de la modificación de algunos pasos en el procedimiento de purificación. Una de las ventajas al utilizar esta metodología es la obtención de una proteína pura con actividad biológica y que esta actividad se mantiene al menos durante dos semanas, tiempo en el cual la proteína se empieza a hidrolizar y a perder actividad biológica. Esta degradación de la proteína se pudo comprobar por la aparición de 3 a 4 bandas en una electroforesis en gel de poliacrilamida (fig. 8). Por lo que no es necesario utilizar un número grande de animales al inicio de la purificación ya que esta proteína se degrada fácilmente y pierde su actividad, no puede ser utilizada posteriormente.

TABLA 4
Purificación de la Histidasa de hígado de rata

Procedimiento de purificación	Actividad enzimática nmol/min	Volumen ml	Actividad total nmol/min	Proteínas totales mg	Actividad específica nmol/min/mg proteína	Recuperación %	Purificación
Homogenado	1387	175	12138.00	17718.1	0.685	100	1
Calentamiento a 65°C	1483	118	8751.1	3097.7	2.8	72	4
Primera precipitación con sulfato de amonio	370.48	4.5	8335.8	503.8	16.5	68	23
Cromatografía DEAE-Sephadex	78.7	4.4	1730.9	71.9	24.0	17	34
Segunda precipitación con sulfato de amonio	215.7	2.0	2156.7	26.9	80.1	14	113
Cromatografía QAE-Sephadex	7.9	2.0	79.5	0.232	341.3	1	498

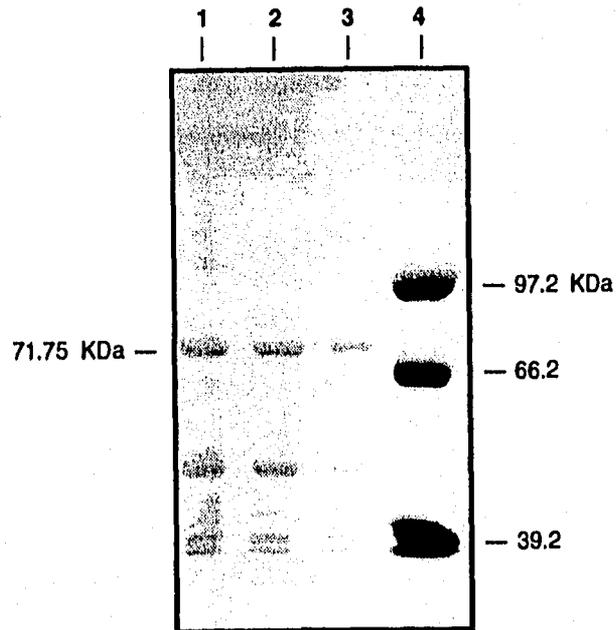


Figura 8. Electroforesis de la histidasa pura de hígado de rata después de dos semanas.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 7.5 % de histidasa pura después de dos semanas de almacenamiento a -20°C . En el carril 1 se colocaron $10\ \mu\text{g}$ de la proteína purificada, en el carril 2 se colocaron $6\ \mu\text{g}$ y en el carril 3 se pusieron $3\ \mu\text{g}$ de la misma proteína. En el carril 4 se colocaron $4\ \mu\text{l}$ del marcador de pesos moleculares.

Uno de los criterios para verificar si la proteína aislada es la proteína de interés es determinar su peso molecular y compararlo con el reportado en la literatura. La manera como se determinó fue la siguiente, se llevó a cabo una electroforesis con una muestra de la proteína pura y con diferentes marcadores de peso molecular, se midió la distancia recorrida en el gel por estas proteínas y este valor fue graficado contra su peso molecular (fig. 9). Se utilizó la siguiente fórmula $y = 1.213 \times 10^5 + -98106 \log(x)$ para calcular el peso molecular de la proteína pura sustituyendo el valor de la distancia recorrida por la proteína en el gel de poliacrilamida. El peso molecular de la histidasa purificada fue de 71.752 KDa, el reportado en la literatura fue de 72.165 KDa [17].

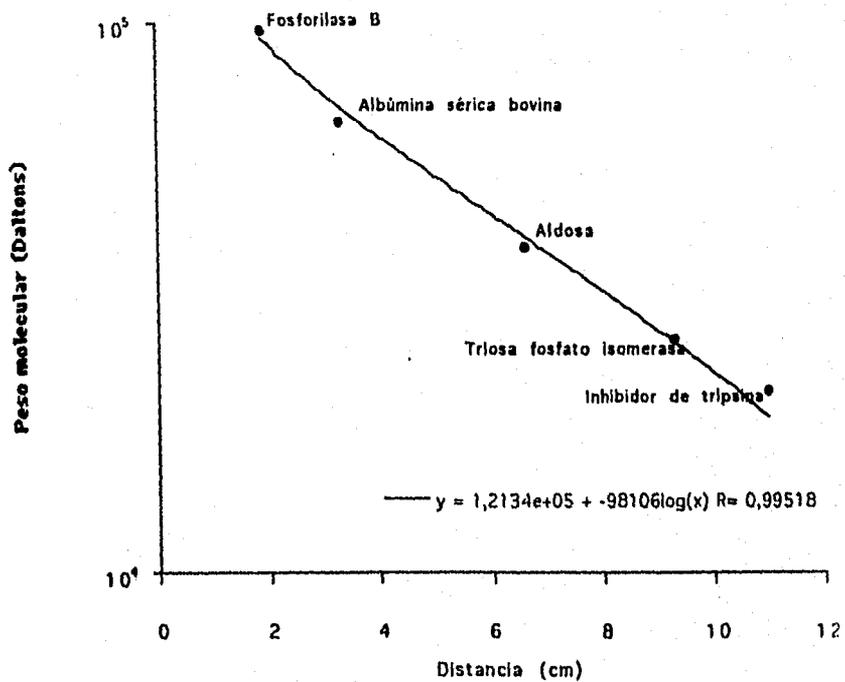


Figura 9. Determinación del peso molecular de la histidasa purificada de hígado de rata.

El eje de las abscisas (X) representa la distancia recorrida en el gel por cada proteína contenida en los marcadores de peso molecular y el eje de las ordenadas (Y) representa los pesos moleculares de las diferentes proteínas del marcador. La distancia recorrida por la histidasa fue de 3.2 cm y su interpolación dio un peso molecular de 71,752 Da.

La obtención de los anticuerpos anti-histidasa se realizó con una preparación de histidasa recién purificada. Después de dos semanas de la tercera inmunización se pudo apreciar la aparición de anticuerpos anti-histidasa.

Uno de los métodos utilizados para medir tanto la especificidad como la cuantificación de una proteína es utilizando el método de Western blot. Una de las ventajas de este método con respecto al método de Ouchterlony utilizado previamente por muchos investigadores y en previas purificaciones de proteínas es la utilización de menor cantidad de muestra (5 a 10 μ g) mientras que en el Ouchterlony se utilizan de 20 a 30 μ g de proteína, además de que la especificidad es mayor en el Western blot; en el Western blot se realiza previamente una electroforesis que permita la separación de las diferentes proteínas contenidas en la muestra a estudiarse y se hace reaccionar con el anticuerpo que reconozca una banda específica.

Con la enzima purificada y los anticuerpos antihistidasa obtenidos se realizó un Western blot, en el cual se verificó la especificidad de estos anticuerpos con respecto a la enzima. Se colocaron cuatro muestras de 10 μ g de la enzima pura en un gel de poliacrilamida, estas muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (NC) la cual se dividió en dos partes iguales (conteniendo dos muestras cada una). Una mitad fue tratada con suero preinmune y a la otra se le adicionó el anticuerpo anti-histidasa, después las dos membranas se manejaron en las mismas condiciones. Únicamente en la membrana de NC tratada con los anticuerpos anti-histidasa se observó la presencia de una sola banda con un peso molecular de 71,752 Da, lo cual muestra que el anticuerpo obtenido es específico para la proteína purificada.

Con el objeto de demostrar que es un método cuantitativo se probaron sobrenadantes de hígado de rata alimentadas con diferentes concentraciones de proteína encontrándose que al aumentar la concentración de la proteína en la

dieta aumentaba también la concentración de enzima, observándose la presencia de una sola banda correspondiente a la histidasa.

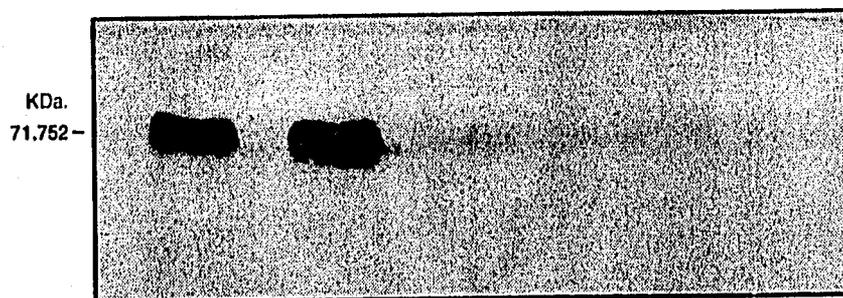


Figura 10. Western Blot de la Histidasa.

Después de su separación electroforética, las muestras de la proteína pura y de sobrenadantes de hígado de rata se transfirieron a una membrana de Nitrocelulosa (0.45 μ m poro) en una solución de Tris-glicina-metanol como amortiguador de transferencia (100 V, 2 horas). El suero anti-histidasa se añadió a una dilución 1:50 en PBS-Tween y se dejó incubar por 2 horas, 20 μ l del segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo preparado en cabra conjugado con peroxidasa) se adicionaron a una dilución de 1:1000 en PBS-Tween y se incubó la membrana durante 2 horas; se añadieron 60 mg del revelador (sustrato de la enzima) 4-cloro-1-naftol en 20 ml de metanol.

La especificidad de los anticuerpos obtenidos se comprobó midiendo la actividad enzimática de la histidasa después de la adición de diferentes concentraciones de anticuerpo anti-histidasa a sobrenadantes de hígado de rata alimentadas con una dieta Chow, observándose que al aumentar el volumen del anticuerpo adicionado aumentaba también la neutralización de la actividad de la enzima por el complejo antígeno-anticuerpo formado, hasta lograrse un 87.68 % de inhibición de la actividad de histidasa. La neutralización de la actividad de la enzima se realizó tomando como base el método descrito por Hall [42]. Este resultado coincide con lo reportado por Okamura [41] quien realizó la neutralización de la actividad de la histidasa con el anticuerpo correspondiente utilizando diferentes concentraciones de proteína y un volumen constante de suero, encontrando que al aumentar la concentración de la proteína aumentaba también la precipitación de la enzima hasta lograrse la neutralización de la actividad.

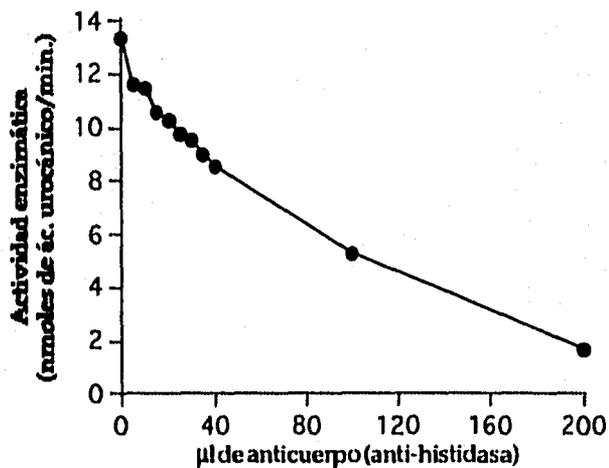


Figura 11. Neutralización de la actividad enzimática de la histidasa por la adición de diferentes concentraciones de anticuerpo anti-histidasa.

Diferentes cantidades de antisuero anti-histidasa (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 100, 200 µl) se adicionaron a 400 µl de sobrenadante de hígado de rata, se incubaron por 90 minutos a 4 °C. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos y al sobrenadante se le midió actividad enzimática de la histidasa.

7.7. Actividad enzimática de la histidasa en diferentes tejidos de rata

La actividad enzimática de la histidasa se determinó en muestras de sobrenadantes de otros tejidos además del hígado.

Los tejidos en los cuales se midió la actividad fueron el corazón, músculo, riñón, cerebro e hígado; encontrándose únicamente actividad de la enzima en hígado. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Taylor [17] quien sólo encontró actividad en hígado y epidermis, él reportó también que la expresión del gen de la histidasa medido por la concentración del RNA mensajero de esta enzima era exclusivamente en hígado y en epidermis en menor cantidad.

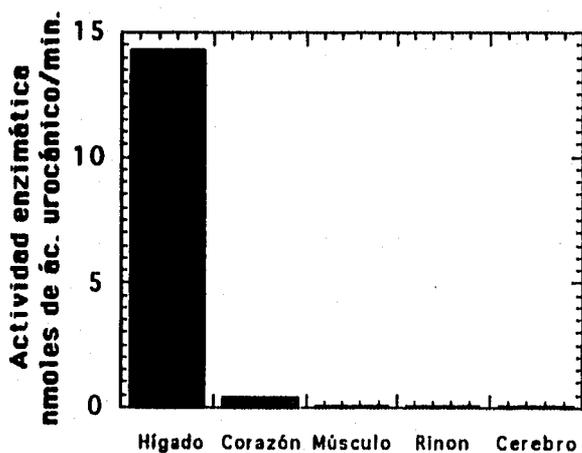


Figura 12. Actividad enzimática de la histidasa en diferentes tejidos de rata.

Se utilizaron 200 μ l de cada sobrenadante para la determinación de la actividad enzimática como se describió en materiales y métodos.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se purificó una proteína (histidasa) utilizando una combinación de diferentes pasos de purificación (precipitaciones con sulfato de amonio y cromatografías de intercambio iónico), que presenta las siguientes características:

- una sola banda al ser corrida en una SDS - PAGE.
- un peso molecular de 71,752 Da.
- mantiene su actividad biológica.
- capaz de ser utilizada como un inmunógeno.

2. La actividad enzimática de la histidasa se encontró únicamente en sobrenadante de hígado de rata pero no en otros tejidos como corazón, músculo, riñón y cerebro, lo que indica que su actividad es específica de tejido.

3. La enzima fue purificada 498 veces con el procedimiento utilizado, presentando una actividad específica de 341.3 nmoles de ácido urocánico/mg de proteína.

4. Se obtuvieron anticuerpos contra la histidasa que reconocen exclusivamente a esta enzima lo cual fue confirmado mediante un Western Blot.

5. Estos anticuerpos son capaces de inhibir la actividad de la enzima.

6. Estos anticuerpos pueden ser utilizados para la detección de la concentración de histidasa en sobrenadantes de hígado de rata bajo diferentes tratamientos dietarios.

IX. PROPUESTAS O SUGERENCIAS

- 1. Medir la concentración de la histidasa en diferentes tejidos para poder así determinar y confirmar la distribución de esta proteína.**
- 2. Medir la concentración de histidasa en sobrenadantes de hígado de rata bajo diferentes tratamientos hormonales.**
- 3. Determinar la concentración de esta enzima en muestras de hígado y de epidermis en humanos.**
- 4. Ya que la histidasa es una enzima degradadora de aminoácidos sería importante utilizar la medición de la concentración de esta proteína así como su actividad enzimática en casos de sospecha de alteraciones genéticas en el metabolismo de la histidina (en el caso de histidinemia) y poder comparar si una disminución en la actividad enzimática de la histidasa esta asociada con una disminución en la concentración de la misma.**

X. REFERENCIAS

1. Wemer R. *Fundamentos de bioquímica moderna* Barcelona, Esp.: Editorial Acribia, S.A., 1988: 2-6, 10-15, 22,23, 26-35.
2. Harper A, Murray R, Mayes P. *Bioquímica*. México, D. F.: Editorial El Manual Moderno, S. A., 1992: 40-46, 59-65, 87-89, 270,274.
3. Toporek M. *Bioquímica*. México, D.F.: Editorial Interamericana, S. A, 3a ed. 1984: 251 - 264.
4. Lehninger A, Nelson D, Cox M. *Principios de bioquímica*. Barcelona, Esp.: Editorial Omega, S.A., 2a ed. 1993: 134-146, 198-203.
5. Stryer L. *Bioquímica* Barcelona, Esp.: Editorial Reverté, S.A., 3a ed. Vol. 1. 1988: 44 - 50.
6. Burgess R. *Protein purification*. Alan R. Liss, Inc., 1987: 71 - 82.
7. Bach J. *Inmunología* México, D.F.: Editorial Limusa, S.A., Vol. 1. 1989: 137-140.
8. Stites D. *Inmunología básica y clínica*. México, D.F.: Editorial El Manual Moderno, S.A., 7a. ed. 1993: 11-116.
9. Lane D. *Antibodies: A laboratory manual*. USA.: Editorial Cold Spring Harbor Laboratory. Ed. Harlow, 1988: Chapter 5.

10. Ausubel F, Bret R, Kingston R. *Current protocols in molecular biology*. USA: Editorial John Wiley. Sons. Inc, ed. Jassen K. Vol. 2. 1994: 11.13.1-11.13.4.
11. Brand M, Harper A. *Histidine ammonia-lyase from rat liver purification. Properties and inhibition by substrate analogues*. *J. Biochem.* 1976; 15: p. 1814-1821.
12. Peterkofsky A. *The mechanism of action of histidase: Amino-enzyme formation and partial reactions*. *J. Biol. Chem.* 1962; 247: p. 787 - 795.
13. Givot J, Abeles R. *Mammalian histidine ammonia lyase*. *J. Biol. Chem.* 1970; 245: p. 3271-3273.
14. Holton J. *Skin L-histidine ammonia-lyase activity in the family of a child with histidinaemia*. *Clin. Chim. Acta.* 1965; 11: p. 193-194.
15. Bert N, La Du J. *L-Histidine ammonia-lyase (human stratum corneum)*. *Meth. Enzymol.* 1971: 891-894.
16. Melancon S, Lee S, Nadler H. *Histidase activity in cultivated human amniotic fluid cells*. *Science.* 1971; 173: p. 627 - 628.
17. Taylor R, Lambert M, Sexsmith E, Sadler S, Ray P, Mahuran D, McInnes R. *Cloning and expression of rat histidase*. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: p. 18192 - 18199.
18. Hernández D, Stroh J, Phillips A. *Identification of ser143 as the site of modification in the active site of histidine ammonia-lyase*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 307: p. 126-132.

19. Taylor R, McInnes R. *Site-directed mutagenesis of conserved serines in rat histidase*. J. Biol. Chem. 1994; 269: p. 27473-27477.
20. Suchi M, Harada N, Wada Y, Takagi Y. *Molecular cloning of a cDNA encoding human histidase*. J. Bioch. Biophys. Acta. 1993: 293 - 295.
21. Suchi M, Sano H, Mizuno H, Wada Y. *Molecular cloning and structural characterization of the human histidase gene (HAL)*. Genomics. 1995; 29: p. 98-104.
22. Morris M, Lee S, Harper A. *Influence of differential induction of histidine catabolic enzymes on histidine degradation in vivo*. J. Biol. Chem. 1972.: 5793 - 5804.
23. Munro H, Allison J. *Mammalian protein metabolism*. New York: Editorial Academic Press, Vol. 1. 1964: 417-420.
24. Schirmer M, Harper A. *Adaptive responses of mammalian histidine-degrading enzymes*. J. Biol. Chem. 1970.: 245: p. 1204 - 1211.
25. Lee Y, Harper A. *Effect on induction of histidase on histidine metabolism in vivo*. J. Nutr. 1979; 109: p. 291-299.
26. Lamartiniere C, Feigelson M. *Effects of estrogen, glucocorticoid, glucagon, and adenosin 3':5'-monophosphate on catalytic activity, amount, and rate of de novo synthesis of hepatic histidase*. J. Biol. Chem. 1977: 252: p. 3234-3239.

27. Rajagopal D, Deodhar A, Hariharan K. *Histidine metabolism in experimental Protein malnutrition in rats*. J. Nutr. 1955: 97: p. 311-317.
28. Devlin T. *Bioquímica*. Buenos Aires: Ed. Reverté, S. A., 2a. ed. Tomo I. 1989: 193, 597, 598.
29. Meister A. *Biochemistry of the amino acids*. New York: Editorial Academic Press, 2a ed. Vol. 2. 1965: 12, 203-208, 214, 215, 484, 485, 818, 833, 837, 1055, 1056.
30. Stanbury J, Wyngaarden J, Fredrickson D. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: Editorial Mc Graw - Hill Book Company, 1978: 317 - 327.
31. Lynch M. *Métodos de laboratorio*. México, D. F.: Editorial Interamericana, S. A., 2a ed. 1987: 498 - 507.
32. Spolter P, Baldridge R. *The metabolism of histidine*. J. Biol. Chem. 1963: 238: p. 2071 - 2074.
33. Taylor R, Levy H, McInnes R. *Histidase and histidinemia. Clinical and molecular considerations*. Mol. Biol. Med. 1991: 8 p. 101 - 116.
34. Virmani K, Widhalm K. *Histidinemia: A biochemical variant or a disease?* J. Amer. Coll. Nutr. 1993: 12: p. 115 - 124.
35. Tabor H, Mehler A. *Histidase and urocanase*. New York: Academic Press, Vol. 2. 1955: 228 - 231.

ESTA TESIS NO DEBE
QUEDAR EN LA BIBLIOTECA

36. Maniatis S. *Molecular cloning. Laboratory manual*. USA: Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2a ed. Vol. 3. 1989: 18.47 - 18.75.
37. Walker J. *Methods in molecular biology*. Vol. 1. 1989: 41-65, 165-178.
38. Cooper T. *The tools of biochemistry*. USA: Editorial Wiley-Interscience, 1977: 257-285.
39. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76: p. 4350-4354.
40. Scopes R. *Protein purification. Principles and practice*. New York: Editorial Springer - Verlag, 2a ed. R. C. C. 1988: 39-51, 75-87, 279-283.
41. Okamura H, Nishida T, Nakagawa H. *L-histidine ammonia-lyase in rat liver. Purification and general characteristics*. *J. Biochem.* 1974; 75: p. 139-152.
42. Hall T, Wallin R, Reinhart G, Hutson S. *Branched chain aminotransferase isoenzymes. Purification and characterization of the rat brain isoenzyme*. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: p. 3092-3098.

ANEXO1

REACTIVOS PARA LA PURIFICACION DE LA HISTIDASA

1. Solución TRIS - HCl, pH 7.4

TRIS	1.576 g
MgCl ₂	1.332 g
KCl	0.0447 g
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

Antes de aforar se ajusta el pH con HCl ó NaOH 0.1 N

2. Solución TRIS - HCl, pH 7.6

TRIS	15.76 g
NaCl	5.850 g
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

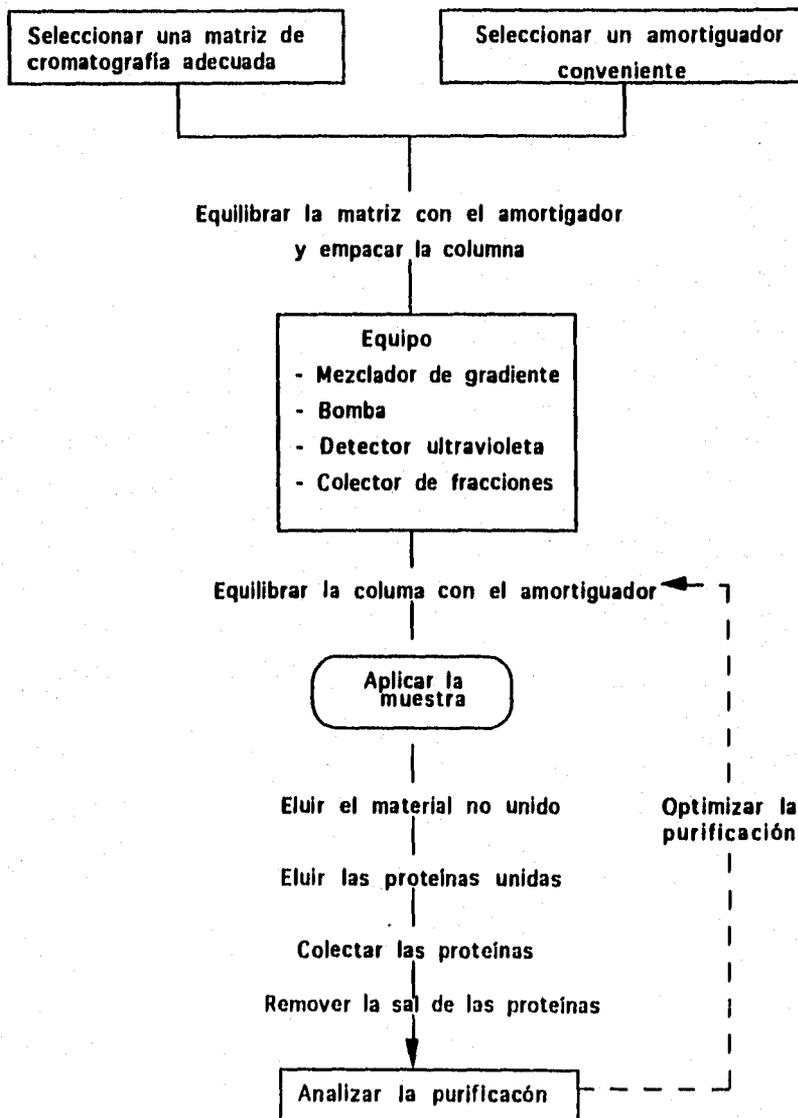
Antes de aforar se ajusta el pH con HCl ó NaOH 0.1 N

3. Amortiguador cloruro de imidazol, pH 6.8

Cloruro de imidazol	6.808 g
NaCl	5.850 g
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

Antes de aforar se ajusta el pH con HCl ó NaOH 0.1 N

ANEXO 2
ESQUEMA GENERAL PARA UNA CROMATOGRAFIA CONVENCIONAL DE
PROTEINAS



ANEXO3
REACTIVOS PARA LA ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE
POLIACRILAMIDA

1. Solución TRIS inferior, pH 8.8

TRIS	18.17 g
SDS al 10 %	4 ml
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

Antes de aforar se ajusta el pH con HCl ó NaOH 0.1 N

2. Solución TRIS superior, pH 6.8

TRIS	6.06 g
SDS al 10 %	4 ml
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

Antes de aforar se ajusta el pH con HCl ó NaOH 0.1 N

3. Amortiguador para las muestras

Glicerol	1 ml
β -mercaptoetanol	500 μ l
SDS al 10 %	3 ml
TRIS superior	1.25 ml
Azul de bromofenol	10 mg
Agua desionizada c.b.p.	10 ml

4. Amortiguador para la electroforesis, pH 8.3 (4x)

TRIS	3 g
Glicina	14.37 g
SDS al 10 %	6 ml
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

Antes de aforar se ajusta el pH con HCl ó NaOH 0.1 N

5. Persulfato de amonio al 10 %

Persulfato de amonio	0.1 g
Agua desionizada	1 ml

6. Azul de bromofenol al 10 %

Azul de bromofenol	1 g
Agua desionizada	10 ml

7. Acrilamida al 30 %

Acrilamida	43.8 g
N-N'-metilen bis acrilamida	1.2 g
Agua desionizada c.b.p.	150 ml

8. Gel separador de acrilamida al 7.5 %

Acrilamida al 30 %	4 ml
TRIS inferior, pH 8.8	4 ml
Persulfato de amonio	200 μ l
TEMED	6.66 μ l
H ₂ O desionizada	8 ml

9. Gel concentrador (stacking) al 5 %

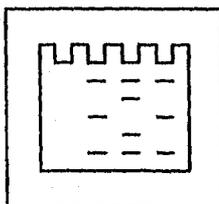
Acrilamida al 30 %	1.25 ml
TRIS superior, pH 6.8	1.9 ml
Persulfato de amonio	50 µl
TEMED	6.66 µl
H₂O desionizada	2.2 ml

10. Solución de tinción para geles de acrilamida

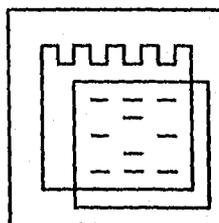
Azul de Comassie	1 g
Metanol absoluto	180 ml
Acido acético	40 ml
Agua desionizada	180 ml

11. Solución de destinción para gel de acrilamida

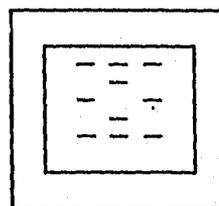
Metanol absoluto	50 ml
Acido acético	70 ml
Agua desionizada	1000 ml

ANEXO 4 WESTERN BLOT

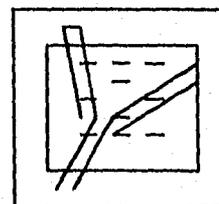
Separación de la muestra (antígeno) por SDS-PAGE



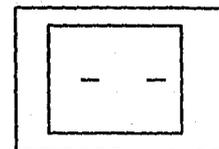
Transferencia de los polipéptidos a una membrana de soporte



Bloqueo de sitios de unión no específicos en la membrana



Adición del anticuerpo



Detección del antígeno específico

ANEXO 5
REACTIVOS PARA WESTERN BLOT

1. Leche descremada (Svelty Nestle) al 10 %

Leche descremada	10 g
Agua desionizada	100 ml

2. Amortiguador de fosfatos (PBST), pH 7.2

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	2.9 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 ml
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

Antes de aforar se ajusta el pH con HCl ó NaOH 0.1 N

3. Sustrato 4-cloro-1-naftol

4-cloro-1-naftol	60 mg
Metanol	20 ml
H ₂ O ₂	60 µl
PBS	100 ml

ANEXO 6

REACTIVOS PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA HISTIDASA

1. Amortiguador pirofosfato de sodio, pH 9.2

Pirofosfato de sodio 4.46 g

Agua desionizada 100 ml

Antes de aforar se ajusta el pH con HCl 0.1 N

2. Solución de histidina, pH 9.2

L-histidina 0.522 g

Agua desionizada 25 ml

Antes de aforar se ajusta el pH con HCl ó NaOH 0.1 N