

17
1-
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

ALERGENOS DE *Hevea brasiliensis*: PURIFICACION Y
CRISTALIZACION DE LA HEVEINA PARA ESTUDIOS
ESTRUCTURALES A ALTA RESOLUCION.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C A
P R E S E N T A:
PAOLA LLINAS GARCIA



MEXICO, D. F.

274999

1999

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).

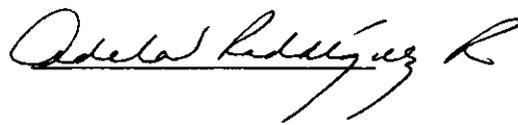
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

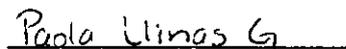
Presidente	Prof. Aguilar Caballero Raul
Vocal	Prof. Hernández Montes Homero
Secretario	Prof. Rodríguez Romero Adela
1er. Suplente	Prof. Bernal Lugo Irma Ofelia
2do. Suplente	Prof. García Ramírez Elpidio

Sitio donde se desarrollo el tema: Instituto de Química, UNAM.

Asesor del tema: Dra. Adela Rodríguez-Romero

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Adela Rodríguez R". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Sustentante: Paola Llinas García

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Paola Llinas G". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Hay mucha gente a la que le agradezco el haberme ayudado de una forma u otra el haber llegado hasta aquí, el problema es que no soy muy buena para hablar sobre este tipo de cosas, así que no se fijen.

A la Dra. Adela, por haberme permitido trabajar en este proyecto, por enseñarme tantas cosas, por apoyarme siempre, por ser una gran persona.

A la M. en C. Alejandra, porque sin su ayuda todavía estaría atorada en alguna parte del laboratorio, por compartir sus conocimientos conmigo, por explicarme como hacer las cosas, por ayudarme cada vez que lo necesitaba (muy seguido).

A los Doctores Barbarin y Roberto Arreguín, porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

A mi familia, gracias por todo lo que han hecho por mí.

A Aura y Toño, Jordi, Rafael y Rodrigo, que aguantaron todas mis crisis de final de semestre (cuando nadie me entendía!), que me ayudaron, que me explicaron con toda la paciencia del mundo, en fin, tantas cosas que solo puedo decirles: Muchas gracias!

A Toni y Marduck, por hacer que siempre me olvidara de todas las cosas que tenía que hacer y pasara ratos realmente interesantes y divertidos.

A Gabriela, que siempre ha estado cerca, aunque estemos ocupadas y no podamos vernos mucho.

A Fabio, por su ayuda incondicional, desde leer tubitos hasta pelearme con las computadoras, y por estar siempre cerca.

Este trabajo se realizó con el apoyo de DGAPA (IN-201997).

INDICE

I. Introduccion.....	1
Proteínas	1
Alergenos del látex del árbol de <i>Hevea brasiliensis</i>	2
II. Justificación.....	6
III. Objetivos.....	7
IV. Desarrollo experimental.....	8
Diagrama de flujo.....	8
Metodología experimental.....	10
1. Obtención	10
2. Cromatografía de permeación en gel.....	10
3. Cromatografía líquida de alta resolución.....	11
4. Determinación de actividad de quitinasa.....	13
5. Caracterización.....	13
5.1 Espectros de absorción.....	13
5.2 Dispersión dinámica de luz.....	13
5.3 Electroforesis.....	14
5.4 Espectrometría de masas.....	15
5.5 Pruebas de cristalización.....	16
Difusión de vapor en gota colgante.....	16
Difusión de vapor en gota asentada.....	17
Método de difusión a través de un gel.....	19
Acupuntura en gel.....	19
Recipiente con micropuentes.....	20
Microsembrado.....	21
Macrosembrado.....	22
5.6 Difracción de rayos X.....	22
5.7 Análisis estructural entre los alergenos protéicos reportados hasta el momento y la heveína.....	22

V. Resultados y discusión.....	23
2 y 3. Cromatografía de permeación en gel y cromatografía líquida de alta resolución.....	23
3.1 Rendimiento	32
4. Determinación de actividad de quitinasa	32
5. Caracterización.....	33
5.1 Espectros de absorción.....	33
5.2 Dispersión dinámica de luz.....	33
5.3 Electroforesis.....	34
5.4 Espectrometría de masas.....	35
5.5 Pruebas de cristalización	36
Difusión de vapor en gota colgante	37
Difusión de vapor en gota asentada.....	37
Método de difusión a través de un gel.....	38
Acupuntura en gel.....	39
Recipiente con micropuentes.....	39
Microsembrado.....	39
Macrosembrado	39
5.6 Difracción de rayos X.....	40
5.7 Análisis estructural entre los alérgenos proteicos reportados hasta el momento y la heveína.....	40
V. Estructuras tridimensionales de alérgenos proteicos.....	44
VI. Conclusiones.....	45
VII. Bibliografía	47

INTRODUCCION

PROTEINAS

Las proteínas son biopolímeros formados por cadenas lineales de aminoácidos unidos entre si mediante enlaces peptídicos. Todos los organismos utilizan los mismos 20 aminoácidos como unidades de construcción para el ensamblaje de las moléculas protéicas.

La palabra proteína se deriva del griego *proteios* que significa primero o primario y se le dió este nombre en 1838 por Jöns Jacob Berzelius ya que se sospechaba que estos compuestos podían ser los más importantes de todas las sustancias biológicas. Ahora se sabe que efectivamente las proteínas se encuentran involucradas en una gran cantidad de funciones biológicas ¹, como por ejemplo:

- Muchas de ellas funcionan como enzimas (catalizadores biológicos). Las enzimas catalizan prácticamente todas las reacciones que ocurren en los seres vivos.
- Algunas se unen a otras moléculas para almacenamiento o transporte.
- Las proteínas estructurales dan soporte mecánico y forma a las células, tejidos y organismos.
- Algunos complejos proteínicos pueden hacer trabajo mecánico, como movimiento de flagelos, separación de cromosomas en la mitosis o contracciones musculares.
- Muchas de ellas juegan un papel importante en la decodificación de información en la célula.
- Algunas son hormonas y otras sirven como receptores para hormonas.
- Algunas llevan a cabo otras funciones especializadas, como por ejemplo las inmunoglobulinas.

Todas las proteínas tienen una conformación específica, dada por la estructura terciaria y cuaternaria, que les confiere cierta actividad biológica. Una conformación es un arreglo espacial de átomos que depende de la rotación sobre un enlace o enlaces en la molécula que a su vez depende de las interacciones intermoleculares como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, etc. Bajo condiciones fisiológicas

cada proteína asume una forma o conformación estable que se conoce como conformación nativa.

De acuerdo a sus características físicas y funcionales, las proteínas se pueden dividir principalmente en dos clases: fibrilares y globulares. Estas dos clases difieren grandemente en su comportamiento, una es normalmente estática y la otra dinámica, respectivamente. Las proteínas fibrilares o estructurales son moléculas elongadas que suelen ser rígidas físicamente e insolubles en agua. Generalmente se componen de un estructura repetitiva ensamblada en forma de cables o fibras. Las proteínas globulares son en su mayoría solubles en agua, compactas, de forma mas o menos esférica y sus cadenas polipeptídicas se encuentran estrechamente plegadas, de manera que presentan un interior hidrofóbico y una superficie hidrofílica. Otra característica es que tienen indentaciones o asas así como hendiduras que sirven como sitios de reconocimiento.

ALERGENOS DEL LATEX DEL ARBOL DE *Hevea brasiliensis*

El hule se ha utilizado desde la época pre-colombina en América Central y América del Sur y fue introducido a Europa por los españoles. El uso comercial de éste y en particular el extraído del árbol del hule *Hevea brasiliensis* empezó con el descubrimiento de la vulcanización en 1839 por Charles Goodyear. Gracias a este proceso fue posible mejorar las propiedades del producto incrementando su durabilidad y elasticidad.

Actualmente el látex de este árbol es la única fuente de hule natural en la industria debido a las propiedades tan particulares que presenta. Los productos más comunes de látex o que contienen látex son : ²

Material médico	Artículos Domésticos
Guantes quirúrgicos	Balones
Algunas partes del sistema para medir presión sanguínea	Condomes
Catéteres	Guantes para lavar platos
Instrumentos dentales	Botellas para agua caliente
Máscaras faciales, bandas	Bandas de hule
Torniquetes	Suelas de zapato
Sondas	Gomas
Embolos	Goggles y visores
Almohadillas de electrodos	Juguetes
Vendajes	Equipo deportivo
Bulbos de jeringas	
Tubos de estetoscopio	

Se puede ver que el hule natural se emplea en una gran cantidad de productos y prácticamente todos los seres humanos tienen contacto con ellos de una manera u otra. A partir del momento en el que se publicó por primera vez un caso de hipersensibilidad al látex,³ la necesidad de realizar estudios sobre este aspecto se ha incrementado, ya que el número de personas que presentan este es cada vez mayor.

El látex es un fluido lechoso que se obtiene al cortar o hacer una incisión en el tronco del árbol del hule, *Hevea brasiliensis*. Este fluido es el citoplasma de unas células especializadas llamadas laticíferos, que consiste de partículas de hule cubiertas por una capa de fosfolipoproteínas y un suero que contiene carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, minerales y varias proteínas. El compuesto predominante en el látex es el cis-1,4-poliisopreno, polímero orgánico que confiere al hule natural sus propiedades de fuerza, elasticidad y durabilidad, siendo el contenido de proteína de 3 a 4 % del peso total.

En el proceso químico de manufactura del látex se agregan varios compuestos químicos tales como antioxidantes, aceleradores y antidegradantes como tiuranos, carbamatos y mercaptobenzotiazoles, los cuales se consideraron en un principio como los agentes

alergenos. Sin embargo, ya se demostró que los alergenos son las proteínas del látex.²⁻¹⁰

A la fecha se han reportado varias proteínas alergenas del hule, de las cuales en algunos casos solo se conoce su peso molecular (entre 5 y 200 KDa). Se ha observado que la presencia de éstas varía dependiendo del producto, ya que los procesos de manufactura, la fuente del látex (tipo de clona), las técnicas de almacenamiento, etc. son diferentes. A pesar de esto ya se han identificado tres proteínas como los principales alergenos y son : heveína (hev b 6.02), proheveína (hev b 6.01) y hev b 5¹¹⁻¹³(esta nomenclatura se define con las tres primeras letras del género, la primera letra de la especie y un número de clasificación). En general, la hipersensibilidad al hule y en particular a estas proteínas es una reacción del tipo I con manifestaciones clínicas que varían desde una urticaria de contacto hasta una anafiláxis fatal.

- Heveína

La heveína fué aislada por primera vez en 1969 por Archer¹⁴. Dicha proteína está contenida en los lutoides, estructuras vacuolares de las células laticíferas, que se encuentran presentes en el sedimento del látex ultracentrifugado. La heveína es una proteína de una sola cadena de 43 aminoácidos, rica en cisteína y glicina que tiene un peso molecular de 4,700 Da y un pI de 4.7.¹⁵

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que esta proteína tiene actividad de lectina¹⁶ y además presenta actividad antifúngica in vitro contra hongos que contienen quitina.¹⁷

También en nuestro laboratorio se llevaron a cabo estudios de la estructura y conformación de esa proteína. La heveína fue cristalizada¹⁵ y determinada su estructura tridimensional por técnicas de difracción de rayos-X a 2.8 Å de resolución¹⁸. Asimismo se hizo un estudio comparativo de la conformación de la aglutinina del germen del trigo (AGT) y la heveína por medio de dicroísmo circular encontrando que presentan conformaciones similares¹⁹ y un estudio de resonancia magnética nuclear permitió ver las interacciones de la heveína con la quitobiosa y la quitotriosa.²⁰

Como ya se mencionó Alenius et al. han demostrado que esta proteína es uno de los principales alergenos del látex.¹¹

- Proheveína

La proheveína también se encuentra contenida en los lutoides. Su caracterización hasta el momento es de estructura primaria, teniendo un peso molecular de 20 KDa y

un pI de 5.57 y tiene un dominio de heveína en la región del amino terminal (43 residuos).¹¹

- Hev b 5

La hev b 5 se encuentra en el suero del látex ultracentrifugado. Es una proteína de 16 KDa y un pI de 3.5 y solo se ha determinado su estructura primaria.¹²⁻¹³

JUSTIFICACION

A partir de mediados de los años 70s, cuando se publicó una revisión sobre alérgenos¹⁹, se empezó a crear conciencia sobre los grandes problemas que estos creaban y se enfatizó la urgencia de purificarlos y estandarizarlos, ya que día con día el número de individuos propensos a las alérgias aumenta. De los alérgenos analizados en dicho trabajo, solo unos cuantos eran de naturaleza proteínica y provenían principalmente del polen y de algunos ácaros.

La purificación de proteínas alérgicas es de suma importancia ya que solo de esta forma es posible su caracterización y la realización de estudios estructurales e inmunológicos que permitan identificar los epitopos y sus mecanismos de acción. Al tener esta información es posible estandarizar las pruebas para determinar a que es alérgico un paciente, desarrollar algún tipo de terapia o algún agente que inhiba la reacción de hipersensibilidad.

A la fecha varios grupos de investigación han realizado estudios bioquímicos e inmunológicos de algunos alérgenos de polvo, polen, veneno de insectos, frutas, etc, sin embargo, los estudios estructurales han sido muy pocos y sólo de unos cuantos de ellos se ha podido determinar la estructura tridimensional. La estructura de las siguientes proteínas alérgicas se encuentra en el Banco de Datos de Proteínas : Bet v 1, principal alérgeno del polen del abedul *Betula verrucosa*, Amb t V, alérgeno del polen de ambrosía; Phl p 2, alérgeno del polen de heno; profilina de polen de abedul y Der f 2, alérgeno del ácaro *Dermatophagoides farinae*.

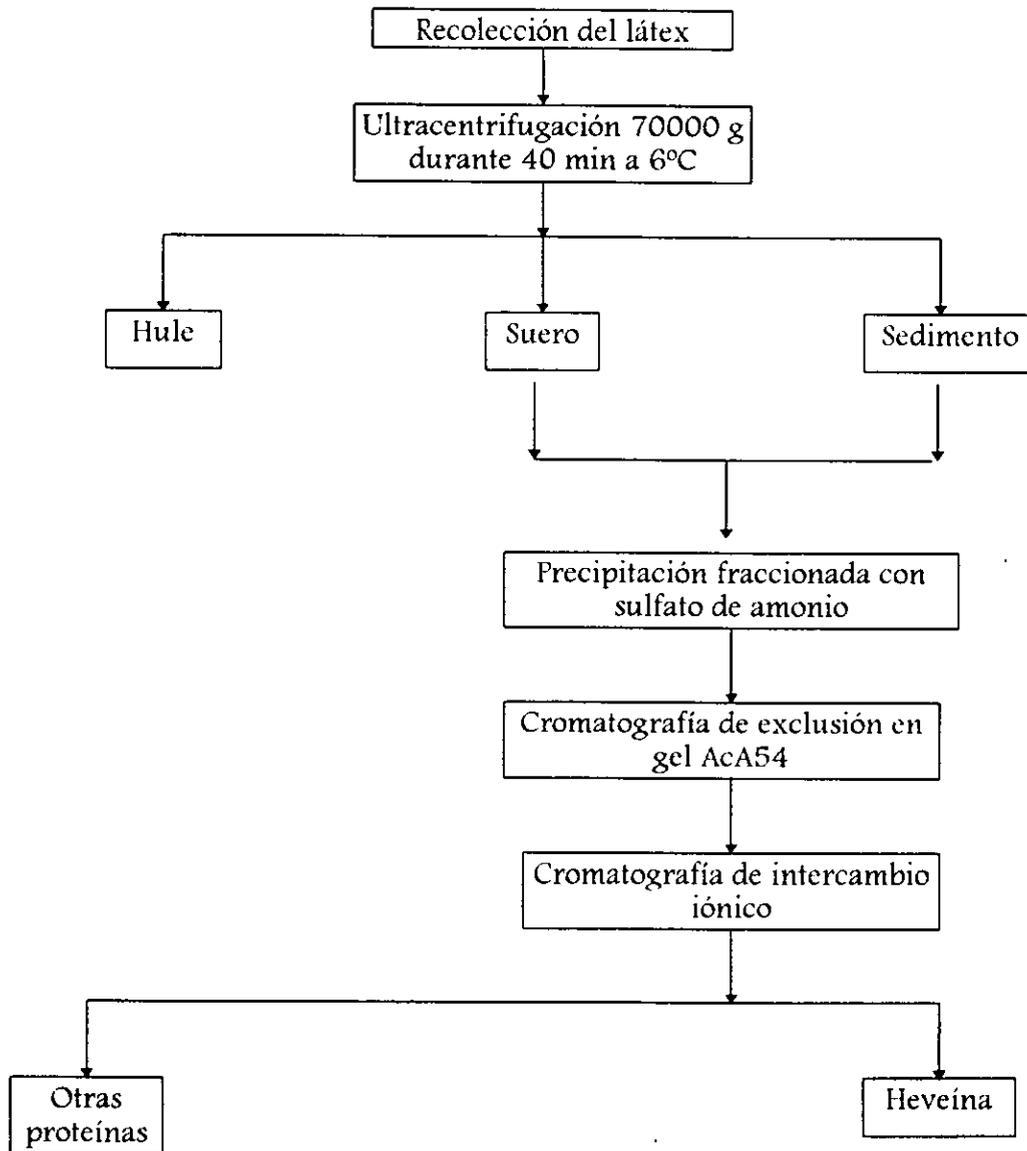
Los estudios estructurales realizados hasta el momento con proteínas alérgicas se han centrado en proteínas que se inhalan, pero de las proteínas de contacto únicamente se ha reportado la estructura tridimensional de la heveína a baja resolución¹⁸. Por el creciente número de casos de hipersensibilidad al látex se considera de gran importancia la purificación y caracterización de las proteínas alérgicas de ese producto. Los estudios estructurales que se realicen permitirán la comprensión de las interacciones moleculares entre los alérgenos y el sistema inmune al reconocer los epitopos de las moléculas y poder comparar a nivel molecular las diferencias y semejanzas entre los alérgenos de contacto y los de inhalación.

OBJETIVOS

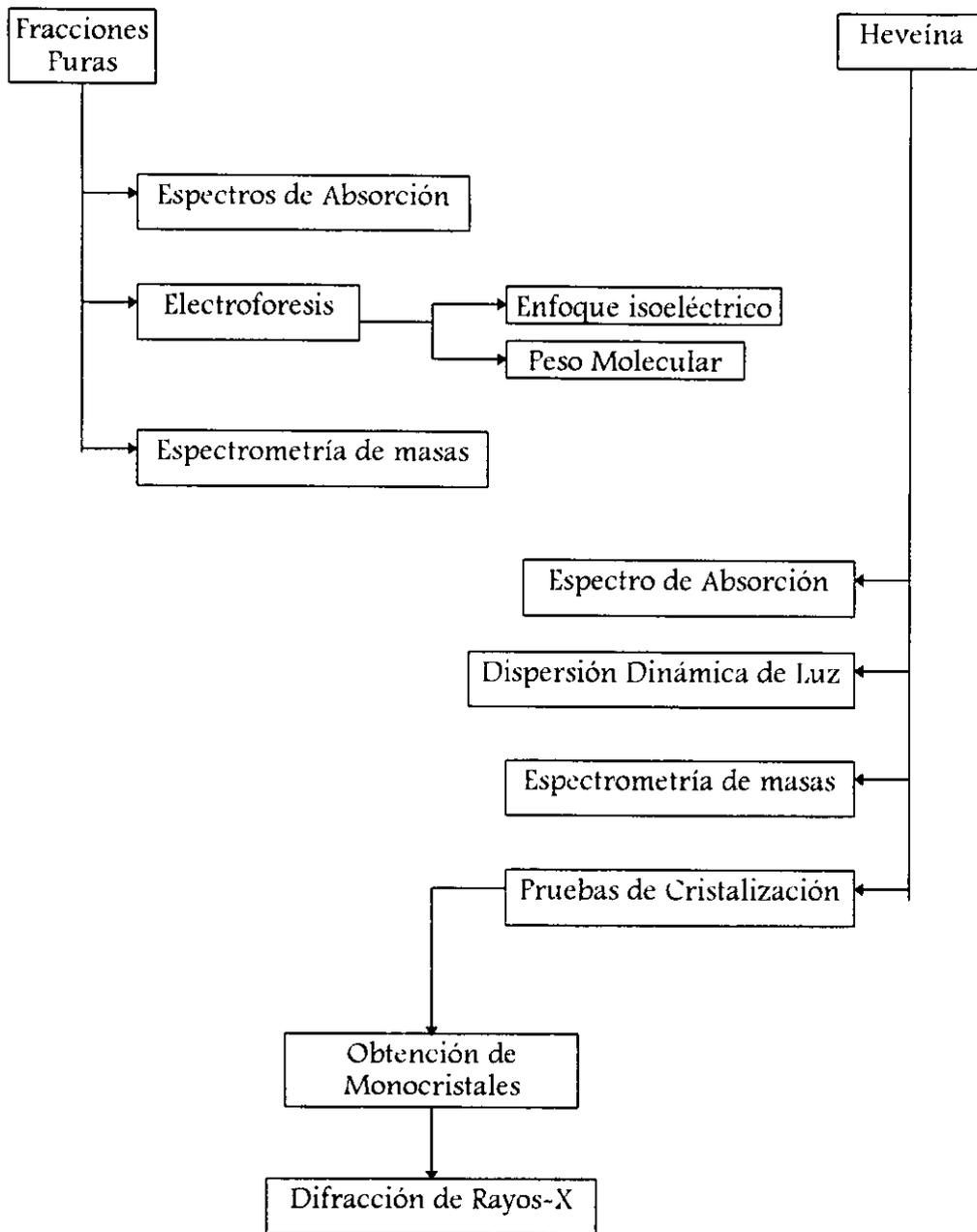
- a. Purificación y cristalización de la heveína para estudios estructurales a alta resolución.
- b. Purificación de las proteínas ácidas del látex de *Hevea brasiliensis*, la proheveína de 20 KDa y la hev b 5 de 16 KDa.
- c. Análisis comparativo entre las estructuras de la heveína y los alérgenos proteínicos reportados en la literatura.

DESAROLLO EXPERIMENTAL

DIAGRAMA DE FLUJO



Caracterización de las fracciones puras



Metodología experimental

1. Obtención

Se recolectó látex de dos clonas, IAN-710 y GV-42, en el campo experimental 'El Palmar' en Veracruz y manteniéndolo en un recipiente a 4°C se transportó a la Ciudad de México.

El tratamiento para las dos clonas fue el mismo y la temperatura en todos los pasos se mantuvo entre 4 y 6°C.

El látex se centrifugó a 70,000g por 40min, separándose en tres fases : hule, suero y sedimento. El sedimento se homogenizó durante 10 min. con un regulador de fosfatos 0.02 M de pH 6.6 que contenía NaCl 0.5 M en un Ultraturrax. El homogeneizado se centrifugó a 30,000 g y 6°C por 35 min, se retiró el sobrenadante y se hizo una reextracción en la mismas condiciones, centrifugando nuevamente. Se juntaron los dos sobrenadantes y se ajustó el pH a 6.0. Se agregó sulfato de amonio hasta alcanzar 65 % de saturación, entonces se dejó reposar una noche en refrigeración. Se centrifugó a 30,000 g y 6°C por 40 min y el sedimento se resuspendió en un regulador de fosfatos 0.02 M de pH7.0 con NaCl 0.1 M, el sobrenadante se llevó a 100 % de saturación con sulfato de amonio, se siguieron los mismos pasos que en la saturación al 65 %. Tanto el precipitado de 65 como el de 100 % se dializaron contra agua destilada utilizando membranas Spectrapor con límite de peso molecular de 3,500.

Se siguió la misma metodología con el suero de la clona GV-42 y el sedimento de la clona IAN-710.

2. Cromatografía de exclusión en gel

Este tipo de cromatografía permite separar las proteínas en base a su peso molecular. Las proteínas pequeñas penetran a las esferas de la matriz y se quedan retenidas, en cambio las proteínas más grandes no pueden penetrar los poros de manera que fluyen con mayor facilidad a través del gel y son eluidas primero mientras que las pequeñas son eluidas hasta el final.²²

Las dos fracciones del suero y del sedimento de GV-42 (columna de gel de 1.6 x 89.5 cm) y la fracción al 100 % de saturación de sedimento de IAN-710 (columna de gel de 1.6 x 115 cm) se aplicaron a una columna de exclusión en gel AcA54 con límites de separación de 5,000 a 75,000 Da, equilibrada con un regulador de fosfatos 0.02 M de pH 7 que contenía NaCl 0.1 M. Se utilizó un equipo LKB con una bomba Varioperpex con un flujo entre 9.5 y 11.5 ml/h, dependiendo de la muestra, un detector UVICORD S para medir la absorbancia a 280 nm y un colector Ultrorac II, colectándose fracciones de 2.5 ml. La columna de 1.6 x 89.5 cm se calibró con muestras estándar de papaina y lisozima bajo las mismas condiciones. A partir de los picos obtenidos se separaron las diferentes fracciones, que se dializaron contra agua destilada utilizando membranas Spectrapor con límite de peso molecular de 3,500 Da y se concentraron por liofilización.

3. Cromatografía líquida de alta resolución

En este tipo de cromatografía se emplean matrices que tienen grupos con cargas positivas (resinas de intercambio aniónico) o con cargas negativas (de intercambio catiónico) que permiten que las proteínas cargadas se unan a la matriz para posteriormente ser eluidas con algún disolvente que aumente la fuerza iónica del medio. La carga de la proteína depende del contenido de aminoácidos y el medio en el que se encuentre.²³

Por experimentos previos en nuestro laboratorio y por datos en la literatura, se sabe que el pico más abundante de la cromatografía de exclusión en gel precipitado con sulfato de amonio al 100 % (sedimento) corresponde a la heveína y sus isoformas¹⁹. Para la purificación de la heveína se utilizó una columna de intercambio aniónico POROS HQ/H en un HPLC Beckman System Gold. La columna se equilibró con un regulador de Tris-HCl 0.05 M de pH 7.4, a un flujo de 3 ml/min y la proteína se eluyó con un gradiente de 0 a 100% del mismo regulador conteniendo NaCl 1 M al mismo flujo. Se registró la absorción a 280 nm de las fracciones eluidas.

La cuarta fracción del suero de GV-42 precipitado al 100% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y con un volumen de elución correspondiente a un peso de aprox 15 KDa se denominó I y se purificó en un HPLC de LKB bajo las siguientes condiciones: se usó una columna de intercambio aniónico BIORAD DEAE-S-PW que fue equilibrada con regulador de Tris-

HCl 0.05 M de pH 8.0 a un flujo de 1 ml/min. La elución se realizó con el mismo flujo y un gradiente lineal de 0 a 100 % de Tris-HCl 0.05 M de pH 8.0 con NaCl 1 M, midiendo absorción a 280 nm. Las fracciones obtenidas se recircularon bajo estas mismas condiciones.

La fracción correspondiente al extracto del sedimento de GV-42 precipitado al 100 % con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con un peso molecular aproximado de 20 KDa, fracción VIII de acuerdo a su volumen de elución, se purificó por cromatografía de intercambio aniónico. Para la purificación de esta fracción se empleó el mismo equipo y condiciones de flujo y registro, pero en este caso se empleó un regulador de fosfatos 0.02 M de pH 7.5 para equilibrar y para eluir se utilizó un gradiente de NaCl (0-1 M) en el mismo regulador. Todas las fracciones obtenidas se dializaron contra agua destilada con membranas Spectrapor con límite de peso molecular de 3,500 Da.

4. Determinación de actividad de quitinasa

Se ha visto que algunas proteínas con actividad de quitinasa obtenidas de frutas como aguacate, kiwi y plátano,^{33 y 34} presentan reactividad cruzada con el látex por lo que resultaría interesante determinar de manera cualitativa que fracciones del látex presentan dicha actividad para su posterior purificación.

Para la determinación de la actividad de quitinasa se utilizó un método colorimétrico²⁴ en el cual se emplea un sustrato insoluble, polvo de quitin-azure, al cual se ha unido covalentemente azul de Remazol. La actividad es proporcional a la liberación del colorante, cuya absorbancia es medida a una longitud de onda de 600 nm.

En el experimento se agregó a 1 mg de quitin-azure 1.9 ml de regulador de Tris-HCl 0.05 M de pH 8 y 100 μ l de la muestra a medir actividad. La mezcla se incubó durante 4 h a 37°C se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min y se midió absorción a 600 nm.

5. Caracterización

5.1 Espectro de absorción

Una de las mediciones que con mayor frecuencia se lleva a cabo en proteínas es la absorción de la luz visible y ultravioleta. Esta técnica se emplea para diversos propósitos que van desde la determinación de la concentración hasta la resolución de algunas características estructurales.

La absorción espectroscópica es la absorción de un fotón por un electrón, y solo los fotones con determinado nivel energético son absorbidos. Las proteínas presentan una absorción de luz en la región del ultravioleta y tienen un espectro muy característico con dos máximos, uno en 200 y otro en 280 nm. La absorción a 280 nm (la de menor energía) se debe a la presencia de aminoácidos aromáticos ya que sus electrones se encuentran estabilizados por el fenómeno de resonancia, y la absorción a 200 nm se debe a la unión peptídica.²⁵

El espectro de absorción para las proteínas purificadas se determinó preparando una dilución de la proteína en agua destilada con una absorción entre 1 y 1.5 y haciendo el barrido de 200 a 800 nm en un espectrofotómetro Pharmacia Biotech modelo Ultrospec 3000.

5.2 Dispersión dinámica de luz

Esta técnica mide el coeficiente de difusión traslacional de una molécula bajo movimiento browniano en solución. Las partículas en movimiento dispersan la luz monocromática dando como resultado una fluctuación en las intensidades correspondiente a un movimiento particular. Llevando a cabo el tratamiento adecuado se puede obtener información cuantitativa sobre el comportamiento de partículas disueltas en solución, como por ejemplo peso molecular y estado de agregación, ya que la intensidad de la luz dispersada es proporcional al cuadrado de la masa de la partícula en solución, lo cual se cumple para proteínas de tipo globular.²⁷ La facilidad con la que una macromolécula cristaliza depende de sus propiedades de solubilidad.

Las mediciones de dispersión dinámica de la luz sirven para examinar el estado de agregación y solubilidad de la proteína.

Con el fin de determinar la homogeneidad (nivel de polidispersidad) de la preparación pura de la heveína, se realizó un estudio de dispersión dinámica de luz con una solución de heveína IAN-710 en concentración de 22 mg / ml en un equipo DynaPro-801 TC.

5.3 Electroforesis

La electroforésis es una técnica que permite separar proteínas con carga por su migración en un campo eléctrico, donde la migración está en función del tamaño, forma y carga de la molécula.

Las proteínas puras fueron caracterizadas utilizando diferentes técnicas electroforéticas, enfoque isoeléctrico y electroforesis desnaturizante.

- Enfoque isoeléctrico

El enfoque isoeléctrico (IEF) es una técnica de alta resolución que separa a las proteínas en base a su punto isoeléctrico. Esto ocurre cuando las proteínas migran a través de un gradiente de pH cuando se aplica un campo eléctrico. La proteína migra hacia el electrodo de carga opuesta a la suya, y durante la migración a través del gradiente de pH, la proteína gana o pierde electrones con lo cual su carga neta y movilidad disminuyen hasta que alcanza un punto en el cual su carga neta es igual a cero, es decir, cuando el pH es igual a su pI .²⁶

En este caso se corrió un microgel Phast Gel PAGE 3-9, gel homogéneo de poliacrilamida, con anfólicas Pharmalyte (pI 3-9) en un equipo Phast System de Pharmacia

- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Este método es ampliamente utilizado para la determinación del peso molecular de cadenas polipeptídicas y el análisis de péptidos. Las proteínas son disociadas en sus

cadenas polipeptídicas al agregar dodecil-sulfato de sodio y β -mercaptoetanol, el primero es un detergente que actúa como desnaturizante y el β -mercaptoetanol sirve para reducir todos los enlaces disulfuro. Las cadenas unen la misma cantidad de SDS por unidad de peso (1.4 g de SDS por gramo de proteína) y adquieren una carga neta negativa, por lo que todas las subunidades tienen la misma densidad de carga de manera que la separación se logra de acuerdo al tamaño de la molécula.²⁶

En este caso se utilizó un microgel SDS-PAGE Phast Gel gradiente de 8-25 con un sistema de amortiguador discontinuo y bajo las condiciones especificadas para este gel en el manual del Phast System²⁸

La tinción en los dos tipos de geles se efectuó con plata siguiendo la metodología indicada en el manual del Phast System.²⁸

5.4 Espectrometría de masas

Una de las técnicas más empleadas para la espectrometría de masas de macromoléculas es la de electrospray. En esta técnica la proteína es disuelta en un ácido volátil e introducida en forma de rocío al espectrofotómetro. Al entrar la muestra, el disolvente se evapora rápidamente en un cámara de vacío debido a una nebulización electrostática a través de un gradiente de campo eléctrico, dejando las moléculas de proteína con cargas positivas múltiples, que por medio de presión son fragmentadas. Los fragmentos son acelerados por un campo eléctrico y desviados por un campo magnético de acuerdo a su relación masa-carga.²⁹

Dos proteínas fueron seleccionadas y analizadas por espectrometría de masas (la proteína I y la heveína). Para analizar la proteína I, esta se disolvió en ácido trifluoroacético (ATF) 0.1 % con una matriz de acetonitrilo-ATF y se utilizó el método MALDI-MS en un equipo KRATOS Analytical, modelo Kompact Maldi. Para la determinación del peso molecular de la heveína se utilizó un equipo de espectrometría de masas Omega. La muestra se disolvió en H₂O:CH₃CN en relación 1:1 en volumen mas 0.2 % de ATF. En los dos casos, la técnica empleada fue la de electrospray.

5.5 Pruebas de cristalización

- Difusión de vapor en gota colgante y gota asentada

Típicamente, una gota suspendida o asentada contiene a la proteína en disolución, más el agente precipitante (sales, disolventes orgánicos, etc) a concentraciones de subsaturación de la proteína. Esta gota se equilibra contra un volumen mayor del agente precipitante, en un recipiente sellado. Las disoluciones alcanzan un equilibrio de presiones de vapor y la proteína en la gota alcanza una concentración de supersaturación lo que induce la cristalización de la misma.³⁰

Es muy importante notar que todos los reactivos para cristalización deben ser de alta pureza y todas las soluciones deben ser filtradas por membranas de 0.22 μm .

- Difusión de vapor en gota colgante

Con el fin de obtener cristales de heveína de alta calidad cristalográfica, en una caja Linbro para cultivo de tejidos (4x6 pozos) se hizo un “screening” variando la concentración de la proteína y del agente precipitante (2-metilpentanodiol, MPD) con el cual se habían obtenido cristales previamente. En cada pozo se colocaron 750 μl de un regulador de Tris-HCl 40 mM de pH 8.1 y con agente precipitante en diferentes porcentajes. Cada pozo se cubre con un cubre objetos siliconizado que contiene adherida en su parte inferior una gota formada por 5 μl de la solución de proteína y 5 μl del regulador con agente precipitante. Ver la figura A.

En este trabajo se estudio el efecto de la concentración de proteína y de agente precipitante a una temperatura constante de 18 °C.

Las condiciones del experimento se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de agente precipitante (MPD) y de heveína empleadas en el experimento, (% MPD, conc. de heveína en mg/ml), en regulador de Tris-HCl 40 mM de pH 8.

Carril	1	2	3	4	5	6
A	(55, 6)	(55, 8.1)	(55, 10.13)	(55, 12.15)	(55, 13.3)	(55, 15.3)
B	(60, 6)	(60, 8.1)	(60, 10.13)	(60, 12.15)	(60, 13.3)	(60, 15.3)
C	(65, 6)	(65, 8.1)	(65, 10.13)	(65, 12.15)	(65, 13.3)	(65, 15.3)

El pozo queda de la siguiente manera:

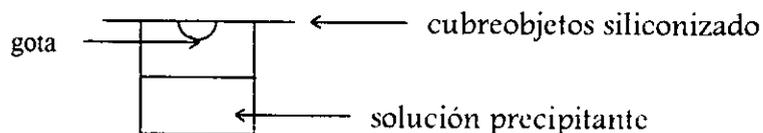


Figura A

- Difusión de vapor en gota asentada

Esta técnica se basa en el mismo principio que la de gota colgante, la diferencia radica en que en este caso el volumen de la gota es mayor y se coloca en un dispositivo que cuenta con una depresión en la parte superior, como se puede ver en la figura B. Gracias a esto es posible obtener cristales de mayor tamaño.

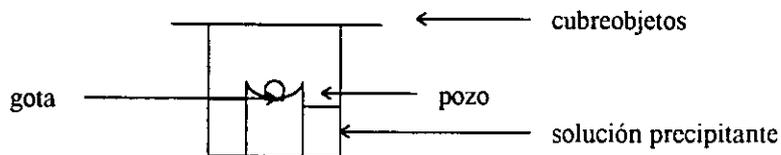


Figura B

En este caso se utilizó una caja Linbro para cultivo de tejido (4 x 6 pozos) para las pruebas de cristalización. Estas se diseñaron con la finalidad de estudiar el efecto del pH y el tipo de heveína, ya que se utilizó heveína de diferentes lotes así como una heveína a la cual se le modificó químicamente la tirosina 30 con yodo. El obtener cristales de yodo-heveína permitiría resolver su estructura tridimensional utilizando el método de reemplazo isomórfico. También se hicieron pruebas con las isoformas de la heveína.

En este experimento se colocaron 7.5 μ l de proteína y 7.5 μ l del agente precipitante en la gota y 750 μ l de este último en el pozo. Las condiciones se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de agente precipitante y proteína, así como los tipos de esta, para el experimento de gota asentada. Tanto en el carril A como en el B se mantuvo invariable la solución precipitante que fue Tris-HCl 40 mM de pH 7.1 con MPD al 60%.

	1	2	3	4	5
A	heveína GV-42 10 mg/ml	heveína GV-42 12.61 mg/ml	yodoheveína 10.62 mg/ml	pseudoheveína 10 mg/ml	
B	heveína fresca IAN-710 10 mg/ml Tris-HCl 40mM de pH 7.97 con MPD al 60%	heveína fresca IAN-710 10 mg/ml Tris-HCl 40mM de pH7.1 con MPD al 60%		heveína almacenada IAN-710 10 mg/ml Tris-HCl 40mM de pH 7.97 con MPD al 60%	heveína almacenada IAN-710 10 mg/ml Tris-HCl 40mM de pH7.1 con MPD al 60%
C	isoformal de heveína 10 mg/ml	Isoformall de heveína 10 mg/ml	Isoformalll de heveína 10 mg/ml	heveína IAN-710, 10 mg/ml	

- Método de difusión a través de un gel

En esta técnica lo que se hace es colocar en un capilar entre una solución de proteína y el agente precipitante una barrera de gel. El fundamento de esta técnica se basa en el fenómeno de difusión, sin embargo, en este caso se le conoce como contradifusión ya que la proteína y el agente precipitante difunden en sentidos contrarios hacia el gel. Se utilizaron capilares de 1.2 mm de diámetro y un gel de silicatos que se prepara con una solución de silicato de sodio $\rho=1.06$ g/ml y ácido acético 1 M. El gel se inyectó con una jeringa en el centro del capilar formando un tapón de 5 mm aproximadamente, después se inyectaron 17 μ l del agente precipitante (~1.5 cm), sellando con cera y parafilm ese extremo, y entonces por el otro extremo se inyectó el mismo volumen de solución de proteína, sellando también este otro extremo. El regulador utilizado fue Tris 40 mM de pH 8.04 y MPD al 55 y 60 %, la heveína se utilizó en dos concentraciones, 3.94 y 5.02 mg/ml.

El experimento se ve de la siguiente manera, Fig C:

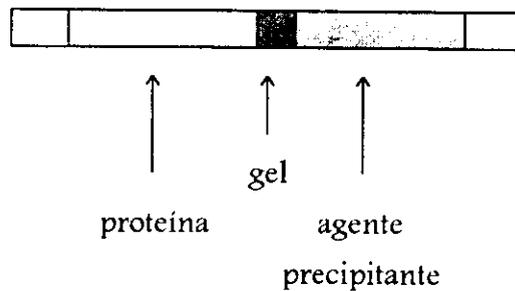


Figura C

- Acupuntura en gel

En este método se aprovechan las propiedades de los geles para formar una barrera entre la solución de proteína y la solución de agente precipitante, pero permitiendo el transporte de masa de éste último. Dicho transporte es bastante lento lo que permite obtener monocristales de buen tamaño.³¹

En esta técnica se utilizan cámaras formadas por dos placas de vidrio con un pequeño espacio entre ellas (de manera que quepan los capilares) y selladas en tres de sus extremos con hule. Se preparó una solución de gel de silicatos añadiendo ml ácido acético 1 M a ml de solución de silicato de sodio con densidad de 1.06 g/ml y se vertió en dos cámaras, dejando polimerizar. Cuatro alícuotas de heveína se tomaron directamente con los capilares (aprox. 5 cm), dos con concentración de 22 mg/ml y dos de 11 mg/ml y se insertaron uno de cada uno en el gel de cada cámara, entonces se agregó lentamente la solución del agente precipitante, en una cámara fue MPD al 60 % y en la otra 80 %, las dos en regulador de Tris-HCl 40 mM de pH 7.1 con azida de sodio al 0.1 % (p/v), finalmente se selló la cámara.

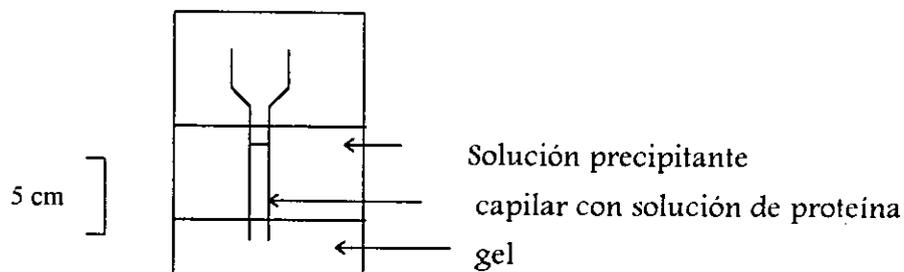


Figura D

- Difusión de vapor en gota asentada en un recipiente con micropuentes

Para poder determinar el efecto de la concentración de proteína en la cristalización, se colocaron 6 micropuentes de Hamptom. A cada uno se le agregaron 5 μ l de heveína y 5 μ l de regulador Tris pH 7.1 con MPD al 60 %. La concentración de proteína en mg/ml en cada pozo es : 1=22, 2=16, 3=11, 4=8.25, 5=5.5, 6=2.75. En el canal y en el pozo central se agregó solución precipitante.

En esta prueba se utilizó un dispositivo como el que se esquematiza en la figura D.

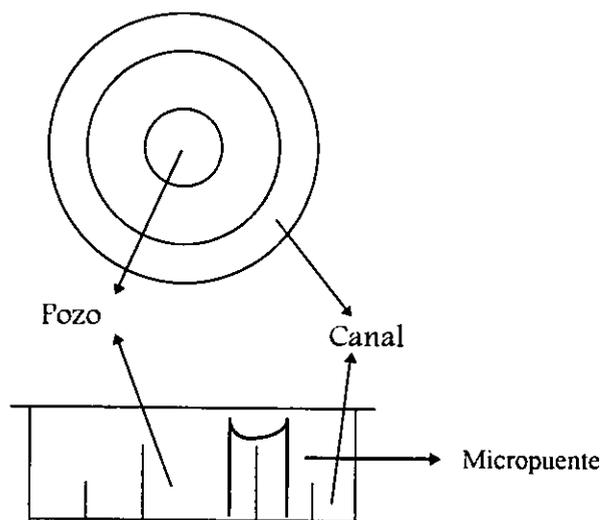


Figura D

- Microsebrado

La técnica de microsebrado involucra la transferencia de cristales microscópicos de una fuente de cristales a una solución de proteína no nucleada, de manera que provee a la solución una superficie regular cristalina preformada para que las moléculas puedan agregarse de manera ordenada.

El microsebrado se puede dividir en tres pasos : 1) preparación de la solución stock de sembrado, 2) dilución repetida de las semillas y 3) el sembrado.³²

Se prepararon 4 tubos eppendorf que contenían 90 μl del regulador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.1 MPD al 65, 60, 55 y 50 %. Se tomó una alícuota de 10 μl de una gota que contenía microcristales de heveína y se transfirió al tubo eppendorf con MPD al 65 %, agitando en un vortex unos segundos. De aquí se tomó una alícuota del mismo volumen y se transfirió al siguiente tubo eppendorf con MPD al 60 % y se repitió lo mismo hasta llegar al MPD al 50 %. Las siembras se hicieron con la última dilución en el recipiente circular con micropuentes previamente equilibradas por 1 día y en los pozos del carril A del experimento de gota asentada.

- Macrosembrado

En esta técnica se transfiere un monocristal preformado y lavado a una solución preequilibrada. Esto con el fin de desarrollar el crecimiento del cristal bajo condiciones que impidan la nucleación espontánea.³²

Un monocristal de heveína de la clona IAN-710 obtenido en uno de los experimentos de gota asentada, se lavó en 1 ml de solución precipitante al 80 % de MPD, luego se transfirió a una solución con MPD al 55 % para disolver un poco las caras y por último se paso a un dispositivo de gota asentada preequilibrado con la proteína.

4.6 Difracción de rayos-X

El monocristal de heveína que se obtuvo en el pozo B₅ de las pruebas de difusión de vapor en gota asentada (MPD 60 %, pH 7.1) se sometió a difracción de rayos-X utilizando la técnica de criocongelación en un equipo RAXIS II-RIGAKU con generador de ánodo rotatorio y detector de placa fosforescente.

Esta técnica consiste en colocar una asa de nylon con el cristal en el equipo bajo un flujo de nitrógeno líquido de manera que este se congele instantaneamente. El flujo del N₂ fue de 1L/h y la temperatura de -160°C

Lo primero que se hace es ver si el cristal difracta y si lo hace a que resolución, con lo cual se ve la calidad del cristal. Posteriormente se caracteriza al cristal que consiste en calcular las dimensiones de la celda unitaria y determinar el grupo de simetría al que pertenece. Ya caracterizado el cristal se procedió a coleccionar los datos de difracción.

4.7 Comparación estructural entre los alergenicos proteínicos reportados hasta el momento y la heveína

Para llevar a cabo el análisis y la comparación de secuencias entre la Hev b 6.02 y los alergenicos Phl p 2, Bet v 1, la profilina de polen de abedul y Der f 2 se utilizó el programa Sequaling. Para la visualización de la estructura tridimensional se utilizó el programa QUANTA.

RESULTADOS y DISCUSION

1. Obtención de las proteínas

2 y 3. Cromatografía de exclusión en gel y cromatografía de intercambio iónico

Para la separación de las proteínas del látex en base a sus pesos moleculares, los extractos del suero de la clona GV-42 y del sedimento de las clonas IAN-710 y GV-42 se sometieron a cromatografía de exclusión en gel AcA54. Se utilizaron dos clonas del látex para analizar si presentaban el mismo perfil de elución, si contenían los mismos alérgenos, y comparar su abundancia. Los resultados se presentan a continuación.

El perfil de elución del suero de la clona GV-42 precipitado al 100 % de saturación con sulfato de amonio se muestra en la Figura 1 y como puede observarse está compuesto por siete fracciones. Para determinar que fracciones se iban a purificar se consideraron los siguientes criterios: abundancia, un punto isoeléctrico por abajo de 7, ya que los alérgenos son en su mayoría proteínas ácidas, y una masa molecular aproximada entre 15 y 25 KDa porque las fracciones con masas dentro de este intervalo se dializaron contra agua destilada y se aplicaron a una columna de intercambio aniónico bajo condiciones que permitieran separar a las proteínas ácidas. La fracción denominada I (Figura 1) fue la que contenía el mayor número de proteínas ácidas y un peso molecular aproximado de 15,000 por lo que se seleccionó para continuar su purificación.

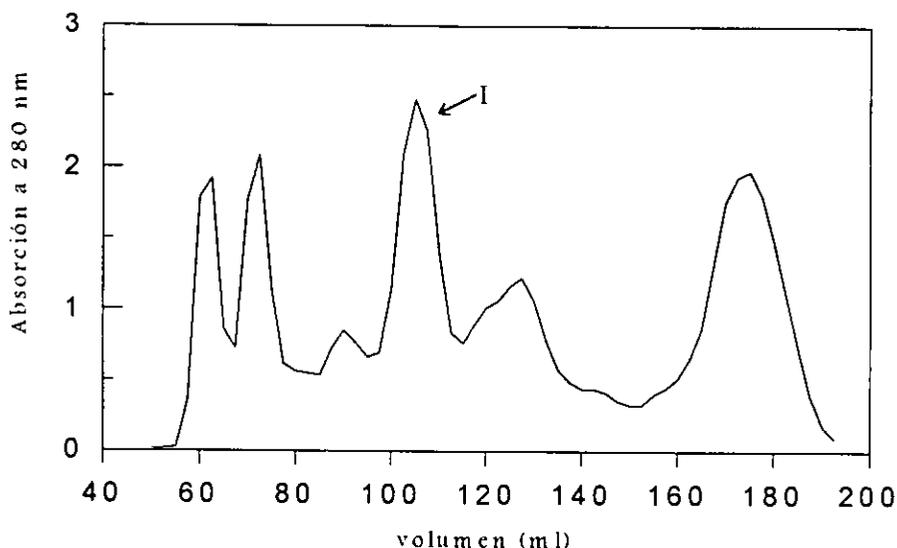


Figura 1. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión en gel (columna de gel de 1.6 x 89.5 cm, flujo de 11.5 ml/h) del precipitado al 100% de saturación con sulfato de amonio proveniente del suero de GV-42. Los tubos conteniendo la fracción I fueron colectados y dializados contra agua destilada para su posterior purificación

La fracción I (Figura 1) se aplicó a una columna de intercambio aniónico y su perfil de elución se muestra en la Figura 2, donde se ve que solo hay una fracción que no es retenida en la columna y varias fracciones que eluyen a partir de 0.25 M de NaCl. Se seleccionó la fracción más ácida y abundante, denominada como Prot I, para continuar su purificación bajo las mismas condiciones. Aprovechando que ya se tenía la proteína pura se le determinó, cualitativamente, actividad de quitinasa dando resultado positivo. El peso molecular determinado por espectrometría de masas para esta proteína es de 12,000 y su punto isoelectrico, determinado por electroforesis, es de 3.9. Hasta el momento no se ha reportado ninguna proteína alergena del látex o de alguna fruta con dichas características. Sin embargo si se han reportado otras proteínas de mayor peso molecular con dicha actividad que presentan reactividad cruzada con algunos alergenos del látex. Por lo tanto, sería muy interesante determinar si esta proteína en estado puro es alergena, ya que todos los estudios que se han realizado para determinar

la alergenicidad de las proteínas ha sido utilizando un extracto total de proteínas, lo cual impide determinar con certeza cuales son alergenas y cuales no. Además de esto, también existe la necesidad de estandarizar (trabajar con proteínas puras) los métodos empleados para determinar alergias en pacientes, así como las inmunoterapias.

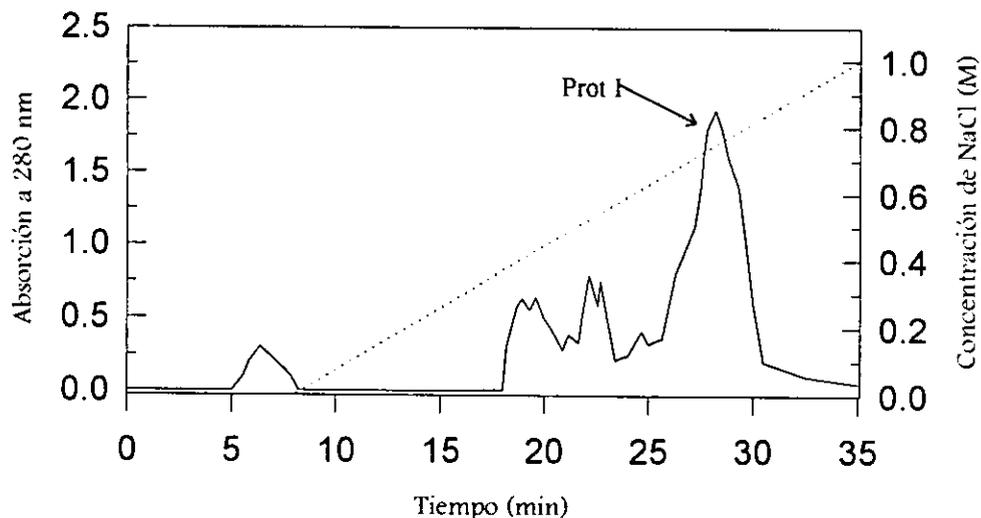


Figura 2. Perfil de elución de la fracción I, utilizando una columna de intercambio aniónico DEAE-S-PW y regulador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 con un flujo de 0.5 ml/min. Los tubos conteniendo a la Prot I se colectaron y se dializaron contra agua destilada para su recirculación bajo las mismas condiciones.

El perfil de elución del precipitado al 65 % de saturación con sulfato de amonio del extracto del sedimento de la clona GV-42 se muestra en la Figura 3. Este se compone de siete fracciones a las cuales se les asignó un número empezando por el II debido a que el I corresponde a la obtenida del suero. Se realizó una determinación cualitativa de actividad de quitinasa a estas fracciones y solo la fracción IV dió resultado positivo. También se aplicaron a una columna de intercambio aniónico aquellas que tenían masa molecular entre ~15 y 25 KDa, fracciones IV, V y VI, viendo que dichas fracciones contenían en su mayoría proteínas básicas, por lo que sólo se continuó con la purificación de la heveína.

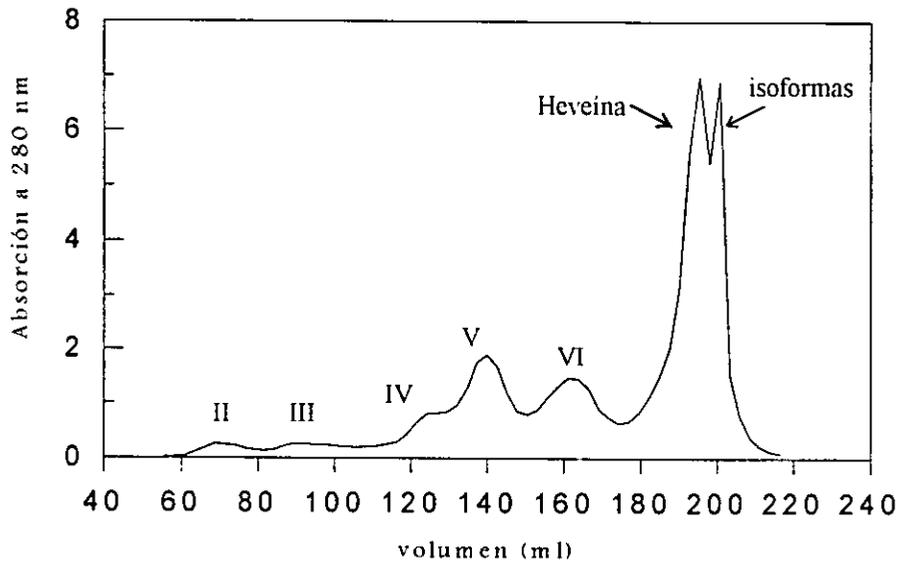


Figura 3. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión en gel (columna de gel de 1.6 x 89.5 cm, flujo de 9.5 ml/h) del precipitado al 65 % de saturación con sulfato de amonio proveniente del sedimento GV-42. A todas las fracciones se les determinó actividad de quitinasa pero solo la fracción IV dió resultado positivo.

El perfil de elución de la heveína de la clona GV-42 aplicada a una columna de intercambio aniónico se muestra en la Figura 4, donde se puede observar que hay dos proteínas muy similares que no se logran separar. Una de estas es la heveína y la otra la forma molecular denominada pseudoheveína.

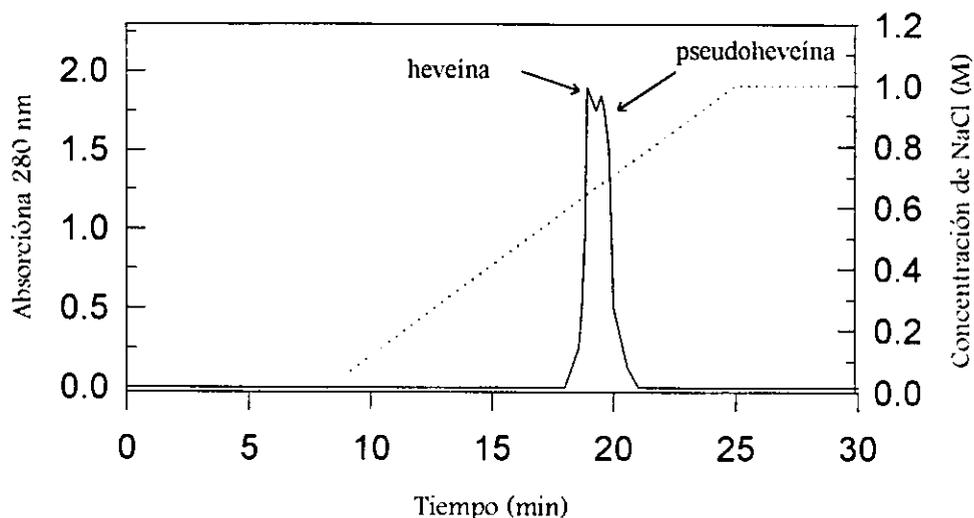


Figura 4. Perfil de elución de la heveína de la clona GV-42, utilizando una columna de intercambio aniónico DEAE-S-PW y regulador Tris-HCl 0.05 M, pH8 con un flujo de 0.5 ml/min. Se ve la presencia de dos proteínas, heveína y pseudoheveína.

En el caso de la precipitación al 100 % de saturación con sulfato de amonio del sedimento de la clona GV-42 se obtuvieron cuatro fracciones, como se observa en la Figura 5. A estas fracciones se les determinó actividad de quitinasa y solo la fracción VII dio positiva. Por cromatografía de intercambio aniónico se vió que la fracción VIII es la que contiene proteínas ácidas, debido a esto y a su peso molecular aproximado se escogió para purificación. La última fracción también se sometió a purificación ya que corresponde a la heveína y sus isoformas

Es importante mencionar que la heveína presenta un perfil de elución característico, sin embargo, su volumen de elución en este caso fue menor (correspondiente a un masa de ~12 KDa), de manera que es posible que bajo las condiciones empleadas, ésta proteína se esté agregando.

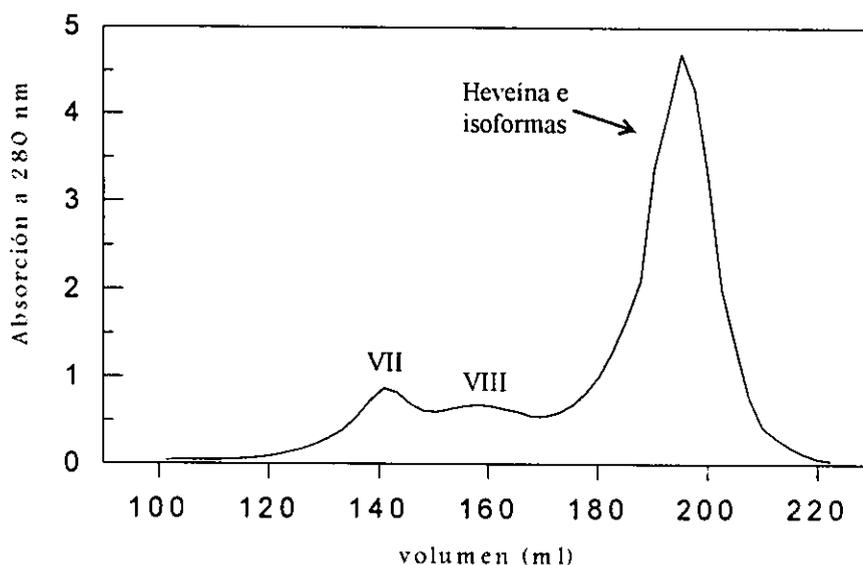


Figura 5. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión en gel (columna de gel de 1.6 x 89.5 cm, flujo de 10.1 ml/h) del precipitado al 100 % de saturación con sulfato de amonio proveniente del sedimento GV-42. En la determinación de actividad proteolítica solo la fracción VII dio positivo. Los tubos conteniendo a la fracción VIII, con peso molecular aproximado de 25,000, fueron colectados y dializados contra agua para su posterior purificación.

La figura 6 presenta el perfil de elución de la fracción VIII cuando se aplicó a una columna de intercambio aniónico. En ésta podemos ver que se obtuvieron tres fracciones de las cuales dos corresponden a proteínas ácidas. Se seleccionó la última fracción (Prot VIII), debido a su acidez y abundancia para recircularse bajo las mismas condiciones. El peso molecular y punto isoeléctrico de esta proteína fueron determinados por electroforesis siendo 17,000 y 4.92, respectivamente.

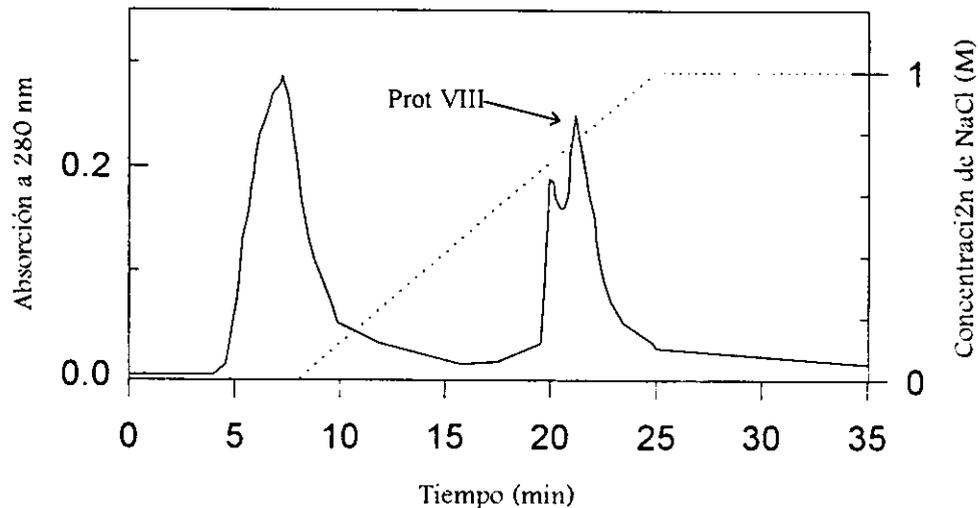


Figura 6. Perfil de elución de la fracción VIII, utilizando una columna de intercambio aniónico DEAE-S-PW y regulador de fosfatos 0.02 M, pH 7.97 con un flujo de 0.5 ml/min. Utilizando técnicas electroforéticas se determinó un masa molecular de 17 KDa y un punto isoeléctrico es 4.92 para la proteína IX.

El perfil de elución del sedimento de la clona IAN-710 al 100 % de saturación se muestra en la Figura 7 y se puede observar que solo se tiene heveína y sus isoformas a diferencia de la clona GV-42, que presenta otras dos fracciones. Esto es un indicio de la diferencia en abundancia de las proteínas entre diferentes clonas, también se nota que en el caso de la clona IAN-710 es posible separar mejor la heveína de sus isoformas. La fracción de la heveína se dializó contra agua destilada y se sometió a cromatografía de intercambio aniónico.

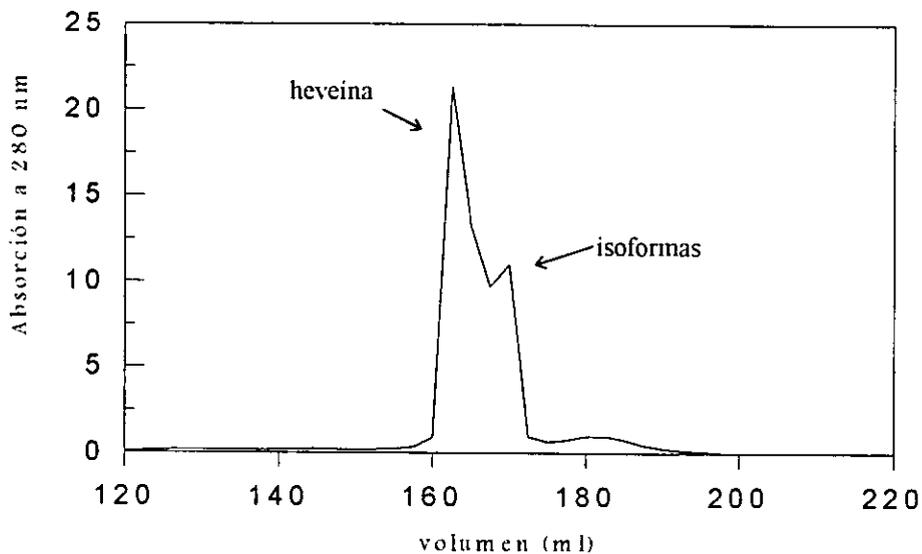


Figura 7. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión en gel (columna de gel de 1.6 x 115 cm, flujo de 10 ml/h) del precipitado al 100 % de saturación con sulfato de amonio proveniente del sedimento IAN-710. Solo se aprecian dos fracciones, la primera fracción corresponde a la heveína y la segunda a sus isoformas.

En la figura 8 se presenta el perfil de elución de la heveína de la clona IAN-710 cuando se aplicó a una columna de intercambio aniónico y se ve que se encuentra prácticamente pura. Es claro que la heveína proveniente de la clona IAN-710 se separa mejor de sus isoformas que la de la clona GV-42, desde su separación por exclusión en gel.

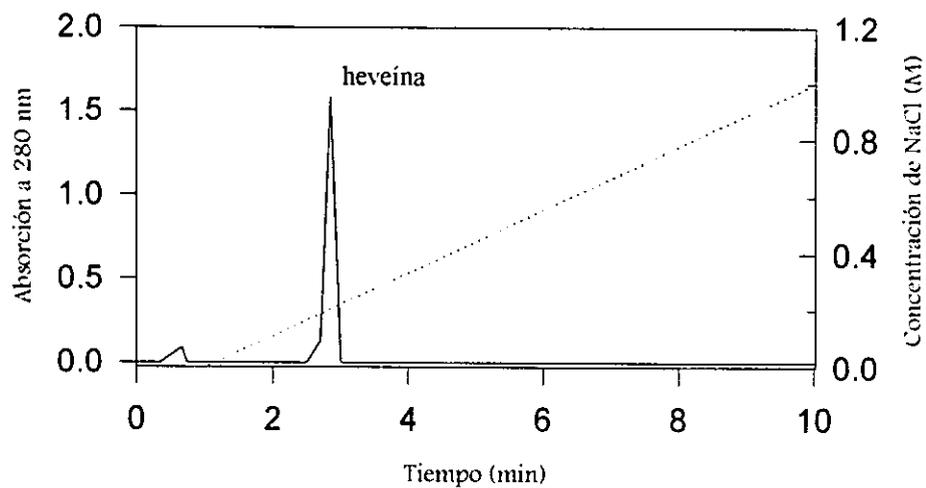


Figura 8. Perfil de elución de la heveína de la clona IAN-710, utilizando una columna de intercambio aniónico POROS HQ/H y regulador Tris-HCl 0.05 M, pH7.41, con un flujo de 3 ml/min.

3.1 Rendimiento

La Tabla 3 presenta los rendimientos en peso de las proteínas purificadas a partir de suero y sedimento del látex de *Hevea brasiliensis* de las clonas IAN-710 y GV-42.

Tabla 3. Rendimientos en peso de las proteínas purificadas.

Extracto	g totales	mg de proteína	% en peso
suero GV-42, protI	22.2 (seco)	2.1	9.4×10^{-3}
sedimento GV-42, protVIII	99.6 (húmedo)	0.19	1.9×10^{-4}
sedimento IAN-710, heveína	60.1 (húmedo)	44.97	0.19

El porcentaje en peso de estas proteínas es congruente con su abundancia en el látex, sin embargo, no es muy exacto ya que los rendimientos se calcularon a partir de extractos húmedos.

4. Determinación de actividad de quitinasa

Como ya se mencionó en la metodología, existen proteínas alergenas de frutas como kiwi, aguacate y plátano con actividad de quitinasa, que presentan reactividad cruzada con algunas proteínas del látex. Por tal motivo consideramos interesante identificar las proteínas del látex con dicha actividad para determinar, en un futuro, si causan alergias y si es así, entonces continuar con estudios estructurales. A la fecha solo se ha reportado la estructura tridimensional de la hevamina (quitinasa básica de P.M. de 29,000) del látex de *Hevea brasiliensis*.⁴¹

Se determinó cualitativamente actividad de quitinasa de las fracciones del sedimento de GV-42 precipitado al 65 y 100 % de saturación, ya que se ha reportado la presencia de quitinasas en los cuerpos lutoideos (vacuolas). Aprovechando que la proteína I ya se había purificado, también se le determinó actividad, dando un resultado positivo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Determinación de actividad quitinasa en las fracciones del sedimento del látex y la proteína I, del suero.

Muestra	Actividad quitinasa
proteína I (suero de GV-42)	positiva
fracción II (Sedimento de GV-42)	negativa
fracción III (Sedimento de GV-42)	negativa
fracción IV (Sedimento de GV-42)	positiva
fracción V (Sedimento de GV-42)	negativa
fracción VI (Sedimento de GV-42)	negativa
fracción VII (Sedimento de GV-42)	positiva
fracción VIII (Sedimento de GV-42)	negativa

5 Caracterización

5.1 Espectros de absorción

Los espectros de absorción obtenidos para las proteínas I y VIII muestran un perfil característico de proteína con máximos de 200 y 280 nm. La heveína presenta un hombro característico centrado en 290 nm.

5.2 Dispersión dinámica de luz

Con el fin de determinar la homogeneidad de la muestra de heveína se realizó un experimento de dispersión dinámica de luz. Los resultados obtenidos con una solución de heveína de 22 mg/ml se pueden ver en la tabla 5.

Tabla 5. Datos de dispersión dinámica de luz de una solución de heveína de 22 mg/ml.

#	Tiempo min:sec	Ampl.	Coef Dif.	Radio (nm)	Polid. (nm)	P.M. Est.	Temp °C	Ctas/ s	Linea Base	error
1	5:34	0.640	1509	1.6	0.618	10K	25.6	194	1.004	1.780
2	6:12	0.747	1452	1.7	0.677	11K	25.8	194	1.014	4.552
3	6:50	0.787	1484	1.6	0.663	10K	25.8	190	1.010	5.719
4	7:29	0.818	1483	1.7	0.665	11K	25.9	188	1.009	4.484
5	9:27	0.870	1496	1.6	0.636	10K	26.1	185	1.006	3.976
6	10:06	0.717	1495	1.6	0.593	10K	25.8	189	1.005	2.584
7	11:22	0.754	1544	1.6	0.581	10K	26.3	184	1.003	2.357
8	12:03	0.793	1539	1.6	0.481	10K	26.4	181	1.003	1.746

Ampl=amplitud; Coef. Dif.=coeficiente de difusión; Polid=polidispersidad; P.M. Est.= peso molecular estimado; Ctas.s.=cuentas por segundo

Los datos obtenidos indican que a la concentración de 22 mg/ml en la solución de heveína predomina el dímero ya que el experimento da un valor de masa molecular de ~10 KDa cuando la masa molecular de esta proteína es de 4.7 KDa. Sin embargo, los cristales de heveína de soluciones de 10 mg/ml contienen un monómero en la celda unitaria¹⁸, por lo que podemos decir que a concentraciones mayores a 20 mg/ml la heveína se agrega en forma dimérica. Como puede apreciarse, la proteína es homogénea (monodispersa) ya que el valor de polidispersidad es menor a 1. La obtención de cristales del dímero sería posible, sin embargo, las condiciones de cristalización podrían ser diferentes a las empleadas en el caso del monómero.

5.3 Electroforesis

En relación a las técnicas electroforéticas los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6. Se determinó el peso molecular de la proteína VIII y se vio que la heveína dio una banda correspondiente a ~11 KDa y otra de ~60 KDa. Este resultado nos indica que posiblemente, a la concentración que se aplicó la muestra esta se encontraba agregada y las condiciones de desnaturalización no fueron suficientes para impedir las interacciones intermoleculares de la heveína. En el caso de la proteína I no se observó ninguna banda

en la determinación de peso molecular bajo condiciones desnaturalizantes, esto puede deberse a que la cantidad de muestra aplicada no fue suficiente o que la técnica de tinción no es adecuada para esta proteína (hay evidencias de que las proteínas del látex son de difícil tinción). También se determinaron los puntos isoeléctricos de las proteínas I y VIII.

Tabla 6. Peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas I, VIII y heveína, determinados por electroforesis.

Muestra	Peso molecular (Da)	Punto isoeléctrico
Proteína I	-----	3.9
Proteína VIII	17 000	4.92
heveína	~11 000 y ~60 000	-----

5.4 Espectrometría de masas

Como ya se mencionó en el punto anterior, no se pudo determinar el peso molecular de la proteína I, del suero de la clona GV-42, mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes, posiblemente esto se debió a que la concentración a la que se aplicó la muestra no fue suficiente. Sin embargo fue posible hacerlo por espectrometría de masas utilizando el método Maldi-MS, el resultado obtenido fue de 12,000.

El peso molecular determinado por espectrometría de masas de la heveína es de 4,717 y su espectro se puede ver en la figura 9. Este resultado no concuerda con lo obtenido en los resultados de la cromatografía de exclusión en gel ya que tenía un volumen de elución correspondiente a un peso molecular aproximado 15 KDa, lo que nos indica que en las condiciones de separación por exclusión esta proteína se encuentra agregada. Para corroborar esto sería necesario repetir el experimento pero equilibrando a la columna con guanidina 6 M o urea 8 M evitando de esta forma estados de agregación. Se observó el mismo fenómeno de agregación en la electroforesis para determinación de peso molecular.

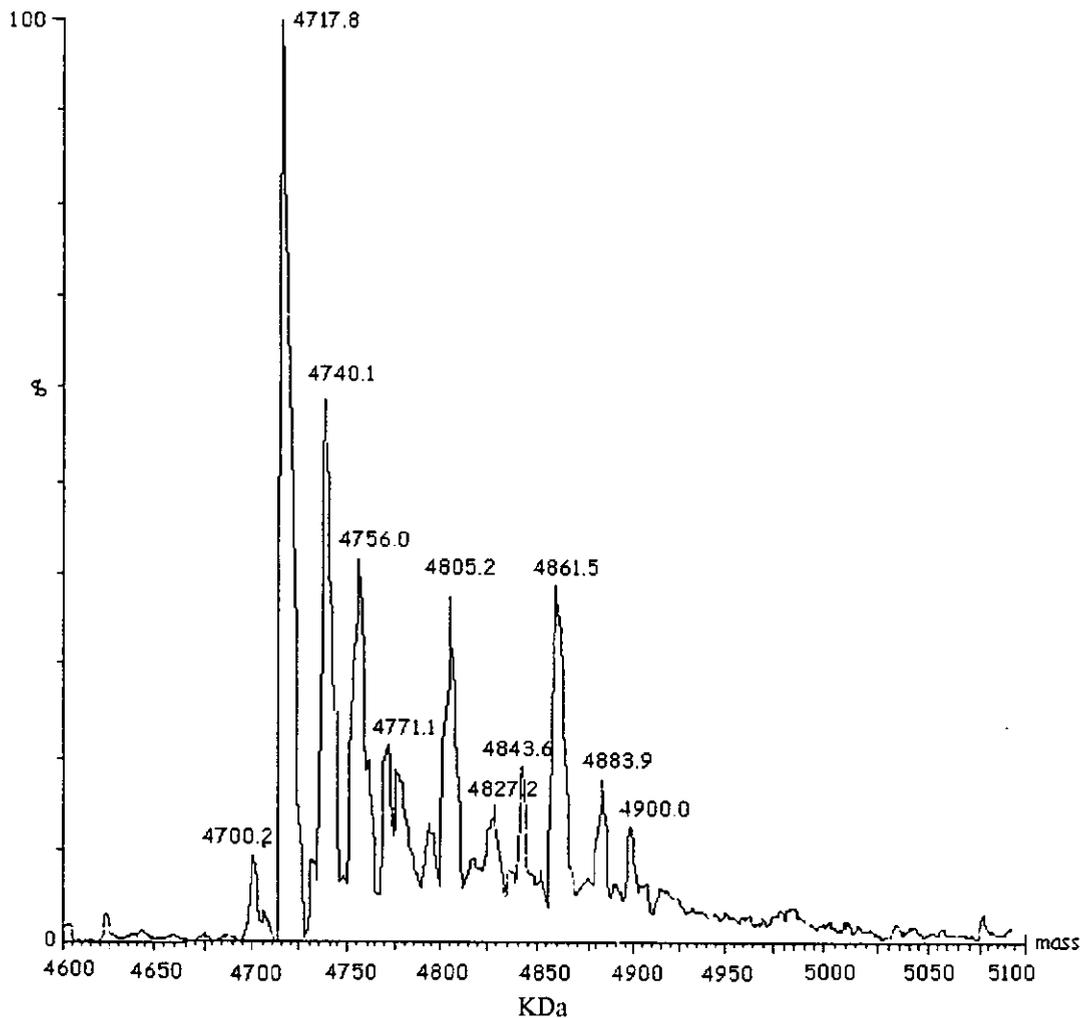


Figura 9. Espectro de masas de la heveina determinado por la técnica de electrospray, en un espectrometro de masas Omega.

5.5. Pruebas de cristalización

Las condiciones de cristalización de la heveina ya se habían determinado en nuestro laboratorio¹⁸. Con el fin de obtener cristales de esta proteína de mejor calidad cristalográfica, que difractaran a una resolución mejor que 2.8 Å, se prepararon varios métodos y condiciones. Dichos métodos nos permitieron estudiar algunos parámetros que afectan la obtención y crecimiento de cristales como concentración de proteína y de

agente precipitante, el pH, el volumen de la muestra a cristalizar y la velocidad de difusión dependiendo del método empleado.

- Difusión de vapor en gota colgante

Después de 5 días de haber puesto las pruebas se observó que en varias gotas con MPD al 55 y 60 % se formaron agregados cristalinos. En la gota con mayor concentración de proteína y menor concentración de agente precipitante se formaron también agregados cristalinos. En la gota con MPD al 60 % y proteína en concentración de 13.3 mg/ml se formaron dos cristales muy pequeños. En todas las gotas con MPD al 65 % se formó precipitado y hasta después de 18 días crecieron algunos cristales pequeños.

Estos resultados indican que el proceso de cristalización se llevó a cabo rápidamente de manera que se formaron muchos núcleos cristalinos que dieron lugar a muchos cristales, a pesar de esto se puede ver que los resultados más favorables se dieron en las pruebas con agente precipitante MPD al 60%.

- Difusión de vapor en gota asentada

Los experimentos de gota asentada con diferentes tipos de heveína y sus isoformas dieron los siguientes resultados:

En A₁ se obtuvieron cristales de mala calidad después de 22 días y en A₂ después de 28 días se formó precipitado. En B₂ se formaron agregados cristalinos al cabo de una semana pero en B₅ se formaron monocristales de los cuales uno se ve con características adecuadas para difracción de rayos-X. Después de un mes y medio se formó un monocristal en B₂.

Al cabo de 4 meses se obtuvieron esférulos en dos pozos, C₂ y C₃, y varios cristales creciendo del mismo núcleo en pozo C₁.

Como se puede apreciar, ésta técnica permite obtener mejores resultados que la de gota colgante, el aumento en el tamaño de la gota posiblemente es un factor determinante para la obtención de monocristales de tamaño adecuado de heveína. Además es interesante mencionar que el número de cristales es menor por lo que se favorece su crecimiento.

Las condiciones empleadas permitieron obtener cristales con características adecuadas para estudios de difracción de rayos-X (figura 10) por lo que dichas condiciones se probaron con otros métodos. Los cristales de mejor calidad se obtuvieron utilizando regulador Tris-HCl 40 mM pH7.1 con MPD al 60 % y crecieron al cabo de quince días.

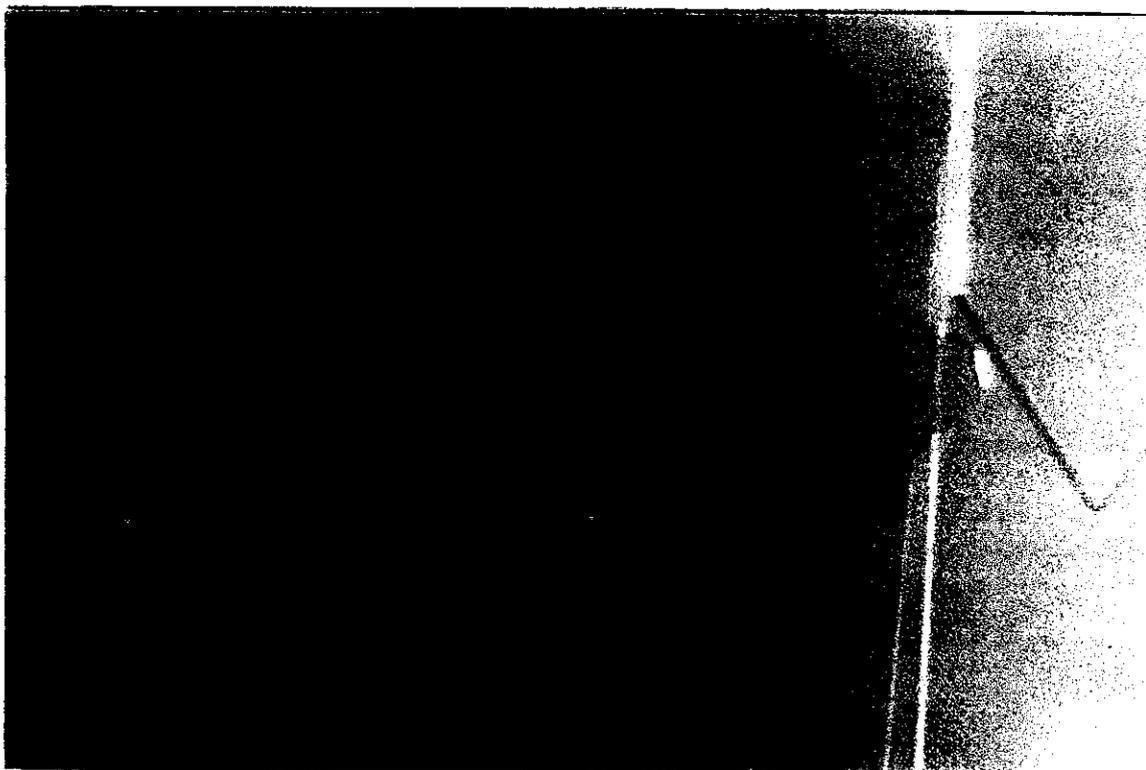


Figura 10. Cristal de heveína IAN-710 con dimensiones aproximadas de 0.7x0.4x0.08 mm, formado en una solución con MPD al 60 % en regulador de Tris-HCL 40mM de pH 7.1.

- Método de difusión a través de un gel

En este experimento los resultados fueron negativos, no se observó la formación cristales. Esto podría deberse a que la barrera de gel fue tan pequeña que el proceso de contradifusión se llevó a cabo rápidamente, por lo que la proteína pudo haber precipitado en las mallas del gel.

- Acupuntura en gel

En uno de los capilares insertados en gel, el de 0.5 mm de diámetro, se formó un cristal de muy mala calidad, con estrías, además la solución de MPD adquirió un color amarillento que al parecer se debió a la disolución del hule empleado para sellar la cámara, de manera que las condiciones de cristalización se vieron afectadas.

En los otros capilares no se observó nada.

- Recipiente con micropuentes

En la prueba del dispositivo con micropuentes se estudió el efecto de la concentración de proteína bajo las mismas condiciones en las que se observó el crecimiento de monocristales, esto es con regulador Tris-HCl 40 mM pH7.1 con MPD al 60 %. Se vio que a mayor concentración de proteína mayor rapidez en el crecimiento de los cristales. En la gota con concentración de 22 mg/ml se formaron agregados cristalinos y en la gota con 8 mg/ml se formó un monocristal después de tres días. En las otras gotas no se observó nada hasta que se hizo microsebrado.

- Microsebrado

Después de realizar el microsebrado en el carril A de las pruebas de gota asentada, se formaron varios cristales (agregados cristalinos y esférulos) en todas las pruebas excepto cuando se usó yodoheveína, la cual no se logró cristalizar en las condiciones descritas.

En el experimento de concentración con micropuentes se obtuvo un monocristal en una de las gotas con heveína en 5 mg/ml y dos cristales en una de las gotas con proteína en 2.75 mg/ml y en las demás gotas se obtuvieron policristales.

- Macrosebrado

El cristal que se usó para el macrosembrado obtenido en las pruebas de difusión en gota asentada no creció, pero crecieron varios cristales muy pequeños en la gota.

5.6 Difracción de rayos X

Caracterización del cristal de heveína

El cristal de heveína que se obtuvo en el experimento de difusión en gota asentada se utilizó para estudios de difracción de rayos-X, las dimensiones aproximadas del mismo eran de 0.7x0.4x0.08 mm. Se determinó que es ortorrómbico y pertenece al grupo espacial $P2_12_12$, con dimensiones de la celda unitaria y los ángulos de $a=31.77 \text{ \AA}$, $b=60.06 \text{ \AA}$, $c=22.09 \text{ \AA}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$ y $\gamma=90^\circ$ y difractó a una resolución de 1.6 \AA . Este cristal fue utilizado para coleccionar datos de difracción de rayos X para determinación de la estructura a dicha resolución. Es interesante mencionar que este cristal pertenece a un grupo espacial diferente al del cristal a partir del cual se obtuvo la estructura a 2.8 \AA .

5.7 Análisis estructural de proteínas alergenas

Como ya se mencionó al principio de este trabajo, en los últimos años se han incrementado los casos reportados de alergias al látex, así como a otras otras proteínas de polen de plantas, de frutas, de insectos, etc. Debido a esto, los estudios sobre alergenos se han incrementado permitiendo recabar mayor información sobre ellos. Hasta el momento solo se encuentran reportadas unas cinco estructuras tridimensionales de proteínas alergenas, las cuales pertenecen al grupo de alergenos del tipo de inhalación.

Las proteínas alergenas del látex pertenecen al tipo de contacto y sólo del principal alergeno hev b 6.02 (heveína), se tiene la estructura tridimensional a una resolución media.

En los estudios inmunológicos que se han realizado con estas proteínas se ha observado un fenómeno conocido como reactividad cruzada. Esto se refiere a que anticuerpos o receptores de células T para un alergeno pueden reconocer alergenos de otras fuentes con epítomos similares, lo que indica que dichos alergenos comparten de alguna manera epítomos de IgE o de células T. En el caso del látex se ha visto que existe reactividad cruzada con maleza, heno, artemisa, ambrosía, papa, kiwi, aguacate, etc. ^{33, 34}, lo que podría considerarse como un indicio de que comparten algún epítomo. Aunado a esto, se

ha observado que muchas de las proteínas alergenas, independientemente de la fuente, pertenecen al grupo de las proteínas PR (por sus siglas en inglés que se refieren a Pathogen Related), teniendo alguna función en el mecanismo de defensa del organismo.^{34, 35}

En este trabajo se realizó un análisis de las estructuras tridimensionales de alérgenos reportadas hasta el momento y se compararon con la heveína. En la tabla 6 se presentan las proteínas alergenas de las cuales se han reportado sus estructuras primarias y terciarias, así como algunas de sus características.

Primero se llevó a cabo una búsqueda de regiones que tuvieran alguna homología a nivel de estructura primaria, centrándonos en las regiones correspondientes a los epítomos (regiones de la proteína reconocidas por un anticuerpo). En este caso no es posible hacer un alineamiento sobre toda la secuencia ya que se trata de proteínas de mayor peso molecular a la heveína por lo que no sería válido.

Centrándonos en las regiones que contenían epítomos se determinó que existen regiones pequeñas entre las proteínas alergenas y la Hev b 6.02 con cierta homología. El mayor porcentaje de homología se observó entre la profilina del polen de abedul, y la heveína. Como ya se mencionó, dicha homología es en la región de los epítomos en las dos proteínas.

Analizando estas observaciones sobre las estructuras primarias nos podemos dar cuenta que dichas proteínas, a excepción de la profilina, no comparten epítomos continuos o lineales, que son aquellos que se componen de un segmento continuo de la cadena polipeptídica. Sin embargo, existe otro tipo de epítomos conocidos como conformacionales o discontinuos, en donde el sitio está compuesto por segmentos de la proteína que son discontinuos, en la estructura primaria, pero que se encuentran cercanos en la estructura tridimensional debido al plegamiento de la proteína ³⁶. Los anticuerpos producidos para una proteína nativa, generalmente reconocen epítomos discontinuos pero también pueden reconocer fragmentos peptídicos de esta. Los anticuerpos producidos para fragmentos peptídicos rara vez reconocen a la proteína nativa.

Por tales motivos también se llevó a cabo un análisis estructural para ver si existía algún epítomo discontinuo compartido por estas proteínas y lo que se observó fue que todas estas tienen algunos residuos aromáticos expuestos en la superficie, formando una pequeña protuberancia. Es importante mencionar que dichos aminoácidos forman parte de epítomos determinados experimentalmente. En el caso de la Hev b 6.02, la profilina y el alérgeno Der f 2 se utilizaron péptidos sintéticos y se probaron con suero de personas

alérgicas conteniendo IgE ^{35, 38 y 39}. Para la determinación de los epítomos del alérgeno Bet v 1 ⁴⁰ se hicieron experimentos de proliferación de células T. En la tabla 7 se muestran los residuos correspondientes a los epítomos lineales así como los residuos aromáticos que forman la protuberancia, la cual se puede observar claramente en color verde en las Figuras 11A, 11B, 11C y 11D.

Tabla 7. Epítomos de las proteínas alérgicas cuya estructura tridimensional ya ha sido reportada.

Proteína	Fuente	Epítomos	Residuos aromáticos formando una protuberancia
Hev b 6.02 ³⁵	Látex (<i>Hevea brasiliensis</i>)	13 24 PNNLCCSQWGW 29 36 EYCSPDHN	21 23 30 W, W, Y
Phl p 2 ³⁷	Heno (<i>Phleum pratense</i>)	-----	6 23 68 78 F, Y, F, F
profilina ³⁸	Polen de abedul	2 20 SWQTYVEHMLDIDGQGE 28 47 VGHDGSVWAQSSFFQFKPQ 108 133 TEEPVTPGQCNMVVERLGDYLIDQGL	3 6 127 W, Y, Y
Der f 2 ³⁹	Acaro del polvo (<i>Dermatofagoides farinae</i>)	7 10 15 D N K 73 75 77 78 C F K C	75 F
Bet v 1 ⁴⁰	Pólen (<i>Betula verrucosa</i>)	Toda excepto los residuos 48-59	150 158 Y, Y

Con estos resultados se podría pensar que esta región rica en aromáticos y expuesta al disolvente, aunque es similar pero no idéntica, es un epítipo discontinuo gracias al cual se presenta el fenómeno de reactividad cruzada.

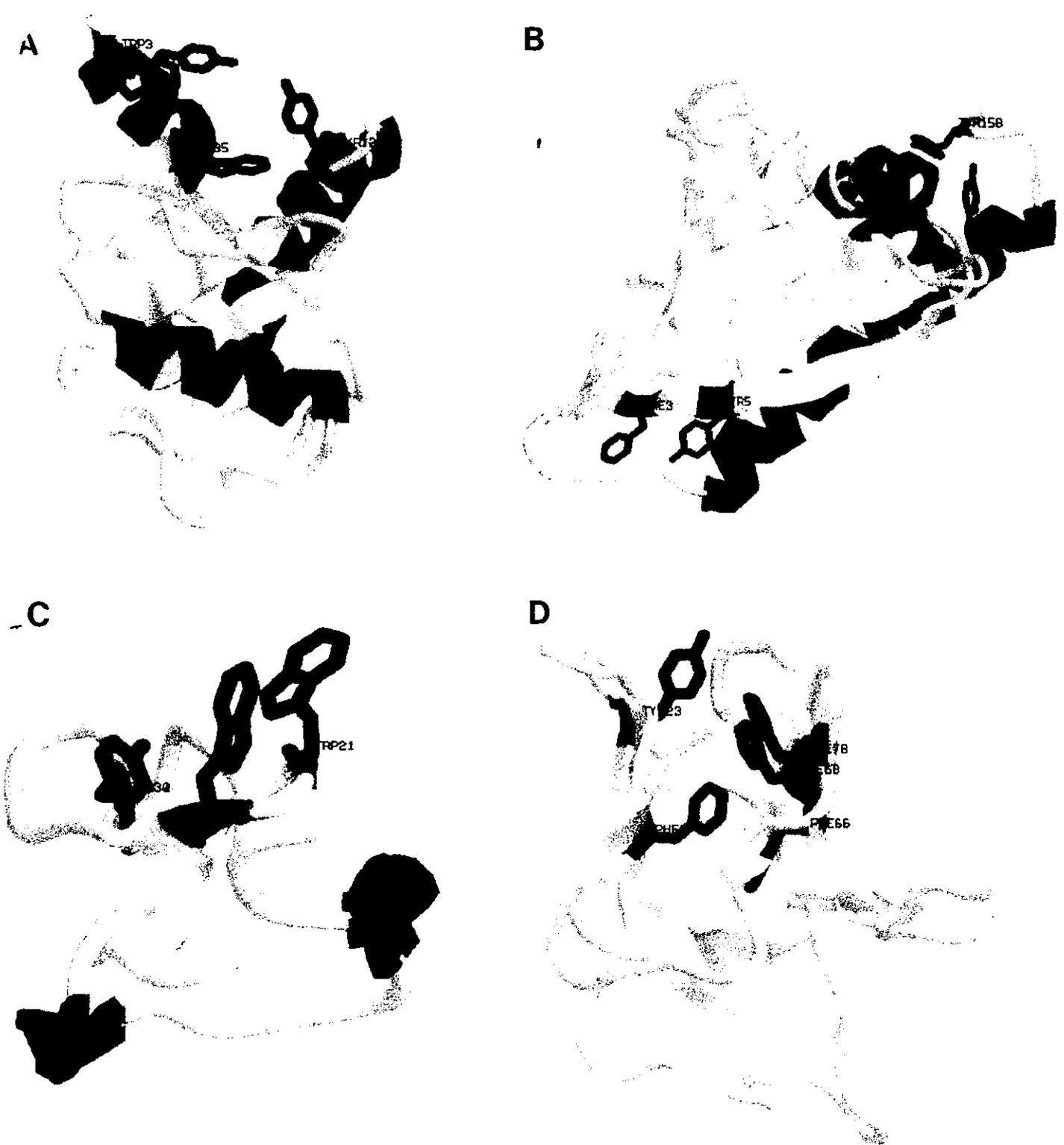


Figura 11. Estructuras tridimensionales de: proteína alergena del polen de abedul (profilina), A; proteína alergena del polen de *Betula verrucosa* (Bet v 1), B; proteína alergena del látex de *Hevea brasiliensis* (heveína), C y proteína alergena del heno de *Phelum pratense* (Phl p 2), D. Las α hélices se muestran en azul, las hojas β en naranja, los giros en rojo y los residuos aromáticos que forman parte de epítopos y se encuentran expuestos en la superficie, en verde.

Conclusiones

Se purificaron tres proteínas ácidas del látex de *Hevea brasiliensis*, la heveína y otras dos proteínas, a las cuales se les determinó peso molecular y punto isoeléctrico. Es necesario continuar con su caracterización, realizar pruebas de hipersensibilidad para saber si son alergenas y de cristalización para obtener su estructura tridimensional.

También se identificaron las fracciones con actividad de quitinasa, ya que se ha visto que hay proteínas alergenas de frutas como kiwi, aguacate y plátano con dicha actividad que presentan reactividad cruzada con las proteínas del látex. Esto nos sugiere que dichas proteínas comparten algún epítipo, de manera que sería sumamente interesante purificar a las proteínas del látex con esta actividad, determinar si son alergenas y realizar estudios estructurales para analizar los posibles epítipos así como buscar la presencia de dominios de heveína (algunas de las proteínas alergenas de frutas con actividad de quitinasa presentan dominios de heveína, por ejemplo la endoquitinasa del aguacate con peso molecular de 30,000 ⁴²).

La heveína se empleó en diversos experimentos de cristalización ya que se buscaba obtener cristales de buena calidad que permitieran obtener una estructura a una mayor resolución que la reportada anteriormente. De esta manera sería posible determinar con mayor precisión la conformación de los residuos expuestos al disolvente, así como también las moléculas de disolvente involucradas en el sitio de reconocimiento de carbohidratos y posible epítipo.

Encontramos que el método de difusión de vapor en gota asentada, utilizando como agente precipitante el MPD al 60% en Tris-HCl 40 mM, pH7.1, fue el mejor para la obtención de monocristales de heveína que difractaran a una resolución de 1.49 Å. Se colectó una serie de datos con un ánodo rotatorio a -160°C. Utilizando los otros métodos también se obtuvieron cristales, sin embargo la calidad no fue la adecuada para estudios cristalográficos.

En el experimento donde se probaron varias concentraciones de proteína se vio que está fue determinante en el crecimiento de los cristales, siendo la más adecuada la de 10 mg/ml, ya que en el caso de concentraciones mayores se tienen agregados tal como se pudo apreciar en el experimento de dispersión dinámica de luz. Por lo tanto, posiblemente a dichas concentraciones se requiere de condiciones de cristalización diferentes para la formación de monocristales. En el caso de concentraciones menores

se vio que no hubo formación de cristales, lo que nos indica que estas condiciones no son suficientes para alcanzar la sobresaturación e iniciar el proceso de cristalización sino que es necesario hacer algún tipo de sembrado para obtener los cristales de núcleos preformados.

La caracterización del cristal a partir del cual se obtuvieron los datos de difracción indica que en estas condiciones la morfología del cristal, el grupo espacial y las dimensiones de la celda son diferentes de los cristales empleados para la determinación de la estructura tridimensional de la heveína a 2.8 Å.

Por otra parte, al realizar el análisis estructural de los alérgenos reportados se observó, que todos ellos presentan una zona de residuos aromáticos expuestos al disolvente y cercanos entre si, a pesar de estar separados en la estructura primaria. Es interesante notar que dichos residuos son parte de los epítomos de estas moléculas. Por tanto, es posible sugerir que en la reacción alérgica podría estar involucrado este epítomo conformacional, que es compartido por estos alérgenos a pesar de ser moléculas muy diferentes en cuanto a tamaño, secuencia de aminoácidos y estructura. Otro aspecto importante que podría apoyar esta hipótesis es el fenómeno de reactividad cruzada, en el cual se ha determinado que un alérgeno puede ocasionar una reacción de hipersensibilidad en un paciente alérgico a otra proteína. Como ya se mencionó, se han reportado casos de reactividad cruzada con aguacate, kiwi, plátano. Posiblemente estas frutas contengan alérgenos con dominios de heveína o presenten un epítomo conformacional como el propuesto en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Moran L. A., Scrimgeour K. G. *Biochemistry*. 2a ed, Prentice Hall.
2. Landwehr P. L., Boguniewicz M.. *J.Pediatr.* 1996; 128:305-12.
3. Walls S. R. *M. J. A.* 1996; 164: 707.
4. Slater E. J. *New Engl. J. Med.* 1989; 320: 1126-1130.
5. Alenius H., Reunala T., Turjanmaa K., Palosuo T. *Allergy Proc.* 1992; 2: 75-77.
6. Alenius H., Turjanmaa K., Palosuo T., Mäkinen-Kiljunen S., Reunala T.. *Int. Arch Allergy and Applied Immunology.* 1991; 96: 376-380.
7. Tomazic J. V., Withrow J. T., Fisher R. B., Dillard F S. *Clinical Immunology and Immunopathology.* 1992; 64: 89-97.
8. Fisher R. B., Tomazic J. V., Withrow J. T. and Matesic E. L. *Clinical Materials.* 1993; 14: 199-205.
9. Siler J. D., Cornish K.. *Industrial Crops and Products.* 1994; 2: 307-313.
10. Wilkinson S. M., Beck M. H. *Brit J. Dermatol.* 1996; 134: 910-914.
11. Alenius H., Kalkkinen N., Reunala T., Turjanmaa K., Palosuo T. *J. Immunol.* 1996; 156: 1618-1625.
12. Akasawa A., Hsich L., Martin M. B., Liu T., Lin Y. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 25389-25393.
13. Slater E. J., Vedvick T., Arthur-Smith A., Trybal E. D., Kekwick G. O. R. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 25394-25399.
14. Archer B. L. *Biochem. J.* 1960; 75: 236
15. Rodríguez A., Tablero M., Barragán B., Lara P., Rangel M., Arreguín B., Possani L. and Soriano-García M. *J Cryst. Growth.* 1986; 76: 710-714.
16. Parijs V. J., Broekaert F. W., Goldstein J. I., Feumans J.W. *Planta.* 1991; 183: 258-264.
17. Gidrol X., Chrestin H., Tan H., Kush A. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 9278-9283.
18. Rodríguez-Romero A., Ravichandran K.G. and Soriano-García M. *FEBS Letters.* 1991, 291: 307-309.
19. Rodríguez-Romero A., Arreguín B., Hernández-Arana A.. *Biochim. Biophys. Acta.* 1989, 998: 21-24.
20. Asensio J. L., Cañada F. J., Bruix M., Rodríguez-Romero A., Jiménez-Barbero J. *Eur. J. Biochem.* 1995, 230: 621-633.

21. Baldo A. B. *Current Opinion In Immunology*. 1991; 3: 841-850.
22. Colowick P. S., Kaplan O. N. *Methods in Enzymology. Enzyme Purification and Related Techniques*, Vol. XXII Academic Press, 1971.
23. Manual de Pharmacia Fine Chemicals. *Ion Exchange Chromatography. Principles and Methods*.
24. Jekel A., Hartman H. B. *J. Biochem.* 1991; 200:123-130.
25. Dyer R. J. *Applications of Absorption Spectroscopy of Organic Compounds*. Prentice-Hall, 1965.
26. Deutscher P. M. *Methods in Enzymology. Guide to Protein Purification*. Academic Press, 1990.
27. Ferré-D'Amaré R. A., Burley K. S.. *Structure*. 1994; 2: 357-359.
28. Manual del equipo de electroforésis Phast System
29. McCloskey A. J. *Meth. in Enzimol. Mass Spectrometry*. Academic Press. 1990, 193: 412-423.
30. Ducruix A., Giegé R. *Crystalization of Nucleic Acids and Proteins. A practical Approach*. IRL Press. New York, 1992.
31. García-Ruiz J.M., Moreno A., Otálora F., Rondón D. *J. Chem. Educ.* 1998, 75: 442-446.
32. Stura A. E., Wilson A. I. *Analytical and production seeding techniques. Methods: A companion to Methods in Enzymology*. Vol. I, No. 1, August, pp 38-49, 1990.
33. Fuchs T., Spitzauer S., Vente C., Hevler J., Kapiotis S., Rumpold H., Kraft D., Valenta R. *J. Allergy Clin. Immun.* 1997;100:356-364.
34. Yayami T., Sato M., Nakamura A., Komiyama T., Kitagawa K., Akasawa A., Ikezawa Z. *Clin. Immun.* 1998;101:379-385.
35. Beezhold D.H., Kostyal D.A., Sussman G. L. *Clin. Exp. Immunol.* 1997;108:114-121.
36. Janeway A. C., Travers F. *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease*. 2a ed, Garland Publishing, 1996.
37. Dolecek C., Vertala S., Laffer S., Steinberger P., Kraft D., Scheiner O., Valenta R. *FEBS Letters*. 1993;335:299-304.
38. Fedorov A. A., Ball T., Mahoney M. N., Valenta R., Almo C. S. *Structure*. 1997; 5:33-45.
39. Ichikawa S., Hatanaka H., Yuuki T., Iwamoto N., Kojima S., Nishiyama C., Ogura K., Okumura Y., Inagaki F. *J. Biol. Chem.* 1998;275:356-360.

40. Gajhede M., Osmark P., Poulsen M. F., Ipsen H., Larsen N. J., Joost van Neerven R. J., Schou C., Löwenstein H., Spangfort D. M. *Nature Struct. Biol.* 1996;3:1040-1045.
41. Terwisscha van Scheltinga A. C., Henning M., Dijkstra B. W. *J. Mol. Biol.* 1996; 262: 243-257.
42. Chen Z., Posch A., Cremer R., Raulf-Heimsoth M., Baur X. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998; 102:476-81.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA