

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

**¿ES ShPI-I UN BUEN INHIBIDOR DE
PROTEASAS ASPÁRTICAS?**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

NOMBRE DEL ALUMNO

ALFONSO LABRA NUÑEZ

TUTOR:
Dr. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA

2007





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.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno Labra Núñez Alfonso 01 (55) 5557 4924 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 097115975</p>
<p>2. Datos del tutor Grado Apellido paterno Apellido materno Nombre</p>	<p>2. Datos del tutor Dr. Rudiño Piñera Enrique</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado Apellido paterno Apellido materno Nombre</p>	<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Aguilar Aguilar Rogelio</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado Apellido paterno Apellido materno Nombre</p>	<p>4. Datos del sinodal 2 M. en C. Contreras Medina Raúl</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado Apellido paterno Apellido materno Nombres</p>	<p>5. Datos del sinodal 3 M. en C. Villela González María Alicia</p>
<p>6. Datos del sinodal 3 Grado Apellido paterno Apellido materno Nombre</p>	<p>6. Datos del sinodal 4 M. en C. Alcántara Sánchez Felipe</p>
<p>7. Datos de la tesis Título No. de páginas Año</p>	<p>7. Datos de la tesis ¿Es ShPI-I un buen inhibidor de proteasas aspárticas? 66 p. 2007</p>

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco:

A mis papás por el apoyo económico y moral,

A mis profesores, que sin duda alguna todos influyeron en mi formación académica,

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de cursar un bachillerato y una licenciatura de excelente calidad,

A mis compañeros y amigos por las muy gratas experiencias compartidas,

Al Dr. Eduardo Horjales por aceptarme como parte de su grupo,

Al Dr. Enrique Rudiño por su oportuna dirección,

A Sonia Rojas por su paciencia,

Al grupo de la Universidad de la Habana por proporcionar el inhibidor,

A los compañeros del laboratorio por la convivencia diaria,

A mi hermano por el tiempo de Internet donado para la fundamentación de éste trabajo,

A los sinodales por sus observaciones hechas a este trabajo,

A la DGAPA y al IBT-UNAM por la beca otorgada.

DEDICATORIA.

Dedico este trabajo:

A mi familia,

A mis abuelitos,

A mis papás,

A mi hermano,

A mis tíos,

A mis primos,

A mis sobrinos,

A mis amigos,

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM,

Al grupo de Cristalografía de proteínas del Instituto de Biotecnología de la UNAM,

Al Dr. Eduardo Horjales,

Al Dr. Enrique Rudiño,

A todos mis profesores.

ÍNDICE.....	5
1.0 RESUMEN.....	7
2.0 INTRODUCCIÓN.....	8
2.1 La conformación de las proteínas es indicativa de su función.....	8
2.2 Las enzimas favorecen reacciones no espontáneas.....	9
2.3 Aspectos teóricos y mecanismos propuestos para las enzimas.....	9
2.4 Modelo de Michaelis-Menten.....	10
2.5 Las enzimas son catalizadores biológicos.....	12
2.6 La actividad de la enzima es abatida por inhibidores.....	14
2.7 Inhibidores reversibles e irreversibles.....	15
2.8 Inhibidores competitivos, no competitivos e incompetitivos.....	15
2.9 Formas de estudiar la inhibición enzimática.....	16
2.10 Clasificación de las enzimas.....	17
2.11 Regulación de la actividad de las proteínas.....	17
2.12 Las hidrolasas son las enzimas clave del catabolismo.....	19
2.13 Las proteasas rompen proteínas en péptidos más pequeños.....	19
2.14 Proteasas: superfamilias basadas en la estructura del sitio activo.....	20
2.15 Homología y propiedades catalíticas muy similares en proteasas aspárticas.....	21
2.16 La pepsina es el prototipo de una proteasa aspártica.....	23
2.17 La pepsina es activa en un medio donde otras proteínas no lo son.....	24
2.18 Estudios y caracterización de pepsina de cerdo.....	25
3.0 ANTECEDENTES.....	26
3.1 Inhibidores conocidos de pepsina.....	27
4.0 OBJETIVO GENERAL.....	29
5.0 OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
6.0 HIPÓTESIS.....	31
7.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	32

7.1 Cromatografía de proteínas por tamiz molecular.....	33
7.2 Electroforesis en gel desnaturalizante SDS- PAGE.....	34
7.3 Ensayos de actividad enzimática.....	39
7.3.1 Reactivos.....	40
7.3.2 Procedimiento.....	41
7.4 Resonancia superficial de plasmones (SPR).....	43
7.4.1 Pruebas de pre-concentración.....	45
7.4.2 Inmovilización de ShPI-I.....	46
8.0 RESULTADOS.....	48
8.1 Cromatografía de proteínas de tamiz molecular.....	48
8.2 Electroforesis en gel desnaturalizante SDS- PAGE.....	50
8.3 Ensayos de actividad enzimática.....	53
8.4 Resonancia superficial de plasmones (SPR).....	54
9.0 CONCLUSIONES.....	56
9.1 Cromatografía de proteínas de tamiz molecular.....	56
9.2 Electroforesis en gel desnaturalizante SDS- PAGE.....	57
9.3 Ensayos de actividad enzimática.....	57
9.4 Resonancia superficial de plasmones (SPR).....	58
9.4.1 Estimación de la constante de inhibición del complejo pepsina-ShPI-I en el experimento de resonancia superficial de plasmones (SPR).....	59
10.0 CONCLUSIONES GENERALES.....	60
11.0 BIBLIOGRAFÍA.....	62

1.0 RESUMEN.

ShPI-I es un inhibidor protéico de proteasas de espectro amplio, purificado a partir de la anémona *Stichodactyla helianthus* (Stichodactylidae). Los antecedentes sugieren la posible inhibición específica sobre proteasas aspárticas. Para corroborar ésta inhibición, se realizaron experimentos utilizando diversos métodos (Cromatografía de tamaño molecular, Resonancia superficial de plasmones, actividad enzimática) tomando como modelo a la pepsina de cerdo (*Sus scrofa*) comercial. Se estudió el comportamiento cromatográfico de pepsina, de ShPI-I y del complejo formado según cambia el pH. Se hicieron electroforesis en gel de pepsina en distintas condiciones de pH, observándose las digestiones de pepsina por actividad autoproteolítica. Se realizaron ensayos de actividad de pepsina a condiciones óptimas (pH 2 y 37 °C) y a condiciones distintas de pH usando como sustrato albúmina bovina, con lo que se caracterizó la actividad de pepsina al cambiar el pH. Así como, la recuperación de la actividad al pasar de condiciones no óptimas de pH a la óptima. Se hicieron experimentos de inhibición de ShPI-I sobre la actividad de pepsina en condiciones óptimas. Se realizaron experimentos de resonancia superficial de plasmones (SPR, por sus siglas en inglés), con ShPI-I inmovilizado y pepsina en fase móvil en pH 3. Se concluye que ShPI-I no es un buen inhibidor de pepsina y por extrapolación tal vez de ninguna otra proteasa aspártica.

2.0 INTRODUCCIÓN.

2.1 La conformación de las proteínas es indicativa de su función.

Las proteínas se pueden clasificar por su estructura tridimensional, o conformación en dos grandes grupos: proteínas fibrosas y proteínas globulares. Las proteínas fibrosas son altamente resistentes al corte y a los factores desnaturizantes, por lo que son los principales constituyentes estructurales de soporte de los tejidos, insolubles en medio acuoso, constituidas por largas secciones de hojas beta o alfa hélices formando secciones alineadas y, en ocasiones, paralelas entre sí, unidos a su vez por medio de asas (“*loops*”) o vueltas. Ejemplos de proteínas fibrosas son la colágena y la elastina, presentes en la matriz extracelular (ver Fig. 1). En cambio, las proteínas globulares tienen una forma globular, lo que le aporta a ésta estructura mucha movilidad, rotación y un grado de flexibilidad mayor que el de las proteínas fibrosas para participar en las reacciones metabólicas. La mayoría de éstas proteínas son solubles en medio acuoso y muchas veces llevan a cabo funciones de transporte, las enzimas tienden a ser proteínas globulares (Alberts *et al.*, 2002) (ver Fig. 2).

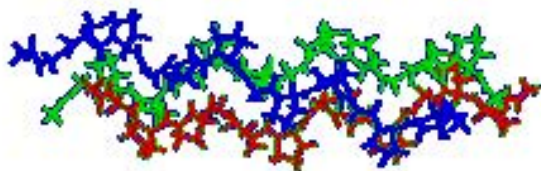


Fig. 1 Modelo teórico de la estructura de la colágena (código PDB 1BBE), que es una familia de proteínas con representantes en distintos órganos en todo el reino animal, como ejemplo de las proteínas fibrosas. Consiste de tres hebras

paralelas de cuatro series de los residuos Gly-Pro-Pro, lo que le aporta un grado de rigidez, su función principal es la de soporte de los tejidos. Tomada de: <http://chemistry.gsu.edu/glactone/PDB/Proteins/Classic/1bbe.html>.



Fig. 2 Estructura de una enzima (código E.C 3.2.1.17), la lisozima (código PDB 132L), de la clara de huevo de gallina (*Gallus gallus*), como ejemplo de las proteínas globulares. Se compone de tres hojas beta y tres alfa hélices,

conectadas por *asas* y vueltas. Tomada de: <http://chemistry.gsu.edu/glactone/PDB/Proteins/Classic/132l.html>.

2.2 Las enzimas favorecen reacciones no espontáneas.

Una enzima es una proteína que favorece una reacción que no sucede de forma espontánea en el contexto bioquímico, al menos no en un marco de tiempo corto y

acorde con los tiempos de las reacciones celulares, por lo que tiene un carácter catalizador¹. Actualmente hay toda una industria en expansión relacionada con las enzimas. Por convención, a la mayoría de las enzimas se les nombra con el sufijo –asa (con excepción de pepsina, tripsina, papaína, trombina, ya que fueron descubiertas antes de que se estableciera la convención para las nomenclatura de las enzimas). Las enzimas producen, modifican o rompen enlaces químicos. Diversos experimentos han sido realizados para explicar la forma en la que actúan estas moléculas.

2.3 Aspectos teóricos y mecanismos propuestos para las enzimas.

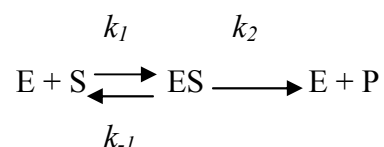
Las enzimas actúan en casi todas las reacciones metabólicas, por lo que es crucial entender su función particular para comprender como funciona el metabolismo. La proximidad y la orientación hacia el sustrato, tienen el efecto de aumentar la eficiencia. El modelo de catálisis covalente propone la transferencia de cargas y de grupos de un sustrato a otro en reacciones consecutivas. El modelo de catálisis ácido-base, también propuesto para reacciones no enzimáticas, toma en cuenta que las reacciones son influenciadas por cambios de pH, en donde la transferencia de protones facilitada en un medio reticulado de puentes de hidrógeno y los efectos de grupos vecinos intervienen para favorecer la formación y/o ruptura de enlaces, llegando a hacerlos más estables. La energía libre electrostática tiene efectos sobre las energías libres catalítica y de unión, debidos a las interacciones electrostáticas entre el medio acuoso y la enzima, apoyando la idea de que el cambio de cargas del sistema de reacción es el factor clave en la catálisis enzimática. El mecanismo de ajuste inducido supone que la enzima no presenta la estructura precisa para la unión al sustrato, por lo que es necesario un reacomodo de los aminoácidos del sitio activo durante la unión de los dos elementos, incrementado así la concentración del sustrato y aumentando la velocidad de reacción. La especificidad por el sustrato puede ser explicada si se considera que el sustrato carece de grupos que tengan complementariedad con el sitio activo de la enzima, no presenta el arreglo necesario para que se lleve a cabo la unión, o bien, un sustrato puede unirse en una posición incorrecta, afectando así la velocidad de la catálisis, por lo que a este tipo de unión se le conoce como no productiva. El modelo electro-mecano-químico considera

¹ Se ha demostrado *in vitro* que las moléculas de ARN intengradas en los ribosomas, tienen tanto propiedades de portador de información para la síntesis de proteínas, como de catalizadores autorreplicantes, es decir, con función de enzimas de polimerización de ARN, a las que se les conoce como ribozimas. lo que apoya la teoría de un mundo de ARN (Alberts *et al.*, 2002), por lo que también se les considera enzimas, si bien no son proteínas.

que el movimiento oscilatorio de la proteína por el bombardeo de partículas de soluto/solvente genera una estabilización conformacional en que el sustrato (unido al sitio activo) es sujeto a un campo eléctrico altamente localizado que polariza uno o varios enlaces clave cuya desestabilización es crítica para la catálisis (Kuby, 1990). Si bien hay modelos de efectos de la temperatura sobre la catálisis clásica, no pueden ser aplicados de forma íntegra a las enzimas, en cambio, se sabe que ciertos agentes estresantes, como la temperatura, el pH y la fuerza iónica provocan la eventual pérdida del plegamiento nativo por ruptura de los enlaces intramoleculares, a lo que se le llama desnaturalización, y a la recuperación del plegamiento nativo se le llama re-naturalización, que se da en condiciones especiales, por lo que es muy importante para la célula conservar el plegamiento nativo de las proteínas para que sean funcionales, incluyendo a las enzimas, por lo que cada enzima tiene intervalos de temperatura, pH y fuerza iónica en que tiene una actividad óptima.

2.4 Modelo de Michaelis-Menten.

El modelo de Michaelis-Menten describe la acción enzimática: la enzima (E) se une al sustrato (S) y forma un complejo enzima-sustrato (ES), el complejo se deshace y la enzima libera al o los productos formados (P). Hay modelos de acción enzimática con dos sustratos y un producto, con dos productos y dos sustratos y multi-sustrato (Kuby, 1990). Medidas de la cinética enzimática son la K_M , que representa la afinidad de una enzima por su sustrato y la V_{max} , que representa la velocidad de reacción máxima a concentraciones saturantes de sustrato (Berg *et al.*, 2002) (ver Fig. 3):



La tasa de formación del producto es dada por la ecuación:

$$V_0 = k_2 [E]_T \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

$[E]_T$ representa la concentración de enzima total, ya sea en complejo o libre.

La V_{max} es comprendida cuando los sitios catalíticos de la enzima están saturados con sustrato, así $[ES] = [E]_T$. Así,

$V_{\max} = k_2 [E]_T$, por lo que:

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

En donde la constante, K_M equivale a la expresión:

$$K_M \cong k_{-1} + k_2/k_1$$

$$K_d = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

K_d equivale a la constante de disociación del complejo enzima-sustrato, que puede interpretarse como la concentración a la que la mitad de los sitios están ocupados. Entre más pequeño sea este valor, indicará una afinidad mayor, y equivale a K_M si la k_{-1} es mucho mayor que k_2 .

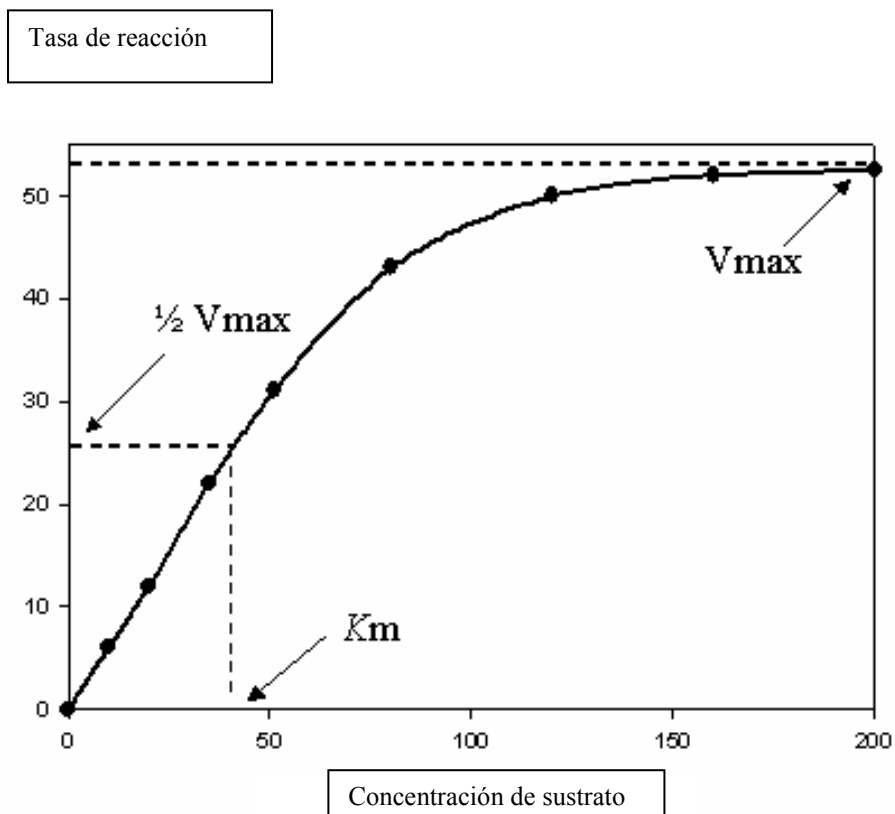


Fig. 3 Comportamiento de una reacción enzimática típica. La reacción enzimática con bajas concentraciones de sustrato muestra una relación directamente proporcional a la tasa de reacción y llega a una asíntota cuando la concentración del sustrato es saturante, el valor de la tasa de reacción en éste punto corresponde a la V_{\max} . El valor $1/2$ de la V_{\max} se intersecta con el valor de la K_m . Tomada y modificada de:

http://en.wikipedia.org/wiki/Image:MM_curve.png.

2.5 Las enzimas son catalizadores biológicos.

La clave de la eficiencia de la enzima es que acelera la velocidad de reacciones al disminuir la energía libre de activación, que es una cantidad de energía mayor que un cierto valor mínimo propio para cada molécula, y es un factor de gran importancia para determinar la velocidad de reacción. El estado de transición, que puede ser el sustrato con un cambio conformacional, tiene una energía libre más alta que el sustrato y el producto, y la diferencia de energía libre entre el sustrato y el estado de transición es la energía libre de activación de la reacción enzimática. La enzima logra disminuir la energía de activación teniendo una unión fuerte con el sustrato, en donde el sitio activo provee de ambientes electrónicos dinámicos, incrementando la probabilidad de que el estado de transición sea formado (Schram, 2005), tornándolo inestable y más susceptible de manipular, permitiendo la catálisis al promover la formación o ruptura de los enlaces (Ma *et al.*, 2000) (ver Fig. 4). Cuando los productos de reacción se forman, se regenera la enzima en el estado libre. La esencia de la catálisis es la unión específica del estado de transición, por lo que requiere que el sustrato se acople de forma perfecta al sitio activo (ver Fig. 5), evitando así que la enzima participe en reacciones erróneas (Berg *et al.*, 2002). Las enzimas comparten con todos los catalizadores las siguientes características:

1. Son efectivas en concentraciones bajas.
2. Conservan su estructura tridimensional global al no sufrir modificaciones químicas irreversibles.
3. No afectan el estado de equilibrio de la reacción catalizada, sólo que se llega al equilibrio mucho más rápido.

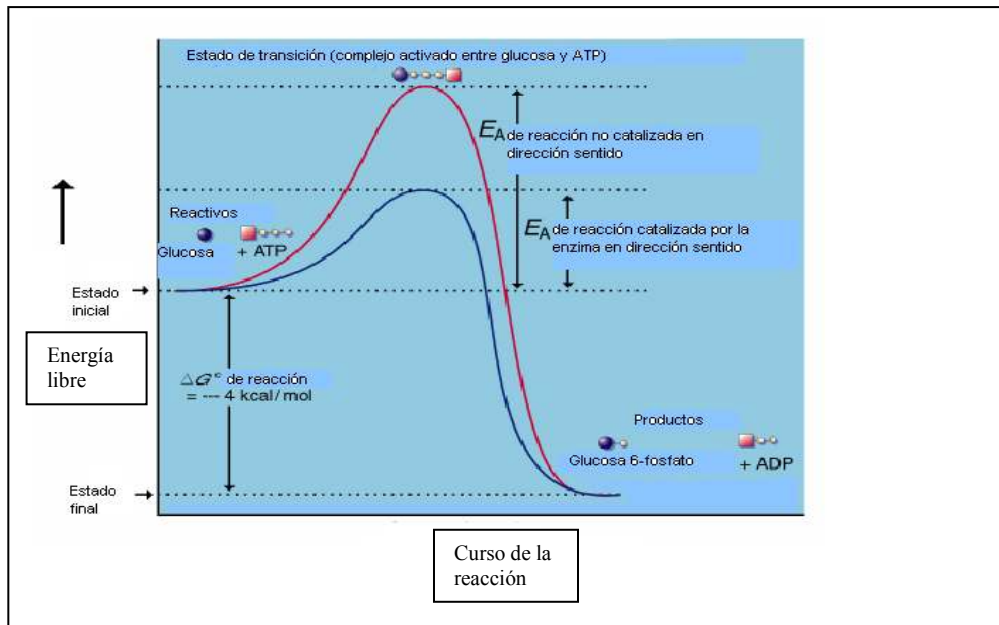


Fig. 4 Ejemplo de un diagrama de energía libre de una reacción enzimática. En éste caso, la enzima es la glucosa 6-fosfato y los sustratos son glucosa y ATP, mostrando en el eje X, el curso de la reacción, y en el eje Y, la energía libre. Cuando la enzima está presente, la energía libre del estado de transición, a la que se le conoce como energía de activación, es menor, que es la propiedad clave en la catálisis. Tomada y modificada de: http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255enz/activation_energy%20.jpg.

2.6 La actividad de la enzima es abatida por inhibidores.

La catálisis puede ser inhibida por moléculas más pequeñas que la enzima en cuestión. Este tipo de inhibición se presenta principalmente en enzimas no alostéricas, si bien esto no es razón para que las enzimas alostéricas sean inhibidas por otros tipos de moléculas llamadas represores o inhibidores (Berg *et al.*, 2002). La clave de la inhibición es estabilizar al complejo enzima-inhibidor, por una interacción específica relativamente fuerte (ver Fig. 5). Los inhibidores pueden ser encontrados naturalmente dentro de organismos que deben controlar la actividad de enzimas en los tiempos y lugares adecuados en cuanto es necesaria, como es el caso de las metaloproteasas y sus inhibidores, que participan en el desarrollo de vertebrados, o en la interacción entre venenos de animales ponzoñosos y la producción natural de anticuerpos por sus presas, lo que hace notar el carácter coevolutivo. Además, los inhibidores con función de medicamentos son desarrollados por la investigación científica en apoyo del tratamiento de enfermedades. Por lo que la variedad de inhibidores es muy amplia, ya sea de los que existen en la naturaleza o de los sintetizados en laboratorio.

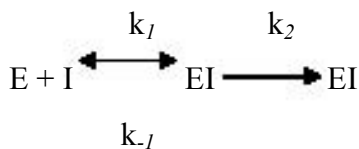


Fig. 5 Modelo de la formación de los complejos enzima-sustrato, en la reacción (a), y enzima-inhibidor en la inhibición (b). La enzima en estado nativo conserva la estructura del sitio activo, que permite la unión específica del sitio activo con el sustrato para promover la reacción y la formación de los productos. La conformación nativa de la enzima es

alterada por la presencia del inhibidor, y aunque el sustrato aún puede unirse a la enzima, la afinidad por éste al sitio activo es reducida, abatiendo la actividad. Tomada y modificada de: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/6/67/Non-competitive_inhibition.jpg/400px-/Non-competitive_inhibition.jpg

2.7 Inhibidores reversibles e irreversibles.

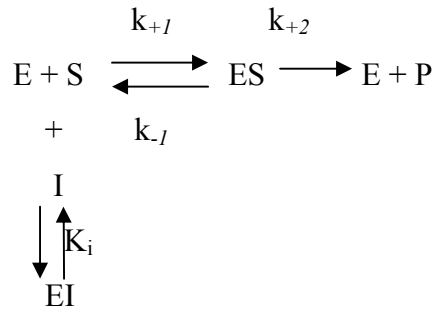
Los inhibidores pueden tener un efecto irreversible, en donde el complejo enzima-inhibidor no se disocia, y presenta el modelo:



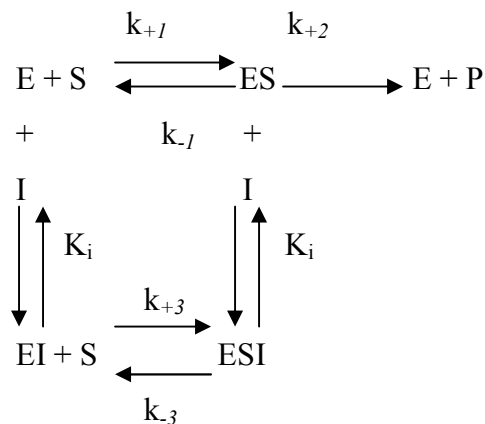
con una constante de inhibición, $K_i = k_{-1} / k_1$, y para el caso de un inhibidor reversible se omite el segundo paso. La K_i indica la concentración a la que la mitad de los sitios están ocupados, por lo que valores más pequeños indican una interacción más fuerte, y como consecuencia una mejor inhibición (Berg *et al.*, 2002).

2.8 Inhibidores competitivos, no competitivos e incompetivos.

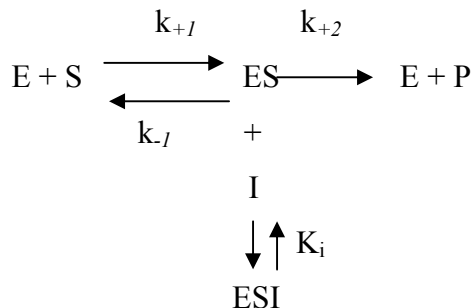
Existe una variedad de los sistemas de inhibición de sustrato, como es la inhibición competitiva, en donde el inhibidor ocupa el sitio activo, para el que existe el modelo:



la inhibición no competitiva, en donde el inhibidor ocupa algún sitio distinto al sitio activo, con el modelo:



y la inhibición incompetitiva, en donde el inhibidor ocupa su sitio de unión una vez que el sustrato se ha unido a la enzima, con el modelo:



así como todas las variantes parciales y mezcladas de los tipos de inhibición, sugiriendo que un pequeño cambio en el arreglo espacial de ciertos aminoácidos o grupos de los inhibidores puede modificar de manera importante su especificidad. Altas concentraciones de sustrato tienen el efecto de inhibir la actividad en algunos modelos enzimáticos. La actividad de ciertas enzimas es inhibida por la ausencia de activadores y cofactores (Rudiño *et al.*, 2002).

2.9 Formas de estudiar la inhibición enzimática.

Las enzimas, los inhibidores proteicos y sus complejos, siendo proteínas, pueden ser

estudiadas su unión por cromatografía de tamiz molecular, por electroforesis en gel en variadas condiciones de pH, e incluso puede determinarse su estructura, en especial el arreglo de los aminoácidos involucrados en la unión de los dos elementos por resonancia magnética nuclear, para proteínas pequeñas, o por cristalografía de rayos X (Berg *et al.*, 2002). Para evaluar la actividad enzimática y la capacidad inhibitoria son necesarios ensayos en condiciones óptimas o cinéticas por espectrofotometría. La resonancia superficial de plasmones es una técnica sofisticada de reconocimiento molecular que permite estudiar la asociación de dos proteínas, la cinética de formación de complejos, llegando a obtenerse constantes de disociación, o bien, constantes de inhibición, esta técnica será descrita más adelante.

2.10 Clasificación de las enzimas.

Existen distintos tipos de enzimas, de acuerdo con su función, algunas adicionan, o remueven grupos, iones o electrones, pero todos los tipos de catálisis conllevan una isomerización, que es un rearrreglo en el espacio de los grupos de la proteína, unos respecto de otros. Las enzimas se clasifican en (según el sistema de clasificación internacional E. C. - Enzyme Commission) (Bairoch, 2000):

1. Oxido-reductasas, agregan un oxígeno a alguna molécula orgánica,
2. Transferasas, transfieren grupos funcionales,
3. Hidrolasas, escinde un enlace C-C, C-N o C-O en un compuesto bioquímico,
4. Liasas, adicionan grupos funcionales a los dobles enlaces,
5. Isomerasas, modifican estéricamente un compuesto,
6. Ligasas, forman enlaces uniendo dos moléculas, con la participación de ATP.

2.11 Regulación de la actividad de las proteínas.

La actividad de las proteínas, incluyendo las enzimas, comúnmente debe ser regulada para que funcionen en el tiempo y lugar apropiado (Harper *et al.*, 1978). La actividad biológica de las proteínas es regulada por:

1. Control alostérico. Las proteínas alostéricas contienen uno o varios sitios reguladores con la participación de moléculas que promueven cambios conformacionales y múltiples sitios funcionales, alterando así su actividad.
2. Formas múltiples de enzimas. Las isozimas o isoenzimas proveen un abanico para la

regulación variante de la misma reacción en distintos lugares o tiempos. Las isozimas son enzimas homólogas con la misma función dentro de un organismo, pero varían en aminoácidos específicos y en sus valores de V_{\max} y de K_m , así como en sus propiedades reguladoras. Comúnmente, las isoenzimas son expresadas en organelos o tejidos distintos, o en diferentes estadios del desarrollo.

3. Modificación covalente reversible. Las propiedades catalíticas de muchas enzimas son marcadamente alteradas por la formación de enlaces covalentes, activándose por la presencia de los cofactores, más comúnmente un grupo fosforilo. Así, las enzimas se regulan al *prenderse* y *apagarse* por la adición o sustracción de un cofactor. Ejemplos de este mecanismo son la acetilación, la fosforilación y la glucosilación (Lodish, *et al.*, 2000).

4. Activación proteolítica. Algunas enzimas son activadas irreversiblemente usando motivos reguladores, que son unidades estructurales con una arquitectura particular que desempeña una función en especial, en éste caso, de activación. Ciertas enzimas hidrolíticas actúan sobre éstos sitios sustrayendo una porción del polipéptido. El polipéptido completo se denomina zimógeno o proenzima. Ejemplos de enzimas con éste mecanismo regulador son enzimas digestivas como la pepsina, la tripsina y la quimiotripsina y las caspasas (Stroud *et al.*, 1977).

5. Inhibidores. Moléculas específicas muestran un reconocimiento por una proteína, o por una familia de proteínas, ya sea enzima, transportador, segundo mensajero, o algún otro tipo de factor en que dicho sistema biológico actúa.

6. Inhibición por retroalimentación. Se presenta en enzimas con un factor de su ruta metabólica, que funciona como inhibidor, uniéndose al sitio activo o alguna otra región de la enzima, como ya se había mencionado.

7. Inhibición por saturación. Cuando las concentraciones de sustrato son saturantes podría haber una inhibición sobre la actividad de la enzima, bajando la V_{\max} de forma importante y mostrando un decaimiento.

2.12 Las hidrolasas son enzimas clave del catabolismo.

Las hidrolasas comprenden cerca de 200 proteínas y se caracterizan por introducir una molécula de agua en el sustrato, proceso llamado hidrólisis. Las hidrolasas pueden actuar sobre lípidos, glúcidos, enlaces éster y proteínas. Así, las hidrolasas muestran gran diversidad de sustratos, pero todas comparten la característica de cortar (o más exactamente hidrolisar) macromoléculas biológicas en alguna ruta metabólica,

convirtiendo éstas moléculas complejas en moléculas más sencillas, a ésta parte del metabolismo se le conoce como catabolismo. Posteriormente se reciclan los productos formados para reintegrarlos en otra ruta y formar otras moléculas complejas, a lo que se conoce como anabolismo, y aunque sean procesos inversos, tienen una estrecha relación en torno a los sustratos, productos e intermediarios, integrando así al metabolismo (Berg *et al.*, 2002).

2.13 Las proteasas rompen proteínas en péptidos más pequeños.

Las hidrolasas encargadas de actuar sobre las proteínas se denominan proteasas. Las proteasas rompen el enlace peptídico entre los residuos de aminoácidos que conforman las proteínas, liberando una molécula de agua al escindir el enlace peptídico. Si bien la hidrólisis de los enlaces peptídicos es favorecida termodinámicamente, esta es muy lenta. La vida media de una proteína es el tiempo en que la mitad de las moléculas de una proteína son destruidas desde que son sintetizadas. Las vidas medias varían en varios órdenes de magnitud. En ausencia de la proteasa, la vida media de un péptido típico a un pH neutro es calculada entre 10 y 1,000 años y la velocidad de reacción no catalizada por una proteasa a pH 9 y 25 °C es $8.2 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ (Silverman, 2000), lo que da cuenta de su estabilidad y conservación de sus propiedades. En ausencia del catalizador, la vida media de la hidrólisis para un péptido típico a un pH neutro es estimada a ser entre 10 y 1,000 años. Algunas proteínas deben ser hidrolizadas dentro de milisegundos en ciertas rutas bioquímicas. La unión peptídica es responsable de tal estabilidad, específicamente, la estructura de resonancia que influye en la planaridad del enlace (Berg *et al.*, 2001).

2.14 Proteasas: superfamilias basadas en la estructura del sitio activo.

La diversidad de estructuras de sitios activos en proteasas es muy amplia, lo que les confiere un intervalo de especificidad que abarca todos los sitios posibles de corte de un polipéptido. Los grupos que participan en la catálisis son distintos en cada tipo, pero el resultado es el mismo, y desarrollan tres funciones: ataque nucleofílico, catálisis base general y asistencia electrofílica (Beynon and Bond, 2001). Los tipos de proteasas son:

1. Tiolproteasas, que tienen un residuo de cisteína que participa en la catálisis, la cisteína tiene un sulfuro en su radical. A los compuestos orgánicos con un ion de azufre se les agrega el prefijo tio o tiol.
2. Serinproteasas, con un residuo de serina involucrado en la catálisis.

3. Metaloproteasas, con un ion metálico coordinado al sitio activo.
4. Proteasas ácidas, también conocidas como proteasas aspárticas, con un residuo de ácido aspártico formando parte del sitio activo.

Las proteasas presentan dos tipos de mecanismos de reacción, uno es el covalente y el otro es el ácido-base (Beynon and Bond, 2001). Las proteasas con mecanismo de reacción covalente son las tiol y serinproteasas. Las proteasas con mecanismo de reacción ácido-base son las metaloproteasas y las proteasas ácidas. Las proteasas participan en contextos metabólicos tan distintos como las fuentes en que están presentes, como la proteasa de VIH, que madura al viroide por proteólisis de su poliproteína, o bien, las proteasas de la familia de la papaína cuyas funciones son múltiples, tanto en el ciclo de vida de los parásitos, como en la patogénesis de dichos parásitos. Por lo que las proteasas pudieron haber evolucionado a partir de ancestros con funciones distintas, convergiendo en la función de proteólisis (Rawlings and Barrett, 1993).

2.15 Homología y propiedades catalíticas muy similares en proteasas aspárticas.

La superfamilia de las proteasas aspárticas se caracteriza por una firma catalítica de los aminoácidos ácido aspártico-treonina-glicina (Asp-Thr-Gly), que forma parte esencial del sitio activo, y en el que la catálisis es llevada a cabo por dos residuos de ácido aspártico, estando la firma presente en los dos residuos de ácido aspártico.. El papel de los dos grupos de carboxilo fue inferida a partir de una modificación química (Knowles, 1970). Los residuos de ácido aspártico que participan en la catálisis, en particular en el caso de la pepsina, son Asp32 y Asp215 (que ocupan las posiciones 91 y 274 en la proenzima, respectivamente), (ver Fig. 8) uno de los cuales tiene que ser protonado y el otro desprotonado para que la enzima sea activa, ocurriendo esto en el intervalo 1 a 5 de la escala pH, lo que indica la importancia del carboxilo de los dos ácidos aspárticos, y su participación en el mecanismo catalítico. Evidencias recientes generadas mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), difracción de rayos X y de neutrones ha establecido que el ácido aspártico protonado es el Asp215 y el que es desprotonado es el Asp32 (Coates *et al.*, 2006). Estudios de difracción de rayos X confirmaron que las cadenas laterales de los ácidos aspárticos están en la posición apropiada para producir la ruptura del enlace peptídico del sustrato, y además revelaron que los dos ácidos aspárticos están lo suficientemente cerca para compartir un puente de hidrógeno entre sus oxígenos (Pearl, 1987). Están formadas por dos lóbulos laterales, constituyéndose

casi exclusivamente de hojas beta paralelas y antiparalelas conectándose entre sí por *asas*, con una hendidura en medio que forma la entrada al sitio activo (ver Fig. 6 y 7). Es ampliamente conocida la inhibición específica de pepsina por pepstatina, un oligopéptido microbiano, obtenido de filtrados de cultivo de *Streptomyces*. La especificidad del sustrato es muy similar dentro de la superfamilia, preferentemente en puntos de corte con residuos de aminoácidos hidrofóbicos a ambos lados, en especial los aromáticos. Comúnmente tiene una masa molecular en el intervalo de 34,500 Da y pHs óptimos entre 1.5 y 5.0 y las secuencias de las proteasas aspárticas están disponibles, haciendo muy obvia la similitud en torno a los residuos de aminoácidos adyacentes a los dos residuos de ácido aspártico, que en conjunto forman al sitio activo, lo que podría indicar que ésta superfamilia tiene un modelo evolutivo que se ajusta al divergente (Tang *et al.*, 1978), en donde un ancestro dio origen a todos los representantes actuales por duplicación y fusión de genes y cambios puntuales en la secuencia de ADN de las varias fuentes.

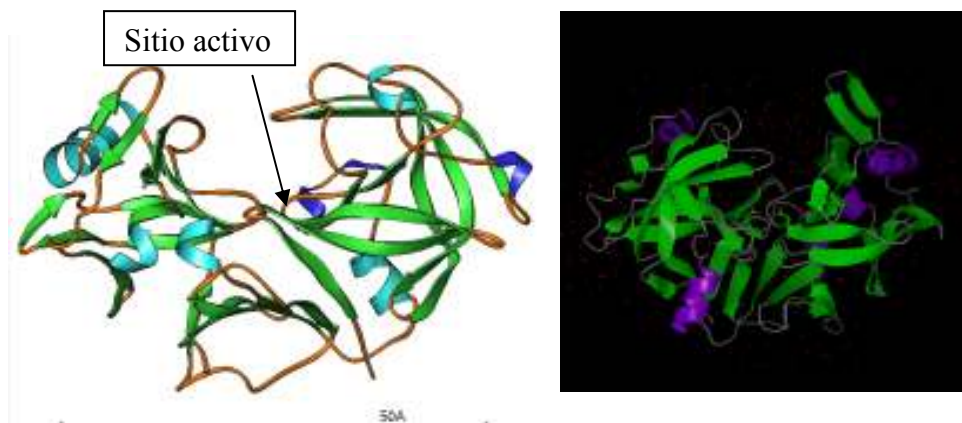


Fig. 6 y 7 Dos vistas de la estructura terciaria de la pepsina, representante y prototipo de las proteasas aspárticas (ver sección 2.21). La cadena principal es mostrada, indicando que se pliega sobre sí misma en dos grandes lóbulos laterales, con una cavidad profunda en el centro, al fondo de la cual se encuentra el sitio activo indicado en la primera imagen, en la segunda son visibles las moléculas de agua en color rojo. La imagen fue generada con los datos cristalográficos del depósito 5PEP del PDB (Berman and Bourne, RCSB, 1993).

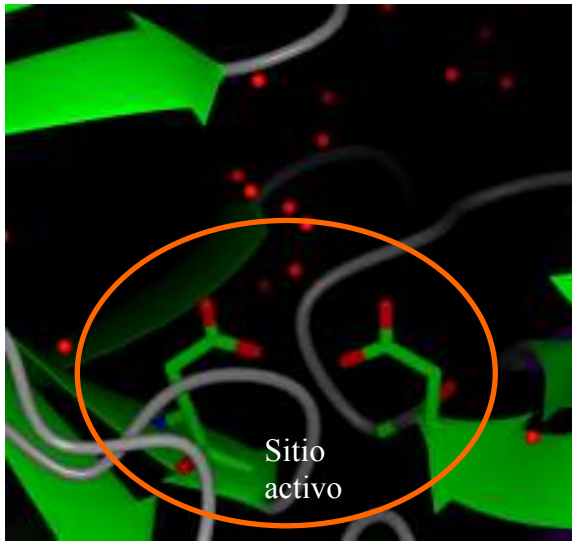


Fig. 8 Acercamiento al sitio activo, mostrando los dos residuos de ácido aspártico (Asp 32 y 215) y la molécula de agua que participan en la catálisis.

2.16 La pepsina es el prototipo de una proteasa aspártica.

La proteasa típica tomada como modelo para las proteasas aspárticas es la pepsina, con código E.C. 3.4.23.1 (IUBMB, 1999) (ver Fig. 6 y 7), que participa en el sistema digestivo de los vertebrados y se encarga de hidrolizar las proteínas ingeridas en la dieta. Una estrategia reguladora de su actividad son las isoformas presentes en los organismos que las sintetizan, en el humano existen 7 isoformas reportadas, lo que implica que hay pequeñas variaciones en la estructura primaria (ver Fig. 9), y como consecuencia en la especificidad del sustrato, el pH óptimo, y en el punto isoeléctrico. La otra estrategia reguladora es la activación proteolítica por ella misma, existe un motivo regulador, que en éste caso es un sitio de corte específico en la cadena del polipéptido de su zimógeno, el pepsinógeno, que inmediatamente se activa después del corte (Lazure, 2002). Recientemente fueron publicados estudios cinéticos y un modelo de activación de zimógenos de proteasas aspárticas (Varon *et al.*, 2006). La pepsina de cerdo fue una de las primeras proteínas en ser cristalizada (Northrop, 1946), más no en determinarse su estructura. La estructura de su zimógeno, el pepsinógeno fue determinada (Sieliecki *et al.*, 1991) y fue determinada la estructura del complejo que forma con el inhibidor de proteasas aspárticas más conocido, la pepstatina (Fuginaga *et al.*, 1995). Estructuralmente se inserta dentro de la clase toda beta, subclase mayoritariamente beta, con un plegamiento característico de proteasas ácidas, por lo que cumple con todos los aspectos que forman el perfil de las proteasas aspárticas.

2.18 Estudios y caracterización de pepsina de cerdo.

La pepsina de cerdo es una molécula monomérica con un peso molecular aproximado de 34.5 kDa, constituida por 327 residuos de aminoácidos en la enzima activa y 386 en la proenzima (pepsinógeno), con un punto isoeléctrico teórico de 3.24 y un punto isoeléctrico, medido experimentalmente, de entre 2.5 y 3.0, según la isoforma, está compuesta de 4 hélices alfa, que constituyen el 8% de la enzima activa y 29 hojas beta, constituyendo el 41% de la enzima activa. Existen 6 depósitos en el *Protein Data Bank* (PDB): 1PSA, 2PSG, 3PEP; 3PSG, 4PEP y 5PEP. Solamente 5PEP cuenta con datos necesarios para generar el mapa de densidad electrónica, sin embargo la asignación del grupo espacial parece ser errónea² y no es posible desplegar al mapa (incluso usando directamente el archivo en formato *cif* depositado junto con las coordenadas). 1PSA presenta ligante, que es pepstatina. Los estudios cristalográficos indican que los rearrreglos locales en la vecindad del sitio activo juegan un papel importante para la especificidad y activación (Cooper *et al.*, 1990).

² De hecho el EDS –*Electron Density Server*- marca como error al intentar generar el mapa a partir de los datos depositados por los autores: “*There is no map available for this entry (5pep), because our automatic script failed to produce an electron density map with an **R-value (0.430)** within 5 percentage points of the published one (0.196). If you are the author of this entry and wish to help us remedy this situation*”.

3.0 ANTECEDENTES.

En 1996, Delfín y colaboradores, de la Universidad de la Habana describieron un inhibidor de proteasas de rango amplio, ShPI-I (ver Fig. 10), proveniente de la anémona *Stichodactyla helianthus* (Stichodactylidae), con alta afinidad contra tripsina, con una $K_i = 1.1 \times 10^{-10}$ M (Delfín *et al.*, 1996). La estructura fue determinada por resonancia magnética nuclear (NMR), y el código en el PDB es 1SHP (Antuch *et al.*, 1993) (ver Fig. 11). ShPI-I tiene un peso molecular de 6,110 Da, con 55 residuos de aminoácidos, su punto isoeléctrico teórico es de 8.86, forma 3 puentes disulfuro. La secuencia fue comparada contra la de otras proteínas de la base de datos de SwissProt (Antuch *et al.*, 1993), y como resultado se obtuvo una similitud muy grande con la familia de inhibidores de Kunitz., en especial con el tipo BTPI. La clasificación estructural de SCOP de ShPI-I. es:

Clase: Proteínas pequeñas

Plegamiento: tipo BTPI

Superfamilia: BTPI

Familia: inhibidores pequeños tipo Kunitz y toxinas tipo Kunitz

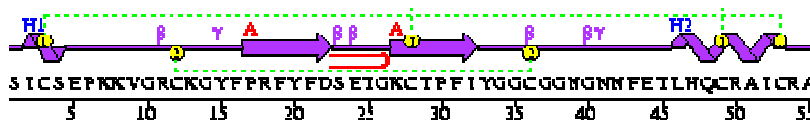


Fig 10. Estructuras primaria y secundaria de ShPI-I. La estructura secundaria, compuesta en gran parte por *loops* se sobrelapa con la secuencia de aminoácidos. Tomada del PDB con el código 1SHP (Berman and Bourne, RCSB, 1993).

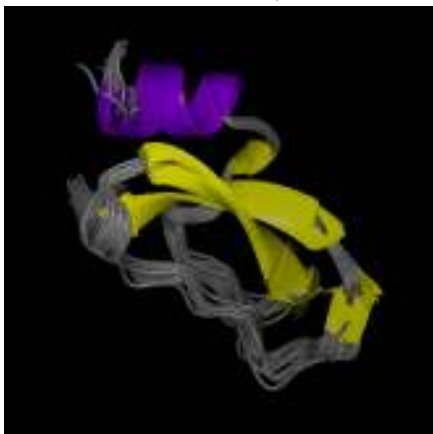


Fig. 11 Estructura terciaria de ShPI-I. Se muestra la cadena principal, compuesta por dos segmentos largos de *loops*, hojas beta antiparalelas y dos pequeños segmentos de alfa hélice. La

imagen fue generada con datos de resonancia magnética nuclear (NMR) del depósito 1SHP del PDB (Berman and Bourne, RCSB, 1993).

3.1 Inhibidores conocidos de pepsina.

Como ya se había mencionado antes, la pepstatina es un inhibidor específico de proteasas aspárticas, en especial de pepsina, incluso están depositados y disponibles los datos de cristalografía de rayos X del complejo formado por pepsina y pepstatina (código PDB 1PSA, sin embargo tampoco es posible representar el mapa de densidad electrónica debido a una alta discordancia entre los errores reportados y los calculados). Está descrito un complejo de pepsina con el inhibidor 3 proveniente de *Ascaris lumbricoides*, con una constante de inhibición determinada experimentalmente de 9.1×10^{-10} M (Abu-Erreish and Peanasky, 1974). El ecabeto de sodio, TA-2711, tiene una inhibición de 78% sobre la actividad de pepsina (Pearson and Roberts, 2001). α -2-macroglobulina tiene propiedades de inhibición de espectro amplio sobre proteasas, incluyendo las proteasas aspárticas (Thomas *et al.*, 1989). Piperidina sustituida tiene una inhibición sobre pepsina, con una constante de inhibición de $1.4 \pm 0.2 \times 10^{-10}$ M experimental (Marcinkeviciene *et al.*, 2002). El inhibidor peptídico hidrofílico ATBI, extraído de *Bacillus sp.* extremófilo tiene inhibición sobre proteasas aspárticas, con una constante de inhibición de $5.5 \pm 0.5 \times 10^{-11}$ M (Dash *et al.*, 2001). Se descubrió que el óxido nitroso aportado por donadores ejerce inhibición sobre proteasas aspárticas (Sharma *et al.*, 2004). Recientemente se publicó la caracterización bioquímica del inhibidor de proteasas aspárticas, API, purificado de *Bacillus liceniformis* termotolerante, con valor para la constante de inhibición de 1.07×10^{-10} M (Kumar *et al.*, 2006). Está publicado en páginas de Internet que eritrosina, colorante rosa, inhibe a la pepsina (www.cosmoedu.net/DESCHUYTENEER5.pdf), aunque no se encontraron datos cuantitativos sobre inhibición o constantes de inhibición ni estructuras de éste ni del complejo formado. Hay antecedentes que sugieren que la inhibición de ShPI-I y ShPI-II de la anémona *Stichodactyla helianthus* sobre pepsina de cerdo es posible, tomándola como modelo de proteasas aspárticas, tomando en cuenta que todas las proteasas aspárticas siguen el mismo mecanismo de reacción, que son funcionalmente activas en pH ácido, de ahí su otra denominación y el estado del conocimiento en éste momento, ya que no se sabe qué tan grandes son los sitios activos de las demás proteasas aspárticas en relación a pepsina, por lo que al momento son válidas las extrapolaciones hechas en función de la inhibición sobre pepsina, asumiendo que quizá en un futuro el efecto inhibitorio sobre alguna proteasa aspártica en particular sea nulo.

4.0 OBJETIVO GENERAL.

Analizar y evaluar la inhibición que ShPI-I produce sobre la actividad de proteasas aspárticas.

5.0 OBJETIVOS PARTICULARES.

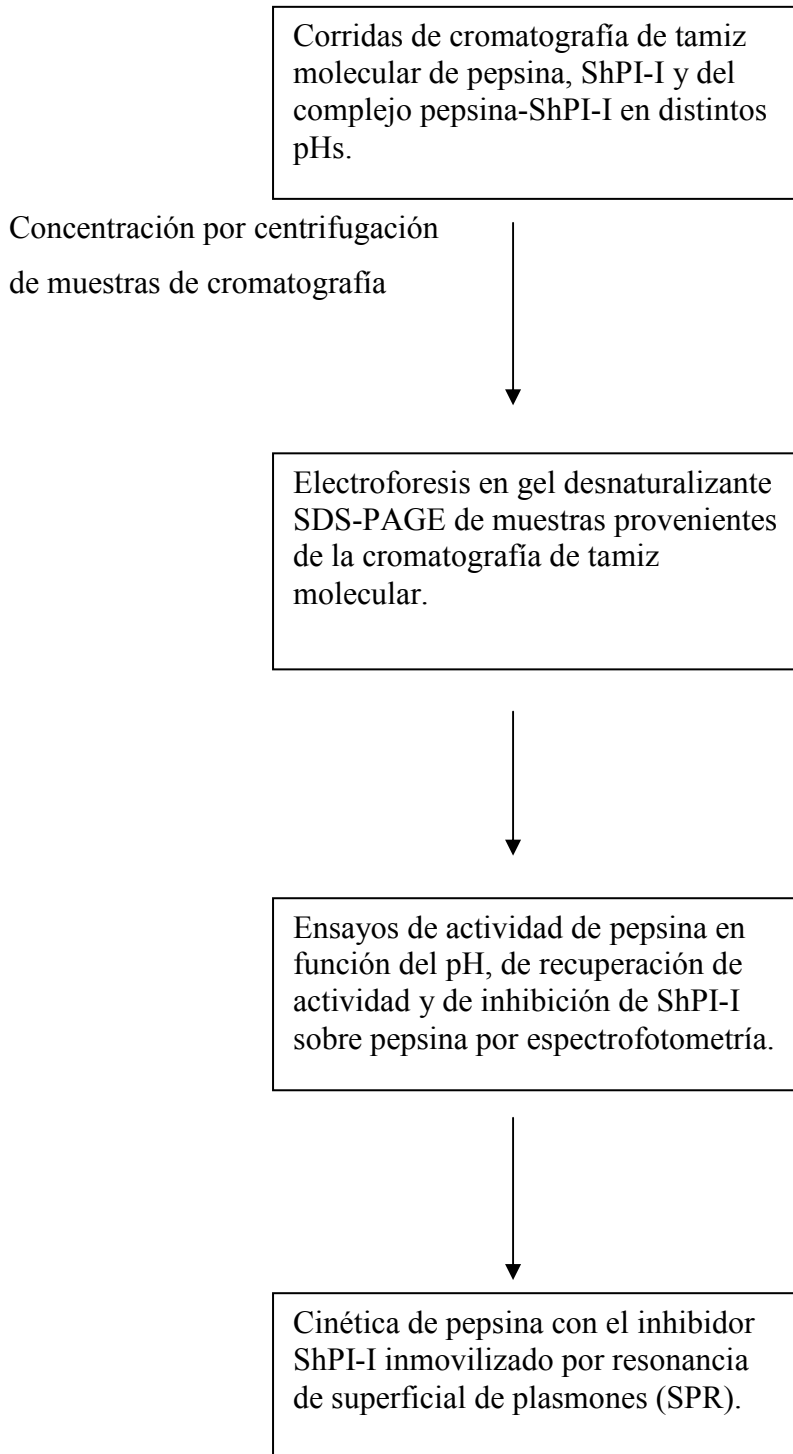
1. Evaluar la capacidad inhibitoria de ShPI-I sobre pepsina utilizando diversos métodos (Resonancia superficial de plasmones, actividad enzimática, cromatografía de tamiz molecular).
2. Estudiar el comportamiento de la pepsina a diferentes pHs.
3. Estudiar el comportamiento del ShPI-I a diferentes pHs.
4. Estudiar el comportamiento del complejo pepsina-ShPI-I a diferentes pHs, con el fin de corroborar la existencia del mismo y sustentar la posible obtención de un complejo formado dentro de una matriz cristalina.

6.0 HIPÓTESIS.

Si ShPI-I es un buen inhibidor de la pepsina entonces la formación de un complejo pepsina-ShPI-I podría obtenerse una muestra del complejo para ser cristalizado y después ser explorado estructuralmente utilizando cristalografía de Rayos X (R_x).

7.0 MATERIALES Y METODOS.

A continuación se presenta un diagrama de los métodos usados en este trabajo por etapas:



7.1 Cromatografía de proteínas por tamiz molecular.

La cromatografía consiste en una separación de una a varias moléculas de una muestra según el volumen eluido o el tiempo de retención. La presencia de las proteínas es detectada al pasar por un sensor de luz ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm, ya que a ésta los aminoácidos aromáticos absorben la luz incidente, en especial el triptofano. Posteriormente se compara el pico de la molécula de interés con una gráfica de calibración, de la columna usando varias proteínas conocidas, en donde cada una tiene un pico en un volumen esperado, por lo que cada molécula tiene un comportamiento y una huella molecular propia, independientemente de la solución *buffer* en la que es inyectada. La variable usada en éste caso es el volumen hidrodinámico (Amersham Pharmacia Biotech, 1998.), que varía proporcionalmente según el peso molecular de cada proteína; proteínas con pesos moleculares grandes tienen tiempos de retención menores, y proteínas con pesos moleculares pequeños tienen tiempos de retención, o bien volúmenes de elución mayores (Amersham Pharmacia Biotech, 1998.), al pasar selectivamente por poros de distinto diámetro en la columna de Hiload 26/60 Superdex 200 acoplada a un equipo Äkta Prime. La muestra de proteína es disuelta en la solución reguladora que se va a ocupar para la corrida con el pH deseado, y es inyectada en el *asa* del equipo de cromatografía, que previamente es equilibrada con la misma solución reguladora de pH de la corrida. Se hicieron 3 corridas de cromatografía en regulador de acetatos 100 mM, NaCl 100 mM pH 3, 3 en regulador de acetatos 100 mM, NaCl 100 mM, pH 4, 1 en regulador de acetatos 100 mM, NaCl 100 mM, pH 4.5 y 1 en regulador de fosfatos 100 mM, NaCl 100 mM, pH 7 con el objetivo de caracterizar el comportamiento de la pepsina según cambia el pH. Previo a la inyección, se desgasificaron las soluciones y se disolvieron de las siguientes cantidades de pepsina comercial SIGMA justo antes de hacer la inyección en la columna en las soluciones *buffer* en 1 mL:

pH	Cantidad de pepsina en la columna (mg)
3.0	8.0, 8.0 y 8.0

4.0	8.0, 4.0 y 4.0
4.5	2.0
7.0	4.0

Se realizaron corridas de cromatografía en un mismo regulador para comparar el comportamiento de la pepsina, del inhibidor ShPI-I y del complejo pepsina-inhibidor ShPI-I con el objetivo de caracterizar el comportamiento de cada uno por separado en relación al complejo. Se hicieron 2 corridas de cromatografía en regulador de acetatos pH 3, se disolvieron 6 mg de pepsina con 2 mg del inhibidor en 1 mL, repitiéndose cantidades en masa en la segunda corrida en regulador a pH 3, a estas se les concentró por centrifugación en ultracentrífuga a 5,000 rpm a 4 °C en ciclos de 30 minutos hasta alcanzar un volumen menor a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *ependorf centrifuge 5403* y se le disolvió en regulador de pH 4.5, con la finalidad de observar si se conserva el complejo formado o se disocian en pepsina e inhibidor. Se disolvieron además las siguientes cantidades en el regulador de acetatos pH 4.5 en cada corrida: 20 mg de pepsina en 10 mL, 2 mg de ShPI-I en 1 mL, esto para comparar el comportamiento de la pepsina y del inhibidor por separado frente al complejo pepsina-inhibidor en este pH.

La tasa de transferencia se mantuvo en 2.5 mL/min, con un límite de presión de 0.5 MPa en todas las corridas de cromatografía.

7.2 Electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE).

La electroforesis en gel consiste en la separación de moléculas de una solución, a partir de la cual se puede establecer el peso molecular aproximado de una proteína en comparación con un patrón o marcador de pesos moleculares, que es una mezcla de proteínas conocidas con un peso molecular específico, por lo que la mezcla de proteínas provee un determinado rango de pesos moleculares, así se puede inferir de qué proteínas se trata, si se conocen las proteínas del experimento, inclusive se puede inferir si la proteína es un monómero o si es una forma multimérica y de cuántas subunidades se compone. La muestra de proteína migra a través del campo electromagnético de una placa de gel de poliacrilamida producido por una cámara conectada por electrodos a un generador de corriente. El SDS rompe los enlaces de las estructuras secundaria y terciaria, por lo que la única estructura conservada dentro de la proteína es la de la cadena polipeptídica, desnaturizándola. Las proteínas con pesos moleculares grandes

migran con una velocidad mayor que las proteínas con pesos moleculares pequeños, por lo que las bandas de proteína recorren distancias según su peso molecular. Para montar un gel de poliacrilamida primero se pone una base de gel de agarosa a que polimerice, este funciona como soporte, encima se vierte una mezcla con la concentración de acrilamida deseada, dependiendo de la capacidad de las proteínas de migrar a través del gel; que en este caso fue de 12% (Laemmli, 1970). Esta capa tiene como función separar los componentes de la muestra. Los compuestos necesarios usados en la mezcla con un volumen de 15 ml son:

Agua	5 mL
Acrilamida 30%	6 mL
Tris pH 8.8	3.8 mL
SDS 10%	0.15 mL
APS 10%	0.15 mL
TEMED	0.006 mL

A continuación se prepara la capa separadora. Se vierte una mezcla con un volumen de 5 mL con los siguientes compuestos:

Agua	3.4 mL
Acrilamida 30%	0.83 mL
Tris pH 8.8	0.63 mL
SDS 10%	0.05 mL
APS 10%	0.05 mL
TEMED	0.005 mL

El TEMED actúa como catalizador de la polimerización, por lo que tiene que agregarse cuando la capa anterior ya polimerizó (Laemmli, 1970).

Se inserta el peine que forma los carriles, se monta el resto de la cámara, se vierte el *buffer* de corrida, las muestras para carga tienen que estar muy concentradas, por lo que comúnmente es necesario concentrarlas en tubos de concentración usados en centrifuga.

Se mezclan en *pellets* 12 μ L de muestra con 8 μ L de colorante, en el caso del patrón de pesos moleculares se mezclan 5 μ L de patrón, más 10 μ L de colorante y 5 μ L de agua.

Los *pellets* se hierven 5 minutos y se centrifugan 30 segundos. Se cargan las muestras y el patrón en el gel. Se conectan los electrodos, se enciende el generador de la corriente y se fija ya sea la intensidad de corriente o el voltaje, en éste caso se hicieron las

electroforesis a 150 V, hasta que el frente de las muestras cargadas llegue a la capa de soporte del gel. Se cortan las partes inferior y superior. Se tiñe con la solución de Coomassie (Laemmli, 1970) por 40 minutos en agitación. Se destiñe con la solución desteñidora 2 por 15 minutos en agitación, después con la solución desteñidora 1 por 15 minutos en agitación, por último otra vez con la solución desteñidora 2 por 15 minutos en agitación, al final se agrega agua miliQ, quitando el líquido entre cada ciclo. La solución 1 para un volumen de un litro contiene.

Metanol	500 mL
Acido acético	100 mL
Agua miliQ	400 mL

La solución 2 para un volumen de un litro contiene:

Metanol	50 mL
Acido acético	70 mL
Agua miliQ	880 mL

Se realizaron electroforesis en gel de los concentrados de distintas corridas de cromatografía:

- Gel 1: se cargaron el marcador de pesos moleculares de rango bajo, de 6.5 a 66 kDa, marca SigmaMarker de Sigma, la pepsina proveniente de la corrida de cromatografía de pH 4, concentrada a 5,000 rpm a 4 °C en ciclos de 30 minutos hasta llegar a un volumen menor a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *eppendorf centrifuge 5403*, incubada a 4 °C por 12 horas, y el marcador de pesos moleculares de rango alto, de 36 a 205 kDa marca SigmaMarker de Sigma;
- Gel 2: se cargaron el marcador de pesos moleculares de 6.5 a 66 kDa, la pepsina proveniente de la corrida de cromatografía de pH 7, que fue concentrada en éste pH a 5,000 rpm a 4 °C en ciclos de 30 minutos hasta tener un volumen inferior a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *eppendorf centrifuge 5403*, después fue dialisada en pH 4 e incubada a 4 °C por 12 horas, la pepsina proveniente de la corrida de cromatografía de pH 7, concentrada en éste pH a 5,000 rpm a 4 °C en ciclos de 30 minutos hasta tener un volumen inferior a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *eppendorf centrifuge 5403*, después fue incubada a 4 °C

por 12 horas y el marcador de pesos moleculares de 36 a 205 kDa;

- Gel 3: se cargaron la pepsina de la corrida de cromatografía de pH 4, que fue recibida en el *buffer* PBS de pH 7, concentrada a 5,000 rpm a 4°C en ciclos de 30 minutos hasta tener un volumen menor a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *eppendorf centrifuge 5403* e incubada a 4 °C por 12 horas, la pepsina de la corrida de cromatografía de pH 7 concentrada a 5,000 rpm a 4°C en ciclos de 30 minutos hasta tener un volumen menor a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *eppendorf centrifuge 5403* e incubada a 4 °C por 12 horas y el marcador de pesos moleculares de 6.5 a 66 kDa;
- Gel 4: se cargaron el marcador de pesos moleculares de 6.5 a 66 kDa, la pepsina que estuvo siempre en pH 7 concentrada a 5,000 rpm a 4°C en ciclos de 30 minutos hasta tener un volumen menor a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *eppendorf centrifuge 5403* y fue incubada a 4 °C por 12 horas, la pepsina, que siempre estuvo en pH 4 concentrada a 5,000 rpm a 4°C en ciclos de 30 minutos hasta tener un volumen menor a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *eppendorf centrifuge 5403* y fue incubada a 4 °C por 12 horas, la pepsina que estuvo 30 minutos en pH 7, que fue concentrada en ese pH a 5,000 rpm a 4°C en ciclos de 30 minutos hasta tener un volumen menor a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *eppendorf centrifuge 5403*, dialisada en pH 4, concentrada a 5,000 rpm a 4°C en ciclos de 30 minutos hasta tener un volumen menor a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *eppendorf centrifuge 5403*, después fue e incubada a 4° C por 12 horas, y la pepsina que estuvo 30 minutos en pH 4, fue concentrada en ese pH a 5,000 rpm a 4°C en ciclos de 30 minutos hasta tener un volumen menor a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *eppendorf centrifuge 5403*, dialisada en pH 7, después fue concentrada a 5,000 rpm a 4°C en ciclos de 30 minutos hasta tener un volumen menor a 100 µL en un filtro de 10,000 Da marca Milipore Amicon por centrifugación en centrífuga *eppendorf centrifuge 5403* e incubada a 4 °C por 12 horas.

El objetivo de la electroforesis es inferir si presenta actividad autoproteolítica y tener una idea de qué tanta proteólisis presenta luego del paso de la pepsina por la columna

cromatográfica en distintas condiciones de pH, y también de tal proteólisis con un cambio de pH a otro, asumiendo que en pH 4 tendrá mayor actividad que en pH 7, por lo que se pretende determinar si la pepsina muestra actividad autoproteolítica sólo en el tiempo de retención mostrado pH 4, esto en el cambio de pH 4 a 7 y con el cambio de pH 7 a 4 se pretende precisar si la pepsina muestra una recuperación de actividad a partir del peso molecular aproximado de cada una de las bandas, con respecto al marcador de pesos moleculares.

7.3 Ensayo de actividad enzimática de pepsina.

La actividad enzimática, en éste caso de proteólisis fue medida en condiciones óptimas tomando como referencia el ensayo de actividad enzimática de SIGMA modificado, esto es en condición de pH 2 y 37 °C por la absorbencia de la solución, que al contener proteínas como sustrato de pepsina y filtrarse, sólo pasaban los productos de proteólisis más pequeños a la celda de cuarzo en un espectrofotómetro usando la lámpara de luz ultravioleta (UV), con una longitud de onda de 280 nm. Se usaron dos espectrofotómetros, uno fue Helios γ UV/visible de Thermospectronic, y el otro fue UV/visible DU650 de Beckman. Además, en una serie de experimentos fue medida la actividad proteolítica en condiciones de pH distintas a la óptima para determinar si sólo el cambio de pH causa la inactivación de la pepsina y qué porcentaje de la actividad proteolítica se conserva, por lo que no se tiene un control positivo ó negativo, sino como referencia un rango de actividad de la pepsina con los extremos de 0 y 100 % de actividad. En otra serie de experimentos la pepsina estuvo en condición de un pH distinto de pH 2 (pHs 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) por 30 minutos, después fue llevada a pH 2, con el fin de precisar si el cambio de pH causa recuperación de actividad. También se hizo un experimento para probar la capacidad de inhibición de ShPI-I sobre pepsina a condiciones óptimas de actividad. El control negativo de la inhibición fue la actividad de pepsina en condiciones óptimas (37 °C y pH 2).

El porcentaje de actividad se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de actividad} = \frac{\text{absorbencia}_{\text{pH } 2} - \text{absorbencia}_{\text{pH } x}}{\text{absorbencia}_{\text{pH } 2}} \times 100$$

Absorbencia_{pH 2} es la lectura de absorbencia a 280 nm de la muestra de la reacción de pepsina en condiciones óptimas de actividad (37 °C y pH 2).

Absorbencia_{pH x} es la lectura de absorbencia a 280 nm de la muestra de la reacción de pepsina en condición de 37 °C y un pH distinto de 2.

Para el caso de la recuperación de actividad, se reemplaza el término de absorbencia_{pH x} por el término absorbencia_{pH x - 2}, que es la lectura de absorbencia de la muestra de la reacción a 37 °C, que tras estar un tiempo en un pH distinto de 2 es llevada a pH 2.

Para el caso de la inhibición, la fórmula a ser usada es:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{absorbencia}_{s/inh} - \text{absorbencia}_{c/inh}}{\text{absorbencia}_{s/inh}} \times 100$$

Absorbencia_{s/inh} corresponde a la lectura de absorbencia a 280 nm de la muestra de la reacción de pepsina en condiciones óptimas de actividad (37 °C y pH 2) sin el inhibidor ShPI-I.

Absorbencia_{c/inh} corresponde a la lectura de absorbencia a 280 nm de la muestra de pepsina en condiciones óptimas de actividad (37 °C y pH 2) añadiendo el inhibidor ShPI-I en concentraciones equimolares de pepsina e inhibidor.

7.3.1 Reactivos.

- A) Ácido acético 10 mM¹ (SIGMA®, 100 mL en agua desionizada).
- B) Ácido acético 300 mM (SIGMA®, 100 mL en agua desionizada).
- C) Albúmina bovina al 2.5%(w/v)²(SIGMA®, 100 mL en agua desionizada).
- D) Albúmina bovina al 2.0% (añadiendo 20 mL del reactivo B a 80 mL del reactivo C).
- E) Ácido tricloroacético (TCA) al 5%(w/v) (SIGMA®, 100 mL en agua desionizada usando TCA aprox. 100% SIGMA No. 490-10).
- F) Pepsina (preparar inmediatamente antes de usar una solución de pepsina conteniendo de 0.01 a 0.05 mg/mL de pepsina en el reactivo A).

7.3.2 Procedimiento.

Se vierten los siguientes reactivos:

	Pepsina (mL)	Blanco(mL)
Reactivo D (pH 2)	5	5

¹ El protocolo original usa HCl para los reactivos A y B.

² El protocolo original señala a Hemoglobina (Hb) como sustrato, y se usa en los reactivos C y D.

Equilibrar a 37 °C. Luego añadir:		
Reactivo F (pepsina)	1	-----
Mezclar con vórtex e incubar a 37 °C exactamente. Luego añadir:		
Reactivo E (TCA)	10	10
Reactivo F (pepsina)	-----	1

Pasar por un filtro Waltman No. 50 ó con un filtro de 0.45 μm^3 . Transferir las soluciones a una celda de cuarzo y leer A_{280} .

Registrar las lecturas obtenidas, donde el aumento de 0.01 en la absorbencia a 280 nm en 10 minutos equivale a una unidad, esto durante el ensayo de cinética.

El regulador de acetatos 300 mM tiene un pH de 2.5, por *default*, por lo que a este se agregó ácido acético glacial a fin de llevar la solución a pH, usando el potenciómetro.

Para los ensayos en donde el pH fue distinto a 2 se usaron las siguientes soluciones:

Regulador de acetatos 10 mM y 300 mM, cada uno con los pH 3, 4 y 5, variando las proporciones de las soluciones de ácido acético 300 mM y acetato de sodio 300 mM, y después haciendo una dilución a partir del regulador de acetatos 300 mM para obtener el regulador de acetatos 10 mM.

Regulador de fosfatos 300 mM cada uno con los pHs 6, 7 y 8, variando las proporciones de fosfato de sodio monobásico y dibásico 300 mM.

Para los ensayos donde la pepsina estuvo en un pH distinto de 2 y después fue llevada a éste pH, se usaron:

Regulador de acetatos 10 mM, pHs 3, 4 y 5, así como regulador de fosfatos 10 mM pHs 6, 7 y 8, para el reactivo A en cada ensayo

Regulador de acetatos 300 mM pH 2 para el reactivo B en todos los ensayos.

Para el ensayo de inhibición sobre pepsina, y tomando en cuenta que la relación masa molecular pepsina/ShPI-I es aproximadamente de $34,500/6,100 = 5.65$, se añadió ShPI-I a una concentración aproximada de 3 mg/mL a fin de que las fueran concentraciones equimolares. El control negativo fue la actividad de pepsina en condiciones óptimas (37 °C y pH 2).

Se repitieron todos los ensayos de actividad proteolítica, pero ésta vez usando sólo ácido acético 300 mM y acetato de sodio 300 mM para los reguladores de pH 2, 3, 4, 5, 6, y 7, en las dos series de experimentos, además se hicieron los ensayos de actividad de los pHs intermedios: 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 y 6.5. Además se repitió el experimento de

³ El protocolo original indicaba que el filtro usado debiera ser de 0.8 μm .

inhibición de ShPI-I sobre pepsina en condiciones óptimas de actividad y en concentraciones equimolares, escalando todos los reactivos y en lugar de hacer el experimento por 10 minutos, se extendió a 15, esto a fin de economizar reactivos y obtener una sensibilidad máxima.

Se concentró la colecta de tubos del pico correspondiente a ShPI-I por centrifugación en ultracentrífuga a 5,000 rpm a 4 °C en ciclos de 30 minutos hasta llegar a un volumen menor a 100 µL en filtros de 500 µL de 2,000 Da marca Milipore Amicon de una cromatografía de afinidad de una muestra de la anémona *Stychodactyla helianthus*⁴ para repetir el ensayo de inhibición de ShPI-I sobre pepsina.

Se determinó que la concentración obtenida fue de 0.913 mg/mL en un volumen de 64 µL, por lo que la masa total de ShPI-I fue de:

$$0.913 \text{ mg/mL} \times 0.064 \text{ mL} = 68.47 \text{ } \mu\text{g},$$

para obtener concentraciones equimolares,

$$6.1 \text{ kDa} / 34.5 \text{ kDa} = 0.17681$$

$$0.17681 \times 68.47 \text{ } \mu\text{g de ShPI-I} = 12.10 \text{ } \mu\text{g totales de pepsina}$$

Se diluyeron 0.5 mg de pepsina en un mililitro de regulador de acetatos 300 mM pH 2, por lo que la concentración de pepsina fue de

0.5 mg/mL, ó 0.5 µg/µL, y a partir de la fórmula de concentración en unidades de µg/µL:

$$C = m/v; v = m/C,$$

por lo que se usó de éste volumen:

$v = 12.10 \text{ } \mu\text{g} / (0.5 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}) = 24.2 \text{ } \mu\text{L}$ de pepsina a 0.5 mg/mL, y entonces el ensayo de inhibición se añadieron así:

	Blanco	Pepsina	Pepsina + ShPI-I
Reactivo D (sustrato) (pH 2)	500 µL	500 µL	500 µL
Equilibrar a 37 °C. Luego añadir:			
ShPI-I	-----	-----	64 µL
Reactivo F (pepsina)	-----	24.2 µL	24.2 µL
Mezclar e incubar a 37 °C por 20 minutos. Luego añadir:			
Reactivo E (TCA)	1000 µL	1000 µL	1000 µL

⁴ Proporcionada por Aisel Pascual del grupo de la Universidad de La Habana.

Reactivo F (pepsina)	21.78 μ L	-----	-----
----------------------	---------------	-------	-------

Pasar por un filtro. Transferir a una celda de cuarzo y leer absorbencia a 280 nm. Si bien al blanco se le añade pepsina después del TCA, esto es para asegurarse que todas las muestras tengan aproximadamente la misma proporción de elementos.

7.4 Resonancia superficial de plasmones (SPR).

Los plasmones son oscilaciones colectivas de los electrones de conducción sobre una placa metálica. El equipo emite ondas de sonido, estableciéndose un proceso de resonancia entre el campo electromagnético incidente y los plasmones, que al pasar por el *chip* o biosensor cambian su ángulo de refracción según la masa total adherida a la placa del biosensor, produciéndose el acoplamiento de los plasmones a ángulos de incidencia cada vez mayores, debido al cambio de medio por la onda incidente en un rango de 100-200 nm. El ángulo se elige preferentemente a la derecha del mínimo de reflectividad porque en esa zona las pendientes de las curvas de reflectividad antes y después (de la formación de la película o adsorción de las moléculas) son prácticamente paralelas, y en consecuencia el aumento en la reflectividad es directamente proporcional al corrimiento del mínimo (que también es proporcional al espesor o masa adheridas a la superficie) (Stefani, 2001). Cada medio tiene un índice de refracción propio, por lo que un cambio de solución *buffer* provocaría un cambio de refracción, y un corrimiento de la línea base (valor de respuesta constante). La resonancia superficial de plasmones permite visualizar en tiempo real la asociación y disociación de dos proteínas, obteniéndose constantes de asociación y disociación. Una proteína es inmovilizada en una condición de un orden de magnitud por debajo de su punto isoeléctrico, esto para promover la unión covalente a los carboxilatos previamente activados sobre la matriz de dextrano de la placa de oro del chip usado en el experimento, así, se hacen las inyecciones de la fase móvil en concentraciones variantes. La sensibilidad del equipo es de una unidad de resonancia (RU), que equivale a un picogramo. La calibración del equipo fue hecha por el fabricante, usando proteínas marcadas radioactivamente, obteniéndose una relación directamente proporcional del peso molecular de las proteínas contra la resonancia medida en el equipo (van der Merwe, 2001). Es necesario tener una línea base estable en la repuesta (un valor de respuesta en RUs constante) al momento de hacer la inyección. Si hay un cambio de *buffer* al momento de la corrida, habrá un corrimiento de la línea base, esto debido a que la onda incidente tendrá un ángulo de refracción distinto al de justo antes de cambiar el *buffer*, y que supuso un

cambio de medio. Después de la inyección, se hace un tratamiento estadístico con el programa BIAevaluation 3.1 de la computadora del equipo, ingresando la concentración molar del elemento en fase móvil, y ajustando los parámetros necesarios. De dicho tratamiento, el programa regresa un gráfico de residuales, que son las diferencias entre el modelo generado por el equipo y los datos experimentales, algunos otros valores estadísticos, como desviación estándar, las velocidades de asociación y disociación y el valor de la K_d , que para el caso de complejos enzima-inhibidor equivale a la K_i , que es el valor realmente importante, ya que es una idea cuantitativa de la cantidad de complejo formado, en tanto que las gráficas proporcionan una idea cualitativa. Todo el tratamiento estadístico en conjunto puede mejorarse conforme se toma en cuenta un número mayor de inyecciones. Es posible determinar las constantes de disociación de dos sitios de unión de unión para una misma proteína por un mismo ligando. Además es posible hacer una selección a partir de las variantes de una biblioteca de ligando contra la proteína inmovilizada. Se debe considerar el rendimiento de la masa total de proteína de la inyección contra la respuesta en RUs, será comparable si la respuesta es del mismo orden o si está un orden de magnitud por debajo, también este criterio debe tomar en cuenta las condiciones de la inyección, a fin de favorecer un reconocimiento óptimo. Este método está entre los más confiables, es muy sensible, ya que puede calcular constantes de disociación picomolares, es reproducible y es repetible. Se puede estudiar el acoplamiento de una proteína en fase móvil sobre una proteína de membrana soportada por el chip. Existe gran número de artículos originales que reportan el cálculo de constantes de disociación mediante el uso de resonancia superficial de plasmones desde que se pusieron en el mercado los primeros equipos, si bien no es un método más extendido, ya que el equipo es caro, por lo que es necesario aprovecharlo, dentro del grupo y con los demás grupos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Incluso hay revistas especializadas en este método, como Biosensors y Biacore Journal, Un ejemplo es el trabajo de tesis para recibir el título de biólogo presentado por Everardo Rodríguez (Facultad de Ciencias, UNAM; 2007), que realizó sus experimentos por este método con el equipo del laboratorio: Selección de y caracterización de fagoanticuerpos contra melitina por resonancia de plasmones superficiales (SPR). El modelo del equipo utilizado es BIAcore X de Biacore®.

7.4.1 Pruebas de pre-concentración.

La pre-concentración es la prueba en que se obtiene altas concentraciones del ligando

cerca de la superficie para la unión, usando las cargas electrostáticas entre los carboxilatos de la matriz de dextrano y la proteína a inmovilizar (van der Merwe, 2001). Durante este proceso previo a la inmovilización deben ponerse a prueba dos características importantes para la optimización de la inmovilización del ligando; el conocer la concentración correcta de éste y las condiciones de las soluciones amortiguadoras (*buffer*) con el que se pueda mejorar el acoplamiento (van der Merwe, 2001). Por esto existen algunas reglas a seguir:

1. Evitar que los componentes de la solución compitan con el ligando para reaccionar con los grupos de carboxilo de la superficie (no usar soluciones con aminas primarias).
2. La inmovilización es posible utilizando soluciones con una unidad de pH por debajo del punto isoeléctrico del ligando, ya que en ésta condición el ligando está cargado positivamente, permitiendo la atracción entre las cargas del ligando y las negativas de la superficie del biosensor.
3. La fuerza iónica de la solución del ligando debe ser baja.
4. La concentración del ligando a inyectar debe estar en un rango de entre 20-50 μg dependiendo del peso molecular (van der Merwe, 2001).

Se hizo una prueba de preconcentración de ShPI-I a 25 °C, inyectando 35 μL a una concentración de 8 mg/mL en solución reguladora de fosfatos 4 mM pH 7 a un flujo de 5 $\mu\text{L/s}$, que resultaron ser las condiciones óptimas para inmovilizar a ShPI-I.

7.4.2 Inmovilización de ShPI-I.

Ya que se obtuvieron las condiciones para inmovilizar a la proteína, se elige el tipo de unión química para la inmovilización al biosensor, que en éste caso fue de tipo CM5, cuya superficie es una matriz de carboxilatos que ofrece gran flexibilidad para la química de inmovilización y provee un ambiente hidrofílico para la interacción entre las moléculas. La unión de ShPI-I, que fue el ligando inmovilizado con la matriz se hizo con el kit amino coupling (BIAcoreX[®]), por medio de una mezcla de N-hidroxisuccinimida (NHS) y N-etil-N'-(dimetil-aminopropil)-carbamida (EDC), los ésteres reaccionan espontáneamente con las aminas y otros grupos nucleofílicos de la matriz para formar enlaces covalentes, esto para desproteger a los carboxilatos de la matriz, previo a la inyección de la proteína. Los carboxilatos están libres para formar enlaces peptídicos con el extremo amino de la proteína a inmovilizar. Se inyectó un

volumen de 35 μ L de la mezcla de EDC y NHS.

Se inmovilizó ShPI-I a una concentración aproximada de 0.8 mg/mL, usando un regulador de fosfatos 4 mM pH 7, con el orden siguiente:

- 1) Mezcla de EDC/NHS, 35 μ l
- 2) ShPI-I 35 μ l (0.8 mg/ml)
- 3) Etanolamina-HCl 35 μ l
- 4) Hidróxido de sodio (NaOH, 5mM) 5 μ l

Se pesó una masa inicial de 3.5 mg de pepsina disuelta en 1 mL de regulador de fosfatos 4 mM pH 7, teniendo una concentración inicial de 1×10^{-4} M, de donde se hicieron una serie de diluciones 1:10 usando siempre el regulador de pH 7, hasta llegar a una concentración de 1×10^{-9} M (1 nM), y al momento de hacer la inyección de la pepsina almacenada en el regulador de fosfatos 4 mM pH 7 fue llevada a pH 3 usando regulador de acetatos 4 mM pH 3, teniendo una concentración final de 0.1 nM y haciendo pasar el regulador de pH 3 a un flujo de 5 μ L/s, se inyectaron 100 μ L. Es necesario dejar encapsuladas dos burbujas de aire, esto para separar y marcar el flujo que lleva la proteína del que no. La regeneración de la placa del *chip* se hizo cambiando el regulador al terminar la inyección al de fosfatos pH 7.

Es necesario hacer inyecciones de NaOH en concentraciones bajas a altas (5 -50 μ M), según se requiera, esto para remover los remanentes sobre la matriz unidos no específicamente previo a cada inyección.

8.0 RESULTADOS.

8.1 Cromatografía de tamiz molecular.

Por un lado, hay un corrimiento en el volumen eluido del pico de pepsina hacia la derecha a medida que aumenta el pH. Si bien en pH 3, el peso de pepsina para las corridas fue el mismo, en la tercera corrida hubo una disminución en la absorbancia y un pequeño corrimiento a la derecha. Por otro lado, a pH 7 hay una inversión en el sentido del corrimiento en el volumen eluido, el pico aparece a la izquierda de los demás (ver Fig. 12).

En pH 3, hay un corrimiento del pico de la pepsina hacia la izquierda en la corrida de la solución de pepsina e inhibidor con relación al pico de la corrida de la solución de pepsina sin inhibidor. El pico de pepsina tiene un área bajo la curva del 38 % de la del pico del complejo de pepsina-ShPI-I, calculada por la computadora del equipo. La repetición del experimento muestra que se conserva la relación de área, con un pequeño corrimiento hacia la derecha de toda la curva, con una altura menor en cada pico (ver Fig. 13). El pico mayor de la corrida de pepsina e inhibidor fue concentrado, llevada la solución a pH 4.5 e inyectada para hacer otra corrida en éste pH, habiendo dos picos que tienen los mismos tiempos de retención cada uno por separado en comparación con los picos de las corridas en pH 4.5 de pepsina e inhibidor donde las soluciones sólo contienen a un elemento (ver Fig. 14).

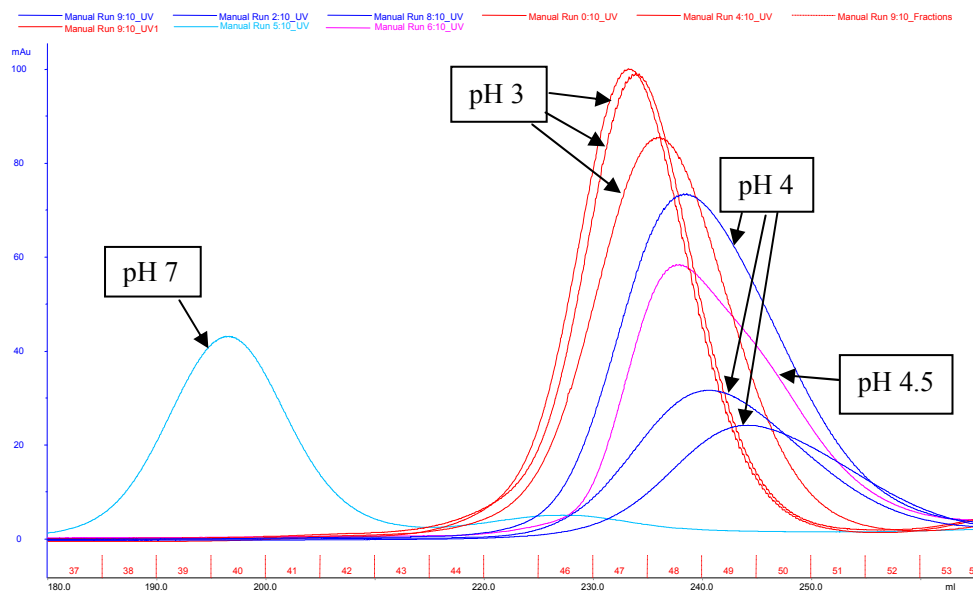


Fig. 12 Perfil de elusión de pepsina a lo largo del pH. Hay una tendencia de corrimiento del pico de la pepsina a ser mayor el volumen eluido conforme aumenta el pH, mientras que a pH 7 hay una inversión

en el sentido del volumen eluido. Cada curva corresponde a un experimento independiente. En color rojo se muestran las corridas de pH 3, en azul las de pH 4, en magenta la de pH 4.5 y en azul claro la de pH 7.

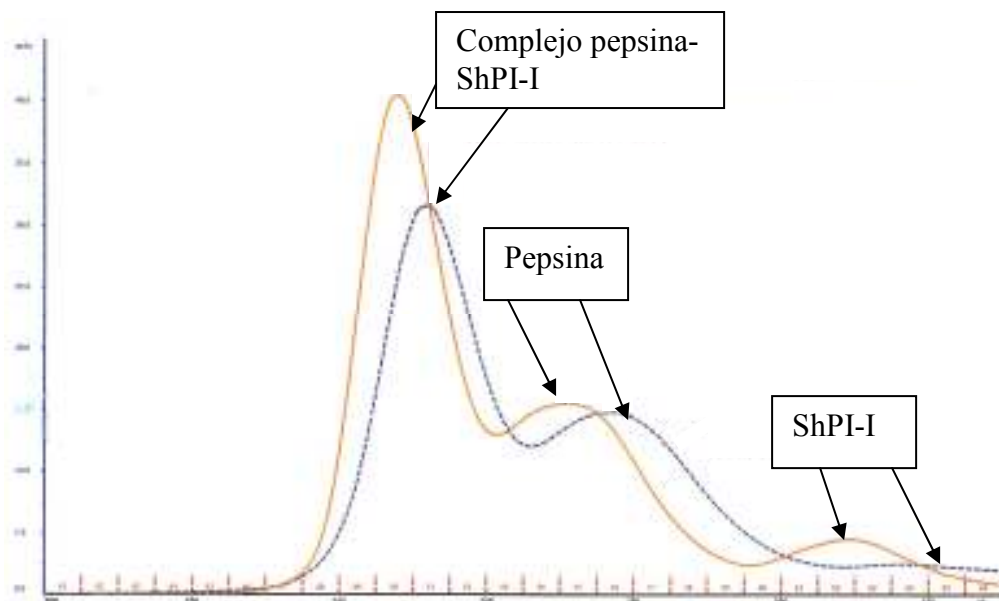


Fig. 13 Perfil de elusión de pepsina y del complejo de pepsina- ShPI-I en pH 3. Se observa que hay un corrimiento del pico de la muestra de la solución que contiene al complejo con respecto al pico de pepsina. El área bajo la curva del pico de pepsina es el 38 % del pico del complejo pepsina-ShPI-I, calculada con la computadora del cromatógrafo. Se muestran dos experimentos independientes, la curva continua en color ocre la primer corrida y la curva punteada en azul es su repetición. La repetición del experimento muestra que se conserva la relación de área, con un pequeño corrimiento hacia la derecha de toda la curva, con una altura menor en cada pico.

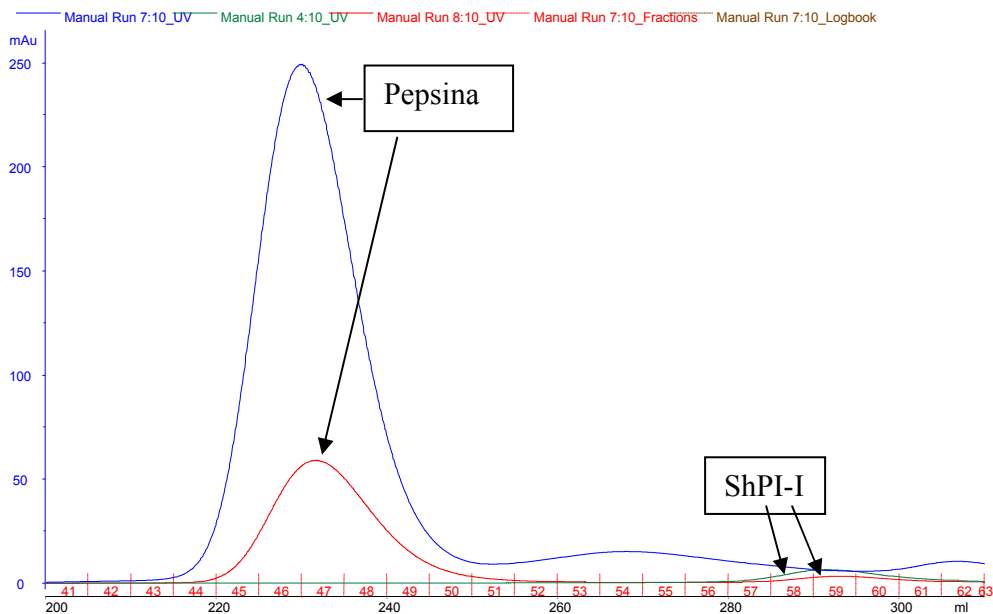


Fig. 14 Perfil de elusión de pepsina, de ShPI-I por separado y en la misma solución en pH 4.5. Se muestran experimentos independientes. La curva en color rojo muestra la corrida de pepsina y ShPI-I, se observa que el cambio de solución *buffer* de pH 3 a 4.5 causó que el complejo pepsina-ShPI-I del

experimento anterior se disociara. En color azul se muestra la corrida de pepsina y en color verde se muestra la corrida de ShPI-I, indicando que tanto la pepsina como ShPI-I por separado tienen cada uno un tiempo de retención que se corresponde con los tiempos de retención de la corrida de la solución que los contiene a los dos.

8.2 Electroforesis en gel desnaturizante SDS-PAGE.

Se observan bandas de péptidos de distintos tamaños, siendo la más común la banda de aproximadamente 35 kDa, hay otras bandas discretas de menor peso molecular bien definido. Hay bandas discretas de péptidos a pH 4 (ver Fig. 15, carril 2 y Fig. 18, carril 3), mientras que a pH 7 casi exclusivamente se ve la banda de 35 kDa (ver Fig. 16, carril 3, Fig. 17, carril 2 y Fig. 18, carril 2). Con el cambio de pH 7 a 4 se observan en el gel 2, varias bandas discretas de péptidos, siendo la más notoria la de 35 kDa (ver Fig. 16, carril 2), mientras que en el gel 4, la única banda es la de 35 kDa (ver Fig. 18, carril 3). En el carril de la pepsina que estuvo en la columna de cromatografía en la corrida de pH 4, y que fue recibida en pH 7 se observan bandas discretas de péptido tanto en el gel 3 como en el 4 (ver Fig. 17, carril 1 y Fig. 18, carril 4). En general se observa que los marcadores de peso molecular se encontraban en malas condiciones, ya que no se distinguen las bandas discretas de cada proteína, sino más bien un barrido, excepto para los geles 2 y 4.

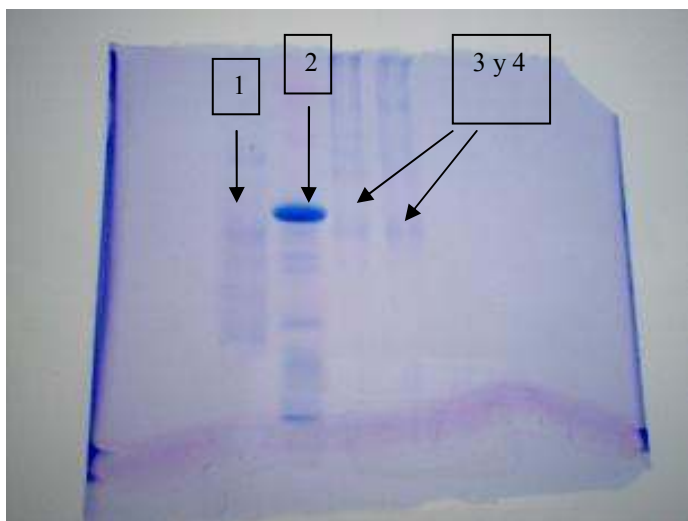


Fig. 15 SDS-PAGE de pepsina a pH 4. El carril 1 corresponde al marcador de pesos moleculares de 6,500-66,000 Da, el carril 2 es la pepsina de la cromatografía en pH 4, los carriles 3 y 4 son los marcadores de pesos moleculares de 36,000-205,000 Da. Se observa una banda mayoritaria alrededor del peso molecular mayor en la muestra de la corrida a pH 4.

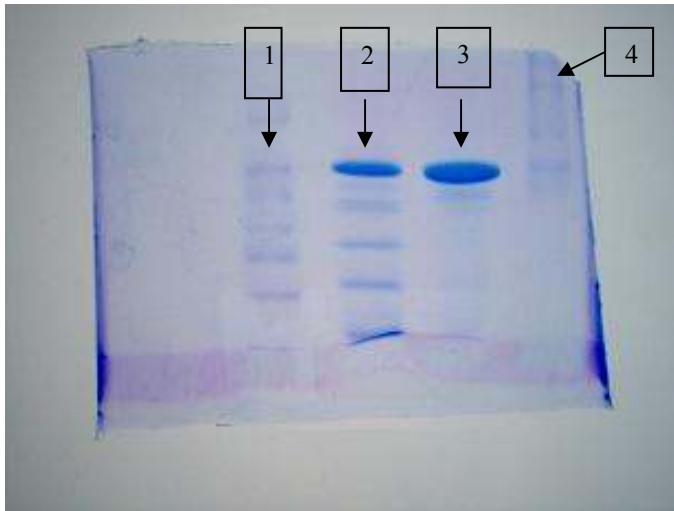


Fig. 16 SDS-PAGE de la pepsina en condición de pH 7 y dialisada en pH 4 y de la pepsina en pH 7. El carril 1 corresponde al Marcador de pesos moleculares de 6,500-66,000 Da, el carril 2 es la pepsina en pepsina de la cromatografía en pH 7 y dialisada en pH 4, el carril 3 es la pepsina en pH 7, el carril 4 es el marcador de pesos moleculares de 36,000-205,000 Da. Se observan bandas discretas de la muestra de la corrida a pH 7 y que fue dialisada en pH 4. En la muestra de la corrida de pH 7 se observa una banda predominante en el peso molecular mayor y pequeñas bandas discretas en una proporción mucho menor.

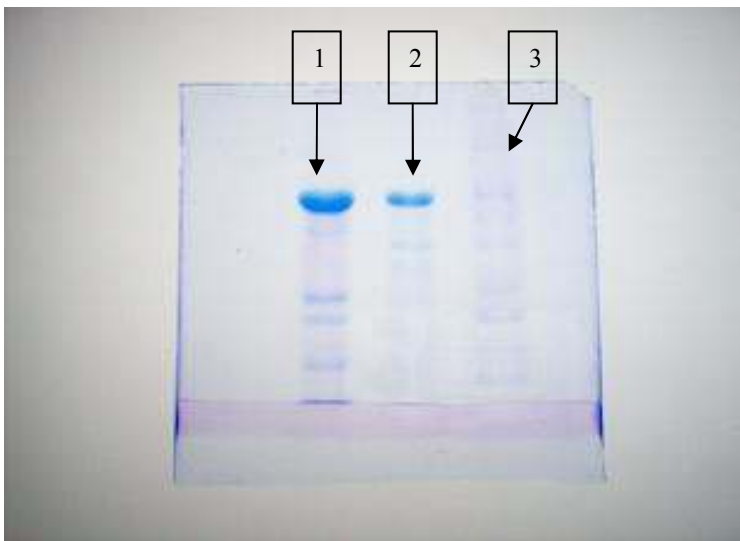


Fig. 17 SDS-PAGE de la pepsina en pH 4, y que fue recibida en pH 7 y de la pepsina en pH 7. El carril 1 corresponde a la pepsina de la cromatografía en pH 4 y recibida en pH 7, el carril 2 es la pepsina en pH 7 y el carril 3 es el marcador de pesos moleculares de 6,500-66,000 Da. Se observan bandas discretas, siendo la que está en mayor proporción la del peso molecular mayor. En pH 7 se observan bandas discretas, como en el gel anterior.

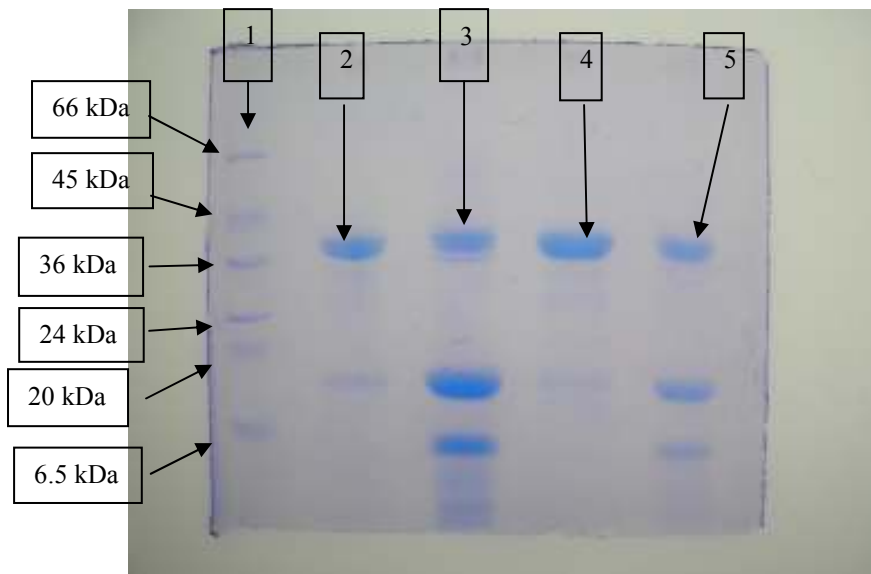


Fig. 18 SDS-PAGE de pepsina en todas las condiciones de pH mencionadas antes. El carril 1 corresponde al marcador de pesos moleculares de 6,5000-66,000 Da, el carril 2 es la pepsina en pH 7, el carril 3 es la pepsina en pH 4, el carril 4 es la pepsina en pH 7 y dialisada en pH 4 y el carril 5 es la pepsina en pH 4 y dialisada en pH 7. En pH 7 se observan bandas discretas, siendo la predominante la de peso molecular de alrededor de 35 kDa. En pH 4 se observan bandas discretas, siendo más abundantes las de peso molecular de alrededor de 10 y 5 kDa. En la muestra concentrada en pH 7 y dialisada contra pH 4 se observan bandas discretas, siendo la predominante la de 35 kDa. En la muestra de pH 4 y dialisada en pH 7 se observan bandas discretas en proporciones similares las de 35 y 10 kDa y en menor proporción la de 5 kDa.

8.3 Ensayos de actividad enzimática.

El máximo de actividad de la pepsina se da a pH 2, mientras a pHs mayores la actividad de la pepsina es menor, ya que sólo un aumento de media unidad de pH provoca una disminución al 37.6% de actividad, y a pH 8 la actividad es de 0%. En los experimentos de recuperación de actividad se observa que la pepsina tiene una cierta actividad (ver Fig. 19).

La repetición de los experimentos confirma que el aumento del pH causa la inactivación de la pepsina, en contraste, muestra que la recuperación de actividad es menor que la mostrada en los resultados de los experimentos descritos en el párrafo anterior, y con un aparente paralelismo a la actividad en función del pH, sin embargo, la pepsina tiene una actividad significativa tras estar un tiempo en pH 5 (60 % de la actividad original) (ver Fig. 20).

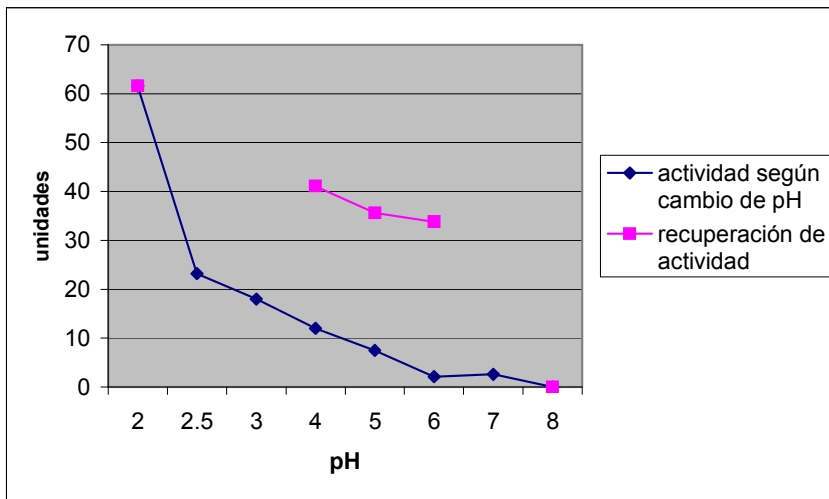


Fig. 20 Actividad de la pepsina en función del pH. La actividad óptima de la pepsina es máxima en pH 2, con un decaimiento exponencial de la actividad conforme aumenta el pH. La recuperación de actividad es importante. Una unidad produce 0.01 de absorbancia a 280 nm.

En el experimento para evaluar la inhibición de ShPI-I sobre la pepsina se obtuvieron los siguientes datos de la actividad de pepsina:

Pepsina sola	79.31 unidades
Pepsina + ShPI-I	30.1 unidades

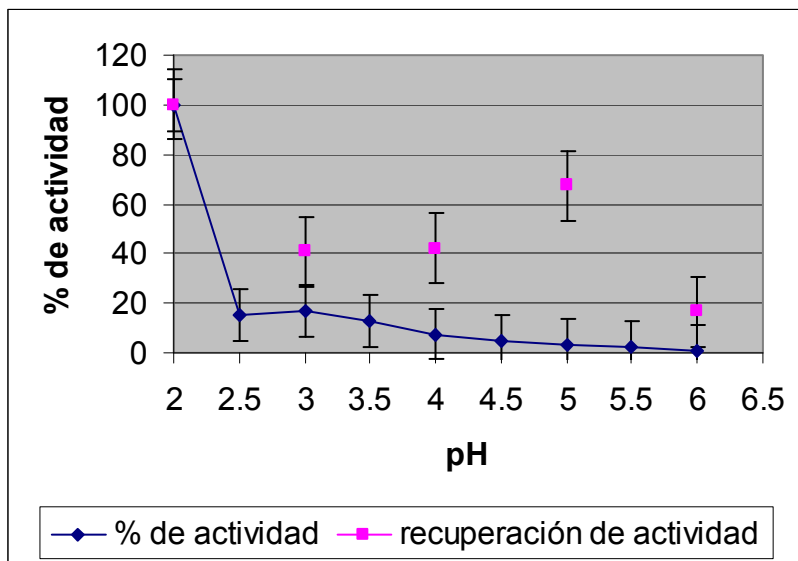


Fig. 20 Actividad de la pepsina en función del pH (repetición). Se corrobora que el 100% de actividad se presenta alrededor de pH 2, y que la actividad decae al aumentar el pH. En contraste, la recuperación de actividad no es tan importante, y aparentemente paralela a la actividad en función del pH, aunque es notable que a pH 5 se recupera un 60% de la actividad.

Se obtuvo una inhibición del 40% sobre la actividad de pepsina en la repetición de éste experimento.

8.4 Resonancia superficial de plamones (SPR).

Se observa un corrimiento de la línea base (ver Fig. 21). La interacción entre la pepsina y ShPI-I mostró una respuesta de 20 unidades de resonancia (RUs), que equivalen a 20 picogramos durante la asociación, y al final de la inyección, la diferencia de resonancia con respecto a la línea base quedó en 10 RUs a causa de la disociación. Hay una asociación rápida ($k_a = 1.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) y una disociación lenta ($k_d = 4.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), calculadas con BIAevaluation 3.1 (ver Fig. 22).

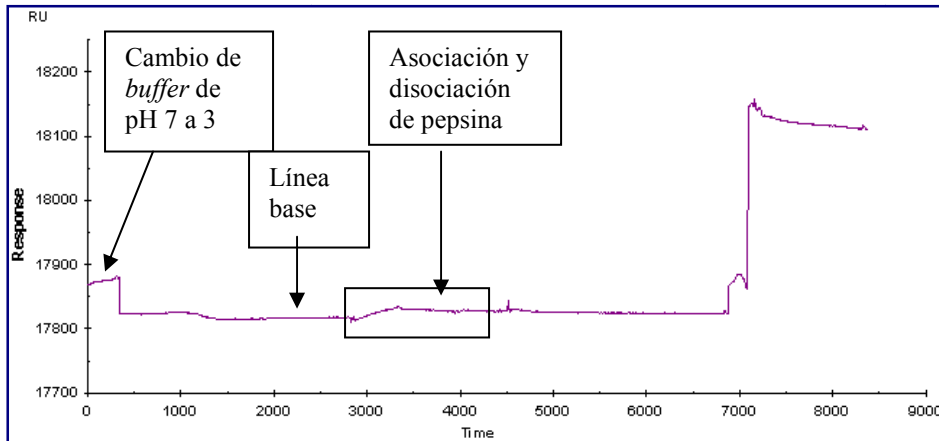


Fig. 21 Sensograma de la inyección de pepsina a una concentración de 0.1 nM en pH 3. Hay un corrimiento de la línea base.

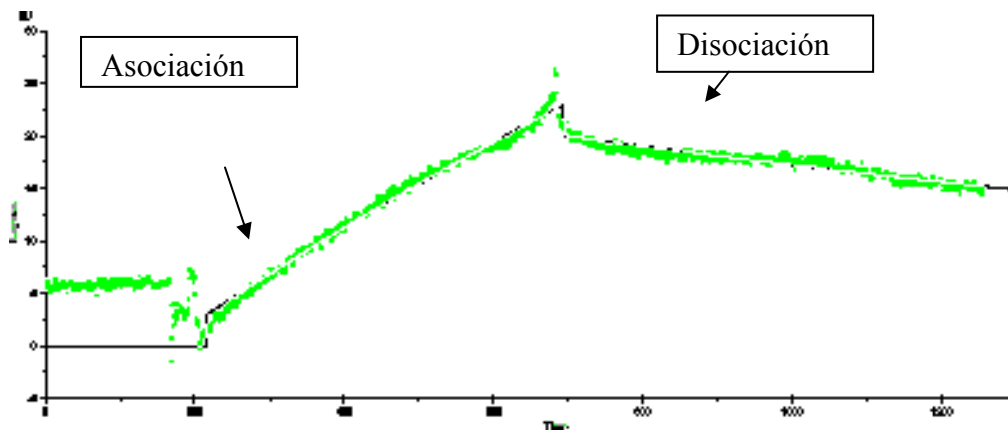


Fig. 22 Cinética. El sensograma muestra el ajuste cinético de los datos obtenidos por RSP mediante el programa BIAevaluation 3.1. En la curva se observan los cambios a nivel de asociación y disociación.

9.0 CONCLUSIONES.

9.1 Cromatografía de tamiz molecular.

Se observan dos fenómenos involucrados en el comportamiento cromatográfico de la pepsina según varía el pH: el corrimiento del pico de la pepsina hacia la derecha conforme aumenta el pH puede indicar que hay una interacción con la columna, y que ésta involucra la compactación del volumen hidrodinámico, por lo que se ocultarían algunos residuos, en especial los aminoácidos aromáticos, como lo es el triptofano, que ocurre en 5 ocasiones en toda la secuencia de la pepsina, y con ello se reduciría la absorbancia, si se oculta uno, se reduce la absorbancia en un 20%. La disminución en la absorbancia y el pequeño corrimiento del pico de la pepsina en la tercera corrida hacia la derecha son atribuibles a que entre la segunda y la tercera corrida hubo un reempacamiento de la columna. La inversión del sentido en el corrimiento en la pepsina eluída en pH 7, que aparece a la izquierda de las demás indica un evento de dimerización de la pepsina, es decir, la presencia de moléculas de pepsina unidas covalentemente (ver Fig. 12), que podría saberse esto con un montaje de un gel nativo.

El corrimiento del pico de la pepsina a pH 3 hacia la izquierda en la corrida de pepsina e inhibidor en relación al pico de la corrida de la solución de pepsina sin inhibidor, indicando la formación del complejo pepsina-ShPI-I. El pequeño corrimiento de toda la curva hacia la derecha y la disminución en la absorbancia en la repetición de éste experimento son atribuibles a que entre esas corridas tuvo lugar un reempacamiento de la columna (ver Fig. 13).

El complejo formado en pH 3 es disociado sólo por el cambio de pH cuando el concentrado se disolvió en pH 4.5 y se inyectó en otra corrida a ese pH, y la pepsina y el inhibidor tienen los mismos tiempos de retención comparándolos con las corridas en donde soluciones sólo contienen a uno, indicando que la interacción de pepsina y ShPI-I para formar el complejo sólo se da en un intervalo de pH ácido (ver Fig. 14).

9.2 Electroforesis en gel desnaturalizante SDS-PAGE.

La banda de péptido más común es la de aproximadamente 35 kDa, que indica que se trata de pepsina, las otras bandas de menor peso molecular bien definidas son fragmentos de proteína producto de la autoproteólisis de la pepsina, que reafirman las referencias de ser una proteasa con preferencia por sitios de corte muy específicos.

La pepsina tiene una cierta actividad a pH 4, aunque no es del 100% (ver Fig. 15, carril 2 y Fig. 18, carril 3), mientras a pH 7 la actividad es casi inexistente (ver Fig. 16, carril 3, Fig. 17, carril 2 y Fig. 18, carril 2). El cambio de pH 7 a 4 promovió una cierta recuperación de la actividad, aunque no total (ver Fig. 16, carril 2) y de una forma no reproducible (ver Fig. 18, carril 4). La pepsina mostró una actividad autoproteolítica sólo en el tiempo que estuvo en la columna de cromatografía en la corrida de pH 4, ya que se observan productos de proteólisis aún con el cambio a pH 7 (ver Fig. 17, carril 1 y Fig. 18, carril 5).

9.3 Ensayos de actividad enzimática.

La primera serie de experimentos confirma que el máximo de actividad de la pepsina se da a pH 2, y que a medida que aumenta el pH la actividad de la pepsina baja considerablemente, siendo totalmente inactiva en pH 8, dicha pérdida de actividad se explica por una afectación al mecanismo catalítico. En los experimentos de recuperación de actividad se observa que la pepsina es capaz de recuperar en un grado importante la actividad a causa del cambio a pH 2 (ver Fig. 19).

La segunda serie de experimentos reafirma que el aumento del pH causa la inactivación de la pepsina, en contraste, muestra que la recuperación de actividad es menor que la mostrada en los experimentos anteriores, aparentemente paralela a la actividad según el cambio de pH, y a pH 5 la pepsina recupera actividad de manera importante (ver Fig. 20).

La pérdida de actividad no está involucrada con una desnaturalización considerable, y sí con la afectación del mecanismo catalítico en que se realizaron los ensayos de actividad, ya que como se mencionó anteriormente, es necesaria la protonación de un residuo de ácido aspártico y la desprotonación del otro residuo de ácido aspártico en el sitio activo, lo que sucede en el intervalo de 1 a 5 de pH, así como la existencia en pHs medianamente ácidos de una conformación similar a la nativa dominante, aunque catalíticamente inactiva.

La adición de ShPI-I provocó una inhibición de alrededor del 50% sobre la actividad de la pepsina en condiciones óptimas de actividad y en concentraciones equimolares.

9.4 Resonancia superficial de plamones (SPR).

Se inyectaron 100 μ L la pepsina a una concentración de 0.1 nM, dado que la pepsina tiene un peso molecular aproximado de 34,500 Da:

$$0.1 \text{ nM} = 0.1 \times 10^{-9} \text{ M} = 1 \times 10^{-10} \text{ moles/L}$$

$$100 \text{ }\mu\text{L} = 0.1 \text{ mL} = 1 \times 10^{-4} \text{ L}$$

$$34,500 \text{ Da} \approx 34,500 \text{ g/mol de proteína}$$

$$1 \times 10^{-10} \text{ moles/L} \times 1 \times 10^{-4} \text{ L} = 1 \times 10^{-14} \text{ moles} \times 34,500 \text{ g/mol} = 0.345 \text{ ng} = 345 \text{ pg}$$

345 picogramos son comparables con 20 picogramos, que fue la respuesta de asociación de pepsina a ShPI-I, aunque el rendimiento fue muy poco, debido quizá a que la recuperación de actividad de la pepsina es muy poca cuando es incubada en un pH mucho mayor que 2 (ver Fig. 21).

El corrimiento de la línea base es debido a un cambio en la solución *buffer* usada, de pH 7 a 3, indicando un cambio de refracción por el medio. La pequeña fluctuación de la repuesta justo antes de la inyección es debida a la presencia de dos burbujas de aire al frente de la muestra que sirven para marcar y separar el flujo de la muestra inyectada con proteína del que no la lleva. El corrimiento de la línea base del ajuste con respecto a la experimental, es debido a que el programa pone la línea base de ajuste en el tiempo cero de la asociación. La asociación rápida ($k_a = 1.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$) y una disociación lenta ($k_d = 4.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), indican que es un reconocimiento específico con una débil interacción en concentraciones muy por debajo de la saturación, estando en el límite de la sensibilidad (ver Fig. 22).

9.4.1 Estimación de la constante de disociación del complejo pepsina-ShPI-I en el experimento de Resonancia Superficial de Plasmones (SPR).

Se obtuvo un valor para la constante de inhibición calculada por el equipo de resonancia superficial de plasmones de $3.3 \times 10^{-9} \text{ M}$, recordando que este método es muy preciso, por ser altamente sensible y poder calcular constantes picomolares de disociación.

10.0 CONCLUSIONES GENERALES.

La pepsina tiene inhibición con el aumento de pH, ya que como todas las proteasas aspárticas tienen sus máximos de actividad en pHs ácidos, y una relación inversamente proporcional del pH contra la actividad, siendo esta nula a pH 8.

La recuperación de la actividad es no reproducible y no es total, particularmente en pH 5 se recupera de la actividad en un grado importante. La formación del complejo de pepsina y ShPI-I sólo se da en un intervalo de pH y en donde la pepsina conserva la actividad de manera importante, ya que el cambio de pH de 3 a 4.5 provoca la disociación del complejo, y si bien, el complejo es formado, y la interacción es específica, y no es muy fuerte, cumpliendo con los objetivos particulares y con el objetivo general.

El valor de la constante de inhibición obtenido por el equipo de resonancia superficial de plasmones es de $K_i = 3.3 \times 10^{-9}$ M y aporta una idea cuantitativa sobre qué tan afín es el inhibidor para la pepsina, si bien Delfín y colaboradores reportaron inhibición de ShPI-I sobre proteasas serínicas, cisteínicas (tiolproteasas) y aspárticas, no han propuesto qué tipo de inhibición tiene (Delfín *et al.*, 1996).

No es posible obtener una muestra proteica del complejo para cristalizar y después determinar su estructura, ya que en éste caso la muestra es heterogénea, es decir, se encuentran la pepsina, ShPI-I y el complejo en solución, y considerando que el valor la K_i , está en el orden de 10^{-9} , apoya la idea de que ShPI-I no es un buen inhibidor de pepsina, ya que una inhibición está en el orden de 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , por lo que se encuentra hasta tres órdenes de magnitud por arriba de los valores para un buen inhibidor, rechazando así la hipótesis propuesta.

Sería necesario aumentar mucho la concentración de ambas proteínas para volcar el equilibrio hacia la formación del complejo.

Como aportación del presente trabajo se desprende que es posible obtener un inhibidor proteico con mayor afinidad sobre pepsina, como modelo de proteasas aspárticas por diseño racional de proteínas a partir de ShPI-I, haciendo posible la migración hacia la inhibición específica de pepsina, y que además pueda estudiarse estructuralmente. También es conveniente hacer un modelo de interacción *in silico* entre pepsina y ShPI-I para dar una idea de los aminoácidos que participan diferencialmente en la formación del complejo, y entonces hacer el diseño sobre un número relativamente pequeño de aminoácidos.

En caso de que el inhibidor hubiera tenido un efecto significativo sobre pepsina, y

considerando que el complejo se forma en pH 3, sería necesario montar un *kit* de cristalización propio, ya que el pH más bajo de los *kits* comerciales es de 4, con lo que se hubiera complicado sobremanera el cumplir con la obtención de un cristal del complejo.

11.0 BIBLIOGRAFÍA.

Abu-Erreish G. M. and Peanasky R. J.; Pepsin Inhibitors from *Ascaris lumbricoides*: Pepsin-Inhibitor Complex: stoichiometry of formation, dissociation, and stability of the complex; J. Biol. Chem.; 249(5):1566-71, 1974.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.; Molecular biology of the cell; 4th ed.; Garland Pub.; New York; 2002.

Amersham Pharmacia Biotech; Gel filtration: Principles and methods, 8th ed.; Uppsala, Suecia, 1998.

Antuch, W., Berndt, K. D., Chavez, M. A., Delfin, J., Wuthrich K.; The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*.; Eur. J. Biochem.; 212(3):675-84; 1993.

Bairoch A.; The ENZYME database in 2000; Nucleic Acids Res.; 28:304-305; 2000.

Barrett, A. J., Tolle, D. P., Rawlings, N. D.; Managing peptidases in the genomic era; Biol Chem.; 384(6):873-82; 2003.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., and Clarke, N. D.; Biochemistry; 5th ed.; W.H. Freeman & Company; New York; 2002.

Berman, H. M. and Bourne, P. E.; Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) consortium; Protein Data Bank (PDB); [Base de datos en línea] Feb. 1993 URL <http://www.rcsb.org/pdb/> [Consulta: 5 de octubre de 2005] [Actualización: 3 de Julio de 2007].

Beynon, R. and Bond, J. S.; Proteolytic enzymes, A practical approach; 2nd ed.; Oxford University Press; Oxford; 2001.

Campos, L. A., and Sancho J.; The active site of pepsin is formed in the intermediate conformation dominant at mildly acidic pH; FEBS Letters; 2003.

Clarke S. D. and Abraham, S.; Gene expression: Nutrient control of pre- and posttranscriptional events; FASEB J. 6: 3146-3152; 1992.

Coates L, Erskine P.T., Mall S., Gill R., Wood S. P., Myles D. A., and Cooper J. B.; X-ray, neutron and NMR studies of the catalytic mechanism of aspartic proteinases; Eur. Biophys. J.; 35(7):559-66; 2006.

Cooper, J. B., Khan, G., Taylor, G., Tickle, I. J., and Blundell, T. L.; X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution.; J. Mol. Biol.; (214); 199-222, 1990.

Dash C., Phadtare S., Deshpande V., and Rao M.; Structural and mechanistic insight into the inhibition of aspartic proteases by a slow-tight binding inhibitor from an extremophilic *Bacillus* sp.: correlation of the kinetic parameters with the inhibitor induced conformational changes; Biochemistry; 40(38):11525-32; 2001.

Delfín J., Martínez I., Antuch W., Morera V., González Y., Rodríguez R., Márquez M., Saroyan A., Larionova N., Díaz J., Padrón G., and Chávez M.; Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*; Toxicon; 34(11-12):1367-76; 1996.

Fujinaga, M., Chernai, M. M., Tarasova, N. I., Mosimann, S. C., James, M. N.; Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin.; Protein Sci.;4(5):960-72; 1995.

Harper, H. A., Rodwell, V. W., Mayes, P. A. y autores asociados; Manual de Química Fisiológica; 6ª ed.; El manual moderno; México; 1978.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB); ENZYME database; [Base de datos en línea] July 1999 URL <http://www.expasy.org/enzyme> [Consulta: 5 de octubre de 2005] [Actualización: 26 de junio de 2007].

Knowles, J. R., On the Mechanism of Action of Pepsin, A Discussion on the Structures and Functions of Proteolytic Enzymes, Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 257(813), 135-146, 1970.

Kuby, S. A.; A study of enzymes, v. 1 Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding; CRC Press; New York; 1990.

Kumar, A. Rao, M.; Biochemical characterization of a low molecular weight aspartic protease inhibitor from thermo-tolerant *Bacillus licheniformis*: Kinetic interactions with Pepsin; Biochim. Biophys. Acta.; 1760(12):1845-1856; 2006.

Lazure, C.; The peptidase zymogen proregions: nature's way of preventing undesired activation and proteolysis.; Curr. Pharm. Des.; 8(7):511-31. Review; 2002.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; Nature; 277: 680–685, 1970.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.; Molecular Cell Biology; 4th ed.; W. H. Freeman & Company; New York; 2000.

Ma, B., Kumar, S., Tsai, C.J., Hu, Z., Nussinov, R.; Transition-state ensemble in enzyme catalysis: possibility, reality, or necessity?; J Theor Biol.; 203(4):383-97; 2000.

Malik, A., Rudolph, R., Sohling, B.; Use of enhanced green fluorescent protein to determine pepsin at high sensitivity; Anal. Biochem., 340(2):252-8; 2005.

Marcinkeviciene J., Kopcho L. M., Yang T., Copeland R. A., Glass B. M., Combs A. P., Falahatpisheh N., Thompson L.; Novel inhibition of porcine pepsin by a substituted piperidine. Preference for one of the enzyme conformers; *Biol. Chem.* ; 277(32):28677-82; 2002.

Northrop, J.H.; Crystallization of pepsin from alcohol; *The Journal of General Physiology*, (30), 177-184, 1946.

Park C, and Marqusee S.; Pulse proteolysis: a simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding; *Nat. Methods*; 2(3):207-12; 2005.

Pearl L. H.; The catalytic mechanism of aspartic proteinases.; *FEBS Lett.*; 214(1):8-12; 1987.

Pearson, J. P., Roberts, N. B.; Mucosal protective effects of ecabet sodium: pepsin inhibition and interaction with mucus; *Clin. Sci. (Lond.)*; 100(4):411-7; 2001.

Rawlings, N. D., Barrett, A. J.; Peptidases, families, and clans; Evolutionary families of peptidases.; *Biochem J.*; 290(Pt 1): 205–218, 1993.

Rodríguez, E.; Selección y caracterización de fagoanticuerpos contra melitina por resonancia de plasmones superficiales; Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias; UNAM; México; 2007.

Rudino-Pinera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S. P., Horjales, E.; Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase; *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58 10-20, 2002.

Schramm, V. L.; Enzymatic transition states and transition state analogues.; *Curr. Opin. Struct. Biol.*; 15(6):604-13; 2005.

Sharma, A., Eapen, A., Subbarao, S. K., Parasite Killing in *Plasmodium vivax* Malaria by Nitric Oxide: Implication of Aspartic Protease Inhibition; J. Biochem., 136(3); 329-334; 2004.

Sielecki, A. R., Fujinaga, M., Read R. J., James M. N.; Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8 Å resolution.; J Mol Biol.; 219(4):671-92; 1991.

Silverman, R. B.; The organic chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions; Academic Press; 2000.

Stefani, F. D.; Técnicas basadas en la resonancia de plasmones superficiales. Detección y estudio de reacciones de hibridización de ADN en superficies; Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de General San Martín, República Argentina, 2001.

Stroud, R. M., Kossiakoff, A. A., Chambers, J. L.; Mechanism of zymogen activation; Annu. Rev. Biophys. Bioeng.; 6; 177-193; 1977.

Tang, J., James, M. N., Hsu, I. N., Jenkins, J. A., Blundell, T. L.; Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases; Nature; 271(5646):618-21; 1978.

Thomas, D. J., Richards, A. D. and Kay J.; Inhibition of aspartic proteinases by alpha 2-macroglobulin; Biochem J.; 259(3): 905-907; 1989.

van der Merwe P. A., Surface Plasmon Resonance in Protein-Ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry; edited by Harding, S. and Chowdhry, P. Z.; Practical Approach series, Oxford University Press; pp.137-170; 2001.

Varón, R., García-Moreno, M., Valera-Ruiperez, D., García-Molina, F., García-Canovas F., Ladrón de Guevara, R. G., Masia-Perez, J., Havsteen, B. H.; Kinetic analysis of a general model of activation of aspartic proteinase zymogens.; J Theor Biol.; 242(3): 743-54. 2006.