



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN
DE SULFIDRIL OXIDASAS Y SU IDENTIFICACIÓN
EN EL LÍQUIDO SEMINAL DE RATAS
MACHO JÓVENES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
JUAN CARLOS MOCTEZUMA GUEVARA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez
Secretario	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Vocal	Dr. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña
1er Suplente	M. en C. Teresa Neri Gómez
2do Suplente	Dra. Aliesha Araceli González Arenas

Laboratorio de Biología de la Reproducción,
L- 206 Edificio F, Facultad de Química, UNAM.

Asesor:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Supervisora:

Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

Sustentante:

Juan Carlos Moctezuma Guevara

DEDICATORIA

A mis padres José Luis y Patricia, por su incondicional apoyo, consejos, alegrías, regaños y por todo aquello que contribuyó a mi formación. Sin ustedes hubiese sido más difícil. ¡Gracias por tener ese gran corazón!

A mis hermanos José Luis y Francisco Javier, que a pesar de los momentos difíciles permanecemos unidos.

A mi tío Mariano por el gran apoyo brindado para la realización de ésta tesis, gracias por tus consejos y sobre todo ese carácter tan especial que tienes.

A mis tías Maria Eugenia y Elsa, gracias por todo el apoyo y cariño brindado tanto para mí como para mis padres y hermanos.

Al Dr. Marco Cerbón, por su valiosa orientación durante la realización de mi trabajo en el laboratorio, su amistad, su incondicional apoyo y su tiempo.

A los compañeros del laboratorio 206, sobre todo a aquellos me apoyaron con el trabajo experimental de ésta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la Facultad de Química por todo el conocimiento y valores que me inculcaron.

ÍNDICE

TEMAS	PÁGINA
1.- RESÚMEN -----	5
2.- INTRODUCCIÓN -----	6
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	21
4.- OBJETIVOS -----	22
5.- PROCEDIMIENTO -----	23
6.- RESULTADOS -----	27
7.- CONCLUSIONES -----	33
8.- ANEXOS -----	34
9.- REFERENCIAS -----	43

1.- RESÚMEN

Las enzimas son moléculas que están involucradas en todos los procesos metabólicos que se llevan a cabo en la célula, como por ejemplo: el ciclo de Krebs, la glucólisis, la gluconeogénesis y la fotosíntesis entre otros, por ello su presencia es fundamental para el correcto funcionamiento de la misma, además de que forman parte de su estructura ya que se localizan tanto en la membrana como en el citoplasma.

El proceso reproductivo de los mamíferos requiere de múltiples enzimas en todos sus pasos, que van desde los procesos de síntesis de hormonas sexuales, hasta los procesos de diferenciación y división celular, maduración y expulsión de gametos, el proceso de fertilización, la implantación y el crecimiento del feto.

En nuestro laboratorio estudiamos la composición del líquido producido por las vesículas seminales de rata y detectamos a las sulfidril oxidasas, las cuales se sabe son indispensables para la maduración y la supervivencia de los espermatozoides, así como para el proceso de fertilización debido a su capacidad de producir puentes disulfuro.

Lo anterior se menciona para dar una idea general de la diversidad de éstas moléculas y del enorme campo de estudio que podemos aplicar.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1 Aparato reproductor masculino

El tracto reproductivo del macho tiene como principal función mantener la continuidad de la especie, consta de una serie de órganos y glándulas auxiliares las cuales se mencionan a continuación:

Los testículos que son dos glándulas ovoides, localizadas en el escroto por debajo y a cada lado del pene, miden aproximadamente 5 cm de largo, 2.5 cm de diámetro y su peso es de 10 a 15 gramos, sin embargo existen variaciones dependiendo de la raza y la edad del individuo. Los testículos están suspendidos dentro del escroto por el cordón espermático y entre sus principales funciones están la de producir espermatozoides y las hormonas sexuales masculinas o andrógenos.

En el interior de cada testículo, los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos, formados por dos tipos de células: las espermatogénicas que dan lugar a los espermatozoides y las de Sertoli encargadas del mantenimiento de la espermatogénesis. En el espacio que separa a los túbulos seminíferos se encuentran las células de Leyding cuya función es la producción de la testosterona. ⁽³⁷⁾

Los túbulos seminíferos se unen para formar una red de canales que recibe el nombre de rete testis. Pequeños conductos conectan la rete testis con el epidídimo, el cual consiste de dos estructuras con forma de coma de unos 4 cm de longitud, cada una de las cuales se encuentra adosada a las superficies superior y posterior de cada testículo, su

función es la maduración de los espermatozoides y el transporte del esperma hacia el conducto eyaculador para su expulsión hacia la uretra.

La próstata es una glándula accesoria del sistema reproductor masculino con un tamaño similar al de una pelota de golf, la cual crece lentamente desde el nacimiento hasta la pubertad, luego se expande hasta los 30 años y permanece estable hasta los 45 años. En ella se produce el líquido prostático el cual es lechoso, levemente ácido debido a que contiene ácido cítrico, enzimas proteolíticas y sustancias antibióticas que contribuyen a disminuir el crecimiento de bacterias en el semen. ^(37,1)

El pene es el órgano de la copulación en el hombre. Sirve de salida común para la orina y el semen. Consiste en un cuerpo compuesto por tres cuerpos de tejido cavernoso eréctil y una raíz, que es la encargada de la sujeción del pene y contiene dos pilares que se insertan en el a cada lado del arco púbico. En la punta del pene el cuerpo esponjoso forma el glande que cubre los extremos libres de los cuerpos cavernosos. Cerca del extremo final del glande se encuentra el orificio externo de la uretra. La piel y las fascias del pene se prolongan como una doble capa de piel dando lugar al prepucio, que cubre el glande en una extensión variable.⁽³⁷⁾

2.2.- Las Vesículas seminales

Las vesículas o glándulas seminales son el interés de este estudio ya que son las productoras de una sección del líquido seminal, llamado líquido de vesículas seminales, el

cual es una secreción espesa que constituye el 60% del volumen total eyaculado, que se mezcla con el espermatozoides a medida que pasa por los conductos eyaculadores.

Las vesículas seminales están situadas en la excavación pélvica, detrás de la vejiga urinaria, delante del recto e inmediatamente por encima de la base de la próstata con la cual están unidas por su extremo inferior. El conducto de la vesícula seminal y el conducto deferente forman el conducto eyaculador, que desemboca en la uretra prostática. (figura 1)

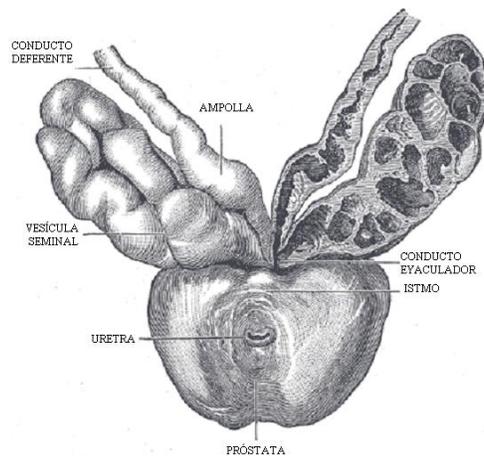


Figura1. Esquema de las vesículas seminales.

Cada vesícula seminal es un túbulo lobulado, revestido por epitelio pseudo estratificado que secreta un material mucoso rico en fructosa y otras sustancias nutritivas, así como grandes cantidades de prostaglandinas y fibrinógenos. Durante el proceso de emisión y eyaculación, cada vesícula seminal vacía su contenido al conducto eyaculador, poco tiempo después de que el conducto deferente vacíe los espermatozoides. ⁽⁴¹⁾

En las vesículas seminales se distinguen 3 capas: la mucosa, constituida por numerosos pliegues primarios y secundarios, que se proyectan hacia el lumen glandular; una túnica media, formada por tejido muscular liso de disposición plexiforme y fibras colágenas que penetran en la lámina propia de los pliegues de la mucosa y una túnica externa o serosa. ⁽⁴¹⁾

2.3.- Líquido seminal

El semen consiste de dos componentes: los espermatozoides que están presentes en una cantidad aproximada de 100 millones por mL y el líquido seminal el cual se forma a partir de la secreción de los tejidos sexuales accesorios. En un volumen eyaculado promedio de 5 mL, la principal contribución al plasma seminal proviene de las vesículas seminales con aproximadamente 2.5 mL, de la próstata proviene alrededor de 1.5 mL, 0.5 mL de la glándula de Cowper y 0.5 mL de las glándulas de Littre. ^(1, 22)

El líquido seminal (figura 2), es un líquido de consistencia mucoide el cual puede ser translucido y en ocasiones presenta una coloración amarilla debida a la presencia de flavina (FAD). Tiene un pH de 7.5, está compuesto principalmente por aminoácidos, fósforo, prostaglandinas, ácido cítrico, fosfatasa alcalina, calcio, sodio, zinc y potasio. Entre sus principales funciones se encuentran la de proporcionar un medio energético a los espermatozoides por medio de la fructosa, la cual activa el movimiento vigoroso de los mismos después de la eyaculación, proporcionando así la energía necesaria para llegar a los órganos reproductores femeninos. ^(1, 22, 41)



Figura 2. Muestra de líquido seminal, la coloración amarilla es debida a la presencia de FAD.

El líquido seminal comienza a producirse a partir de la pubertad y tiene las características del adulto a partir de los 12 a los 14 años. La cantidad producida aumenta con la edad hasta un nivel máximo que depende de cada individuo que luego disminuye a medida que el varón envejece, no obstante, se produce durante toda la vida adulta del varón. ⁽⁴¹⁾

2.3.1.- Líquido de las vesículas seminales

El líquido de las vesículas seminales es una secreción espesa y alcalina, formada principalmente por agua, proteínas, fructosa que es el principal soluto presente en dicho líquido (200mg/dL) y otros azúcares libres como glucosa, sorbitol, ribosa y fucosa los cuales en conjunto suman menos de 10 mg/dL y ácido cítrico. ⁽¹⁾

2.4.- Generalidades sobre Proteínas

Como todas las proteínas, las de las vesículas seminales tienen las características generales que describiremos brevemente ya que nos permitirá entender algunas de las particularidades de las sulfidril oxidasas.

Las proteínas son moléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos, las cuales desempeñan un papel fundamental para la vida por ello son las biomoléculas más versátiles y diversas que existen. Entre sus principales funciones destacan: estructural, inmunológica, enzimática, contráctil, homeostática, transducción de señales y protectora. De acuerdo con el acomodo de sus unidades básicas (aminoácidos) las proteínas presentan diferentes estructuras, las cuales se denominan:

a) Primaria, la cual está determinada por la secuencia de aminoácidos en la cadena proteica, es decir, es el número de aminoácidos presentes y el orden en que están enlazados por medio de enlaces peptídicos.

b) Secundaria: La estructura secundaria de las proteínas es el plegamiento regular local entre residuos de aminoácidos cercanos de la cadena polipeptídica. Se adopta gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de aminoácidos cercanos en la cadena, adoptando diferentes formas como son: alfa hélice y formas beta.

Con la formación de la estructura secundaria se da la formación de dominios, los cuales son las unidades funcionales y tridimensionales de un polipéptido, su número depende de la cantidad de aminoácidos presentes en la proteína.

c) Terciaria: La estructura terciaria se refiere al plegamiento de dominios y el arreglo final de los mismos en el polipéptido, es estabilizada por puentes disulfuro, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones iónicas.

Los puentes disulfuro (figura 3), son enlaces covalentes formados por dos grupos sulfhidrilo (-SH), cada uno de ellos perteneciente a una cisteína, los cuales se unen de manera covalente para formar un residuo de cistina. Los dos residuos que forman al puente, pueden estar separados por muchos aminoácidos en la secuencia o bien pueden pertenecer a diferentes cadenas polipeptídicas; el plegamiento de las cadenas polipeptídicas, lleva a los residuos de cisteína a estar muy próximos, lo que permite la formación del enlace disulfuro, la formación de este enlace estabiliza la estructura tridimensional de la proteína.

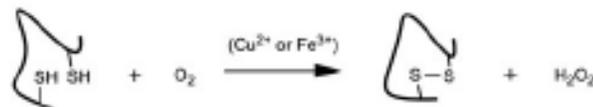


Figura 3. Reacción de formación de un puente disulfuro, en donde se utilizan cofactores y se libera peróxido de hidrógeno.

d) Estructura cuaternaria: Muchas proteínas consisten de una sola cadena polipeptídica, por ello se les denomina monómeros. Otras proteínas pueden estar formadas por dos o más cadenas polipeptídicas que pueden ser iguales o diferentes entre sí, cada una

de estas cadenas pueden plegarse para formar un oligómero y adquirir así su estructura cuaternaria. ⁽⁴⁾

2.5.- Enzimas

Las enzimas son proteínas generalmente globulares que pueden presentar tamaños muy variables, los cuales van desde 62 aminoácidos hasta los 2500 y su actividad esta determinada por su estructura tridimensional. Son moléculas muy específicas en el tipo de reacción que catalizan, los responsables de dicha especificidad son sus propiedades fisicoquímicas así como los sustratos.

Debido a que son moléculas de mayor tamaño que los sustratos sobre los que actúan solo una pequeña parte de la molécula esta directamente involucrada en la reacción que catalizan, la región encargada de catalizar la reacción se denomina centro activo, los cuales pueden utilizar cofactores para llevar a cabo sus reacciones y así aumentan o disminuyen la actividad de las mismas. ⁽⁴⁾

2.5.1.- Clasificación de las enzimas

La clasificación y los nombres de las enzimas suelen derivarse del sustrato o de la reacción química que catalizan, con la palabra terminada en *-asa*. De acuerdo a su función la clasificación es la siguiente: Transferasas, las cuales se encargan de transferir grupos activos a otras sustancias receptoras, hidrolasas, éstas catalizan reacciones de hidrólisis, liasas, son aquellas que catalizan reacciones en donde se libera H_2O , CO_2 y NH_3 , para así formar dobles enlaces; isomerasas, actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de

ellas sus isómeros funcionales, ligasas, se encargan de degradar o sintetizar enlaces fuertes mediante el acoplamiento a moléculas de alto valor energético, oxidorreductasas, las cuales se encargan de catalizar reacciones de oxidorreducción o redox y precisan la colaboración de las coenzimas de oxidorreducción como son: nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+ en su forma oxidada y NADH en su forma reducida) , nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+ en su forma oxidada y NADPH en su forma reducida) y flavín adenin dinucleótido (FAD en su forma oxidada y FADH en su forma reducida) que aceptan o ceden los electrones correspondientes.⁽⁴⁾

2.6.- Sulfidril oxidasas

Es un monómero de 66 KDa formado por 570 aminoácidos, que pertenece a la familia de las oxidorreductasas; su función principal es la generación de puentes disulfuro, debido a que son capaces de oxidar el grupo funcional tiol (R-SH)^(32, 33). Están ligadas a FAD (FAD es una base heterocíclica nitrogenada, la cual es capaz de reducirse y así intervenir en una gran cantidad de reacciones de óxido reducción) por lo que se asocian con la generación de peróxido de hidrógeno intracelular.^(8, 13, 29, 44)

2.6.1.- Descubrimiento de las sulfidril oxidasas

La familia de la Quiescin – sulfidril oxidasas fue descubierta por el Dr. *Ostrowski y col* en el año de 1979, cuando investigando las secreciones de vesículas seminales de rata notaron un contaminante color amarillo debido a la presencia de FAD en la muestra. Posteriormente fueron identificadas en el huevo de gallina blanca, en el cual se encontraron pequeñas cantidades de FAD y abundante riboflavina la cual es fundamental en el

desarrollo embrionario. FAD posee funciones como cofactor activador redox y por ello la atención se centró en la identificación de las sulfidril oxidasas por su posible función enzimática. ^(32,33)

Se purificaron por primera vez por *Takamori y col* ⁽⁴⁴⁾ y se clasificaron como oxidasas cobre dependiente ⁽⁴⁷⁾, posteriormente *Hooper y col* encontraron que la reducción de la flavoproteína de huevo con hidrosulfito de sodio produce una banda de transferencia de carga, al igual que la observada con una serie de flavina vinculados a piridina nucleótido-disulfuro oxidorreductasas⁽¹⁸⁾, lo que sugiere que la enzima de huevo tiene un cofactor FAD con sitios superpuestos redox-activos con disulfuro y esto llevó a la identificación de la proteína como una sulfidril oxidasa dependiente de FAD, además se identificaron una serie de péptidos de la oxidasa de clara de huevo que mostraron una homología con dichas proteínas lo cual derivó con su identificación como factores de crecimiento ⁽¹⁷⁾.

Posteriormente se purificó un segundo inhibidor sulfidril por *Kiermer Petz y col* ⁽²⁵⁾ a partir de la leche fresca de vaca, el cual despertó un gran interés para las industrias de bebidas y alimentos debido a que contrarresta el sabor desagradable que se produce en la pasteurización a temperatura ultra-alta ⁽⁴⁰⁾. Esta enzima fue designada como una oxidasa hierro dependiente ⁽²³⁾.

Las sulfidril oxidasas han sido aisladas de la fracción prostática del líquido seminal de rata y los estudios reflejan que tienen gran actividad en el tracto reproductivo, por ejemplo, se sabe que esta proteína es fundamental para el funcionamiento adecuado del

líquido seminal. Esta actividad se había sugerido por *Chang y Morton* para desempeñar un papel homeostático en los grupos tiol/disulfuro presentes en el semen ⁽¹¹⁾, 25 años después esta flavoenzima, enmascarada como un inhibidor de la cisteína proteasa fue encontrada por *Benayoun y col* la cual se homóloga con el factor de crecimiento humano llamado Quiescin Q6 ⁽³⁾.

En 1999 se llevaron a cabo estudios en el factor de crecimiento del hueso, el factor de crecimiento de las células inhibitoras y Quiescin Q6, por *Coppock y col*, quienes demostraron que las sulfidril oxidasas son secretadas a partir de fibroblastos humanos cuando se acercan a la confluencia. ^(6, 7, 17)

Las oxidasas de las vesículas seminales y la clara de huevo representan los miembros fundadores de la familia Quiescin sulfidril oxidasas (QSOX) disulfuro dependientes de flavina, las cuales son enzimas multidominio que se encuentran ampliamente distribuidas tanto en eucariotas como en procariotas. ^(8, 16, 42, 43)

La importancia de las enzimas celulares QSOX es debido a su abundancia, su amplia distribución, gran capacidad y versatilidad catalítica ya que son moléculas generadoras de enlaces disulfuro. Otra característica muy peculiar de las enzimas ligadas a flavina es que están relacionadas con la generación de peróxido de hidrógeno intracelular. Es importante mencionar la generación de dicho compuesto ya que el radical superóxido produce estrés oxidativo. ^(8, 13, 29, 44)

2.6.2.- Síntesis de las sulfidril oxidasas

Son sintetizadas en el retículo endoplásmico, lugar donde la generación de puentes disulfuro se cataliza por cofactores en éste caso cobre o hierro ⁽³¹⁾. Sin la existencia de los iones metálicos necesarios la reacción entre el grupo funcional tiol y el oxígeno para la formación de disulfuros es muy lenta, debido al impedimento estérico que existe entre estos, el cual es eludido por la reducción de la flavina por el oxígeno, produciendo así el radical superóxido. Los factores que pueden catalizar la reacción son la presencia de tiol peroxidasas y peroxirredoxinas, los cuales aceleran la reacción por la combinación de sulfidril tiol oxidasa y peroxidasa respectivamente, en dichas reacciones se generan dos enlaces disulfuro por cada molécula de oxígeno que se consume. ⁽⁴⁵⁾

Otra molécula clave para la formación de las sulfidril oxidasas que obligan a las oxidorreductasas a conducir un plegamiento oxidativo de las proteínas son las quinonas, las cuales son las responsables de la formación de los enlaces disulfuro en especies que carecen de oxidorreductasas. ^(20, 24, 28)

El Ditioneitol (DTT) es un ditiol que puede ser sustrato de estas enzimas, debido a sus parámetros catalíticos, los cuales son similares a otros sustratos bien conocidos como son: glutatión, cisteína, RNAsa, lisozima y ribofosfatasa reducidas por citar algunos. Se sabe que estas enzimas pierden su estructura terciaria cuando se reducen y se liberan de las limitaciones estéricas de sus enlaces disulfuro, el ciclo catalítico de las sulfidril oxidasas se completa con la reducción del oxígeno y la formación de peróxido de hidrógeno. ⁽³⁶⁾

En resumen, todas las proteínas que pueden ser reducidas en su grupo funcional tiol son buenos sustratos de miembros de la familia QSOX.

2.6.3.- Estructura de las sulfidril oxidasas

En las sulfidril oxidasas (figura 4) han sido identificados cuatro dominios evidentes de los cuales dos son sitios activos redox (Trx1 y Trx2) cuya función es la reducción de grupos tiol, seguidos de una región de función desconocida rica en alfa hélices llamada HRR, que aparentemente solo se encuentra en miembros de dicha familia y es la región menos conservada en las secuencias identificadas de sulfidril oxidasas, el cuarto dominio representa el motor de la oxidación ya que conecta el segmento tiol – disulfuro con el oxígeno molecular a través de un cofactor. ^(15,16,18,19)



Figura 4. Estructura de sulfidril oxidasa donde se muestran los dominios presentes en la misma.

Quisecin Q6 presenta un dominio adicional denominado Erv/ALR el cual tiene una cisteína que interactúa directamente con FAD. Dicho dominio se ha identificado como factor de crecimiento y se ha demostrado que es esencial en la respiración. ⁽⁹⁾

2.6.4.- Funciones de las sulfidril oxidasas

Las sulfidril oxidasas son enzimas capaces de producir alrededor de 700 puentes disulfuro por minuto en proteínas blanco provocando así la activación de las mismas, por

ello las sulfidril oxidasas son abundantes en el pulmón, además de encontrarse altos niveles en una amplia gama de tejidos. *Wittke y col* ⁽⁴⁶⁾ han encontrado que son necesarias para mantener la integridad celular y así evitar la apoptosis.

Estas enzimas se acumulan en fluidos extracelulares, por esta razón podemos encontrarlas en fluidos secretados como la leche ⁽²¹⁾, semen ^(3,5,17,32), clara de huevo ^(17,18), las lágrimas ⁽³⁵⁾ y suero de la sangre ^(38,48). Además se han encontrado en el medio de crecimiento osteosarcoma de mama ⁽¹⁰⁾, así como en las células de cáncer de próstata ⁽³⁰⁾.

Como se mencionó anteriormente las sulfidril oxidasas generan radicales superóxido, la importancia de dichos radicales, es que además de producir estrés oxidativo, se cree que tienen una función antimicrobiana en fluidos luminales ^(8,32), además *Mairet – Coello y col* ⁽²⁷⁾ han sugerido que la formación de radicales es importante para la señalización del sistema nervioso.

2.6.5.- Las sulfidril oxidasas y su identificación en el líquido de las vesículas seminales

Actualmente se sabe que los factores seminales tienen diferentes funciones como son: actúan en el tracto reproductivo femenino para promover la supervivencia de los espermatozoides, condicionan la respuesta inmune femenina, participan durante el proceso de la fertilización y facilitan la implantación, por lo cual predisponen a un desarrollo normal del embrión.

Las proteínas presentes en el líquido de las vesículas seminales interactúan por medio de puentes disulfuro son enzimas que participan en la coagulación rápida del eyaculado. Entre las principales proteínas del líquido de las vesículas seminales están la seminogelinas y se ha demostrado que son blanco del antígeno prostático específico (PSA) que es una proteasa de serinas y que lisa enzimáticamente el coágulo a través de su actividad de proteasa.⁽³⁴⁾

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El líquido de las vesículas seminales de la rata aporta aproximadamente el 40% del contenido total del plasma seminal, además de que contiene un gran número de proteínas las cuales tienen diversas funciones como se mencionó anteriormente. Entre las proteínas que contiene el líquido de las vesículas seminales están presentes las sulfidril oxidasas. Estas enzimas son indispensables para la función del líquido seminal debido a su capacidad de formar puentes disulfuro, sin embargo, no se conoce de una manera detallada su función.

A pesar de que una gran cantidad de proteínas del líquido seminal provienen de éstas glándulas no se ha realizado una caracterización bioquímica exacta de las mismas en la rata.

En esta tesis describimos la estructura de las sulfidril oxidasas por medio de una caracterización bioquímica parcial a través de geles de poliacrilamida, seguida por un análisis de masas-masas en un secuenciador automatizado.

4.- OBJETIVOS

- 1.- La obtención de proteínas de líquido de las vesículas seminales de la rata.

- 2.- La identificación de las sulfidril oxidasas de líquido de las vesículas seminales por medio de la electroforesis en geles de poliacrilamida de una dimensión.

- 3.- La secuenciación de las sulfidril oxidasas, para así describir su estructura utilizando el método de espectrometría masas-masas.

- 4.- Comprobar que en el líquido de las vesículas seminales se encuentran las sulfidril oxidasas comparando la secuencias obtenidas con un banco de datos.

5.- PROCEDIMIENTO

5.1 Animales de experimentación

Para este proyecto se seleccionaron ratas macho jóvenes (2 meses de edad), en etapa reproductiva y fertilidad comprobada, cepa Wistar, con 250g de peso corporal aproximadamente, mantenidas bajo ciclos de 12 hr de luz / oscuridad , con comida y agua *ad libitum*.

5.2.- Obtención de líquido seminal de rata

Se sacrificaron por decapitación 2 ratas de la raza Wistar de 2 meses de edad y se realizó la disección de las vesículas seminales. (figura 5)

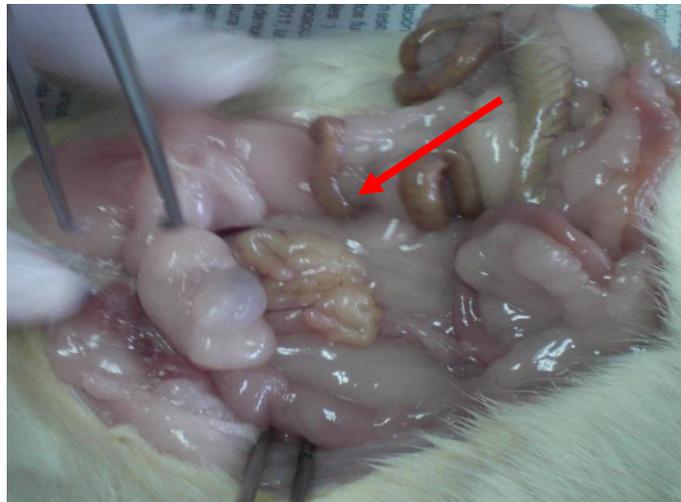


Figura 5. Localización de las vesículas seminales, la flecha indica la ubicación de las mismas.

Se vacía el contenido de la vesícula seminal por compresión suave de la misma, teniendo cuidado no perforar las glándulas coagulantes, en 500 μ L de agua desionizada y 100 μ L de inhibidor de proteasas (*Roche, Complete, protease inhibitor, tablets provided in easy pack*, cat No. 04693116001) previamente calentado a 37°C.

5.3.- Precipitación y cuantificación de proteínas.

Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético / acetona para remover sustancias que se encuentran en el líquido seminal, las cuales puedan interferir con la electroforesis. Una vez precipitadas las proteínas, fueron resuspendidas en 1 mL buffer de rehidratación y se dejaron rehidratar durante toda la noche. Las proteínas fueron cuantificadas por la técnica de Bradford. (Anexo I)⁽³⁹⁾

5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida para la identificación de las sulfidril oxidasas.

Se prepararon geles de poliacrilamida a concentración de 10%, para separar las proteínas por su peso molecular (*Gorg A .y col. 2000, 2004*). En cada uno de los geles se cargaron 5, 10 y 20 μ g de proteínas totales del líquido de las vesículas seminales en orden ascendente en cada carril para cada una de las vesículas extraídas.

Para la separación de las proteínas se aplicó una corriente de 60 Volts durante 20 min y transcurrido este tiempo se aumentó la corriente a 110 volts durante 1 hora.

Los geles se tiñeron con azul de Coomassie durante 4 horas a temperatura ambiente con agitación suave y constante. Transcurrido el tiempo se destiñó el gel haciendo lavados con solución para desteñir, que se prepara mezclando 90 mL de Metanol con agua destilada 1:1 y 10 mL de ácido acético glacial. Los geles se introducen en dicha solución de 4 a 8 horas con 3 ó 4 cambios de la misma. Los geles se analizaron con un software (*PDQuest*) y fueron fotografiados (anexo II)⁽³⁹⁾.

5.5.- Espectrometría de masas

La espectrometría de masas de las sulfidril oxidasas aisladas en los geles de poliacrilamida se llevó a cabo con un MALDITOF (anexo III).

El análisis de la secuenciación de proteínas se llevo a cabo con la colaboración de la Unidad de Proteómica del Instituto Nacional de Salud Pública, en el laboratorio de la Dra. Victoria Pando, en donde ya hemos realizado diversos ensayos de estandarización.

5.5.1.- Procesamiento de la muestra para su análisis por espectrometría de masas

La banda de proteína cortada del gel en el rango de 50 a 75 KDa, se sometió a una deshidratación con 1 mL de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 50 mM, y se incubó durante 45 min a 56°C. Posteriormente se sustituyó el bicarbonato con 1 mL de acetonitrilo (ACN) al 100%. Una vez transcurridos los 45 min se adicionaron a la mezcla 25 μL de tripsina y se incubó durante 12 horas a 37°C.

La extracción de los péptidos productos de la digestión con tripsina se realizó adicionando 20 µL de ácido fórmico al 0.1% y posteriormente se añaden 10 µL de solución al 50% de ácido trifluoroacético (TFA) en ACN y se mezcló en proporción 1:1 con solución saturada de ácidocianoalfa-4-hidroxicinámico preparado en 50% ACN y 50% TFA 0.1%.

De la solución anterior se tomaron 0.7mL de cada una de las muestras procesadas se colocaron en una placa MALDI y se analizaron en un MALDI-TOF-MS *Voyager Pro DE*.

La espectrometría de masas se obtuvo por medio de reflexión positiva de 1,500 disparos láser con una resolución de 10,000. Los espectros obtenidos fueron procesados y analizados por el software *ProteinPilotTM* y *Mascot* y contra el banco de datos *Genbank*: AAG53892.1 NCBI disponible en línea ⁽¹²⁾.

6.- RESULTADOS

6.1.- Anatomía de las vesículas seminales

Se observó que las vesículas seminales son estructuras de forma alargada y piliforme, con superficie irregular, de 2 cm de largo y 0.5 cm de ancho. (figura 6)

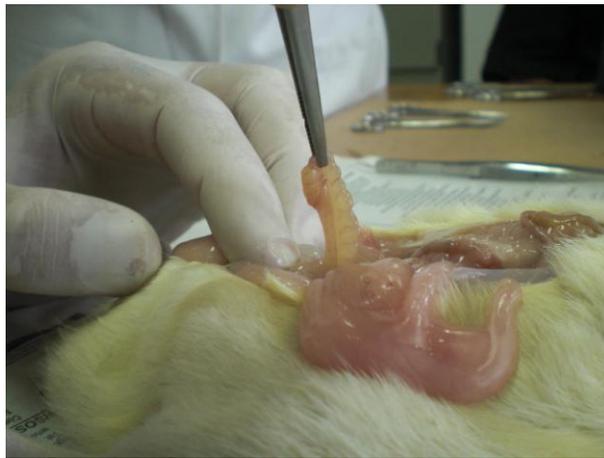


Figura 6. Anatomía de las vesículas seminales, en donde se observa la forma alargada y la superficie irregular.

6.2.- Obtención del líquido de la vesícula seminal.

De cada una de las vesículas seminales se obtuvieron aproximadamente 150 μ L de líquido blanquecino, turbio y de consistencia mucoide, con un pH de 7.5 y aroma afrutado.

6.3.- Electroforesis del líquido seminal.

El líquido seminal fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida (*ID PAGE*) a una concentración del 10% de poliacrilamida, los resultados de dicho experimento se muestran en la figura 7:

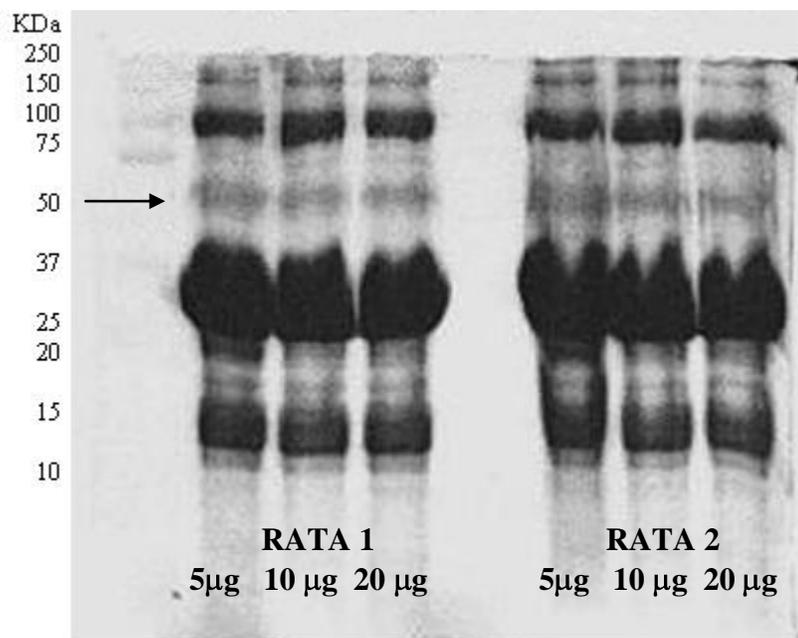


Figura 7. Gel de poliacrilamida al 10 % corrido con proteínas del líquido de la vesícula seminal de ambas ratas, la flecha indica la zona de marcate molecular de 50 a 75 KDa en donde podemos observar la banda correspondiente a las sulfidril oxidasas.

En la figura 7 se observan bandas a lo largo de todo el corrimiento las bandas más abundantes corresponden a las diferentes seminogelinas, cuyos pesos moleculares se encuentran entre 10 y 100 KDa, pero cabe mencionar que en la zona de marcate molecular entre 50 a 75 KDa se observan claramente las bandas que corresponden a las sulfidril

oxidasas del líquido de las vesículas seminales. Cabe mencionar que los resultados de la electroforesis en el gel, muestran que la concentración de sulfidril oxidasas en el líquido de la vesícula seminal es abundante, debido a que la aplicación de diferentes concentraciones de proteínas en cada uno de los carriles muestran la presencia de dichas proteínas en forma clara.

6.4.- Análisis de proteínas por espectrometría de masas y secuenciación.

La banda de proteína cortada del gel en cada carril en el rango de 50 a 75 KDa, se sometió a una extracción con ACN, fue digerida con tripsina y sometida a secuenciación por espectrometría de masas – masas.

En la figura 8 se muestra el reporte obtenido en *Proteinpilot™*, en el cual se reporta que de la banda enviada a secuenciar se obtuvieron al menos dos secuencias específicas distintas, las cuales corresponden a: Las sulfidril oxidasas dependientes de FAD y la proteína de secreción de vesículas seminales tipo 2, la cual es una proteína de arrastre ya que ésta proteína al igual que las distintas seminogelinas es una de las más abundantes en el líquido seminal.⁽¹⁴⁾

La secuenciación obtenida por este método se comparó con el banco de datos *Genbank*: AAG53892.1 NCBI disponible en línea ⁽¹²⁾, donde pudimos observar que la secuencia reportada en dicho banco es idéntica a la obtenida por nosotros.

ProteinPilot™ Software - [Result - C:\Documents and Settings\Administrator\Desktop\RESULTADOS UNIPRO 2009\Marco Cervon\gerardo-Marco Cervon 090610_Job Run-4(1)]

File Configure Window Help

Workflow Tasks

- Analyze
- Identify Proteins...
- View
- Analysis Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID: Summary Statistics

Spectra

Proteins Detected

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Biological Processes	Molecular Functions	PAINTER I
1	8.60	8.60	16.3	trm Q99J80	Sulfhydryl oxidase (FAD-dependent sulfhydryl oxidase-2)	Rattus norvegicus	Protein metabolism and...	Oxidoreductase->Oxida...	P1HE20373;SE1
2	2.07	2.07	8.2	trm G6F6X2	Seminal vesicle protein, secretion 2	Rattus norvegicus	Developmental process...	Miscellaneous function...	P1HE18547;SF1

Protein Group 1

Proteins in Group			Peptides in Group		
N	Unused	Total	Accession #	Name	Sp
1	8.60	8.60	trm Q99J80	Sulfhydryl oxidase (FAD-...	Rattus n
1	0.00	8.60	trm Q9K4M2	FAD-dependent sulfhydr...	Rattus n
1	0.00	8.60	trm Q9IUJ3	Quiescin Q6	Rattus n
1	0.00	8.60	cr CP33869	quiescin Q6	Rattus n
1	0.00	8.60	cr CP33868	quiescin Q6	Rattus n

Proteins in Group			Peptides in Group		
Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass
2.00	59	EFNIAGFPVTR			-0.140
2.00	59	EVTLDLSQFNAVAVR			-0.149
2.00	99	SPSNVAVLWVTSNRR			-0.152
2.00	59	VPVLVESRPFYTSYLR			-0.170
0.60	75	FVTFDFPSCVLLLR	Carbamidomethyl(C@9)		-0.148
0.00	59	EFNIAGFPVTR			-0.140
0.00	58	EFNIAGFPVTR			-0.127
0.00	59	EVTLDLSQFNAVAVR			-0.143
0.00	83	EVTLDLSQFNAVAVR			-0.130
0.00	72	FVTFDFPSCVLLLR	Carbamidomethyl(C@9)		-0.145
0.00	33	FVTFDFPSCVLLLR	Carbamidomethyl(C@9)		-0.137
0.00	<1	SKREYVLIIPER		missed KA...	-0.118
0.00	59	SPSNVAVLWVTSNRR			-0.151

Protein Sequence Coverage

```

MFRGCRHSPPSLLLLLLLLPFLLSVPGQVYARLQSVLYSSSDPLTLDDADTVRPAVLGSSSAWAVEFFASUCGHCIAFPTWHELANDVDRPFAVLMVLDCADETNASVCEPFIAGFPVTRFK
AFSRNGTGTALPAAAGANYQTLRMLIDALESHRDTWPPACPLEEPAKLKIDINEFFTRSKAETLALIFERLSDYLGREVTLDLSQFNAVAVRVLNSEDVYVSRVAVTFPSCVLLLRNGSVSRVPLV
ESRPFYTSYLRGLPGLTRPAPTTAAFTVTPDKIAPTVYKFADESRKYHADLESALHYILRVEVGRFVLEGGQVLYAKVYALAYFFPGQFLVQNFVLSINDMLQKQKRFYFYFKAALDRKRN
AVLAERKVMIGCGSEPHFRGFPVCSLWVLFHFLTVQAHRYSEAHPQEPADGQEVLAQMSVYVQSFVCGCRDCAHHFEQHAASAHNHQVSPSNVAVLWVTSNRRVNAKRLSGALSEDPOFPKVVQPPRELC
SACHNEVNGQVPLVDLQALNHLKAFHSPANIVRPPAPGPA3SRRGTDQPEASEPNLLL

```

ProteinPilot™ Software - [Result - C:\Documents and Settings\Administrator\Desktop\RESULTADOS UNIPRO 2009\Marco Cervon\gerardo-Marco Cervon 090610_Job Run-4(1)]

File Configure Window Help

Workflow Tasks

- Analyze
- Identify Proteins...
- View
- Analysis Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID: Summary Statistics

Spectra

Proteins Detected

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Biological Processes	Molecular Functions	PAINTER I
1	8.60	8.60	16.3	trm Q99J80	Sulfhydryl oxidase (FAD-dependent sulfhydryl oxidase-2)	Rattus norvegicus	Protein metabolism and...	Oxidoreductase->Oxida...	P1HE20373;SE1
2	2.07	2.07	8.2	trm G6F6X2	Seminal vesicle protein, secretion 2	Rattus norvegicus	Developmental process...	Miscellaneous function...	P1HE18547;SF1

Protein Group 1

Proteins in Group			Peptides in Group		
N	Unused	Total	Accession #	Name	Sp
1	8.60	8.60	trm Q99J80	Sulfhydryl oxidase (FAD-...	Rattus n
1	0.00	8.60	trm Q9K4M2	FAD-dependent sulfhydr...	Rattus n
1	0.00	8.60	trm Q9IUJ3	Quiescin Q6	Rattus n
1	0.00	8.60	cr CP33869	quiescin Q6	Rattus n
1	0.00	8.60	cr CP33868	quiescin Q6	Rattus n

Proteins in Group			Peptides in Group		
Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass
2.00	59	EFNIAGFPVTR			-0.140
2.00	59	EVTLDLSQFNAVAVR			-0.149
2.00	99	SPSNVAVLWVTSNRR			-0.152
2.00	59	VPVLVESRPFYTSYLR			-0.170
0.60	75	FVTFDFPSCVLLLR	Carbamidomethyl(C@9)		-0.148
0.00	59	EFNIAGFPVTR			-0.140
0.00	58	EFNIAGFPVTR			-0.127
0.00	59	EVTLDLSQFNAVAVR			-0.143
0.00	83	EVTLDLSQFNAVAVR			-0.130
0.00	72	FVTFDFPSCVLLLR	Carbamidomethyl(C@9)		-0.145
0.00	33	FVTFDFPSCVLLLR	Carbamidomethyl(C@9)		-0.137
0.00	<1	SKREYVLIIPER		missed KA...	-0.118
0.00	59	SPSNVAVLWVTSNRR			-0.151

Protein Sequence Coverage

```

MFRGCRHSPPSLLLLLLLLPFLLSVPGQVYARLQSVLYSSSDPLTLDDADTVRPAVLGSSSAWAVEFFASUCGHCIAFPTWHELANDVDRPFAVLMVLDCADETNASVCEPFIAGFPVTRFK
AFSRNGTGTALPAAAGANYQTLRMLIDALESHRDTWPPACPLEEPAKLKIDINEFFTRSKAETLALIFERLSDYLGREVTLDLSQFNAVAVRVLNSEDVYVSRVAVTFPSCVLLLRNGSVSRVPLV
ESRPFYTSYLRGLPGLTRPAPTTAAFTVTPDKIAPTVYKFADESRKYHADLESALHYILRVEVGRFVLEGGQVLYAKVYALAYFFPGQFLVQNFVLSINDMLQKQKRFYFYFKAALDRKRN
AVLAERKVMIGCGSEPHFRGFPVCSLWVLFHFLTVQAHRYSEAHPQEPADGQEVLAQMSVYVQSFVCGCRDCAHHFEQHAASAHNHQVSPSNVAVLWVTSNRRVNAKRLSGALSEDPOFPKVVQPPRELC
SACHNEVNGQVPLVDLQALNHLKAFHSPANIVRPPAPGPA3SRRGTDQPEASEPNLLL

```

ProteinPilot™ Software - [Result - C:\Documents and Settings\Administrator\Desktop\RESULTADOS UNIPRO 2009\Marco Cervon\gerardo-Marco Cervon 090610_Job Run-4(1)]

File Configure Window Help

Workflow Tasks

- Analyze
- Identify Proteins...
- View
- Analysis Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID: Summary Statistics

Spectra

Proteins Detected

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Biological Processes	Molecular Functions	PAINTER I
1	8.60	8.60	16.3	trm Q99J80	Sulfhydryl oxidase (FAD-dependent sulfhydryl oxidase-2)	Rattus norvegicus	Protein metabolism and...	Oxidoreductase->Oxida...	P1HE20373;SE1
2	2.07	2.07	8.2	trm G6F6X2	Seminal vesicle protein, secretion 2	Rattus norvegicus	Developmental process...	Miscellaneous function...	P1HE18547;SF1

Protein Group 1

Proteins in Group			Peptides in Group		
N	Unused	Total	Accession #	Name	Sp
1	8.60	8.60	trm Q99J80	Sulfhydryl oxidase (FAD-...	Rattus n
1	0.00	8.60	trm Q9K4M2	FAD-dependent sulfhydr...	Rattus n
1	0.00	8.60	trm Q9IUJ3	Quiescin Q6	Rattus n
1	0.00	8.60	cr CP33869	quiescin Q6	Rattus n
1	0.00	8.60	cr CP33868	quiescin Q6	Rattus n

Proteins in Group			Peptides in Group		
Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass
2.00	59	EFNIAGFPVTR			-0.140
2.00	59	EVTLDLSQFNAVAVR			-0.149
2.00	99	SPSNVAVLWVTSNRR			-0.152
2.00	59	VPVLVESRPFYTSYLR			-0.170
0.60	75	FVTFDFPSCVLLLR	Carbamidomethyl(C@9)		-0.148
0.00	59	EFNIAGFPVTR			-0.140
0.00	58	EFNIAGFPVTR			-0.127
0.00	59	EVTLDLSQFNAVAVR			-0.143
0.00	83	EVTLDLSQFNAVAVR			-0.130
0.00	72	FVTFDFPSCVLLLR	Carbamidomethyl(C@9)		-0.145
0.00	33	FVTFDFPSCVLLLR	Carbamidomethyl(C@9)		-0.137
0.00	<1	SKREYVLIIPER		missed KA...	-0.118
0.00	59	SPSNVAVLWVTSNRR			-0.151

Protein Sequence Coverage

```

MFRGCRHSPPSLLLLLLLLPFLLSVPGQVYARLQSVLYSSSDPLTLDDADTVRPAVLGSSSAWAVEFFASUCGHCIAFPTWHELANDVDRPFAVLMVLDCADETNASVCEPFIAGFPVTRFK
AFSRNGTGTALPAAAGANYQTLRMLIDALESHRDTWPPACPLEEPAKLKIDINEFFTRSKAETLALIFERLSDYLGREVTLDLSQFNAVAVRVLNSEDVYVSRVAVTFPSCVLLLRNGSVSRVPLV
ESRPFYTSYLRGLPGLTRPAPTTAAFTVTPDKIAPTVYKFADESRKYHADLESALHYILRVEVGRFVLEGGQVLYAKVYALAYFFPGQFLVQNFVLSINDMLQKQKRFYFYFKAALDRKRN
AVLAERKVMIGCGSEPHFRGFPVCSLWVLFHFLTVQAHRYSEAHPQEPADGQEVLAQMSVYVQSFVCGCRDCAHHFEQHAASAHNHQVSPSNVAVLWVTSNRRVNAKRLSGALSEDPOFPKVVQPPRELC
SACHNEVNGQVPLVDLQALNHLKAFHSPANIVRPPAPGPA3SRRGTDQPEASEPNLLL

```

Figura 8. Reporte de secuenciación *ProteinPilot*TM, correspondiente a la banda en el rango de 50 a 75 KDa, en donde se observa la presencia de las sulfhidril oxidasas, así como la proteína de secreción de vesículas seminales tipo 2.

En la figura 9 se muestra el resultado del análisis en el software *Matrix Science Mascot*, en donde también fue posible la identificación de las sulfhidril oxidasas del líquido de la vesícula seminal de rata.

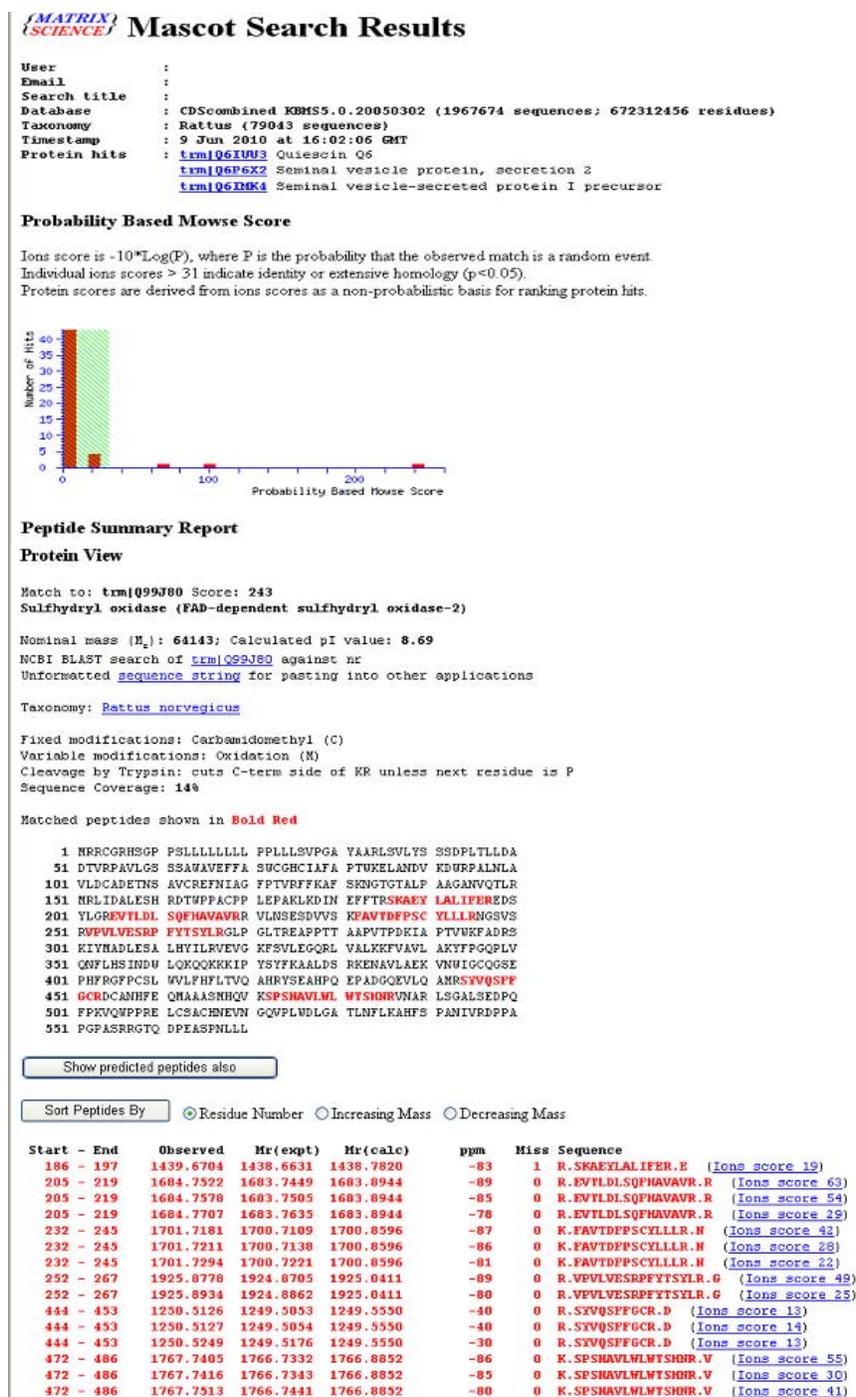


Figura 9.-Reporte de secuenciación de las proteínas de la vesícula seminal de rata de la banda en el rango de 50 a 75 KDa, en el software *Matrix Science Mascot*.

Con respecto a la figura 9, en primer lugar, podemos observar que la probabilidad mas alta es de 240 aproximadamente, este es un buen resultado ya que la puntuación mas alta es muy significativa dejando poco espacio a la duda de que en la banda secuenciada se encuentren las sulfidril oxidasas, lo cual nos indica que los resultados reportados son confiables.

En segundo lugar, las secuencias de los péptidos encontrados y marcados en rojo nos permiten identificar a las sulfidril oxidasas en el líquido de las vesículas seminales de rata (especie *Rattus norvegicus*), con una posibilidad de error de menos de 0.05%.

Al igual que en el primer resultado la secuencia de aminoácidos reportada, fue comparada con el banco de datos *Genbank*: AAG53892.1 NCBI disponible en línea ⁽¹²⁾, donde pudimos observar que la secuencia reportada en dicho banco es idéntica a la obtenida por nosotros.

7.- CONCLUSIONES

1.- Los resultados demuestran que las sulfidril oxidasas están presentes en el líquido de las vesículas seminales de rata.

2.- Las sulfidril oxidasas son abundantes en el líquido de vesículas seminales de la rata, lo anterior se deduce debido a que se pudieron secuenciar directamente a partir de geles de poliacrilamida.

3- Las sulfidril oxidasas al ser generadoras de puentes disulfuro, pueden actuar como factores activadores de una gran cantidad de proteínas presentes en el líquido seminal, particularmente en la formación del coágulo después de la eyaculación.

4.- El método de electroforesis es un método adecuado para la separación de las proteínas presentes en el líquido de las vesículas seminales.

5.- La secuenciación por MALDITOF, es un método adecuado para la identificación de las sulfidril oxidasas presentes en el líquido de las vesículas seminales.

6.- Por medio de la secuenciación de las proteínas previamente identificadas en geles de poliacrilamida, éstas pueden ser analizadas de forma más simple, más precisa y más rápida.

8.- ANEXOS

Anexo I. ⁽³⁹⁾

Precipitación y cuantificación de proteínas

a) Purificación por el método TCA/Acetona

- 1.- Se añaden 140 μ L de TCA al 80% a cada uno de los tubos que contienen el vaciado de las vesículas seminales respectivamente.
- 2.- Se deja precipitar a 4°C durante 30 minutos.
- 3.- Transcurridos los 30 minutos centrifugar a 11,500 rpm a 4°C durante 5 minutos.
- 4.- Desechar sobrenadante.
- 5.- Añadir inmediatamente 1 mL de acetona y resuspender en vortex.
- 6.- Repetir los pasos de centrifugado 4 y 5 tres veces más.
- 7.- Evaporar el exceso de acetona
- 8.- Resuspender en 1mL de buffer de rehidratación, preparado de acuerdo con la tabla 1:

Buffer de rehidratación (5mL)	
Urea	1.8 g
DTT 100 mM	3.5 mL
Chaps 1%	0.05g

Tabla 1. Reactivos necesarios para la preparación del buffer de rehidratación

b) Cuantificación de proteínas

1.- Preparación de muestras para la curva estándar (tabla 2)

Tubo	BSA μg/mL	Estándar BSA (0,5 g/ml) (μL)	NaCl 0.15 M (μL)	Reactivo de Bradford (mL)
Blanco	0	0	200	2
1	2.5	10	190	2
1	2.5	10	190	2
2	5	20	180	2
2	5	20	180	2
3	7.5	30	170	2
3	7.5	30	170	2
4	10	40	160	2
4	10	40	160	2

Tabla 2. Preparación de muestras para la curva estándar.

2.- Añadir el reactivo de Bradford a temperatura ambiente y leer absorbancia a 595 nm frente al blanco.

3.- Preparar diluciones para la cuantificación de la muestra problema (tabla 3)

Reactivos			
Tubo	Muestra problema		Reactivo de Bradford
Dilución μL	Dilución μL	NaCl 0.15 M μL	mL
Blanco	0	200	2
1 (1:10)	200	0	2
1 (1:10)	200	0	2
2 (1:20)	200	0	2
2 (1:20)	200	0	2
3 (1:50)	200	0	2
3 (1:50)	200	0	2

Tabla 3. Preparación de muestras para la curva estándar

4.- Añadir el reactivo de Bradford a temperatura ambiente y leer absorbancia a 595 nm frente al blanco.

5.- Interpolarse los datos de absorbancia en la curva estándar, para determinar la concentración de la proteína total en la muestra.

- Preparación de reactivo de Bradford

Se diluyen 10 mg de *Comassie Blue G-250* en 10 mL de ácido fosfórico al 88% y 4,7 mL de etanol absoluto (100%), posteriormente se añade agua destilada hasta aforar a 100 mL. Pasar la solución a través de papel de filtro y guardar en frasco ámbar.

Anexo II ⁽³⁹⁾

Preparación de geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se componen de acrilamida polimerizada que se entrecruzan por medio de un agente bifuncional como N,N-metilenbisacrilamida. El alcance de la separación de las proteínas depende de la concentración de poliacrilamida añadida y la cantidad de enlaces cruzados. Lo anterior se debe a que a mayor concentración de acrilamida aumenta la rigidez y disminuye el tamaño de los poros por los cuales el SDS-polipéptido deben pasar (tabla 4).

Concentraciones efectivas en geles de poliacrilamida	
% de acrilamida	Rango de separación (kD)
15	12 – 43
10	16 – 68
7.5	36 – 94
5	57 – 212

Tabla 4. Concentraciones de poliacrilamida utilizada de acuerdo con su peso molecular.

- Reactivos utilizados:

1.-Acrilamida y N,N-metilenbisacrilamida. Es una solución madre que contiene 29% de acrilamida y 1% de N,N-metilenbisacrilamida a pH de entre 6.5 y 7.0 ya que a pH alcalino se degrada fácilmente. Se debe tener precaución al manejar esta mezcla ya que se trata de neurotoxinas potentes que se absorben por la piel.

2.- SDS. En los geles de poliacrilamida se lleva a cabo la disociación de las proteínas en subunidades polipeptídicas para evitar así su agregación, para lograr esto se utilizan detergentes altamente alcalinos como el SDS (dodecilsulfato de sodio).

3.- TEMED. Se encarga de acelerar la polimerización de la acrilamida y bisacrilamida al catalizar la formación de radicales libres provenientes del persulfato de amonio. La polimerización se inhibe cuando hay pH ácido.

4.- Persulfato de amonio. Proporciona los radicales libres necesarios para la polimerización de la acrilamida y bisacrilamida.

- Preparación del gel

- 1.- Para el montaje de las placas de vidrio de 1.5 mm de espesor se deben lavar previamente con etanol.
- 2.- Se colocan dentro de la ventana se emparejan y se colocan sobre una almohadilla verificando con agua la ausencia de fugas
- 3.- Se prepararon 2 geles con concentraciones del 8% y 12% de poliacrilamida respectivamente. (tabla 5)

Preparación de gel de poliacrilamida			
	Gel de corrida		Gel concentrador
Reactivo	8%	12%	5%
H ₂ O desionizada	4.6 mL	3.3 mL	3.4 mL
Poliacrilamida mix 30%	2.7 mL	4.0 mL	0.83 mL
1.5 Tris M (pH 8.8)	2.5 mL	2.5 mL	0.63 mL (pH 6.8)
SDS 10%	0.1 mL	0.1 mL	0.05 mL
Persulfato de amonio 10%	0.1 mL	0.1 mL	0.05 mL
TEMED*	0.006 mL	0.004 mL	0.005 mL

Tabla 5. Preparación de gel de poliacrilamida al 8% y 12%

* Al añadir este reactivo se debe agitar rápidamente la mezcla con precaución de no producir espuma.

- 4.- Se pone el peine entre las dos placas de vidrio, se hace una marca 0.5 cm y 1 cm debajo del peine y se retira el mismo.
- 5.- Se vierte el gel de corrida hasta que quede entre las dos marcas hechas debajo del peine.
- 6.- Se agrega EtOH 70% para que la superficie del gel quede totalmente recta.
- 7.- Una vez que polimeriza el gel de corrida, se desecha el EtOH al 70% y se seca el exceso con papel filtro.
- 8.- El siguiente paso es verter el gel concentrador (5%) directamente sobre la superficie del gel polimerizado. Enseguida se colocan los peines de teflón y se deja polimerizar completamente. Al momento de los vaciados de cada uno de los geles se debe evitar la formación de burbujas.

9.- Una vez polimerizado el gel se retira con cuidado el peine y se coloca dentro de la cámara de corrida, la cual contiene el buffer de corrida. (tabla 6)

Buffer de corrida (1000 mL)	
25 mM de tris base	3.02g
192 mM de Glicina	14.41 g
0.1% de SDS (10%)	10 mL
Agua destilada	cbp 1000 mL
Ajustar pH a 8.3	

Tabla 6. Preparación del buffer de corrida

10.- Ya introducido el gel en el buffer de corrida a las muestras se les debe añadir el buffer de carga (tabla 7), se homogeniza y se coloca a 100°C para desnaturalizar las proteínas y posteriormente se coloca en un baño de hielo.

Loading buffer	
Agua destilada	4.8 mL
Tris - HCl 0.5 M pH 6.8	1.2 mL
Glicerol	1 mL
SDS 10%	2 mL
Azul de bromofenol 0.1%	0.5 mL

Tabla 7. Preparación del buffer de carga

11.- Una vez que las muestras están a 4°C se hace la descarga completa de la muestra con una micropipeta, colocando la punta en el fondo del pozo evitando así que la muestra escape del mismo. El primer pozo será utilizado para introducir el marcador de peso molecular.

12.- Conectar el aparato de electroforesis a una fuente de poder. Se aplica una corriente de 60 volts durante su corrimiento en el gel concentrador y posteriormente se aplica una corriente de 100 volts hasta que el colorante llegue al fondo del gel.

13.- Una vez que el colorante ha llegado al fondo del gel se desconecta la fuente de poder y se retiran las placas de vidrio del aparato de electroforesis. Se separan los vidrios y se corta con una espátula el gel concentrador.

14.- Se tiñe el gel con azul de Coomassie (tabla 8) durante 4 horas a temperatura ambiente con agitación suave y constante.

Preparación de azul de Coomassie	
Azul brillante R 250	0.25g
Metanol / H ₂ O 1:1	90 mL
Ácido acético glacial	10 mL

Tabla 6. Preparación de azul de Coomassie

15.- Transcurrido el tiempo se debe desteñir el gel haciendo lavados con solución desteñidora que se prepara mezclando 90 mL de Metanol con agua destilada (1:1) y 10 mL de ácido acético glacial. El gel se introduce en dicha solución de 4 – 8 horas con 3 o 4 cambios de dicha solución.

Anexo III

Secuenciación de proteínas

a) Degradación de Edman:

En esta técnica se añade a la muestra reactivo de Edman o fenilisotiocianato, el cual se encuentra en condiciones ligeramente básicas, para así marcar específicamente el grupo amino terminal de una proteína, con lo anterior se da la formación de un derivado feniltioidantoina el cual hace inestable el segmento N-terminal, de manera que éste puede ser selectivamente hidrolizado sin romper los demás enlaces peptídicos. El reactivo de Edman puede ser aplicado repetidamente al péptido resultante del tratamiento anterior. Este proceso ha sido automatizado y se lleva a cabo por un secuenciador que puede determinar la secuencia de alrededor de 100 aminoácidos en una proteína desde su N-terminal.

Cuando las proteínas tienen una secuencia mayor a 100 aminoácidos, las moléculas no pueden ser secuenciadas desde el N-terminal hasta el C-terminal por el secuenciador, por lo tanto las moléculas son cortadas en sitios específicos con tripsina la cual corta enlaces peptídicos formados por lisina o arginina y el bromuro de cianógeno, el cual rompe los enlaces formados con metionina.

La desventaja de esta técnica es que al ser secuenciados los fragmentos no es posible conocer la secuencia de los mismos en la cadena original, por lo cual, deben prepararse péptidos superponibles que se obtienen al romper a la proteína con diferentes agentes químicos

b) Espectrometría de masas.

La Espectrometría de Masas es una tecnología analítica esencial en el contexto de la proteómica actual debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de masas moleculares proteicas. Los espectrómetros de masas utilizados en el análisis de proteínas o péptidos pueden ser divididos básicamente en dos partes:

Fuente de iones, que genera e introduce los iones analitos en el instrumento y el detector, el cual se utiliza para medir las masas de los iones generados.

Generalmente se utilizan dos tipos de técnicas de ionización: Ionización ESI (*Electrosprat Ionosation*) e ionización MALDI (*Matriz-Assited laser Desorption / Ionisation*)

La ionización MALDI se encuentra asociada con un analizador de tiempo de vuelo (TOF, *Time-Of-Flight*) en el cual los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, o a un analizador TOF / TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y por tanto, mayor resolución y precisión másicas. En el primer

TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ión padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

- Identificación de Proteínas por espectrometría de masas

Las proteínas de interés en un experimento de proteómica pueden ser analizadas directamente mediante espectrometría de masas pero el punto de partida puede ser diferente.

Si partimos de proteínas separadas mediante 1 D o 2D *PAGE*, el primer paso del análisis consistiría en recortarlas directamente del gel dónde han sido resueltas (“*picado de spots*”). Este proceso de recorte se lleva a cabo en una estación automática de picado de geles (*ProPic, genomics solutions*), tomando las debidas precauciones para evitar contaminación con queratinas por la manipulación del gel.

El análisis también se puede llevar a cabo con *spots* recortados manualmente, con extrema limpieza para evitar contaminación con queratinas y una vez analizados se comparan con un *spot* control.

Si partimos de muestras líquidas se lleva a cabo una limpieza de la muestra, seguida de la desnaturalización, reducción y alquilación de la misma.

En ambos casos (proteínas separadas en gel o proteínas en solución), el siguiente paso en el procedimiento es la digestión de las mismas mediante una proteasa específica (generalmente tripsina porcina), que genera un conjunto de péptidos que pueden ser analizados por espectrometría de masas.

9.- REFERENCIAS

- 1.- Aiquel Federico, Manual De análisis clínicos, 4ª edición, 1997, Editorial medica panamericana, México.
- 2.- Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. "Introducción a la Biología Celular". Segunda Edición
- 3.- Benayoun B, Esnard–Feve A, Castella S, Courty Y, and Esnard F. Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase=quiescin Q6 gene family. J Biol Chem 276: 13830–13837, 2001.
- 4.- Bioquímica y biología molecular. Información actualizada para la enseñanza y el aprendizaje de estas disciplinas científicas. Dr. Edgar Vázquez Contreras, Instituto de Química UNAM. <http://bq.unam.mx/~evazquez>
- 5.- Chang TSK and Zirkin BR. Distribution of sulfhydryl oxidase activity in the rat and hamster male reproductive tract. Biol Reprod 17: 745–748, 1978.
- 6.- Coppock DL, Cina–Poppe D, and Gilleran S. The Quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: Thioredoxin and ERV1. Genomics 54: 460–468, 1998.
- 7.- Coppock DL, Kopman C, Scandalis S, and Gillerman S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. Cell Growth Differ 4: 483–493, 1993.
- 8.- Coppock DL and Thorpe C. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. Antioxid Redox Signal 8: 300–311, 2006.
- 9.- Dym O and Eisenberg D. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. Protein Sci 10: 1712–1728, 2001.
- 10.- Farrell CL, Martin FH, and Yabkowitz R. Placental-derived prostate growth factors. USA: Amgen Inc, 2001.
- 11.- Fernandes PA and Ramos MJ. Theoretical insights into the mechanism for thiol=disulfide exchange. Chemistry 10: 257– 266, 2004.
- 12.- Genbank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAG53892.1>
- 13.- Haynes CM, Titus EA, and Cooper AA. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. Mol Cell 15: 767–776, 2004.
- 14.- Hernández-Romano J, Rodríguez MH, Pando V, Torres-Monzón JA, Alvarado-Delgado A, Lecona Valera AN, Ramos RA, Martínez-Barnette J, Rodríguez MC. Conserved peptide sequences bind to actin and enolase on the surface of Plasmodium berghei ookinetes. Parasitology. 2011 Sep;138(11):1341-53. Epub 2011.

- 15.- Heckler EJ, Alon A, Fass D, and Thorpe C. Human quiescin- sulfhydryl oxidase, QSOX1: Probing internal redox steps by mutagenesis. *Biochemistry* 47: 4955–4963, 2008.
- 16.- Heckler EJ, Rancy PC, Kodali VK, and Thorpe C. Generating disulfides with the Quiescin-sulfhydryl oxidases. *Biochim Biophys Acta* 1783: 567–577, 2008.
- 17.- Hooper KL, Glynn NM, Burnside J, Coppock DL, and Thorpe C. Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases. *J Biol Chem* 274: 31759–31762, 1999.
- 18.- Hooper KL, Joneja B, White HB, III, and Thorpe C. A sulfhydryl oxidase from chicken egg white. *J Biol Chem* 271: 30510–30516, 1996.
- 19.- Hooper KL, Sheasley SS, Gilbert HF, and Thorpe C. Sulfhydryl oxidase from egg white: A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides. *J Biol Chem* 274: 22147–22150, 1999.
- 20.- Inaba K and Ito K. Structure and mechanisms of the DsbB– DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim Biophys Acta* 1783: 520–529, 2008.
- 21.- Jaje J, Wolcott HN, Fadugba O, Cripps D, Yang AJ, Mather IH, and Thorpe C. A flavin-dependent sulfhydryl oxidase in bovine milk. *Biochemistry* 46: 13031–13040, 2007.
- 22.- Jimeno, Antonio; Ballesteros, Manuel; Ugedo, Luis. *Biología*. Fuenlabrada: Santillana, 1997.
- 23.- Janolino VG and Swaisgood HE. Isolation and characterization of sulfhydryl oxidase from bovine milk. *J Biol Chem* 250: 2532–2538, 1975.
- 24.- Kadokura H, Katzen F, and Beckwith J. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Ann Rev Biochem* 72: 111– 135, 2003.
- 25.- Kiermeier F and Petz E. A sulfhydryl group-oxidizing enzyme in milk. I. Isolation and characterization of the enzyme. *Z Lebensm Unters Forsch* 132: 342–352, 1967.
- 26.- Lisowsky T, Lee JE, Polimeno L, Francavilla A, and Hofhaus G. Mammalian augments of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Dig Liver Dis* 33: 173–180, 2001. 1228 KODALI AND THORPE
- 27.- Mairet–Coello G, Tury A, Esnard–Fève A, Fellmann D, Risold PY, and Griffond B. FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: Topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system. *J Comp Neurol* 473: 334–363, 2004.
- 28.- Mairet–Coello G, Tury A, Fellmann D, Risold PY, and Griffond B. Ontogenesis of the sulfhydryl oxidase QSOX expression in rat brain. *J Comp Neurol* 484: 403–417, 2005.

- 29.- Marciniak SJ and Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 86: 1133–1149, 2006.
- 30.- Martin DB, Gifford DR, Wright ME, Keller A, Yi E, Goodlett DR, Aebersold R, and Nelson PS. Quantitative proteomic analysis of proteins released by neoplastic prostate epithelium. *Cancer Res* 64: 347–355, 2004.
- 31.- Munday R, Munday CM, and Winterbourn CC. Inhibition of copper-catalyzed cysteine oxidation by nanomolar concentrations of iron salts. *Free Radic Biol Med* 36: 757–764, 2004.
- 32.- Ostrowski MC and Kistler WS. Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. *Biochemistry* 19: 2639–2645, 1980.
- 33.- Ostrowski MC, Kistler WS, and Williams–Ashman HG. A flavoprotein responsible for the intense sulfhydryl oxidase activity of rat seminal vesicle secretion. *Biochem Biophys Res Comm* 87: 171–176, 1979.
- 34.- Peter A, Lilja H, Lundwall A, Malm J. Semenogelin I and semenogelin II, the major gel-forming proteins in human semen, are substrates for transglutaminase. *Eur J Biochem*. 1998 Mar 1;252(2):216-21.
- 35.- . Raje S, Glynn N, and Thorpe C. A continuous fluorescence assay for sulfhydryl oxidase. *Anal Biochem* 307: 266–272, 2002.
- 36.- Ramadan D, Rancy PC, Nagarkar RP, Schneider JP, and Thorpe C. Arsenic(III) species inhibit oxidative protein folding in vitro. *Biochemistry* 48: 424–432, 2009.
- 37.- Revista chilena de anatomía . *Rev. chil. anat.* v.18 n.1 Temuco 2000
- 38.- States DJ, Omenn GS, Blackwell TW, Fermin D, Eng J, Speicher DW, and Hanash SM. Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study. *Nat Biotechnol* 24: 333–338, 2006. QUIESCIN–SULFHYDRYL OXIDASE ENZYME FAMILY 1229
- 39.- Sambrook, Fritsch, Maniatis. *Molecular Cloning a Laboratory Manual* 2nd Edition Vol. 3. 18.48 – 18.59
- 40.- Swaisgood H and Janolino V. Mammalian sulfhydryl oxidase. *Food Sci Technol* 122: 539–546, 2003.
- 41.- Tanagho, E.A, *Urología general de Smith*, 12^a edición, 2001, Editorial El Manual Moderno, México.
- 42.- Thorpe C and Coppock DL. Generating disulfides in multicellular organisms: Emerging roles for a new flavoprotein family. *J Biol Chem* 282: 13929–13933, 2007.

- 43.- Thorpe C, Hooper K, Raje S, Glynn N, Burnside J, Turi G, and Coppock D. Sulfhydryl oxidases: Emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch Biochem Biophys* 405: 1–12, 2002.
- 44.- Tu BP and Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences. *J Cell Biol* 164: 341–346, 2004.
- 45.- Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 4: 278–286, 2008.
- 46.- Wittke I, Wiedemeyer R, Pillmann A, Savelyeva L, Westermann F, and Schwab M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase = Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 63: 7742–7752, 2003.
- 47.- Yamada H. Localization in skin, activation and reaction mechanisms of skin sulfhydryl oxidase. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* 99: 861–869, 1989.
- 48.- Zanata SM, Luvizon AC, Batista DF, Ikegami CM, Pedrosa FO, Souza EM, Chaves DF, Caron LF, Pelizzari JV, Laurindo FR, and Nakao LS. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. *Redox Rep* 10: 319–323, 2005.