



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA ENZIMA
LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) DE MÚSCULO ESQUELÉTICO
DE *Gallus gallus domesticus*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
ALMA DELIA MARTÍNEZ CORREA



CIUDAD DE MÉXICO

2016



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: Profesora: Luz del Carmen Castellanos Román

VOCAL: Profesor: J. Eleazar Martínez Barajas

SECRETARIO: Profesora: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

1er. SUPLENTE: Profesora: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

2° SUPLENTE: Profesora: Laura Carmona Salazar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 307 (BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL). EDIFICIO B. FACULTAD DE QUÍMICA.
U.N.A.M.**

ASESOR DEL TEMA: _____

(Nombre y firma)

M. en C. Luz del Carmen Castellanos Román.

SUSTENTANTE: _____

(Nombre y firma)

Alma Delia Martínez Correa

ÍNDICE DE FIGURAS.

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

ÍNDICE DE TABLAS.

1. LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	5
2. RESUMEN.....	7
3. JUSTIFICACIÓN.....	8
4. INTRODUCCIÓN.....	8
5. MARCO TEÓRICO.....	12
1. <u>Proteínas</u>	12
1. <i>Definición</i>	12
2. <i>Estructura y clasificación de las proteínas</i>	13
2. <u>Enzimas</u>	14
1. <i>Definición y características</i>	14
2. <i>Clasificación de las enzimas</i>	16
3. <i>Sitio catalítico o activo. Modelos de interacción enzima-sustrato</i> ..	17
4. <i>Catálisis enzimática</i>	18
5. <i>Cinética enzimática</i>	19
1. Michaelis-Menten.....	19
2. Lineweaver-Burk.....	20
3. Otros parámetros cinéticos.....	21
6. <i>Inhibición</i>	21
7. <i>Condiciones que modifican velocidad de las enzimas</i>	23
1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	23
2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	23
8. <i>Purificación de enzimas</i>	24
9. <i>Métodos empleados en la purificación de LDH a partir de músculo esquelético de pollo</i>	26
1. Homogenización mecánica.....	26
2. Precipitación por salado.....	26
3. Cromatografía.....	26
1. Cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel).....	27
2. Cromatografía de intercambio iónico.....	27
4. Electroforesis.....	28
1. PAGE-SDS.....	29
3. <u>Información general de la LDH</u>	30
1. <i>Bioquímica</i>	30
2. <i>Descripción e isoenzimas</i>	31
3. <i>Reacción</i>	32
4. <i>Diferencias cinéticas</i>	33

	Página
5. <i>Sitio activo y mecanismo de acción</i>	34
6. <i>Aplicaciones clínicas</i>	35
6. HIPÓTESIS.....	36
7. OBJETIVOS.....	36
1. <u>Objetivo general</u>	36
2. <u>Objetivos particulares</u>	36
8. METODOLOGÍA.....	37
1. <u>Diagrama de flujo general del proyecto</u>	37
2. <u>Reactivos</u>	38
3. <u>Materiales y equipos</u>	39
4. <u>Procedimiento general</u>	40
1. <i>Extracción de LDH y precipitación con sulfato de amonio</i>	40
2. <i>Desalado</i>	41
3. <i>Cromatografía de Intercambio Catiónico con gradiente de [NaCl]</i>	41
4. <i>Cromatografía de Intercambio Catiónico con gradiente de pH</i>	42
5. <i>Ensayo para medir la actividad LDH</i>	45
6. <i>Determinación de la cantidad de proteína (método de Bradford)</i>	46
7. <i>Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)</i>	46
8. <i>Precipitación de proteínas</i>	47
9. <i>Determinación del progreso de la reacción enzimática</i>	48
10. <i>Determinación de pH óptimo</i>	48
11. <i>Determinación de temperatura óptima</i>	49
12. <i>Determinación de cinética enzimática</i>	50
13. <i>Determinación del efecto de un inhibidor</i>	50
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	52
1. <u>Evaluación de diversos gradientes de elución</u>	52
1. <i>Gradiente de [NaCl]</i>	53
2. <i>Gradiente de pH</i>	56
2. <u>Comparación entre gradientes</u>	58
3. <u>Implementación del protocolo obtenido</u>	63
4. <u>Caracterización de la LDH purificada</u>	72
1. <i>Efecto del pH</i>	72
2. <i>Efecto de la temperatura</i>	72
3. <i>Efecto de la concentración de sustrato</i>	74
4. <i>Efecto de un inhibidor</i>	75
10. PRUEBA PILOTO.....	79
11. CONCLUSIONES.....	79
12. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	81
13. REFERENCIAS	82
14. ANEXOS.....	87

Figura 1. Estructura general de los α -aminoácidos.....	12
Figura 2. Niveles de estructuración de las proteínas.....	14
Figura 3. Holoenzimas.....	15
Figura 4. Modelos de interacción enzima-sustrato.....	17
Figura 5. Perfil energético de una reacción química.....	17
Figura 6. Comparación entre el perfil energético de una reacción sin catálisis y la misma reacción catalizada..	18
Figura 7. Curva hiperbólica representativa de la cinética de Michaelis-Menten.....	19
Figura 8. Transformación de Lineweaver-Burk para la cinética enzimática de Michaelis-Menten.....	20
Figura 9. Representaciones de los distintos tipos de inhibición.....	22
Figura 10. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	23
Figura 11. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	23
Figura 12. Etapas involucradas en la purificación de enzimas.....	24
Figura 13. Cromatografía de exclusión molecular.....	27
Figura 14. Cromatografía de intercambio iónico. Intercambiador catiónico.....	28
Figura 15. Cámara de electroforesis vertical.....	28
Figura 16. Separación de proteínas en gel.....	29
Figura 17. Esquema del metabolismo de la glucosa y la intervención de la LDH en el paso final.....	30
Figura 18. Representación del tetrámero LDH (no específica).....	31
Figura 19. Reacción de interconversión entre piruvato y lactato catalizada por la familia de enzimas LDH.....	33
Figura 20. Esquema del sitio activo de la LDH.....	34
Figura 21. Esquema del montaje y realización de la cromatografía de exclusión molecular para realizar el desalado.....	41
Figura 22. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio.....	52
Figura 23. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas al realizar el desalado.....	53
Figura 24. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la primera CIC con gradiente de [NaCl].....	54
Figura 25. Actividad de la LDH en unidades enzimáticas (U) en cada una de las fracciones obtenidas bajo las condiciones del intento 1 de CIC con gradiente de [NaCl].....	54
Figura 26. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la segunda CIC con gradiente de [NaCl].....	55
Figura 27. Actividad de la LDH en unidades enzimáticas (U) en cada una de las fracciones obtenidas bajo las condiciones del intento 2 de CIC con gradiente de [NaCl].....	55
Figura 28. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la tercera CIC con gradiente de [NaCl].....	55
Figura 29. Actividad de la LDH en unidades enzimáticas (U) en cada una de las fracciones obtenidas bajo las condiciones del intento 3 de C.I.C con gradiente de [NaCl].....	55
Figura 30. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la primera CIC con gradiente de pH.....	57
Figura 31. Actividad de la LDH en unidades enzimáticas (U) en cada una de las fracciones obtenidas bajo las condiciones del intento 1 de CIC con gradiente de pH.....	57
Figura 32. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la segunda CIC con gradiente de pH.....	57
Figura 33. Actividad de la LDH en unidades enzimáticas (U) en cada una de las fracciones obtenidas bajo las condiciones del intento 2 de CIC con gradiente de pH.....	57
Figura 34. Actividad enzimática en unidades internacionales obtenida en las fracciones colectadas en todas las cromatografías realizadas.....	58
Figura 35. Patrones electroforéticos de las fracciones colectadas en los procesos de homogenización, centrifugación, precipitación con sulfato de amonio y desalado.....	59
Figura 36. Patrones electroforéticos de las fracciones colectadas al aplicar las condiciones de elución del intento 3 de gradiente de [NaCl].....	60
Figura 37. Patrones electroforéticos de las fracciones colectadas al aplicar las condiciones de elución del intento 2 de gradiente de pH.....	60
Figura 38. Curvas de actividad enzimática de las fracciones obtenidas desde la homogenización hasta el desalado de la fracción F3, por triplicado.....	64
Figura 39. Curvas de actividad enzimática de las fracciones obtenidas al realizar la CIC con gradiente de pH bajo las condiciones del ensayo A de la tabla 5.....	65
Figura 40. Unidades enzimáticas totales obtenidas mediante CIC bajo las condiciones del ensayo A de la tabla 5 en cada una de las repeticiones.....	66
Figura 41. Curvas de actividad enzimática de las fracciones obtenidas al realizar la CIC con gradiente de pH bajo las condiciones del intento B de la tabla 5.....	66

Figura 42. Unidades enzimáticas totales obtenidas mediante CIC bajo las condiciones del ensayo B de la tabla 5 en cada una de las repeticiones.....	67
Figura 43. Actividad enzimática de la LDH en función del pH real. Curvas independientes.....	68
Figura 44. Cromatograma final.....	68
Figura 45. Patrones electroforéticos de las fracciones F0, F1, F2, F3 y D2 colectadas mediante la implementación del protocolo.....	69
Figura 46. Patrones electroforéticos de las fracciones colectadas al aplicar las condiciones de elución del ensayo B de gradiente de pH de la tabla 5.....	69
Figura 47. Efecto del pH.....	72
Figura 48. Efecto de la temperatura.....	72
Figura 49. Cálculo de la energía de activación de la LDH.....	73
Figura 50. Curva de saturación de la LDH de músculo esquelético de pollo.....	74
Figura 51. Curvas de saturación de la LDH en presencia de diferentes concentraciones de oxamato de sodio..	75
Figura 52. Transformaciones de Lineweaver-Burk de las curvas de saturación obtenidas al añadir diferentes concentraciones de oxamato de sodio al medio de reacción.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Clasificación de enzimas y sus principales subclases.....	16
Tabla 2. Procedimientos comunes aplicados a la purificación de proteínas.....	25
Tabla 3. Resumen y explicación de los parámetros considerados para elaborar una tabla de purificación de enzimas.....	25
Tabla 4. Detalle de las condiciones aplicadas a las CIC con gradientes de [NaCl].....	43
Tabla 5. Detalle de las condiciones aplicadas a las CIC con gradientes de pH.....	44
Tabla 6. Preparación del medio de reacción para la determinación de la actividad enzimática de la LDH.....	45
Tabla 7. Registro de absorbencia para la determinación de la actividad enzimática de la LDH en las fracciones colectadas.....	45
Tabla 8. Elaboración de la curva patrón para la determinación de proteínas por el método de Bradford.....	46
Tabla 9. Preparación de las muestras para la determinación de proteínas por el método de Bradford.....	46
Tabla 10. Preparación de los geles para SDS-PAGE.....	47
Tabla 11. Registro de absorbencias para la determinación del progreso de la reacción enzimática.....	48
Tabla 12. Preparación del medio de reacción para la determinación del pH óptimo.....	48
Tabla 13. Registro de datos para la determinación del pH óptimo.....	49
Tabla 14. Preparación del medio de reacción para la determinación de la temperatura óptima.....	49
Tabla 15. Registro de datos para la determinación de la temperatura óptima.....	49
Tabla 16. Preparación de los tubos de reacción para la determinación de la cinética enzimática.....	50
Tabla 17. Registro de datos para la determinación de la cinética enzimática.....	50
Tabla 18. Preparación de los tubos de reacción para la determinación del efecto de una concentración 6 mM de oxamato de sodio sobre la cinética enzimática de la LDH.....	50
Tabla 19. Preparación de los tubos de reacción para la determinación del efecto de una concentración 12 mM de oxamato de sodio sobre la cinética enzimática de la LDH.....	51
Tabla 20. Preparación de los tubos de reacción para la determinación del efecto de una concentración 25 mM de oxamato de sodio sobre la cinética enzimática de la LDH.....	51
Tabla 21. Registro de datos para la determinación del efecto de un inhibidor a diferentes concentraciones sobre la cinética enzimática.....	51
Tabla 22. Relación entre número de fracción y el gradiente aplicado en cada cromatografía realizada.....	58
Tabla 23. Tabla de purificación de la LDH empleando CII con gradiente de [NaCl].....	61
Tabla 24. Tabla de purificación de la LDH empleando CII con gradiente de pH.....	61
Tabla 25. Detalle de los procesos de homogenización y precipitación con sulfato de amonio realizados por triplicado.....	63
Tabla 26. Detalle del proceso de desalado realizado por triplicado.....	64
Tabla 27. Valores de pH real de las fracciones colectadas al realizar la CIC bajo las condiciones del ensayo B (tabla 5).....	67
Tabla 28. Tabla de purificación del primer aislamiento de LDH a partir de músculo esquelético de pollo.....	71
Tabla 29. Tabla de purificación del segundo aislamiento de LDH a partir de músculo esquelético de pollo.....	71
Tabla 30. Tabla de purificación del tercer aislamiento de LDH a partir de músculo esquelético de pollo.....	71
Tabla 31. Valores de $V_{m\acute{a}x.}$, K_M , $V_{m\acute{a}x.ap.}$ y $K_{M_{ap.}}$ de la LDH purificada.....	77
Tabla 32. Resumen de los parámetros de caracterización de la LDH.....	80

1. LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

SIGLA O ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ϵ	Coeficiente de extinción molar
[I]	Concentración de inhibidor
[S]	Concentración de sustrato
°C	<i>Grado Celsius</i>
μg	Microgramo
μL	Microlitro
%	Por ciento
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosín tri-fosfato
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CIC	Cromatografía de Intercambio Catiónico
CII	Cromatografía de Intercambio Iónico
CH_3COOH	Ácido acético
CoA	Coenzima A
Da	Daltones
DE	Desviación estándar
E_A	Energía de activación
g	Gramo
Gln	Glutamina
His	Histidina
hrs	Horas
Ile	Isoleucina
J	Joule
K	Kelvin
K_{cat}	Constante catalítica o número de recambio.
KDa	Kilodaltones
K_M	Constante de Michaelis-Menten
$K_{M_{\text{ap}}}$	Constante de Michaelis-Menten aparente
LDH	Lactato Deshidrogenasa
ln	Logaritmo natural
M	Molar
m/v	Masa/volumen
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPM	Marcadores de peso molecular
mV	Milivoltios
NaCl	Cloruro de sodio
NAD^+	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina reducido
NaHCO_3	Bicarbonato de sodio
nm	Nanómetro

SIGLA O ABREVIATURA	SIGNIFICADO
pH	Potencial de Hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
pKa	Constante de disociación ácida
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
R ²	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo(s)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio
t	Tiempo
TCA	Ácido Tricloroacético
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Thr	Treonina
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
U	Unidad enzimática de actividad (μmol/min)
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
V ₀	Velocidad inicial
VM	Volumen muerto
V _{máx.}	Velocidad máxima
V _{máx.ap}	Velocidad máxima aparente

2. RESUMEN

Como parte de las actividades que ya se realizan en el curso de Bioquímica Experimental (0141) impartido en la Facultad de Química de la UNAM, se purifica la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) mediante cromatografía de afinidad, y se aplica también un protocolo de Cromatografía de Intercambio Catiónico (CIC) con una elución isocrática de NaCl. Sin embargo, se vio la necesidad de optimizar los resultados obtenidos hasta la fecha mediante este último protocolo, por lo que en este proyecto se buscó comparar dos diferentes condiciones de elución en gradiente, para lograr el aislamiento de la LDH mediante CIC.

Se aplicaron dos gradientes crecientes diferentes para realizar la elución en la columna cromatográfica, uno de sales (NaCl) y otro de pH. A lo largo de la investigación se realizaron varias modificaciones a los protocolos inicialmente planteados, hasta obtener los resultados esperados en materia de purificación. Al comparar los resultados de actividad y purificación, monitoreada mediante Electroforesis en gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (PAGE-SDS), se encontró que la mejor purificación se obtiene al aplicar un gradiente de pH.

Se realizó también la caracterización parcial de la enzima, evaluando el efecto de la variación del pH, efecto de la variación de la temperatura, el efecto de la concentración de sustrato, y el del inhibidor oxamato de sodio a diferentes concentraciones, obteniéndose los parámetros de pH óptimo, temperatura óptima, energía de activación (E_A), constante de Michaelis (K_M), velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x.}$), y K_M y $V_{m\acute{a}x.}$ aparentes, para cada diferente concentración de inhibidor evaluada. Se determinó también el peso molecular de la enzima y se calcularon los valores de constante catalítica ($K_{cat.}$) y eficiencia catalítica (tabla 32).

3. JUSTIFICACIÓN

Con los resultados obtenidos durante la presente investigación, se busca obtener un protocolo que permita a los alumnos del curso de Bioquímica Experimental purificar a la enzima LDH de músculo esquelético de pollo, empleando cromatografía de intercambio catiónico y aplicando un gradiente en la elución, como alternativa a las condiciones de elución empleadas actualmente en dicho curso, que no han permitido lograr la purificación de la LDH mediante CIC. La principal finalidad es que el alumno pueda aplicar sus conocimientos teóricos en materia de enzimología en el proceso de purificación.

Como parte de una institución con un firme compromiso con la sociedad, el laboratorio de Bioquímica Experimental busca siempre la optimización de los recursos de todo tipo empleados en cada uno de los experimentos que en él se realizan, así como brindar a sus alumnos la experiencia más enriquecedora en los temas involucrados en el curso, por tanto, con el presente trabajo se busca ampliar los conceptos a revisar en materia de purificación de proteínas y en el trabajo con enzimas en general, obteniendo los mejores resultados posibles.

4. INTRODUCCIÓN

Desde el primer aislamiento de LDH reportado, en 1940, se han implementado diversos métodos para purificar dicha enzima a partir de una gran variedad de organismos y combinando diferentes técnicas (Kopperschläger, G., Kirchberger, J. 1996; Al-Jassabi, S. 2002; Coquelle, N. 2007; Pesce, A. 1967). La mayoría de las metodologías desarrolladas incluyen una o más técnicas cromatográficas en el proceso. El método más empleado para tal propósito ha sido la cromatografía de intercambio iónico, la cual ofrece una gran variedad de opciones en cuanto a soporte a emplear, tipo de elución, etc. (Clark, P. *et al.* 1976).

Para la presente investigación se optó por realizar la purificación de LDH a partir de músculo esquelético de pollo, mediante cromatografía de intercambio catiónico. Esta enzima presenta múltiples ventajas para ser empleada en un experimento de laboratorio de pregrado, pues es de alta abundancia relativa en músculo, un tejido fácil de obtener y manipular, y que facilita en cierta manera su purificación, además, tiene una elevada actividad, y es muy estable (Karamanos, Y. 2014). Actualmente se cuenta con numerosos estudios sobre la abundancia relativa de las diferentes isoformas de la LDH en los distintos tejidos del pollo, por lo que al trabajar con tejido de pechuga de pollo, se esperaba desde un inicio purificar la isoenzima 5 de la LDH (Heinova, D. *et al.* 1999; Withycombe, W. 1967).

De manera general, la purificación se realiza partiendo de la obtención de un extracto crudo del tejido, en este caso muscular, del cual se eliminan los restos de tejido mediante centrifugación. Posteriormente, se satura la solución resultante con sales neutras, comúnmente sulfato de amonio, a porcentajes de saturación que dependen de las propiedades particulares de la proteína de interés. En este caso, los porcentajes de saturación empleados fueron de 55% y 75% (Holbrook, J. *et al.* 1982; Vega, F. 2013; Datos de Laboratorio de Bioquímica Experimental. Servicio Social, 2010). El siguiente paso consiste en eliminar el exceso de sal, para lo cual se recurrió a la cromatografía de exclusión molecular, empleando para ello Sephadex G-25. El Sephadex es un dextrano entrecruzado, que se presenta como microesferas porosas, capaz de retener partículas de determinados tamaños dependiendo del tamaño de sus poros. El Sephadex G-25, de manera particular, tiene un rango de fraccionamiento reportado de 1 a 5 KDa, lo que implica que las moléculas de menor peso molecular serán retenidas en los poros de las microesferas, mientras que las proteínas serán excluidas, permitiendo así el desalado de la muestra, y la eliminación de algunas otras moléculas presentes (Voet, D., Voet, J. 2009.).

La Cromatografía de Intercambio Iónico (CII) se basa en la propiedad de carga eléctrica de las moléculas, en este caso, las proteínas, que les permite interactuar con la fase estacionaria, que contiene grupos químicos con carga eléctrica, aprovechando principalmente la posibilidad de modificar su grado de unión a la resina de intercambio al cambiar el pH del medio, o la fuerza iónica del mismo. Ya que se han reportado purificaciones mediante CII, en las cuales se ha aplicado elución con gradiente, principalmente de sales; se evaluaron varios gradientes, tanto de [NaCl] como de pH, para determinar cuál de los dos arroja mejores resultados en cuanto a purificación, al realizarse en las condiciones del laboratorio de Bioquímica Experimental de la Facultad de Química.

Hay numerosos autores que reportan un punto isoeléctrico para la LDH de entre 7.2 y 7.6, sin embargo, también hay reportes de un punto isoeléctrico experimental de entre 8.0 y 8.4 (Smit, M. *et al.* 1987; Malamud, D., Drysdale, J. 1977). Por tanto se realizaron ensayos considerando ambos datos para la elección tanto del pH de equilibrio de la columna, como los valores de pH empleados para el gradiente de elución.

Como soporte, o fase estacionaria, se optó por emplear la resina MacroPrep High S Support, un copolímero de metacrilato, cuyo grupo intercambiador es el sulfonilo ($-SO_3^-$), con carga negativa, que actúa como un intercambiador catiónico fuerte.

El proceso de purificación se suele monitorear mediante electroforesis, en este caso se recurrió a electroforesis desnaturizante en poliacrilamida (SDS-PAGE).

Una vez lograda la purificación, se procede a realizar diversas evaluaciones a la enzima aislada, dependiendo de los fines que se tengan contemplados. Se procedió a la caracterización de la misma, y a la obtención de sus constantes cinéticas, realizando las determinaciones de curso temporal de la reacción enzimática, temperatura óptima, y pH óptimo para la caracterización de la LDH purificada. La variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato, mostró que la enzima LDH sigue una cinética de tipo Michaeliano. Los valores de $V_{m\acute{a}x.}$ y K_M se obtuvieron mediante la regresión Lineweaver-Burk ($\frac{1}{v}$ vs. $\frac{1}{[S]}$). Para la obtención de los valores $V_{m\acute{a}x.ap}$ y $K_{M.ap}$, se empleó oxamato de sodio como inhibidor, pues es el principal inhibidor de la enzima reportado (Boyer, P. 1982.; Kopperschläger, G., Kirchberger, J. 1996; Holbrook, J. *et al.* 1982). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en la literatura.

5. MARCO TEÓRICO

5. 1. Proteínas

5. 1. 1. Definición

Las moléculas que componen a los organismos vivos son de elevada complejidad y variedad. Unas de las más importantes son aquellas a las que se denomina *proteínas*. Químicamente las proteínas son polímeros, resultado de la unión de diferentes ácidos α -amino carboxílicos, o α -aminoácidos (Figura 1).

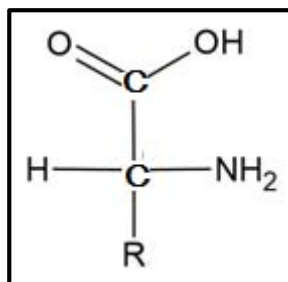


Figura 1. Estructura general de los α -aminoácidos.

Los distintos α -aminoácidos se diferencian entre sí en estructura y propiedades debido a sus cadenas laterales (R). Éstas pueden ser cadenas alifáticas, grupos aromáticos, o grupos químicos que confieran al α -aminoácido propiedades ácidas o alcalinas. Los α -aminoácidos se unen entre sí mediante un enlace covalente entre el grupo α -carboxilo de uno y el grupo α -amino de otro. Este enlace se denomina peptídico, y los compuestos resultantes se denominan péptidos. Las proteínas son polipéptidos, es decir, cadenas peptídicas muy largas, cuyas propiedades dependen de la secuencia de α -aminoácidos que las componen (Voet, D., Voet, J. 2007; Areal, R. 2004).

Tanto el grupo amino como el carboxilo de un aminoácido pueden ionizarse dependiendo el pH al que se encuentren sometidos. Además, algunas de las cadenas laterales (R) consisten en grupos con propiedades ácido base que también se ionizan en función del pH. Por tanto, los aminoácidos tendrán una carga neta, positiva o negativa, debido a la ionización de todos estos grupos químicos. El valor de pH al que la carga neta de un aminoácido es 0, se denomina *punto isoeléctrico (pI)*. Al estar conformados por aminoácidos, las proteínas también adquieren carga eléctrica en función del pH, y tienen un pI (Pacheco, D. 2004).

5. 1. 2. Estructura y clasificación de las proteínas

Existen por lo menos cuatro niveles de estructuración para una proteína (Figura 2), cada uno de los cuales la convierten en una molécula única. El nivel más sencillo es el que está definido por la secuencia específica lineal de α -aminoácidos enlazados covalentemente para formar la cadena peptídica. Ésta es la *estructura primaria* (García, E. 2013). El siguiente nivel, o *estructura secundaria*, considera la disposición espacial local que la cadena peptídica adquiere como resultado de la interacción entre las diferentes partes que componen la cadena principal, dando origen a estructuras que pueden ser de tipo hélice, placas u hojas plegadas tipo β y vueltas. En los plegamientos tipo hélice, los aminoácidos de la cadena principal se disponen de manera parcialmente enrollada, o helicoidal. Dependiendo de la cantidad de aminoácidos que conforman los giros en la hélice y de la dirección en la que ésta se enrolla, se pueden obtener distintas formas de hélice, sin embargo, la más común es la tipo α , que se enrolla hacia la derecha y tiene una longitud de giro de 3.6 aminoácidos. La hoja plegada tipo β se conforma de dos o más segmentos de la cadena principal, denominados hebras β , que se acomodan de forma extendida uno al lado de otro, paralela o anti-paralelamente, dando origen a estructuras de tipo laminar. Las vueltas, como su nombre sugiere, permiten cambiar la dirección de la cadena principal, son comúnmente rígidas y de estructura definida, aunque generalmente carecen de una estructura periódica regular (Peretó, J. 2007; García, E. 2013).

En la *estructura terciaria* las proteínas adquieren una conformación tri-dimensional, como resultado de la combinación de hélices y plegamientos en diferentes partes de la misma cadena. Como resultado de esta organización, pueden originarse dos tipos de proteínas (Areal, R. 2002; Peretó, J. 2007):

- a) Proteínas fibrosas, que forman puentes de hidrógeno intermoleculares, y son generalmente insolubles en agua. Son moléculas cuya principal característica es su secuencia de aminoácidos relativamente periódica, que le otorga una conformación extendida.
- b) Proteínas globulares, en las que la mayor parte de los residuos de aminoácidos no polares quedan orientados hacia el interior de la proteína, mientras que las partes hidrofílicas tienden a orientarse a la superficie, por lo que la molécula resultante es hidrosoluble, o soluble en soluciones acuosas de ácidos, bases o sales.

La conformación de las proteínas globulares origina unidades compactas, regularmente esferoides.

Finalmente, dos o más estructuras terciarias pueden interactuar, formando un complejo polipeptídico, generalmente la forma funcional de la proteína. Cada una de las estructuras terciarias que conforman la estructura cuaternaria se denomina subunidad. Las subunidades que conforman una proteína pueden ser iguales o muy parecidas (formando proteínas homotípicas) o totalmente diferentes (originando proteínas heterotípicas) (Peretó, J. 2007).

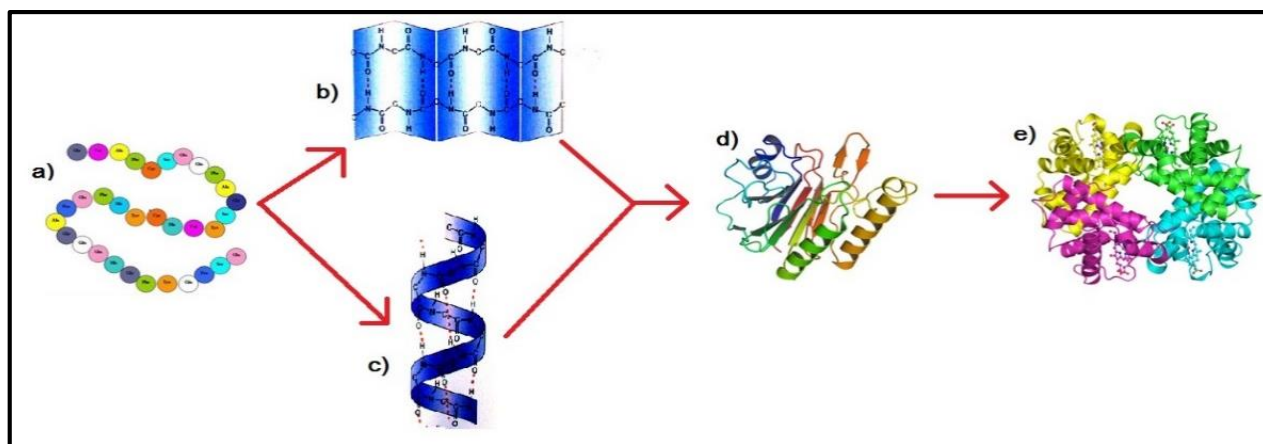


Figura 2. Niveles de estructuración de las proteínas. a) Estructura primaria; b) Estructura secundaria, hoja plegada β ; c) Estructura secundaria, hélice α ; d) Estructura terciaria; e) Estructura cuaternaria.

Dentro las células de un organismo, las proteínas desempeñan una gran variedad de funciones, que van desde la estructural y de transporte, hasta la catalización de las reacciones químicas necesarias para la vida. A este último grupo de proteínas se les conoce como *enzimas*.

5. 2. Enzimas

5. 2. 1. Definición y características

Las enzimas son proteínas capaces de catalizar las reacciones metabólicas, por lo cual se les conoce como catalizadores biológicos. Existen en la naturaleza una enorme cantidad de enzimas, cada una de las cuales cataliza un sólo tipo de reacción, y aunque se acepta que una enzima actúa sobre un único sustrato, recientemente se han encontrado enzimas capaces de actuar sobre más de un sustrato (Ferrer, S. 2006).

Las enzimas, desde el punto de vista biológico, superan por mucho a los catalizadores inorgánicos en varios aspectos (Voet, D., Voet, J. 2009):

- I. Pueden acelerar una reacción en órdenes de magnitud que van desde 10^6 a 10^{23} veces.
- II. Las condiciones en las que actúan son compatibles con la vida, en comparación a las requeridas para una catálisis inorgánica:
 - i. Temperatura menor a 100°C .
 - ii. Presión atmosférica.
 - iii. pH neutro o muy cercano al neutro.
- III. Especificidad de reacción: tanto con su sustrato como con los productos.
- IV. Actúan en cantidades muy pequeñas y se recuperan al terminar la catálisis.
- V. Capacidad de regulación en respuesta a la concentración de la misma enzima, reactivos, productos u otras sustancias.

A algunas enzimas les basta con adquirir su conformación o estructura cuaternaria para poder efectuar su actividad catalítica, mientras que otras, requieren además de otro u otros componentes adicionales, no proteicos que en general son llamados cofactores. El complejo enzima-cofactor se denomina holoenzima (Figura 3). Cuando la proteína se separa del cofactor es inactiva, y recibe entonces el nombre de apoenzima. Cuando el cofactor de una apoenzima es una molécula orgánica, éste se denomina coenzima, y actúan, por lo general, como transportadores intermediarios de grupos funcionales, de átomos específicos o de electrones (Ferrer, S. 2006; Voet, D., Voet, J. 2009).

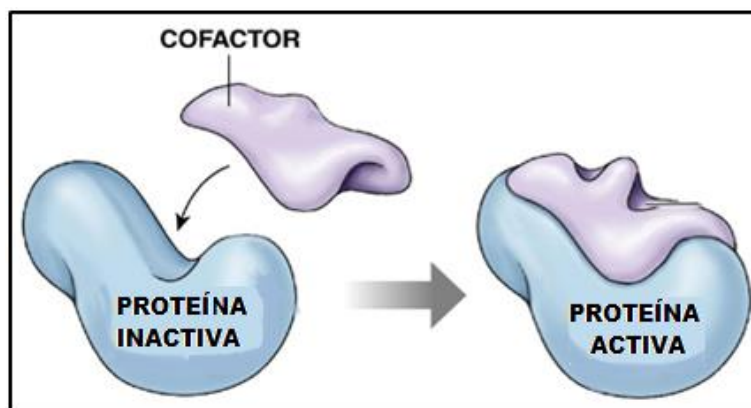


Figura 3. Holoenzimas. El complejo enzima-cofactor (holoenzima) es activo, mientras que la apoenzima por sí sola, carece de actividad catalítica. (Modificado de <https://biochemmaniacs.wordpress.com>)

5. 2. 2. Clasificación de las enzimas

A pesar de la enorme cantidad de reacciones que son catalizadas por enzimas, éstas se pueden agrupar o clasificar en 6 grandes categorías (Ayala, H. 2011; Teijón, J. 2006):

- ☛ Oxidoreductasas: enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción, es decir, de transferencia de electrones.
- ☛ Transferasas: enzimas que catalizan la transferencia de grupos funcionales.
- ☛ Hidrolasas: enzimas que realizan la hidrólisis de su sustrato.
- ☛ Liasas: adición de dobles enlaces.
- ☛ Isomerasas: enzimas que catalizan reacciones de isomerización.
- ☛ Ligasas: enzimas que crean enlaces con rompimiento de ATP (adenosín trifosfato).

Algunas subclases que pertenecen cada uno de los grupos mencionados anteriormente se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Clasificación de enzimas y sus principales subclases. (Tomado de Devlyn, T. 2006)

Clase enzimática	Principales subclases	Clase enzimática	Principales subclases
1.- Oxidoreductasas	<ul style="list-style-type: none"> i. Deshidrogenasas ii. Oxidasas iii. Reductasas iv. Peroxidasas v. Catalasas vi. Oxigenasas vii. Hidroxilasas 	4.- Liasas	<ul style="list-style-type: none"> i. Descarboxilasas ii. Aldolasas iii. Hidratasas iv. Deshidratasas v. Sintasas vi. Liasas
2.- Transferasas	<ul style="list-style-type: none"> i. Transaldolasa/ Transcetolasa ii. Acil-,metil-, glucosil- y fosforiltransferasas iii. Quinasas iv. Fosfomutasas 	5.- Isomerasas	<ul style="list-style-type: none"> i. Racemasas ii. Epimerasas iii. Isomerasas iv. Mutasas (algunas)
3.- Hidrolasas	<ul style="list-style-type: none"> i. Esterasas ii. Glucosidasas iii. Peptidasas iv. Fosfatasas v. Tioasas vi. Fosfolipasas vii. Amidasas viii. Desaminasas ix. Ribonucleasas 	6.- Ligasas	<ul style="list-style-type: none"> i. Sintetasas ii. Carboxilasas

5. 2. 3. Sitio activo o catalítico. Modelos de interacción enzima-sustrato

Las enzimas son macromoléculas de un peso molecular que oscila entre varios miles y varios millones de unidades atómicas. Sin embargo, no toda la molécula participa en la catálisis de la reacción, pues en realidad, sólo una porción de ella entra en contacto directo con el sustrato (Ferrer, S. 2006). La pequeña región de la enzima a la cual el sustrato se une, y donde es transformado, se denomina *sitio activo* o *sitio catalítico* de la enzima.

Existen dos principales modelos para explicar que la unión entre el sitio activo de la enzima y el sustrato sea tan específica y eficiente. Uno de ellos, el modelo de "Llave-Cerradura", establece que el sitio activo y el sustrato poseen estructuras tridimensionales

complementarias, de tal

manera que encajan a la perfección al aproximarse (De Paula, A. 2006). Mientras que el segundo modelo, el del "Ajuste inducido", propone que el sitio activo no es un espacio molde para el sustrato, sino que es el mismo sustrato al aproximarse al sitio activo el que induce, mediante la interacción de sus grupos químicos y los de los aminoácidos que conforman a la enzima, un cambio de forma o conformación en la región del sitio activo, de manera que se conduce a los grupos químicos de ambas moléculas a adoptar posiciones que favorecen su interacción (Campbell, N. 2007)(Figura 4).

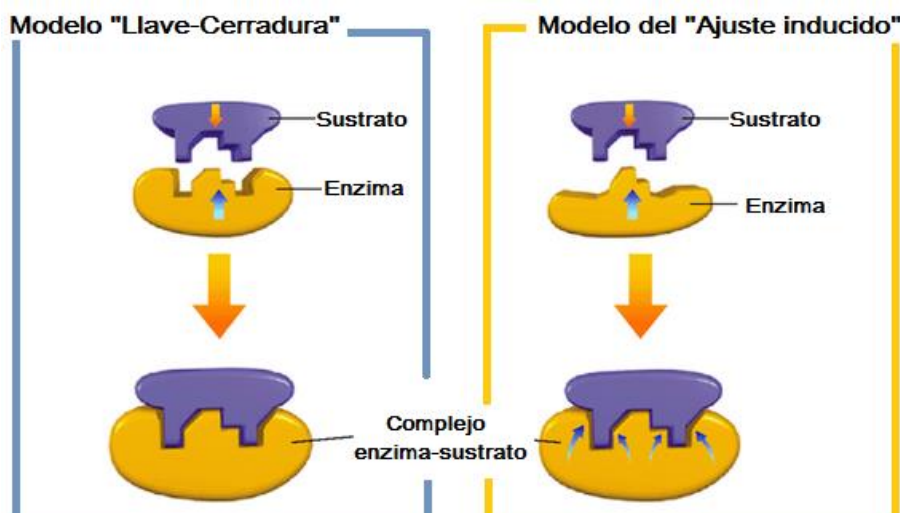


Figura 4. Modelos de interacción enzima-sustrato. (Modificado de <http://teoriacelular12345.blogspot.mx>)

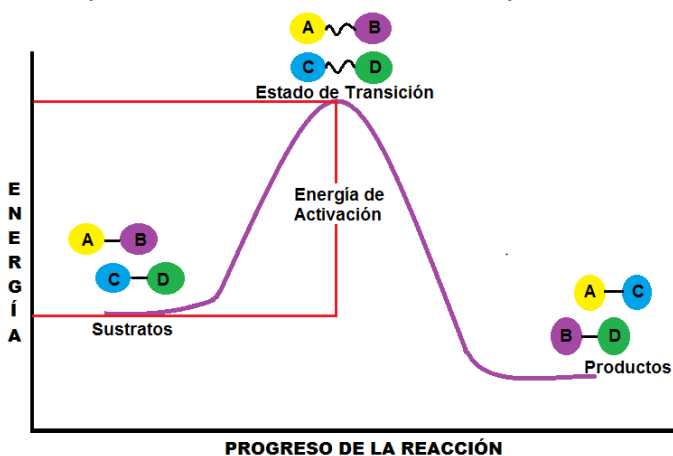


Figura 5. Perfil energético de una reacción química.

5. 2. 4. Catálisis enzimática

Una reacción química implica la ruptura y formación de enlaces entre las moléculas implicadas para generar un compuesto nuevo. Para ello, los sustratos pasan por un estado altamente inestable, denominado *estado de transición*, en el que es posible modificar sus enlaces, antes de poder generarse los productos de la reacción. Para llegar a dicho estado se requiere suministrar energía. Esta energía se conoce como *energía libre de activación* o simplemente *energía de activación* (E_a)(Figura 5).

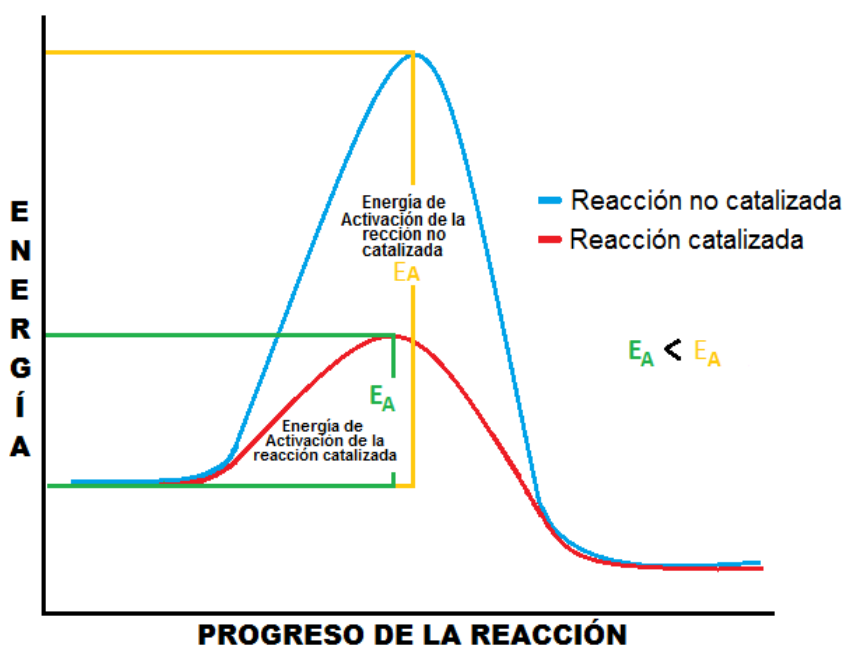


Figura 6. Comparación entre el perfil energético de una reacción sin catálisis y la misma reacción catalizada.

La energía de activación determina la velocidad de la reacción, pues de no ser alcanzado tal nivel energético, la reacción no procederá. Lamentablemente, en la mayoría de las reacciones implicadas en el metabolismo, la energía de activación es tan alta que no es posible realizarse en condiciones que permitan la vida del organismo. Una enzima cataliza una reacción química

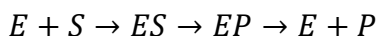
al disminuir la energía de activación (Figura 6), empleando para ello varios mecanismos (Campbell, N. 2007; Koolman, J. 2004.):

- i. Durante la unión con el sustrato en el sitio activo se eliminan las capas de hidratación. Además, el sitio activo actúa como un molde en el que el o los sustratos son “acomodados”, aproximándose de tal manera que se favorece la reacción.
- ii. La interacción entre los sustratos y el sitio activo, también favorece que los enlaces entre los átomos de los sustratos se “deformen”, tensándose o curvándose, aproximándose así a su configuración en el estado de transición. De esta manera, la cantidad de energía que se debe proporcionar a la reacción es menor.

- iii. Los residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima también pueden proporcionar un entorno favorable para la reacción. Por ejemplo, los aminoácidos con propiedades ácido-base pueden conferir al sitio activo un microambiente de pH, tal que la reacción se vea favorecida.
- iv. En algunas ocasiones, alguno de los grupos químicos del sitio activo participan directamente en la reacción, formando momentáneamente un enlace covalente con el sustrato. Después de la reacción, dicho enlace se rompe, por lo que la enzima no se ve modificada.

5. 2. 5. Cinética enzimática

Se divide a la reacción catalizada por una enzima en varios procesos: uno en el que la enzima (E) y el sustrato (S) se unen para formar un complejo (ES). Posteriormente ocurre la transformación del S en el producto (P), de modo que el complejo ES se convierte en el complejo EP. Finalmente, el complejo EP se disocia, quedando la enzima nuevamente libre (Fersht, A. 1980):



El estudio de las reacciones catalizadas por enzimas no puede realizarse completamente aplicando sólo los principios generales de la cinética química, pues hay una diferencia entre el curso de ambas reacciones (la no catalizada por enzima y la catalizada por alguna enzima): la saturación por sustrato. Para poder estudiar la velocidad a la que ocurren las reacciones bioquímicas se recurre a la cinética enzimática (Teijón, J. 2006).

5. 2. 5. 1. Michaelis-Menten

Se considera que se ha llegado a un estado de saturación cuando los centros activos de la totalidad de las moléculas de la enzima están ocupados por una molécula de sustrato. En este contexto, la velocidad inicial (V_o) de la reacción depende de la concentración de sustrato ($[S]$) en el medio de reacción. La mayoría de las enzimas describen un comportamiento tal, que al graficar la velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de sustrato, se obtiene una curva hiperbólica, como la que se muestra en la figura 7.

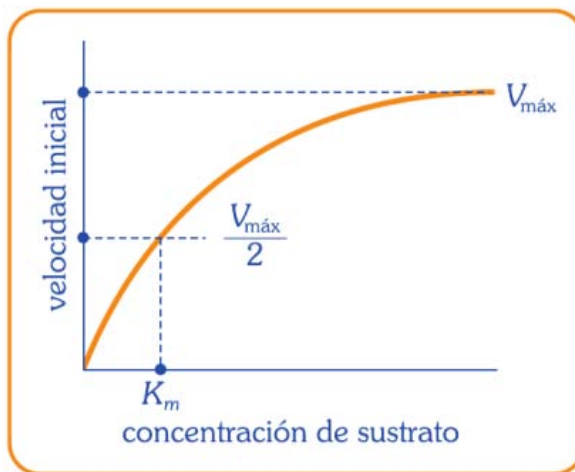


Figura 7. Curva hiperbólica representativa de la cinética de Michaelis-Menten (Tomado de Teijón, J. 2006).

Este tipo de cinética fue estudiada por Leonor Michaelis y Maude Menten en 1913, por lo que se conoce comúnmente como Michaelis- Menten. Y en ella se distinguen tres etapas (Teijón, J. 2006):

- ◇ A una concentración baja de sustrato, la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración del sustrato, siguiendo una cinética de primer orden, es decir, se sigue una relación lineal.
- ◇ A concentraciones de sustrato intermedias, la velocidad del proceso deja de ser lineal. A esta zona se la denomina de cinética mixta, y la velocidad incrementa más lentamente.
- ◇ Por último, cuando la concentración de sustrato es alta, la velocidad de la reacción se hace prácticamente constante e independiente de la concentración de sustrato, por lo tanto, la cinética se considera de orden cero. La velocidad se aproxima entonces a un valor máximo. Dicho valor se denomina velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x.}$).

La forma matemática de expresar la curva de saturación enzimática se conoce como ecuación de Michaelis-Menten, expresada a continuación:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x.} * [S]}{K_M + [S]}$$

En donde K_M es un el valor de la concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima ($\frac{1}{2}V_{m\acute{a}x.}$), y se denomina constante de Michaelis.

5. 2. 5. 2. Lineweaver-Burk

Para poder calcular con mayor facilidad los valores de $V_{m\acute{a}x.}$ y K_m , se emplean otros métodos gráficos con base en transformaciones matemáticas de la ecuación de Michaelis; una de las expresiones más utilizadas es la representación de Lineweaver-Burk, con ecuación general:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x.} * [S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x.}}$$

Y consiste en representar gráficamente en inverso de V_0

en función del inverso de $[S]$, obteniéndose una línea recta con pendiente positiva (Figura 8), pudiéndose calcular de forma sencilla los valores $V_{m\acute{a}x.}$ y K_M (Fersht, A. 1980).

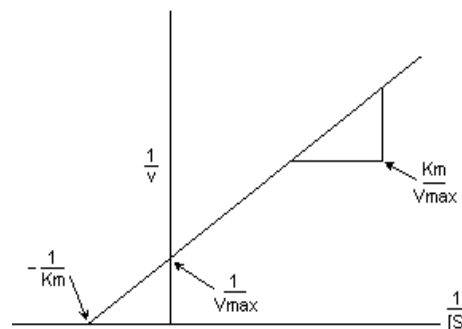


Figura 8. Transformación de Lineweaver-Burk para la cinética enzimática de Michaelis-Menten (Modificado de Teijón, J. 2006).

5. 2. 5. 3. Otros parámetros cinéticos

Además de la $V_{m\acute{a}x}$. y la K_M , hay otras constantes cinéticas importantes para caracterizar a las enzimas, entre éstas se encuentran (Müller-Esterl, W. 2008):

- **Constante catalítica o número de recambio (K_{cat}):** su valor indica el número máximo de moléculas de sustrato que son convertidas en producto por unidad de tiempo, generalmente, por segundo.
- **Eficiencia catalítica (ϵ):** valora la capacidad de rendimiento de una enzima, al proporcionar una idea de la afinidad que tiene ésta por el sustrato. Su valor corresponde al cociente $\frac{K_{cat}}{K_M}$.

5. 2. 6. Inhibición

Existen sustancias conocidas como inhibidores, que pueden disminuir la actividad de las enzimas, ya sea al intervenir en su interacción con el sustrato o al modificar directamente a la enzima. Se consideran en general dos tipos de inhibición enzimática, la reversible, que implica una unión no covalente de la enzima y el inhibidor; y la irreversible, en la que el inhibidor se une covalentemente a la enzima, con algún grupo funcional importante para la catálisis en el sitio activo, impidiendo permanentemente su acción sobre el sustrato. (Voet, D. & Voet, J., 2004). Los subtipos de inhibición más comunes son:

- **Competitivo:** el inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima, generalmente por similitud entre ambas moléculas. Sin embargo, aunque logra unirse, no se efectúa ninguna reacción (Voet, D. & Voet, J., 2004). En términos numéricos la $V_{m\acute{a}x}$. no se modifica, pero la K_M aumenta, por requerirse mayor cantidad de sustrato para alcanzarla (Figura 9a).
- **No competitivo:** el inhibidor se une al complejo enzima sustrato, impidiendo la conversión del sustrato en producto. En este caso, la K_M no se modifica, pues la inhibición no se relaciona con una competencia por el sitio activo, sin embargo, el valor de la $V_{m\acute{a}x}$. se ve disminuido (Figura 9b) (McKee, J. 2009).
- **Mixto:** es una combinación de las inhibiciones competitiva y acompetitiva, es decir, el inhibidor se une tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato. Como resultado de esta combinación de mecanismos, tanto el valor de $V_{m\acute{a}x}$. como el de K_M se ven modificados (Figura 9c) (Voet, D. & Voet, J., 2004).

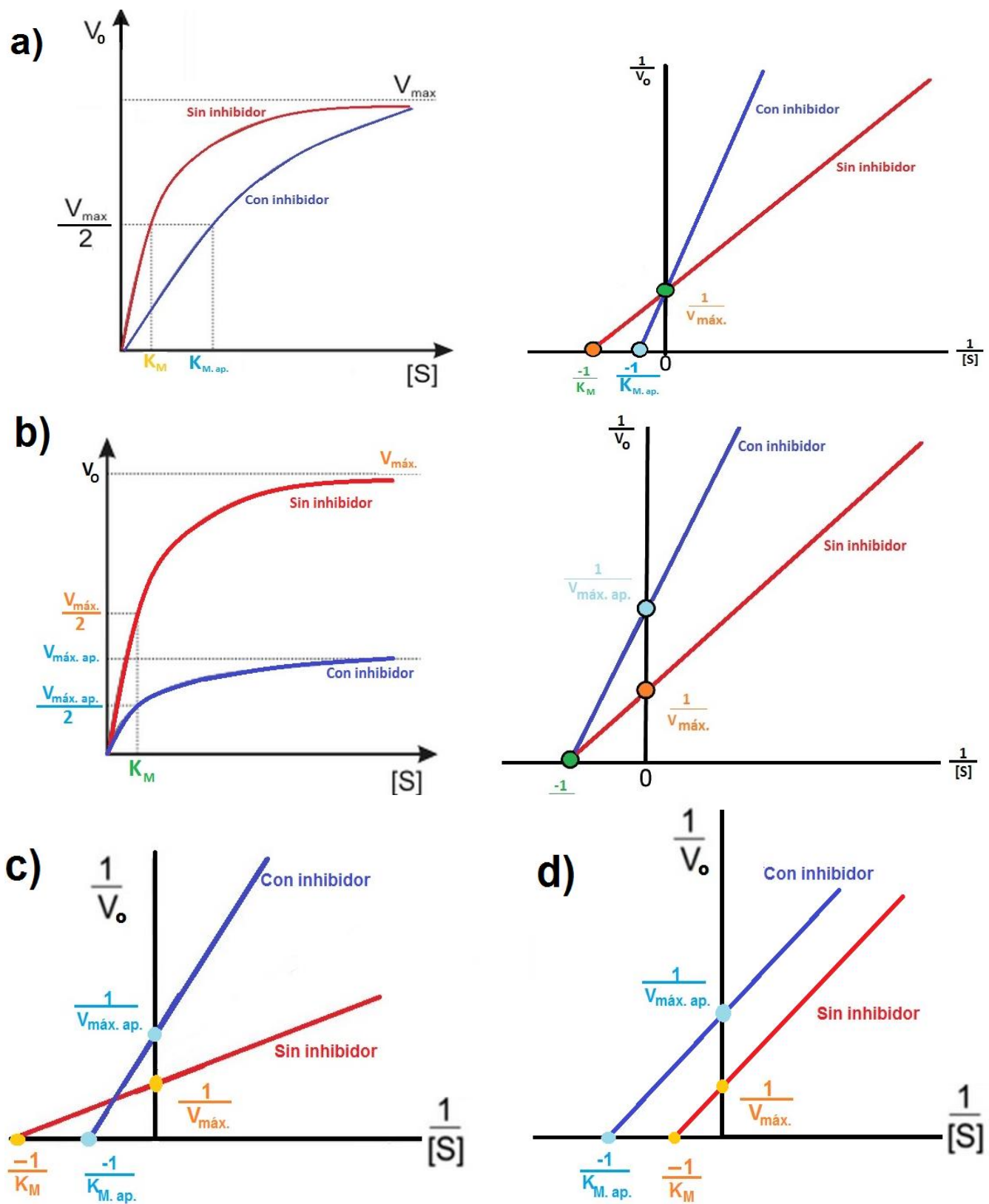


Figura 9. Representaciones de los distintos tipos de inhibición. Se observa la modificación de los valores cinéticos $V_{máx.}$ y K_M . a) Gráfica de Michelis-Menten y transformación Lineweaver-Burk para un inhibidor competitivo; b) Gráfica de Michelis-Menten y transformación Lineweaver-Burk para un inhibidor no competitivo; c) Representación de Lineweaver-Burk de una inhibición mixta; d) Representación de Lineweaver-Burk de una inhibición acompetitiva o incompetitiva.

- Incompetitivo o incompetitivo: se trata de un tipo muy raro de inhibición en el que tanto la $V_{m\acute{a}x.}$ como la K_M se ven afectadas, de tal manera que al realizar la representación Lineweaver-Burk, se obtiene una familia de rectas paralelas (con igual pendiente). Una posible explicación a este fenómeno es una unión selectiva del inhibidor al complejo ES, (Figura 9d) (Koolman, J. 2004; McKee, J. 2009).

5. 2. 7. Condiciones que modifican la velocidad de las enzimas

Al ser estructuras proteicas, las enzimas son vulnerables ante cualquier factor ambiental que pueda modificar su estructura, afectando también su actividad catalítica. Sin embargo, son dos los factores a los cuales se les considera especialmente sensibles, e importantes para su caracterización: el pH y la temperatura (McKee, J. 2009).

5. 2. 7. 1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Los cambios en el pH del medio en el que se encuentra la enzima pueden alterar el estado de ionización de los residuos de aminoácidos con propiedades ácido-base. Si estos residuos participan en la unión de la enzima con el sustrato, la afinidad de éstos se verá afectada, pero si los residuos afectados participan en la catálisis, entonces también se puede ver alterada la transformación del sustrato en producto (Feduchi, E. 2010). Existe un pH tal, al que la enzima actúa con máxima eficiencia, denominado *pH óptimo* (Figura 10).

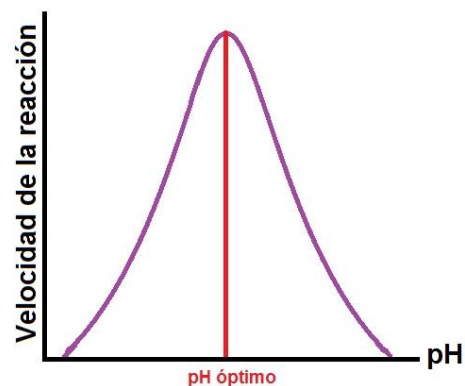


Figura 10. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

5. 2. 7. 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

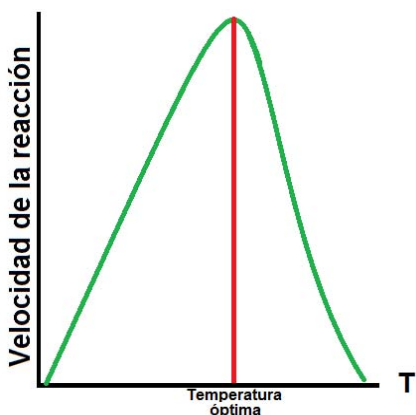


Figura 11. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

El incremento de la temperatura generalmente favorece el progreso de las reacciones. En una reacción catalizada enzimáticamente ocurre lo mismo, pues el incremento de la temperatura del medio conduce a un aumento en la velocidad de la reacción, pues se genera el aporte energético necesario para llegar al estado de transición. Sin embargo, conforme la temperatura del medio de reacción se aproxima a la temperatura de descomposición de la enzima, ésta comenzará a perder su capacidad catalítica hasta llegar a desnaturalizarse

completamente (Feduchi, E. 2010). La temperatura a la cual se obtiene la máxima eficiencia en la actividad enzimática se denomina *temperatura óptima* (Figura 11).

5. 2. 8. Purificación de enzimas

Las células contienen una gran variedad y número de moléculas, como proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc. Cuando se desea caracterizar una de ellas, se debe aislar del resto de los componentes celulares, es decir, purificarla. Se busca siempre obtener la máxima pureza posible, con la menor pérdida de la molécula de interés. No existe un protocolo universal de purificación para cada tipo de biomolécula, dependerá siempre de las propiedades particulares de cada una.

No obstante, se puede considerar un esquema general, en el que es importante considerar varias elecciones. En el caso particular de las enzimas se pueden mencionar (Figura 12):

- a) Fuente de la enzima a purificar.
- b) Método de homogeneización adecuado.
- c) Método o métodos de separación.

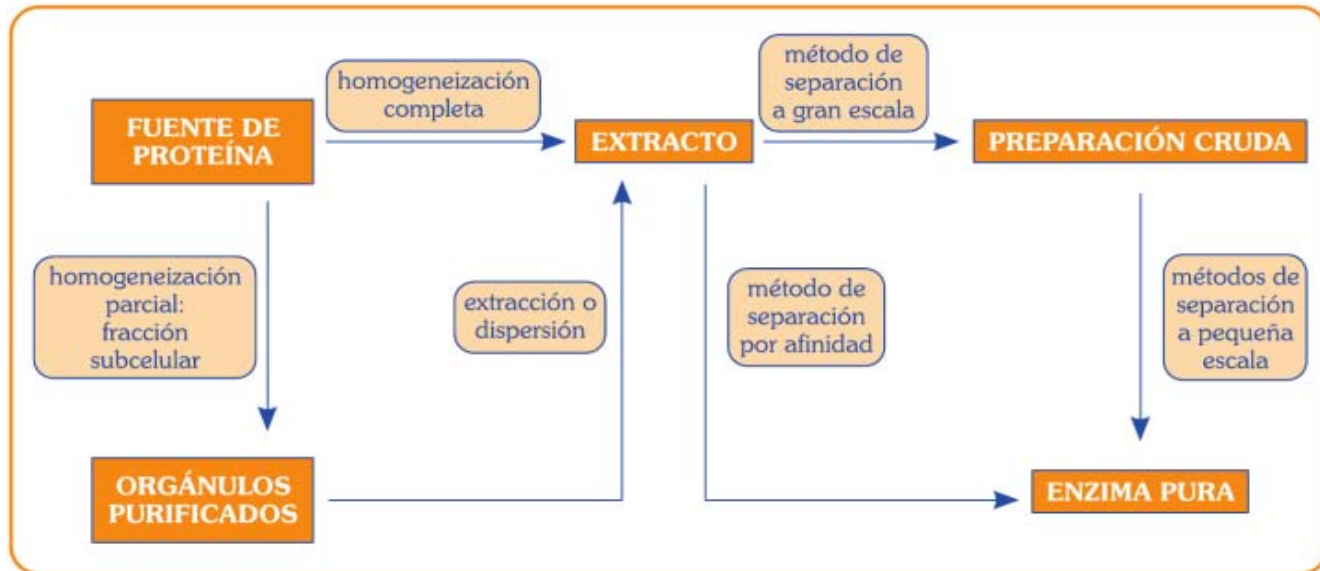


Figura 12. Etapas involucradas en la purificación de enzimas (Tomado de Teijón, J. 2006).

Las proteínas (incluidas las enzimas) se purifican mediante una serie de etapas independientes, en las que sus diversas propiedades fisicoquímicas se aprovechan para separarla de otras moléculas. Algunos de los procedimientos más empleados según la característica a considerar son los mencionados en la tabla 2 (Voet, D. & Voet, J. 2009).

Tabla 2. Procedimientos comunes aplicados a la purificación de proteínas.

Característica de la proteína	Procedimiento de purificación
Solubilidad	Precipitación con sales neutras (<i>Salting out</i>)
Tamaño	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía por filtración en gel • SDS-PAGE • Ultracentrifugación
Polaridad	Cromatografía de interacción hidrófoba
Carga iónica	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía de intercambio iónico • Electroforesis • Isoelectroenfoque
Especificidad de unión	Cromatografía de afinidad

Comúnmente, se aplican varios procedimientos, siendo cada uno más específico que el anterior. Es posible determinar para cada paso de la purificación el éxito obtenido, construyendo una tabla de purificación, que de manera general, contiene los datos indicados en la tabla 3 (Berg, J. 2008):

Tabla 3. Resumen y explicación de los parámetros considerados para elaborar una tabla de purificación de enzimas.

Paso	Proteína total	Actividad total	Actividad específica	Rendimiento	Enriquecimiento
Se especifica la técnica de purificación empleada.	Cantidad de proteínas totales presentes en la fracción obtenida al aplicar la técnica en cuestión. Generalmente, la proteína total se expresa en mg.	Se obtiene al determinar la actividad enzimática de una alícuota de la fracción, y multiplicándola por el volumen total de ésta. Las unidades de la actividad total son por lo general U ($\mu\text{g}/\text{min}$)	Es un parámetro que se obtiene al dividir la actividad total entre la cantidad total de proteína. Las unidades son U/mg.	Es una medida de la actividad existente después de cada paso de purificación, expresada como porcentaje, considerando la actividad del extracto crudo como 100%.	Mide el incremento en la pureza y se obtiene dividiendo la actividad específica de cada paso de purificación entre la actividad específica del extracto inicial.

En principio, la primera señal de que se está logrando la purificación de una enzima es el incremento de la actividad específica con cada paso de purificación. Lo anterior repercute directamente en el valor del enriquecimiento, que de igual manera incrementa en cada etapa del proceso. Por lo cual, el objetivo de un proceso de purificación es maximizar la actividad específica. Es muy común que durante el proceso haya pérdidas de la enzima de interés, lo cual se verá reflejado directamente en el rendimiento. Aunque es verdad que el objetivo principal es la purificación, no debe descuidarse el rendimiento, pues una pobre recuperación genera problemas posteriores en cuanto al empleo de la enzima aislada.

5. 2. 9. Métodos empleados en la purificación de LDH a partir de músculo esquelético de pollo

Se presenta a continuación una breve explicación sobre los métodos seleccionados para realizar la purificación de Lactato Deshidrogenasa a partir de músculo esquelético de pollo durante esta investigación:

5. 2. 9. 1. Homogenización mecánica. La homogeneización es un proceso donde las células y los tejidos son lisados o rotos en fragmentos lo suficientemente pequeños para dar lugar a una suspensión uniforme y estable llamada homogeneizado (Sánchez, S. 2012). Existen diferentes métodos para lograr la homogeneización. La homogeneización mecánica es empleada comúnmente para lisis celular de tejidos animales y vegetales, consiste en la ruptura de la célula mediante la acción mecánica de navajas. Las células deben ser suspendidas en un solvente adecuado o amortiguador, para asegurar la estabilidad de las moléculas una vez liberadas (Armendariz, J. *et al.* 2013).

5. 2. 9. 2. Precipitación por salado. Una proteína es una molécula muy grande, que se disuelve gracias a la solvatación de numerosas moléculas de agua que impiden una interacción íntima entre ellas. Sin embargo, cuando se agregan a la solución grandes cantidades de un compuesto electrolítico, las moléculas de agua quedan fuertemente ligadas a los nuevos iones, siendo incapaces de solvatar a las proteínas. Por lo anterior, la conformación de la proteína se modifica para evitar la exposición de sus residuos apolares con el solvente, dando como resultado nuevas interacciones y por lo tanto lleva a la formación de plegamientos o asociaciones nuevas que pueden llevar a su precipitación. La concentración de sal a la cual precipita varía de proteína a proteína, por lo cual, al ir variando la concentración de sal en la solución se puede fraccionar una mezcla de proteínas (Sánchez, S. 2012; Freifelder, D. 2003; Vega, F. 2013).

5. 2. 9. 3. Cromatografía. La cromatografía es, más que una técnica, un término general que engloba diferentes métodos de separación de mezclas, ampliamente aplicados a la purificación de proteínas. Todos estos métodos se basan en el reparto desigual de los componentes de la mezcla entre dos fases, una fija (sólido) y una móvil (líquido o gas), en función de sus diferentes características. La fase fija, o estacionaria, se encuentra normalmente empacada en una columna, sobre la cual se coloca una muestra de la mezcla que se desea separar. Posteriormente, se aplica una corriente de la fase móvil, que hará a los componentes de la

mezcla pasar a través de la fase estacionaria. En el transcurso, los diferentes componentes de la mezcla interactúan con la fase estacionaria, distribuyéndose entre las dos fases según las características fisicoquímicas de cada componente. Así, se logra una separación, y los componentes con menor afinidad por la fase estacionaria saldrán primero de la columna, mientras que los de mayor afinidad por la fase estacionaria serán retenidos y saldrán posteriormente, pudiéndose recuperar por separado (Skoog, D. 2001).

5. 2. 9. 3. 1. Cromatografía de exclusión molecular (Filtración en gel)

Es un tipo de cromatografía que se basa en la diferencia de tamaños entre las moléculas que conforman la mezcla para separarlas. En la filtración en gel, la fase estacionaria consiste en pequeñas esferas de algún polímero, generalmente agarosa, dextrano o poliácridamida, con poros microscópicos en forma de cueva, que se empaca en una columna. Tal como se observa en la figura 13, la muestra (A+B) se coloca en la cabeza de la columna, haciendo pasar posteriormente la fase móvil, que suele consistir en un amortiguador.

Las moléculas pequeñas penetran los poros de la fase estacionaria (B), mientras que las moléculas voluminosas (A), como la mayoría de las proteínas pueden pasar por los espacios libres entre las esferas de polímero. Se emplea frecuentemente en procesos de purificación de proteínas, para separarlas y clasificarlas según su tamaño, pero también para eliminar sales después de un proceso de salting out. (Vega, F. 2013; Müller-Esterl, W. 2008).

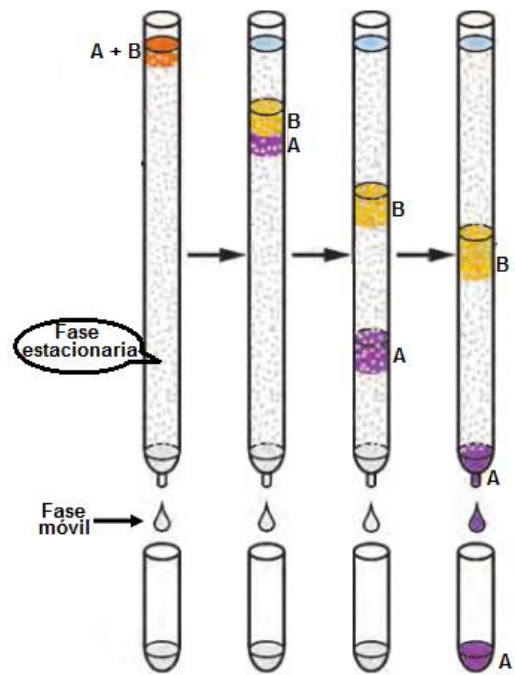


Figura 13. Cromatografía de exclusión molecular (Tomado de Müller-Esterl, W. 2008).

5. 2. 9. 3. 2. Cromatografía de Intercambio Iónico

Este tipo de cromatografía permite la separación de los compuestos que componen una mezcla en función de su carga eléctrica. Como se mencionó en el apartado 1.1, las proteínas adquieren carga eléctrica en función del pH del medio en el que se encuentran, debido a los grupos ionizables que contienen los aminoácidos que la conforman. Así, es posible manipular la intensidad, e incluso el signo (+ o -) de esa carga al cambiar el pH en el que se encuentra la

proteína. En la cromatografía de intercambio iónico, la fase estacionaria es un soporte sólido (resina) con grupos ionizables, llamados *intercambiadores*. Los intercambiadores pueden ser:

- Catiónicos: contienen grupos cargados negativamente, que intercambian moléculas con carga positiva.
- Aniónicos: contienen grupos cargados positivamente, que intercambian moléculas con carga negativa.

Ambos tipos de intercambiadores pueden ionizarse en función del pH del eluyente (débil), o bien, estar siempre ionizados (fuertes).

Como se muestra en la figura 14, la mezcla se hace pasar por la resina de intercambio, al interactuar con los grupos de la resina, los diferentes compuestos se unirán a ellos por interacciones electrostáticas, con mayor o menor fuerza cada uno. Como es de esperarse, los que tengan carga neta igual a la del intercambiador, no serán retenidos, y saldrán de la columna. Posteriormente, se emplea otro amortiguador para desplazar a las proteínas que se unieron a la resina. Este amortiguador puede modificar el pH, con lo que se modificará la carga neta de las proteínas, o bien, cambiar la fuerza iónica, es decir, agregar a la columna iones con carga contraria a la de los grupos intercambiadores que desplacen a las proteínas. Al emplear un gradiente de cualquiera de los dos factores mencionados, puede realizarse una elución diferencial de los compuestos retenidos por la resina (Roca, P. *et al.*, 2003).

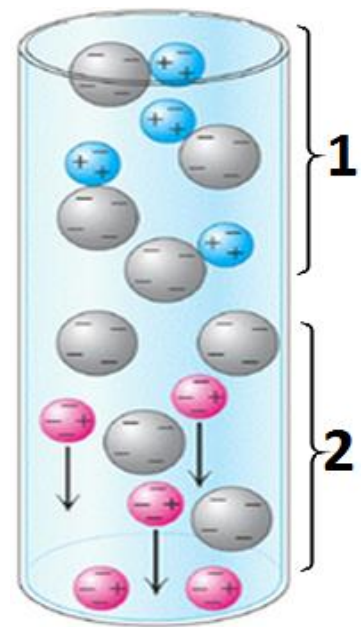


Figura 14. Cromatografía de intercambio iónico. Intercambiador catiónico.

● Grupos cargados de la resina. ● Moléculas con carga neta positiva. ● Moléculas con carga neta negativa.

1) Unión de moléculas con carga positiva a la resina de intercambio por interacciones electrostáticas. 2) Las moléculas con carga negativa salen de la columna. (Modificado de <http://ecovi.tripod.com>)

5. 2. 9. 4. Electroforesis. La electroforesis es una técnica con la que se puede estudiar el movimiento de biomoléculas con carga a través de un campo eléctrico, ya sea de manera horizontal o vertical (Figura 15). Esta técnica se basa en que cada molécula que compone una mezcla problema tendrá propiedades de tamaño, carga, forma y composición química únicas, por lo que su movilidad y velocidad de migración en el campo eléctrico será única y se separarán

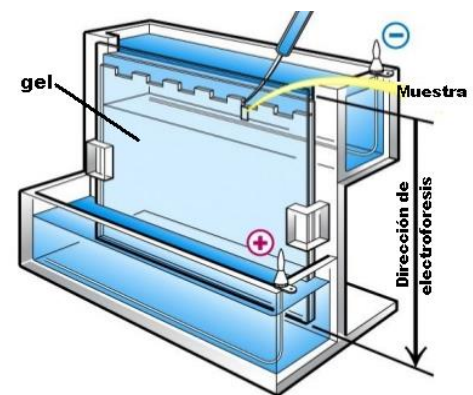


Figura 15. Cámara de electroforesis vertical. (Modificado de: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol>)

en bandas (Figura 16). A la fecha se han desarrollado diversos tipos de electroforesis, cuya principal diferencia radica en el tipo de soporte:

- Gel de celulosa: empleada para separar moléculas de bajo peso molecular (aminoácidos y carbohidratos)
- Gel de poliacrilamida y agarosa: empleada para separar moléculas de mayor peso molecular (ácidos nucleicos y proteínas).

La electroforesis también puede ser:

- Nativa: mantiene íntegra la estructura y actividad (en caso de las enzimas) de las moléculas separadas.
- Desnaturalizante: desnatura a las moléculas, por lo que su actividad se pierde, e incluso su estructura, quedando sólo péptidos de cadena lineal.

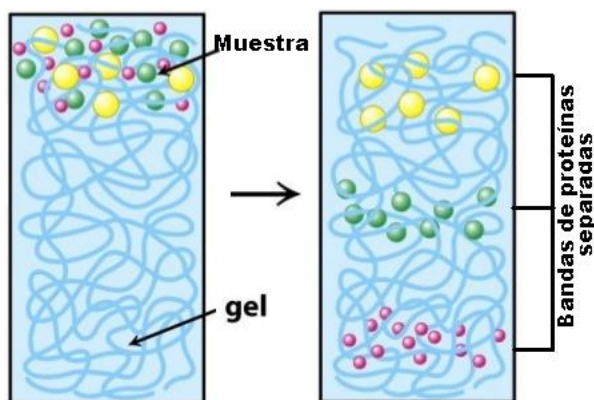


Figura 16. Separación de proteínas en gel.
(Modificado de:
<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS>)

Para la presente investigación se empleó un gel discontinuo de poliacrilamida en una electroforesis desnaturalizante vertical (PAGE-SDS). Un gel discontinuo consiste en realidad de dos geles diferentes unidos, uno denominado concentrador y otro, denominado separador. Para su preparación se emplean amortiguadores con diferente fuerza iónica, pH y tamaño de poro.

5. 2. 9. 4. 1. PAGE-SDS.

Se trata de un tipo de electroforesis desnaturalizante en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes:

- β -mercaptoetanol, que reduce los puentes disulfuro.
- SDS, que desnaturaliza y confiere a las proteínas carga neta negativa.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida, el soporte es un gel constituido por una red tridimensional de acrilamida polimerizada con N, N'-metilen-bisacrilamida, controlada por un sistema de catálisis con persulfato de amonio y N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (Segal, C., Ortega, G. 2005).

5.3. Información general de la LDH

5.3.1. Bioquímica

La glucólisis, que consiste en la transformación catalítica de glucosa a piruvato y NADH, es una fuente importante para la producción de ATP en los diversos tejidos de un organismo. El destino de las moléculas de piruvato producidas durante la glucólisis depende de la presencia o ausencia de oxígeno. En condiciones aerobicas, el piruvato es transformado en acetil-CoA por la enzima piruvato deshidrogenasa, que posteriormente entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Durante la fosforilación oxidativa, el NADH se transforma de nuevo a NAD⁺, que es esencial para la continua producción de ATP. Bajo condiciones de hipoxia, la producción de ATP a través de la conversión de glucosa a piruvato está garantizada por la producción continua de NAD⁺, seguido por la conversión de piruvato a lactato, una reacción catalizada por lactato deshidrogenasa 5 (LDH5) principalmente. Este proceso se llama la glucólisis anaeróbica (Figura 17).

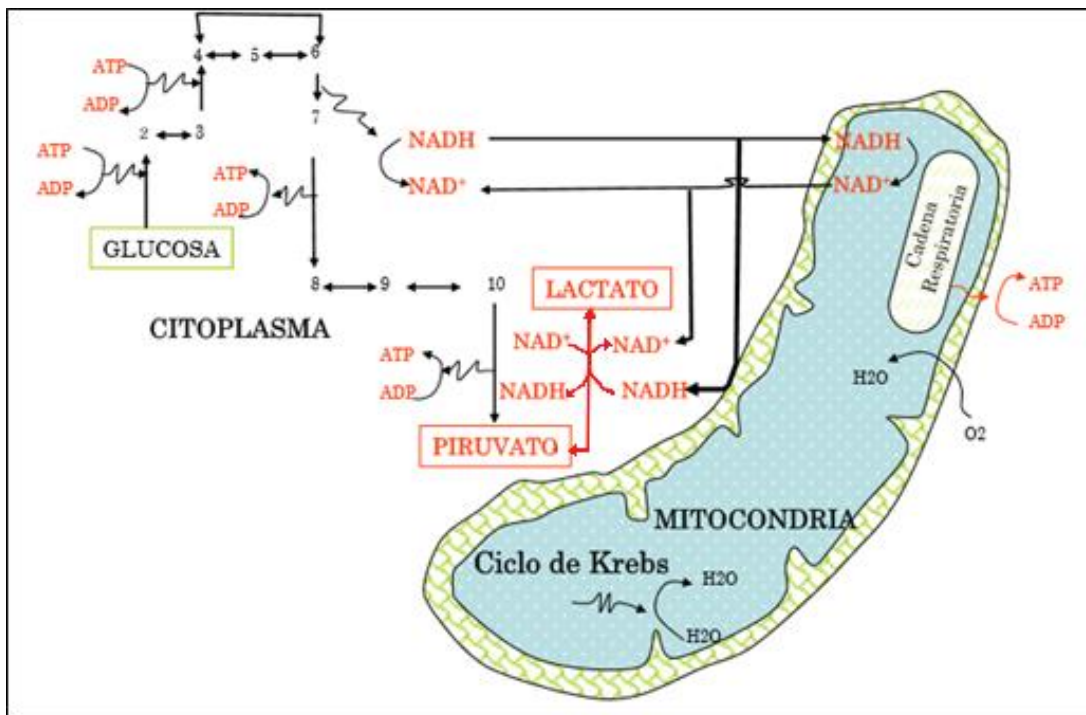


Figura 17. Esquema del metabolismo de la glucosa y la intervención de la LDH en el paso final. (Modificado de Ferrer, S. 2006)

5. 3. 2. Descripción e isoenzimas

La lactato deshidrogenasa o LDH, (EC 1.1.1.27.), es una familia de enzimas L-lactato: NAD⁺ oxidoreductasas. Molecularmente, son tetrámeros ensamblados por dos tipos de monómeros peptídicos, o subunidades diferentes, denominados A o M (*muscle*), y B o H (*heart*). Cada subunidad tiene un peso molecular de aproximadamente 35,000 Da (34-40 KDa) (Basaglia, F. 1989). La secuencia de aminoácidos de cada subunidad se muestra a continuación:

→ Subunidad A o M, de 332 aminoácidos: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_990615.1

```
1 mslkdhlihn vhkeehahah nkisvvgvga vgmacaisil mkdladeltl vdvvedklkg
61 emldlqhgsi flktpkiisg kdysvtahsk lvivtagarq qegesrlnlv qrnvnifkfi
121 ipnvvkyspd ckllivsnpv diltyvawki sgfpkhrvig sgcnlDsarf rhlmgerlgi
181 hplschgwiw gehgdssvpv wsgvrvagvs lkalhpdmgd dadkehwev hkqvvsaye
241 viklkytsw aiglsvadla etimknlrrv hpistavkgm hgikddvfls vpcvlgssgi
301 tdvkvmlkp deekikkksa dtlwgiiqkel qf
```

→ Subunidad B o H, de 333 aminoácidos: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_989508.1

```
1 matlkeklit pvaagstvps nkitvvgvgq vgmacaisil gkgldelal vdvledklkg
61 emmdlqhgsi flqthkivad kdyavtansk ivvvtagrqr qegesrlnlv qrnvnvfkfi
121 ipqivkyspn ctillvsnpv diltyvtwkl sglpkhrvig sgcnlDtarf rylmaerlgi
181 hptschgwil gehgdssvav wsgvrvagvs lqelnpamgt dkdsenwkev hkqvvesaye
241 virkgytnw aiglsvaelc etmlknlrvv hsvstlvkgt ygiendvfls lpcvlsasgl
301 tsvinqklkd devaqlkksa dtlwsiiqkdl kdl
```

La LDH fue la primera enzima en la que se estudiaron y caracterizaron diferentes formas de la misma, es decir, las isoenzimas. Las diferentes combinaciones de los monómeros A y B originan cinco diferentes isoformas, o isoenzimas, principales (Fondy, T. & Kaplan N. 1965, Singh, R. 2011) de alrededor de 140,000 Da, que se distribuyen en diferentes cantidades en los distintos tejidos del organismo (Figura 18) (Maestre, R. 2004):

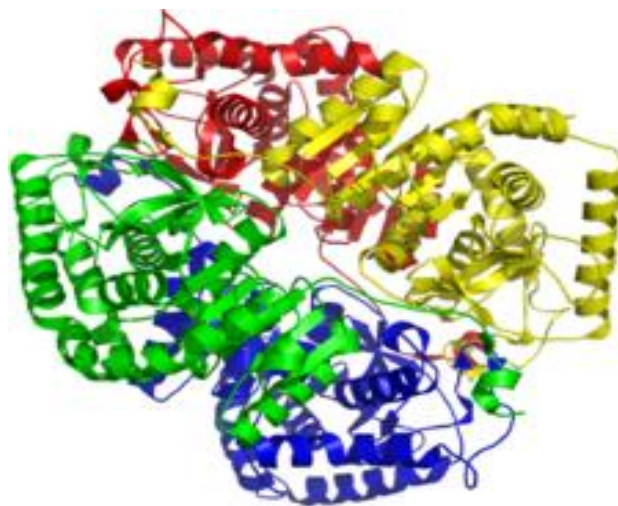


Figura 18. Representación del tetrámero LDH (no específica). Cada subunidad se representa en un color diferente para su distinción.

- La isoenzima LDH-1, LDH-B o LDH-H se compone de cuatro subunidades B o H, por lo que su composición suele indicarse como B₄ o H₄. Predomina en tejido muscular cardíaco.
- La isoenzima LDH-5, LDH-A o LDH-M se compone de cuatro subunidades A o M, por lo que su composición suele indicarse como A₄ o M₄. Predomina en tejido muscular esquelético (Holbrook, J. *et al.* 1982; Singh, R. 2012).

Las otras tres isoenzimas son:

- LDH-2, compuesta por tres subunidades B o H, y una subunidad A o M (B₃A o H₃M)
- LDH-3, que se compone de 2 subunidades B o H, y dos subunidades A o M (B₂A₂ o H₂M₂), y
- LDH-4, en cuya composición hay una subunidad B o H y tres subunidades A o M (BA₃ o HM₃).

Existe una sexta isoforma específica de LDH, denominada LDH-6 o LDH-X, que es un homotetrámero formado por subunidades C (C₄), que se ha descrito mayormente en testículos y espermatozoides de machos mamíferos y aves (Fountain, J. *et al.* 1970, Singh, R. 2011), y se controla hormonalmente, por lo que sólo se ha detectado en etapas pospúberes. Se piensa que el gen que codifica la subunidad C es una copia del que codifica la subunidad A o M (Holbrook, J. *et al.* 1982; Spielmann, W. *et al.* 1973). Actualmente se ha reportado que los peces teleósteos expresan isoenzimas compuestas por la subunidad C en tejidos neural y digestivo, principalmente hígado (Maestre, R. 2004). Aunque en un inicio se reportó que la subunidad C no se asociaba con las subunidades A y B, posteriormente se reportaron múltiples asociaciones entre las subunidades A y C en algunos tejidos de peces, y B y C en los tejidos de la retina y neuronales de los mismos (Basaglia, F. 1989).

5. 3. 3. Reacción

Las LDHs catalizan la conversión reversible entre piruvato y L- lactato mediante una reacción redox. En un sentido, la formación de L- lactato consume dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH), y genera dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado (NAD⁺); mientras que el NADH se produce durante la oxidación de L- lactato a piruvato mediante una transferencia de hidruro desde el cofactor y una transferencia de protón desde la histidina 195

de la cadena de aminoácidos de la enzima al oxígeno del grupo carbonílico del piruvato (Figura 19). La constante de velocidad de la reacción catalizada por la LDH aumenta en un factor de 10^{14} veces, en comparación con la reacción no catalizada en disolución (Ferrer, S. 2006; Porraz, R. 2012).

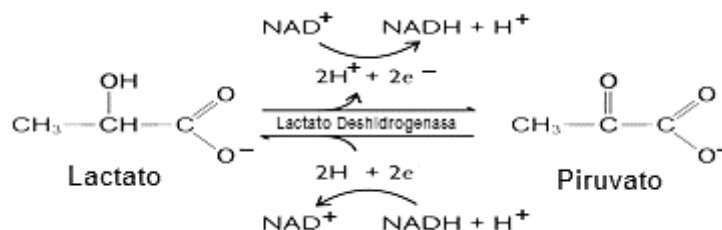


Figura 19. Reacción de interconversión entre piruvato y lactato catalizada por la familia de enzimas LDH.

5. 3. 4. Diferencias cinéticas

Cada subunidad determina las características metabólicas de las isoformas, y predispone a la enzima activa a actuar, ya sea en un ambiente aeróbico o anaeróbico. Así, conforme el número de subunidades M aumenta sobre el número de subunidades H, la isoenzima resultante de LDH convierte más eficientemente el piruvato a L-lactato; mientras tanto, un aumento en el número de subunidades H sobre el número de subunidades M, favorece la oxidación de L-lactato a piruvato. Por lo tanto, la isoenzima LDH-5, que se encuentra principalmente en tejidos como el músculo esquelético, favorece la conversión de piruvato a L-lactato, permitiendo la rápida acumulación de lactato donde predomina la glucólisis anaeróbica. Mientras tanto, la LDH-1 preferencialmente impulsa la reacción hacia la producción de piruvato, y se encuentra en tejidos tales como corazón, donde el piruvato se oxida a través del Ciclo de los ácidos Tricarboxílicos (Adeva, M. *et al.* 2013; Al-Jassabi, S. 2002, Javed, M. *et al.* 1995; Singh, 2012). Estas diferencias en el comportamiento cinético de las diversas isoenzimas se han estudiado ya en tejidos tanto de pollo y humanos (Bishop, M. *et al.* 1972).

Además, existe una marcada diferencia en las estabilidades térmicas de las subunidades H y M, que tienen como consecuencia la misma distinción en la estabilidad térmica de las diferentes isoenzimas. Así, la isoenzima H4 enzimas conserva su actividad enzimática a temperaturas elevadas, mientras que bajo estas condiciones, la isoenzima M4 se inactiva rápidamente. Se ha observado que en las formas híbridas de LDH se conserva también esta distinción. Esta diferencia en la estabilidad se explica mediante diferencias estructurales que permiten a las subunidades tipo H de la LDH retener su conformación e integridad catalítica,

mientras que el tipo M no es estabilizado estructuralmente (Fondy, T., Kaplan, N. 1965; Javed, M. *et al.* 1995; Kaletha, K. 1974).

5.3.5. Sitio activo y mecanismo de reacción

En comparación con las reacciones de otras deshidrogenasas, el mecanismo de la catálisis de la LDH es bastante simple. Como resultado de los experimentos cinéticos de unión y de equilibrio, se sabe que existe un orden obligatorio de interacción y unión de la enzima, primero con la coenzima, y en segundo lugar, con el sustrato.

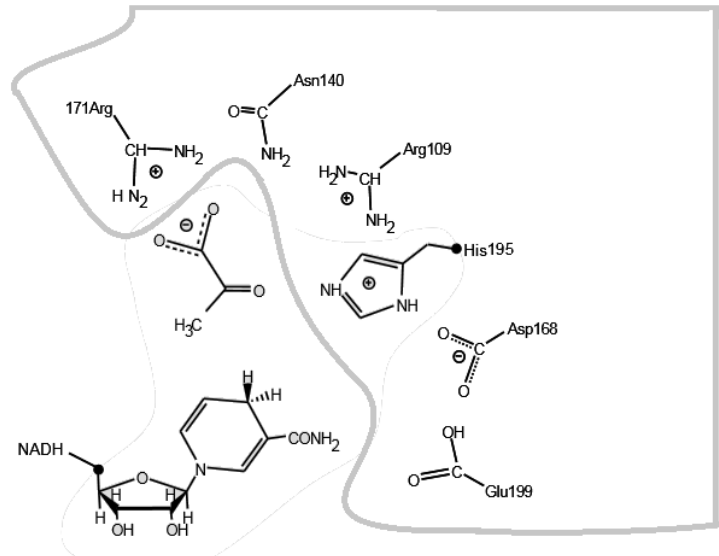


Figura 20. Esquema del sitio activo de la LDH. Se representan los aminoácidos más estrechamente involucrados en la reacción. (Modificado de Ferrer, S. 2006)

Para lograr la catálisis, el anillo imidazol del residuo His195 interactúa con los sustratos y realiza dos acciones principales:

1. Actúa como donador/receptor de protones en la etapa de redox y
2. Orientación de sustrato apropiado para su interacción NADH.

El residuo Asp168 interactúa con el de His195, para estabilizar la forma protonada. El residuo Arg171 proporciona una fuerte interacción de dos puntos cuando el sustrato es un carboxilato. El residuo Arg109 polariza el enlace carbonilo del cetoadido, promoviendo la transferencia del hidruro hacia el carbono, y la del protón al oxígeno. Se sabe además que los residuos Gln102 y Thr246 desempeñan su papel en la discriminación del sustrato (Figura 20) (Holbrook, J. *et al.* 1982).

Una de las características destacadas de la coenzima de la LDH es el ambiente hidrófobo del anillo de nicotinamida representado por Ile250. Esto explica el por qué hay una mayor unión entre la LDH y la molécula neutra de NADH, en comparación con el NAD⁺, que es una molécula con carga (Kopperschläger, G. & Kirchberger, J. 1996).

5. 3. 6. *Aplicaciones clínicas*

En la práctica clínica, los niveles totales de LDH en suero son típicamente empleados como indicadores de daño tisular. La variedad de trastornos en los que la LDH puede elevarse ha favorecido la investigación del papel de cada una de sus isoformas en diversos padecimientos. Sin embargo, la significancia de los niveles séricos de las diferentes isoformas de la LDH sigue en discusión (Augoff, K. *et al.* 2015). Así, se observan cambios en el patrón de isoenzimas en suero después de un infarto de miocardio. Los cambios en el patrón de isoenzimas se emplean como indicador de la necrosis de miocardio, de enfermedades en las que se produce daño de las células del hígado, de tumores malignos, de anemia hemolítica, y de distrofia muscular (Bishop, M. *et al.* 1972).

Se sabe desde hace mucho tiempo que en muchos tipos de cánceres humanos, por ejemplo, cánceres pancreáticos, hepáticos, hematopoyéticos, óseos y colorectales, se presentan niveles más altos LDH-5, en comparación con tejidos sanos, y se ha demostrado que juega un papel importante en el desarrollo, invasión y metástasis de tumores malignos (Augoff, K. *et al.* 2015). La glucólisis anaeróbica es prominente en las células cancerosas, presumiblemente como resultado de un aumento de la actividad de enzimas glucolíticas, inducido por la adaptación de células de cáncer a condiciones hipóxicas intratumorales. Se sabe que los cambios específicos en el microambiente tumoral y la hipoxia pueden mejorar la glucólisis, que se convierte en una fuente importante para la producción de ATP en las células cancerosas. Además, aproximadamente 0.5% del total de la LDH-5 se localiza en el núcleo, donde actúa como una proteína de unión a ADN de cadena sencilla que afecta al complejo de ADN-polimerasa α -primasa de una forma estimuladora, pudiendo estar implicado en la transcripción y/o la replicación del ADN (Sheng, S. *et al.* 2012; Koukourakis, M. 2005).

Por lo tanto, la LDH-5 es considerada marcador tumoral, además de un nuevo blanco muy prometedor en la terapia de diversos tipos de cáncer (Augoff, K. *et al.* 2015.).

6. HIPÓTESIS

Es posible mejorar la técnica de Cromatografía de Intercambio Iónico empleando una elución en gradiente para purificar a la enzima Lactato Deshidrogenasa a partir de músculo esquelético de pollo (*Gallus gallus domesticus*).

7. OBJETIVOS

7. 1. Objetivo General

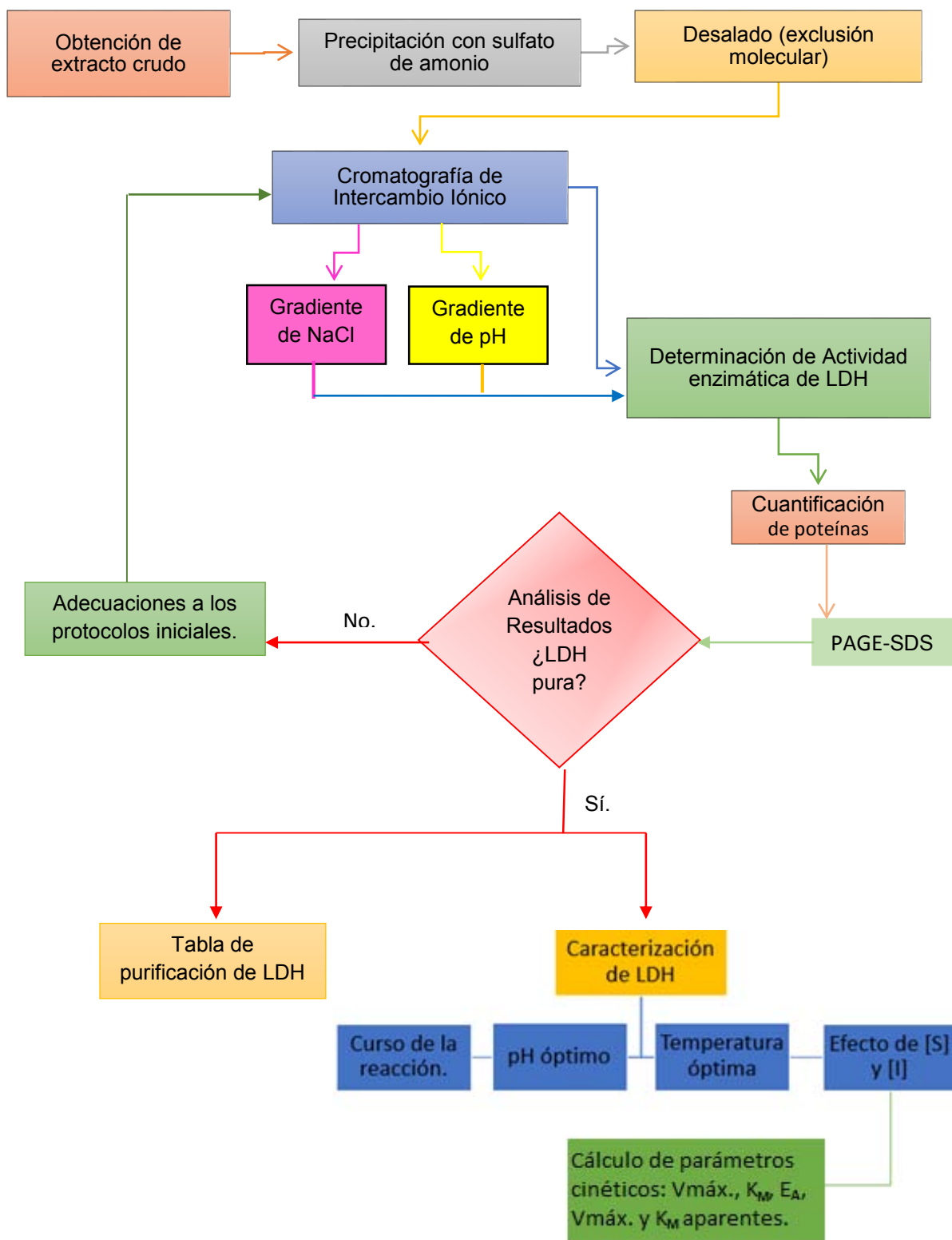
Purificar y caracterizar parcialmente a la enzima Lactato Deshidrogenasa de músculo esquelético de pollo (*Gallus gallus domesticus*), mediante la modificación de la técnica de Cromatografía de Intercambio Catiónico.

7. 2. Objetivos Particulares

- Emplear la precipitación con sulfato de amonio y la filtración en gel como técnicas aplicadas al proceso de purificación de LDH.
- Comparar diferentes condiciones de elución en columna para realizar un intercambio iónico que permita la separación de la enzima.
- Elegir la mejor metodología para la purificación de la LDH.
- Realizar la tabla de purificación de la LDH.
- Determinar experimentalmente el curso de la reacción enzimática.
- Determinar experimentalmente el pH óptimo para la actividad de la enzima.
- Determinar experimentalmente la temperatura óptima de la actividad de la enzima.
- Calcular el valor de E_A para la LDH purificada.
- Determinar experimentalmente el efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de la enzima.
- Calcular los valores de $V_{m\acute{a}x.}$ y K_M .
- Determinar experimentalmente el tipo de inhibición que tiene el oxamato de sodio sobre la actividad enzimática de la LDH.
- Encontrar valores de K_M y $V_{m\acute{a}x.}$ aparentes para diferentes concentraciones de oxamato de sodio evaluadas.

8. METODOLOGÍA

8. 1. Diagrama de flujo general del proyecto: “Aislamiento y caracterización de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) de músculo esquelético de *Gallus gallus domesticus*”



8.2. Reactivos

- Agua destilada.
- Amortiguador "A": TRIS pH 8.6 20 mM, PMSF 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM.
- Amortiguadores A con concentraciones de NaCl 0.1, 0.2, 0.5 y 1 M.
- Amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5.
- Amortiguadores TRIS base 50 mM pH 6.5, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5.
- BSA 0.1 mg/mL.
- Hielo.
- NADH 4 mM (disuelto en NaHCO_3 0.03 M).
- Oxamato de Sodio 10 mM.
- Piruvato de sodio 10 mM.
- Reactivo de Bradford.
- Resina de intercambio catiónico MacroPrep High S Support hidratada.
- SDS 1%.
- Sephadex G-25 hidratado.
- Sulfato de amonio pulverizado.
- TCA 10%.

→ Geles de poliacrilamida:

- Acrilamida: Bis-acrilamida 30%:0.8%.
- TRIS*HCl 2M pH 8.8.
- TRIS*HCl 0.5M pH 6.8.
- Persulfato de amonio 10% m/v .
- TEMED 10%.
- SDS 10% m/v .

→ Amortiguador de corrida 1X:

- TRIS*HCl 0.025 M.
- Glicina 0.19 M.
- SDS 0.025%.

→ Amortiguador muestra 5X:

- Glicerol 50%.
- Azul de bromofenol 0.05%.
- TRIS pH 6.8 312.5 mM.
- SDS 0.1 %.
- β -mercaptoetanol 5.125%.

→ Solución Teñidora:

- β -Ciclodextrina 0.3% m/v.
- Coomassie 0.15% m/v.
- CH_3COOH 7% v/v

8. 3. Materiales y equipos

- Agitadores magnéticos.
- Balanza de platillos.
- Balanza granataria.
- Baños de calentamiento a 20, 30, 37, 45, 50, 60 °C.
- Bloque de calentamiento.
- Cámara de electroforesis (vidrios, base, cámara, electrodos, etc.).
- Celdas para espectrofotómetro PS (BRAND).
- Celdas para espectrofotómetro UV- micro (BRAND).
- Columnas de cromatografía.
- Cronómetro.
- Embudo de filtración.
- Espátula.
- Espectrofotómetro.
- Fuente de poder.
- Gasa.
- Gradilla para celdas.
- Gradilla para tubos de microcentrífuga.
- Licuadora.

- Microcentrífuga.
- Micropipetas.
- Parrilla con agitación.
- Probetas de 50 y 100 mL.
- Puntas para micropipeta.
- Soportes universales.
- Tijeras de disección.
- Tubos para centrifuga (50 mL).
- Tubos para microcentrífuga.
- Ultracentrífuga.
- Vasos de precipitado 100 y 50 mL.
- Vórtex.

8.4. Procedimiento general

El procedimiento general seguido para la purificación de la enzima LDH desde la extracción hasta su caracterización se describe a continuación. Debido a que se realizaron numerosas modificaciones sobre todo en la parte de Cromatografía de Intercambio Catiónico, para encontrar las mejores condiciones de purificación, se especificarán en las tablas 4 y 5 los reactivos y procedimientos específicos para cada caso.

8.4.1. Extracción de LDH y precipitación con sulfato de amonio

La carne de pollo (~20 g) se cortó en cubos pequeños, y se licuó en aproximadamente dos y medio volúmenes de amortiguador "A" frío. Se realizó la operación a 4°C y mediante pulsos. El vaso de la licuadora se enjuagó con 10 mL más del mismo amortiguador y se agregó al licuado. Se registró el volumen del licuado, etiquetando como F0. Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se filtró el sobrenadante con una gasa y se registró el volumen etiquetando como F1. A la fracción F1 se agregó lentamente la cantidad de sulfato de amonio necesaria para alcanzar una concentración del 55 % de saturación (0.351 g/mL). Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante, registrando el volumen obtenido y etiquetando como F2. A la fracción F2 se le agregó lentamente la cantidad de sulfato

de amonio pulverizado necesaria para alcanzar una concentración final del 75 % de saturación (0.141 g/mL). Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1 ó 2 mL de agua destilada, registrando el volumen final y etiquetando como F3.

8.4.2. *Desalado*

Se empacaron 2.5 mL de Sephadex G-25® (anexo 5) hidratado en una columna. Se lavó con suficiente agua destilada, y posteriormente se equilibró con 3.0 mL de amortiguador “A” frío. Se cargaron 250 µL de la fracción F3, colectando el volumen muerto, y se eluyó con 2.0 mL de amortiguador “A”, según se muestra en la figura 21.

Se colectaron tres fracciones diferentes:

- Fracción D1: el primer volumen en eluir, incoloro, previo a un volumen colorido.
- Fracción D2: volumen colorido (tono rosado), que eluye a continuación de la fracción D1.
- Fracción D3: volumen incoloro que eluye inmediatamente al terminar el volumen colorido.

Se midió la actividad enzimática de cada una de las fracciones obtenidas hasta este punto, para determinar a cuál de las fracciones del desalado convenía realizar la cromatografía de intercambio catiónico. La metodología para la determinación de la actividad enzimática se especifica más adelante.

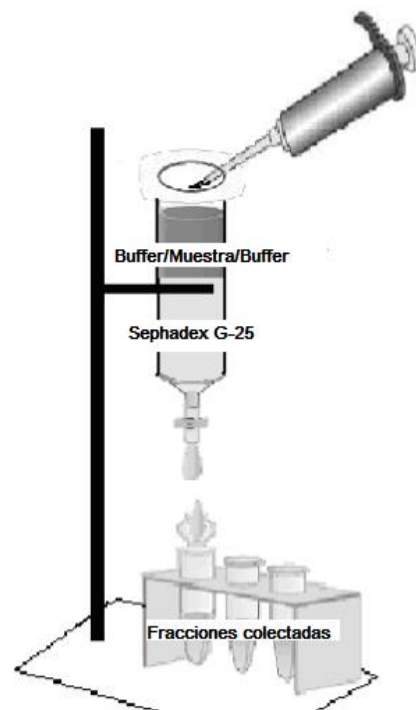


Figura 21. Esquema del montaje y realización de la cromatografía de exclusión molecular para realizar el desalado.

8.4.3. *Cromatografía de Intercambio Catiónico con gradiente de [NaCl]*

En la tabla 4 se especifican las diferentes condiciones que se probaron para llevar a cabo la CII con gradiente de [NaCl]. En general se empacó una columna con 1.5 mL de resina de intercambio catiónico MacroPrep High S Support® (anexo 4), y se equilibró con 3 mL de amortiguador de equilibrio. Posteriormente se cargó el volumen de la fracción de Desalado con mayor actividad como se especifica en cada caso en la tabla 4. Se colectó el volumen muerto y posteriormente se lavó con 1.5 mL del primer amortiguador de elución (la concentración

menor de NaCl evaluada) colectando fracciones de aproximadamente igual volumen (especificado en cada caso), y etiquetando como “lavado”. Una vez que el nivel del amortiguador llegó al borde de la resina de intercambio en la columna, se agregaron lentamente 1.5 mL del siguiente amortiguador de elución (la siguiente concentración de NaCl evaluada, en orden creciente), y se colectaron alícuotas de aproximadamente el mismo volumen, según sea el caso. El procedimiento se repitió con cada uno de los amortiguadores evaluados.

A continuación se midió la actividad enzimática de cada una de las fracciones obtenidas, así como la concentración proteica por el método de Bradford, cuya metodología se describe más adelante.

8.4.4. Cromatografía de Intercambio Catiónico con gradiente de pH

En la tabla 5 se especifican las diferentes condiciones que se probaron para llevar a cabo la CII con gradiente de pH. En general se empacó una columna con 1.5 mL de resina de intercambio catiónico MacroPrep High S Support® (anexo 4) se equilibró con 3 mL de amortiguador de equilibrio. Posteriormente se cargó el volumen de la fracción de Desalado con mayor actividad, especificado en la tabla 5 en cada caso. Se colectó el volumen muerto y posteriormente se lavó con 1.5 mL del primer amortiguador de elución (el menor valor de pH a evaluar) colectando fracciones de aproximadamente igual volumen (especificado en cada caso), y etiquetando como “lavado”. Una vez que el nivel del amortiguador llegó al borde de la resina de intercambio en la columna, se agregaron lentamente 1.5 mL del siguiente amortiguador de elución (el siguiente valor de pH a evaluar, en orden creciente), colectando alícuotas de aproximadamente el mismo volumen, según sea el caso. El procedimiento se repitió con cada uno de los amortiguadores evaluados. A continuación se midió la actividad enzimática de cada una de las fracciones obtenidas, así como la concentración proteica por el método de Bradford, cuya metodología se describe más adelante.

TABLA 4. Detalle de las condiciones aplicadas a las Cromatografías de Intercambio Catiónico con gradientes de [NaCl].

Gradiente	Intento	Vol. de muestra	Equilibrio	Lavado		Elución	
			Amortiguador. Volumen.	Volumen. Amortiguador	Vol. de fracciones	Amortiguadores de gradiente.	Vol. de fracciones
[NaCl]	1	250 μ L	3 mL. Amortiguador A: TRIS 20 mM pH 8.6, PMSF 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM.	1.5 mL. Amortiguador A.	750 μ L	1.5 mL de cada uno. Amortiguador A+NaCl 0.2M Amortiguador A+NaCl 0.5 M Amortiguador A+NaCl 1 M	3 fracciones de 500 μ L por cada amortiguador.
	2	250 μ L	3 mL. TRIS 50 mM pH 8.0.	2 mL. Amortiguador A.	1 mL	1.5 mL de cada uno. Amortiguador A+NaCl 0.2M Amortiguador A+NaCl 0.5 M Amortiguador A+NaCl 1 M	3 fracciones de 500 μ L por cada amortiguador.
	3	200 μ L	3 mL. TRIS 50 mM pH 8.0.	2 mL. TRIS 50 mM pH 8.	1 mL	1.5 mL de cada uno. Amortiguador A+NaCl 0.1 M Amortiguador A+NaCl 0.2 M Amortiguador A+NaCl 0.5 M	3 fracciones de 500 μ L por cada amortiguador.

TABLA 5. Detalle de las condiciones aplicadas a las Cromatografías de Intercambio Catiónico con gradientes de pH.

Gradiente	Ensayo	Vol. de muestra	Equilibrio	Lavado		Elución	
			Amortiguador. Volumen.	Volumen. Amortiguador.	Vol. de fracciones	Amortiguadores de gradiente.	Vol. de fracciones
pH	1	250 µL	3 mL. Amortiguador A.	1.5 mL. Amortiguador A.	750 µL	1.5 mL de cada uno. TRIS 50 mM pH 6.5 TRIS 50 mM pH 7.0 TRIS 50 mM pH 8.0 TRIS 50 mM pH 8.5 TRIS 50 mM pH 9.0	2 fracciones de 750 µL por cada amortiguador.
	2	150 µL	3 mL. TRIS 50 mM pH 7.0	1.5 mL. TRIS 50 mM pH 7	750 µL	1.5 mL de cada uno TRIS 50 mM pH 8.0 TRIS 50 mM pH 8.5 TRIS 50 mM pH 9.0	2 fracciones de 750 µL por cada amortiguador
	A	150 µL	3 mL. TRIS 50 mM pH 7	1.5 mL. TRIS 50 mM pH 7.	750 µL	1.5 mL de cada uno. TRIS 50 mM pH 8 TRIS 50 mM pH 8.5 TRIS 50 mM pH 9 TRIS 50 mM pH 9.5	2 fracciones de 750 µL por cada amortiguador.
	B	150 µL	3 mL. TRIS 50 mM pH 7	1.5 mL. TRIS 50 mM pH 7.	1.5 mL	1.5 mL de cada uno. TRIS 50 mM pH 8 TRIS 50 mM pH 8.5 TRIS 50 mM pH 9 TRIS 50 mM pH 9.5	1 fracción de 1.5 mL por cada amortiguador.

8.4.5. Ensayo para medir la actividad de LDH

La LDH toma una molécula de NADH por cada molécula de piruvato que convierte a lactato, por tanto, se puede determinar su actividad enzimática al monitorear la desaparición del NADH del medio de reacción. Para ello se requiere determinar la cantidad inicial del mismo, y registrar la variación a través del tiempo de la cantidad restante de NADH en el medio de reacción. El NADH presenta una máximo de absorción a 340 nm, y los datos de absorbencia se transforman en valores de concentración de NADH empleando la ley de Lambert-Beer (Holbrook, J. *et al.* 1982; Howell, B. *et al.* 1979).

1. Se colocaron en una celda de espectrofotómetro para UV los siguientes reactivos:

Tabla 6. Preparación del medio de reacción para la determinación de la actividad enzimática de la LDH.

Reactivo	Cantidad
Amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7	515 μ L
Agua	404 μ L
Piruvato 10 mM	30 μ L
NADH 4 mM	50 μ L

2. Empleando únicamente agua destilada como blanco de reacción, se registró la absorbencia inicial de la mezcla anterior a 340 nm.

3. Se agregó a la celda 1 μ L de la fracción enzimática a ensayar o dilución de la misma*, activando el cronómetro justo al momento de colocar la fracción enzimática en el medio de reacción.

4. Se registró la absorbencia a 340 nm, empleando como guía la tabla 7:

Tabla 7. Registro de absorbencia para la determinación de la actividad enzimática de la LDH en las fracciones colectadas.

t (s)	Fracción*											
0												
10												
20												
30												
40												
50												
...												

*Se prepararon diluciones 1:10 de las fracciones F0, F1, F2, F3 y D2: 1 μ L de la fracción + 9 μ L agua, y de esta dilución se tomó 1 μ L para el ensayo de actividad.

8.4.6. Determinación de la cantidad de proteína (método de Bradford)

1. Se elaboró una Curva Patrón empleando BSA, de 1 µg/mL a 10 µg /mL, según se indica en la tabla 8 (anexo 1):

Tabla 8. Elaboración de la curva patrón para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

µg/mL de BSA	Agua (µL)	BSA $\frac{0.1 \text{ mg}}{\text{mL}}$ (µL)	Reactivo de Bradford (µL)
0 (Blanco)	800	0	200
1	790	10	200
3	770	30	200
4	760	40	200
6	740	60	200
8	720	80	200
10	700	100	200

2. Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

Tabla 9. Preparación de las muestras para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

Agua (µL)	Reactivo de Bradford (µL)	Muestra o Dilución* (µL)
799	200	1

*Dilución que permitió obtener una absorbencia dentro de la curva realizada

3. Se determinó la absorbencia a 595 nm tanto de las preparaciones de la curva como las muestras, calculando la cantidad de proteínas en cada muestra por interpolación en la Curva Patrón obtenida.

8.4.7. Electroforesis desnaturalizante en geles de Poliacrilamida (PAGE-SDS)

1. El gel separador se preparó empleando las siguientes concentraciones de reactivos: poliacrilamida 12% en amortiguador Tris*HCl 2M pH 8.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.05%, TEMED $5 \cdot 10^{-4}$ % v/v. El gel concentrador se preparó con las concentraciones: poliacrilamida 4% en amortiguador Tris*HCl 2M pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.05%, TEMED 0.01% v/v. Para ello, se emplearon las cantidades indicadas en la tabla 10.
2. Los geles se montaron en la cámara de electroforesis y se cubrieron con amortiguador de corrida 1X.
3. Se preparó el equivalente a 30 µg de proteína de cada fracción con 6 µL de amortiguador muestra 5X y completando un volumen máximo de 30 µL con agua destilada. En caso de requerirse un volumen mayor a 24 µL de fracción para obtener los 30 µg de proteínas, se

procedió a realizar una precipitación de proteínas como se describe en el siguiente apartado.

4. Se calentó cada fracción preparada a 95 °C por 5 minutos.
5. Se colocó en uno de los pozos de cada gel un volumen de 4 µL de marcador de peso molecular (anexo 2).
6. Después de cargar cada fracción enzimática en un pozo del gel, éste se corrió a aproximadamente 80 mV por 1.5 hrs.
7. Después de desmontar y enjuagar el gel, se procedió a teñirlo sumergiéndolo en solución teñidora por 2 minutos.
8. Se enjuagó y destiño hasta observar bandas diferenciadas.

Tabla 10. Preparación de los geles para SDS-PAGE.

Porción del gel	Reactivo	Cantidad
Gel Concentrador: 4%	Agua destilada	900 µL
	Acrilamida:Bisacrilamida 30%:0.8%	200 µL
	TRIS*HCl 0.5 M pH 6.8	375 µL
	SDS 10%	15 µL
	TEMED 10%	1.5 µL
	Persulfato de amonio 10% m/v	7.5 µL
Gel separador: 12%	Agua destilada	1.32 mL
	Acrilamida:Bisacrilamida 30%:0.8%	1.6 mL
	TRIS*HCl 2M pH 8.8	1.0 mL
	SDS 10%	40 µL
	TEMED 10%	2 µL
	Persulfato de amonio 10% m/v	20 µL

8.4.8. *Precipitación de proteínas*

1. Se tomó el volumen necesario de fracción a precipitar, y se agregó 75 µL de TCA 10% por cada 150 µL de fracción.
2. Se homogeneizó en vórtex y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en 24 µL de agua destilada. Se prosiguió con la preparación habitual para cargar en el gel PAGE-SDS.

8.4.9. Determinación de Progreso de la Reacción Enzimática

1. Se colocaron en una celda de espectrofotómetro para UV los reactivos en el orden indicado en la tabla 6.
2. Se registró la absorbencia inicial a 340 nm empleando agua destilada como blanco de reacción.
3. Posteriormente se agregó a la celda 1 μL de la solución de la enzima aislada, activando en cronómetro justo al momento de colocar la fracción enzimática en el medio de reacción. Se registró la absorbencia a 340 nm, empleando como guía la tabla 11:

Tabla 11. Registro de absorbencias para la determinación del progreso de la reacción enzimática.

t (s)*	Absorbencia	t (s)*	Absorbencia	t (s)*	Absorbencia
0		40		80	
10		50		90	
20		60		100	
30		70		...	

*Se realizó el registro hasta que la variación en la absorbencia se detuvo

4. Se determinó gráficamente el periodo de tiempo en que la velocidad enzimática es constante y se considera ese periodo de tiempo como el apto para realizar determinaciones a punto final.

8.4.10. Determinación de pH óptimo

1. Para cada amortiguador evaluado, se prepararon por duplicado los tubos B y R, colocando en el orden indicado los siguientes reactivos:

Tabla 12. Preparación del medio de reacción para la determinación del pH óptimo.

Reactivo	Cantidad
Amortiguador de fosfatos 100 mM pH a ensayar	515 μL
Agua	304 μL
Piruvato 10 mM	30 μL
NADH 4 mM	50 μL

2. Se incubó 2 minutos a 30°C y posteriormente se agregó al tubo "R" 1 μL de la solución de enzima aislada, activando el cronómetro justo al momento de colocar la solución enzimática en el medio de reacción.
3. Transcurridos el tiempo determinado en el ensayo "Progreso de la reacción" se agregó a ambos tubos 100 μL de SDS 1%, y se agregó al tubo "B" 1 μL de solución de enzima.

- Se registró la absorbencia a 340 nm, empleando como blanco agua destilada, y el valor de la reacción “B” para determinar el cambio en la absorbencia en el tubo “R”, registrando los resultados en la tabla 13:

Tabla 13. Registro de datos para la determinación del pH óptimo.

pH	Absorbencia tubo B	Absorbencia tubo R	Δ Absorbencia a punto final
6			
6.5			
7			
7.5			
8			
8.5			

8.4.11. Determinación de temperatura óptima

- Para cada evaluada, se prepararon por duplicado los tubos B y R, colocando en el orden indicado los siguientes reactivos:

Tabla 14. Preparación del medio de reacción para la determinación de la temperatura óptima.

Reactivo	Cantidad
Amortiguador de fosfatos 100 mM pH óptimo	515 μ L
Agua	304 μ L
Piruvato 10 mM	30 μ L
NADH 4 mM	50 μ L

- Se incubó 2 minutos a la temperatura a ensayar y posteriormente se agregó al tubo “R” 1 μ L de la solución de enzima aislada, activando el cronómetro justo al momento de colocar la solución enzimática en el medio de reacción.
- Transcurrido el tiempo determinado en el ensayo “Progreso de la reacción”, se agregó a ambos tubos 100 μ L de SDS 1%, y se agregó al tubo “B” 1 μ L de solución de enzima.
- Se registró la absorbencia a 340 nm, empleando como blanco de reacción agua destilada, y el tubo B para determinar el cambio en la absorbencia en el tubo “R”, registrando los resultados en la tabla 15:

Tabla 15. Registro de datos para la determinación de la temperatura óptima.

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Absorbencia tubo B	Absorbencia tubo R	Δ Absorbencia a punto final
0 (Hielo)			
20			
30			
37			
45			
50			
60			

8.4.12. Determinación de cinética enzimática

1. Se prepararon los siguientes tubos de ensaye, agregando los reactivos en el orden indicado:

Tabla 16. Preparación de los tubos de reacción para la determinación de la cinética enzimática.

Reactivo (µL)	Tubo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Amortiguador	515							
Piruvato	0	3	8	15	32	47	63	95
NADH	50							
H ₂ O	334	331	326	319	302	287	271	239
Incubar 2 minutos a temperatura óptima								
ENZIMA	1							

2. Se activó el cronómetro justo al momento de colocar la solución enzimática en el medio de reacción.
3. Transcurrido el tiempo determinado en el ensayo “Progreso de la reacción” para cada tubo, se agregaron 100 µL de SDS 1% a cada uno.
4. Se registró la absorbencia a 340 nm, empleando como blanco de reacción el tubo 1, en la tabla 17:

Tabla 17. Registro de datos para la determinación de la cinética enzimática.

[S] (mM)	Absorbencia a punto final
0	
0.03	
0.08	
0.15	
0.32	
0.47	
0.63	
0.95	

8.4.13. Efecto de un inhibidor

1. Se preparó una serie de tubos tal como se indica en la tabla 16.
2. Se prepararon además las siguientes series de tubos de ensaye, agregando los reactivos en el orden indicado:

Tabla 18. Preparación de los tubos de reacción para la determinación del efecto de una concentración 6 mM de oxamato de sodio sobre la cinética enzimática de la LDH.

SERIE 1	Reactivo (µL)	Tubo							
		1	2	3	4	5	6	7	8
	Amortiguador	515							
	Piruvato	0	3	8	15	32	47	63	95
	NADH	50							
	H ₂ O	328	325	320	313	296	281	265	233
	Oxamato de sodio	6							
Incubar 2 minutos a temperatura óptima									
	ENZIMA	1							

Tabla 19. Preparación de los tubos de reacción para la determinación del efecto de una concentración 12 mM de oxamato de sodio sobre la cinética enzimática de la LDH.

SERIE 2	Reactivo (µL)	Tubo							
		1	2	3	4	5	6	7	8
	Amortiguador	515							
	Piruvato	0	3	8	15	32	47	63	95
	NADH	50							
	H ₂ O	322	319	314	307	290	275	259	227
	Oxamato de sodio	12							
	Incubar 2 minutos a temperatura óptima								
	ENZIMA	1							

Tabla 20. Preparación de los tubos de reacción para la determinación del efecto de una concentración 25 mM de oxamato de sodio sobre la cinética enzimática de la LDH.

SERIE 3	Reactivo (µL)	Tubo							
		1	2	3	4	5	6	7	8
	Amortiguador	515							
	Piruvato	0	3	8	15	32	47	63	95
	NADH	50							
	H ₂ O	309	306	301	294	277	262	246	214
	Oxamato de sodio	25							
	Incubar 2 minutos a temperatura óptima								
	ENZIMA	1							

- Se activó el cronómetro justo al momento de colocar la solución enzimática en el medio de reacción y transcurrido el tiempo determinado en el ensayo "Progreso de la reacción" para cada uno de los tubos, se agregaron 100 µL de SDS 1%.
- Se registró la absorbencia a 340 nm, empleando como blanco de reacción el tubo 1, colectando los datos obtenidos en la tabla 21:

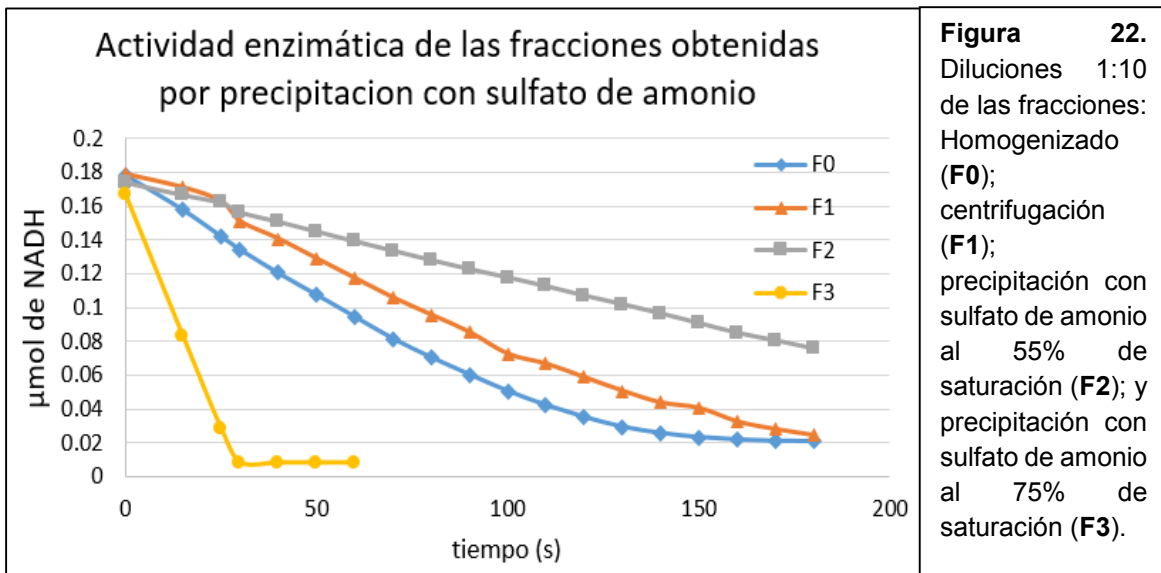
Tabla 21. Registro de datos para la determinación del efecto de un inhibidor a diferentes concentraciones sobre la cinética enzimática.

[S] (mM)	Absorbencia a 340 nm a punto final		
	Oxamato 0.06 mM	Oxamato 0.12 mM	Oxamato 0.25 mM
0			
0.03			
0.08			
0.15			
0.32			
0.47			
0.63			
0.95			

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1. Evaluación de diversos gradientes de elución

Se realizó una primera extracción de la LDH, la posterior precipitación con sulfato de amonio y desalado por filtración en gel con Sephadex G-25, tal como se indica en la metodología. Se determinó la actividad enzimática de la LDH considerando un coeficiente de absorción molar (ϵ) de $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (De Gäde, G., 1979; Al-Jassabi, S. 2002).



La actividad enzimática de la fracción F3 fue la más elevada de las fracciones obtenidas en la etapa correspondiente a la extracción y fraccionamiento por precipitación con sales, según se muestra en la figura 22. Ésta es la fracción en la que se encuentra concentrada toda la LDH extraída, pues se ha precipitado y resuspendido en un mínimo volumen.

En cuanto a la filtración en gel, o cromatografía de exclusión molecular, se colectaron en total cuatro fracciones según se indica en la metodología. La fracción colorida (D2) fue la de mayor actividad (figura 23), indicando que es en esta porción del volumen en la que eluye la LDH, por lo tanto, es de esta fracción de la que se partió para realizar las posteriores evaluaciones de gradientes de elución para la cromatografía de intercambio catiónico.

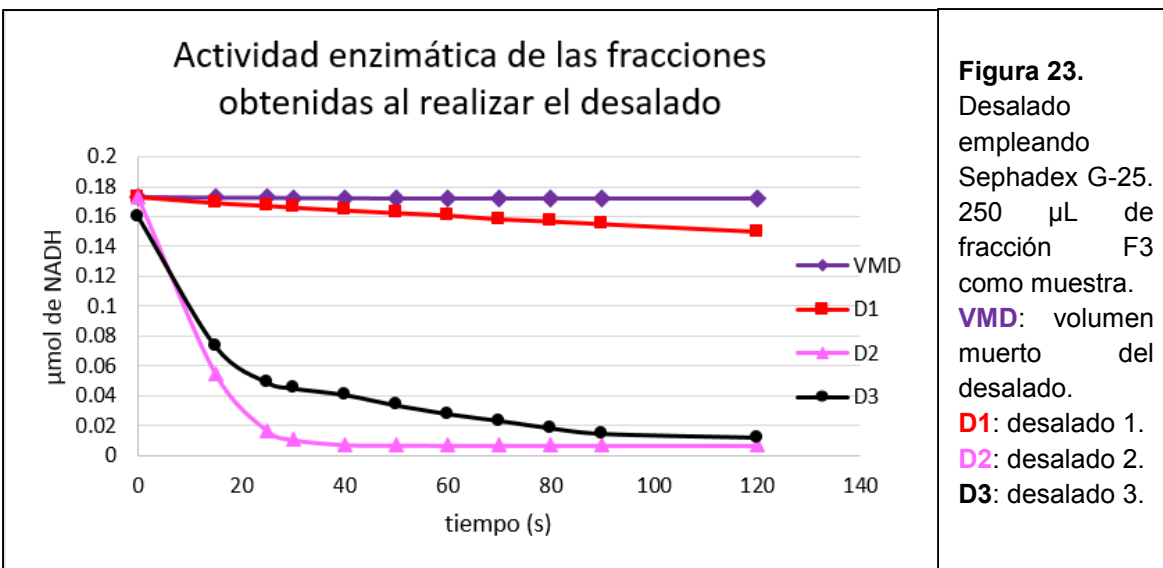


Figura 23. Desalado empleando Sephadex G-25. 250 μ L de fracción F3 como muestra. **VMD:** volumen muerto del desalado. **D1:** desalado 1. **D2:** desalado 2. **D3:** desalado 3.

9.1.1. Gradiente de [NaCl]

Se han reportado purificaciones de LDH de diferentes especies, y diferentes tejidos de las mismas. En la mayoría de ellas se emplearon técnicas cromatográficas, y en algunas de ellas se emplean gradientes de sales durante la elución (Dawson, N., 2013; De Gäde, G., 1979; Karamanos, Y. 2014; Nadeem, M. *et al.* 2011; Kaletha, K. 1974; Olson, J. 1972; Sasaki, T. *et al.* 1989). Se reportan concentraciones empleadas de NaCl o KCl de hasta 2 M. Como primer intento, se optó por una CIC con gradiente de [NaCl] 0 a 1 M (Gradiente de [NaCl], intento 1 en la tabla 4 de la sección “Metodología”), obteniendo los resultados mostrados en las figuras 24 y 25.

Debido a que la actividad enzimática fue detectada en el volumen de retención y las dos fracciones de lavado, no obteniéndose ninguna actividad en las fracciones correspondientes al gradiente de [NaCl] (figura 25), se infiere que, específicamente debido a las condiciones de equilibrio, la LDH no está interaccionando con la resina de intercambio catiónico. Siendo así, el pH de equilibrio es tal que la carga neta de la LDH es negativa, por lo que no es retenida por los grupos sulfonato de la resina intercambiadora. El pI de la LDH considerado en este ensayo es de 7.2 - 7.6, pero los resultados muestran que debe considerarse el valor de pI reportado de entre 8.0 y 8.4, por lo cual, el valor de pH de equilibrio se redujo a 8.0, manteniendo constantes el resto de las condiciones experimentales (Gradiente de [NaCl], intento 2 en la tabla 4 de la sección “Metodología”). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 26 y 27.

Bajo las nuevas condiciones empleadas se obtuvo una mayor retención de la muestra a la resina, pues a pesar de que se perdió una cantidad considerable de LDH en los lavados, se observó que no se pierde la totalidad de ésta, pues la enzima eluyó también al aplicar el gradiente de [NaCl] (figura 27). Por tanto, se planteó reducir la cantidad de muestra aplicada en la columna, considerando la posibilidad de que la pérdida de LDH en los lavados se deba a un exceso de ésta. Por otro lado, la elución parece completarse a una [NaCl] de 0.5 M, por lo cual se planteó modificar también las concentraciones de NaCl empleadas en el gradiente, y manteniendo el resto de las condiciones de este segundo intento constantes (Gradiente de [NaCl], intento 3 en la tabla 4 de la sección “Metodología”). Los resultados obtenidos en este tercer experimento se muestran en las figuras 28 y 29.

Se logró la recuperación total de la enzima empleando concentraciones de NaCl menores que en los intentos 1 y 2. Se observó también que la cantidad de LDH perdida en el lavado de la muestra se redujo significativamente, sin afectar la cantidad de unidades enzimáticas obtenidas al aplicar el gradiente de elución (figura 29). Por lo tanto, las condiciones de esta última cromatografía, en lo que respecta a la aplicación de un gradiente de [NaCl], son las que mejores resultados arrojaron en cuanto a actividad enzimática, específicamente la fracción NaCl 0.2M-1, es decir, la primera porción de 500 µL recolectada al eluir la muestra con el amortiguador que contiene una [NaCl] de 0.2 M.

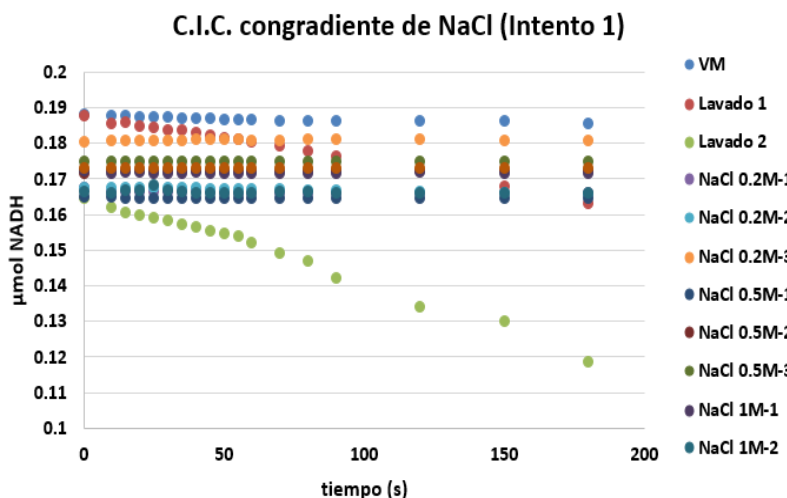


Figura 24. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la primera CIC con gradiente de [NaCl]. Resina equilibrada a pH 8.6. 250 µL de D2 como muestra. [NaCl] de 0 M (Lavado), 0.2 M, 0.5 M y 1M. 1.5 mL de cada amortiguador de elución colectando 3 fracciones de 500 µL para cada amortiguador.

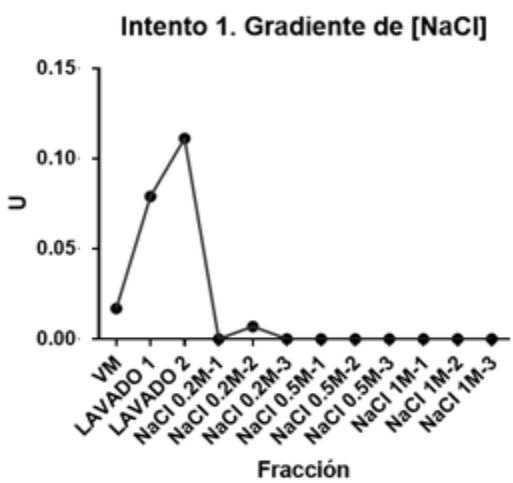


Figura 25. Actividad de la LDH en unidades enzimáticas (U) en cada una de las fracciones obtenidas bajo las condiciones del intento 1 de CIC con gradiente de [NaCl].

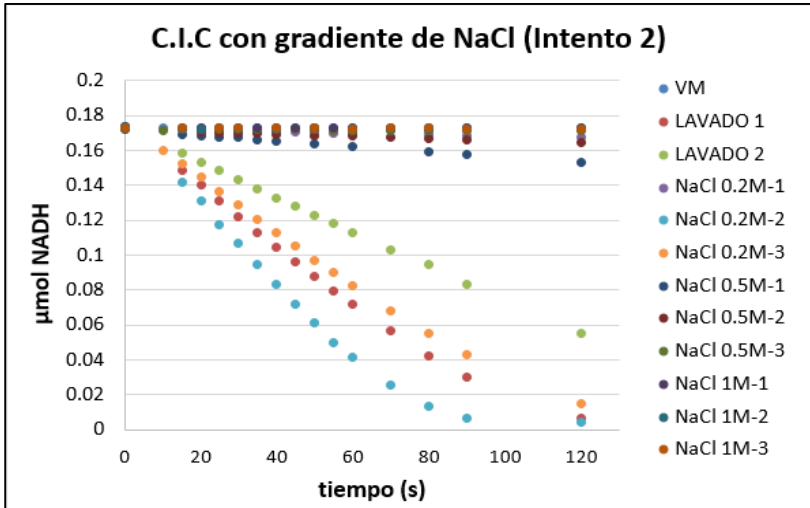


Figura 26. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la segunda CIC con gradiente de [NaCl]. Resina equilibrada a pH 8.0. 250 µL de D2 como muestra. [NaCl] de 0 M (Lavado), 0.2 M, 0.5 M y 1M. 1.5 mL de cada amortiguador de elución colectando 3 fracciones de 500 µL para cada amortiguador.

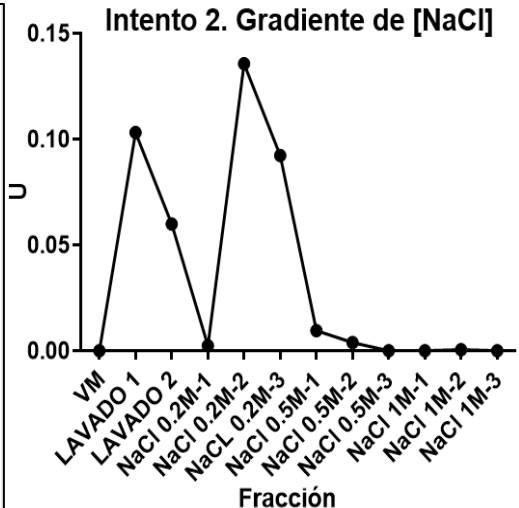


Figura 27. Actividad de la LDH en unidades enzimáticas (U) en cada una de las fracciones obtenidas bajo las condiciones del intento 2 de CIC con gradiente de [NaCl].

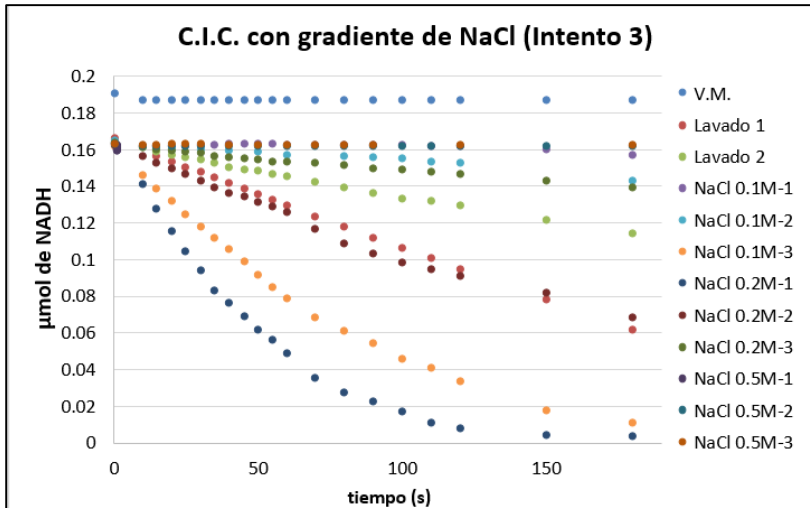


Figura 28. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la tercera CIC con gradiente de [NaCl]. Resina equilibrada a pH 8.0. 200 µL de D2 como muestra. [NaCl] de 0 M (Lavado), 0.1 M, 0.2 M y 0.5 M. 1.5 mL de cada amortiguador de elución colectando 3 fracciones de 500 µL para cada amortiguador.

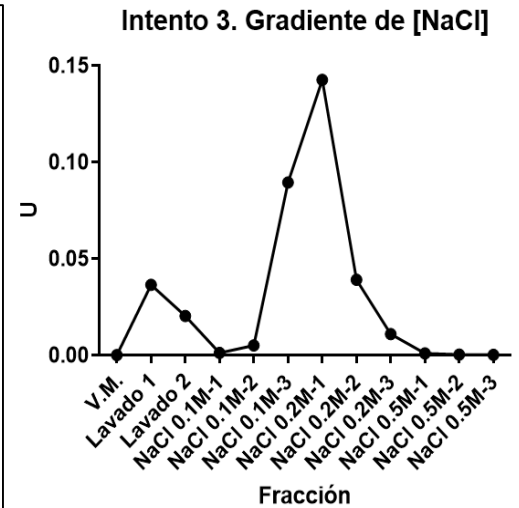


Figura 29. Actividad de la LDH en unidades enzimáticas (U) en cada una de las fracciones obtenidas bajo las condiciones del intento 3 de C.I.C con gradiente de [NaCl].

9.1.2. *Gradiente de pH*

Para la CIC con gradiente de pH se optó por aplicar amortiguadores de pH creciente. Por cuestiones de practicidad, para poder determinar el pH real con un electrodo se colectaron sólo 2 fracciones por cada amortiguador empleado, resultando cada una de un volumen aproximado de 750 μL . Al igual que con las aplicaciones de gradiente de pH, las condiciones específicas de cada cromatografía se detallan en la tabla 5 de la sección “Metodología”.

La aplicación de un gradiente de pH para realizar la elución de la LDH en una CII no es muy empleada. Para realizar la selección de los valores de pH que habrían de emplearse para efectuarla se consideraron sobre todo los valores de pI reportados, tal como se mencionó anteriormente. Se buscó obtener un gradiente creciente, por lo que se aplicaron amortiguadores de mayor pH cada vez.

Para el primer intento de CIC con gradiente de pH, que se realizó a la par del primer intento de CIC con gradiente de [NaCl], se empleó un valor de equilibrio de columna de 8.6. Los resultados al aplicar el primer gradiente de pH a la CIC se muestran en las figuras 30 y 31.

En concordancia con lo ocurrido en el gradiente 1 de [NaCl], gran parte de la LDH se perdió en los lavados de la columna. Por otro lado, se obtuvo también actividad enzimática en las fracciones colectadas al aplicar los amortiguadores a partir del pH 8.0. Por otro lado, ya que al aplicar los amortiguadores de TRIS base de pH inferior a 8 no se observa elución de la LDH se planteó eliminarlos del gradiente (figura 31). Por lo tanto, se modificó el amortiguador de equilibrio, y en un intento de mejorar la retención de la enzima, la resina se equilibró a un pH menor, empleando para ello TRIS base 50 mM pH 7.0. Además, para el siguiente experimento, la muestra se redujo 50 μL más, pues en los experimentos de CIC con gradiente de [NaCl] se observó que a pesar de haber reducido la cantidad de muestra (D2) colocada en la columna, la pérdida de LDH en los lavados sigue siendo importante, colocando así un volumen de 150 μL de fracción D2 en la columna y el gradiente se inició en un pH de 8.0. Los resultados obtenidos al realizar la CIC bajo estas condiciones se muestran en las figuras 32 y 33.

Con las condiciones empleadas en la última cromatografía realizada se observó la resolución del problema de fuga de la enzima en el lavado de la columna, al mismo tiempo que la mayor actividad enzimática se concentra en una sola de las fracciones colectadas (figura 33). No obstante, la cantidad de unidades enzimáticas obtenidas fue significativamente mayor con el

intento 3 del gradiente de [NaCl], a pesar de haber una elevada actividad enzimática en más de una fracción colectada (figura 34). Por lo cual, el mejor gradiente se seleccionará con base a la purificación de la LDH, monitoreada por medio de Electroforesis desnaturizante (PAGE-SDS) (figuras 36 y 37) y la comparación de las tablas de purificación de ambos procesos: intento 3 de gradiente de [NaCl] e intento 2 de gradiente de pH (tablas 23 y 24).

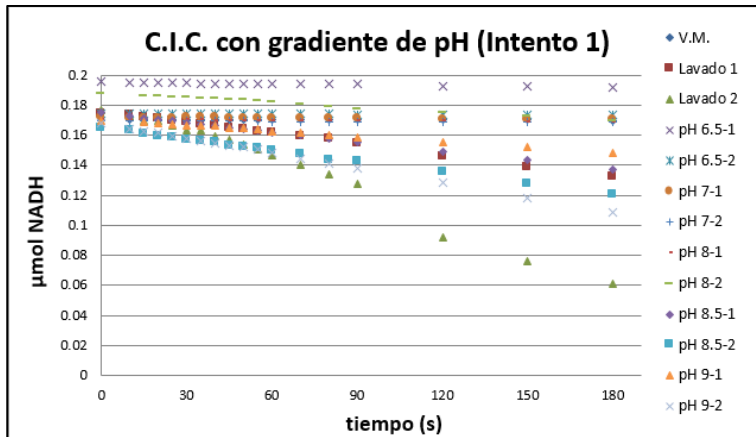


Figura 30. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la primera CIC con gradiente de pH. Resina equilibrada a pH 8.6. 250 µL de D2 como muestra. pH de 6.5, 7.0, 8.0, 8.5 y 9.0. 1.5 mL de cada amortiguador de elución colectando 2 fracciones de 750 µL para cada amortiguador.

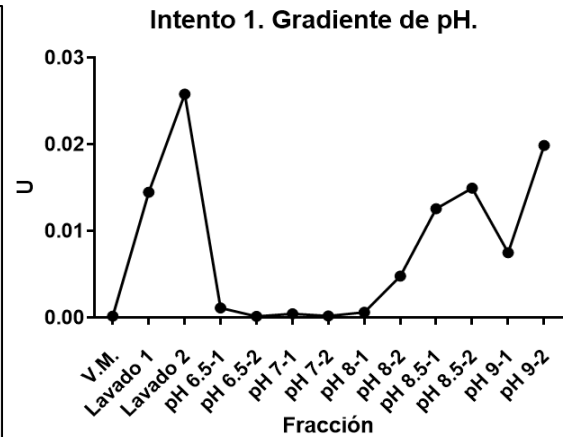


Figura 31. Actividad de la LDH en unidades enzimáticas (U) en cada una de las fracciones obtenidas bajo las condiciones del intento 1 de CIC con gradiente de pH.

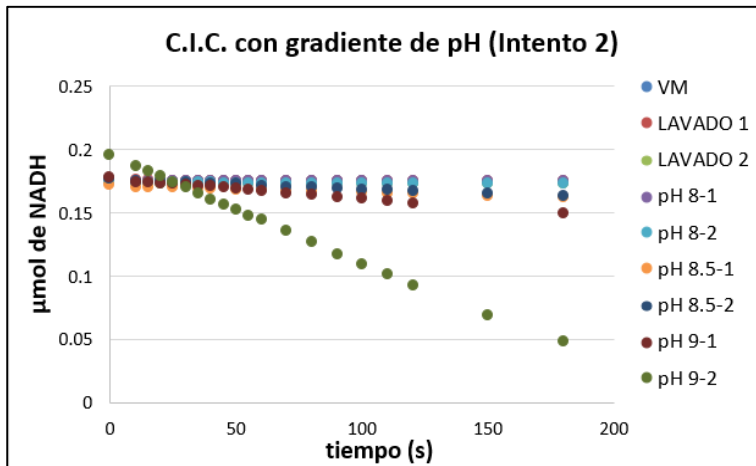


Figura 32. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la segunda CIC con gradiente de pH. Resina equilibrada a pH 7.0. 150 µL de D2 como muestra. pH de 8.0, 8.5 y 9.0. 1.5 mL de cada amortiguador de elución colectando 2 fracciones de 750 µL para cada amortiguador.

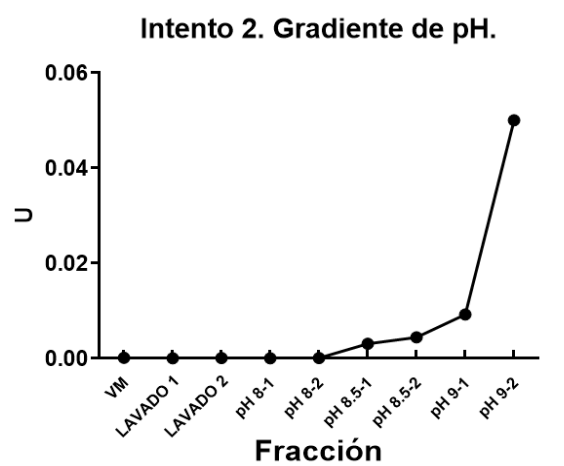


Figura 33. Actividad de la LDH en unidades enzimáticas (U) en cada una de las fracciones obtenidas bajo las condiciones del intento 2 de CIC con gradiente de pH.

9.2. Comparación entre gradientes

Tabla 22. Relación entre número de fracción y el gradiente aplicado en cada cromatografía realizada.

Número de fracción	Gradiente				
	[NaCl]			pH	
	1	2	3	1	2
1	VM	VM	VM	V.M.	VM
2	LAVADO 1	LAVADO 1	LAVADO 1	LAVADO 1	LAVADO 1
3	LAVADO 2	LAVADO 2	LAVADO 2	LAVADO 2	LAVADO 2
4	NaCl 0.2M-1	NaCl 0.2M-1	NaCl 0.1M-1	pH 6.5-1	pH 8-1
5	NaCl 0.2M-2	NaCl 0.2M-2	NaCl 0.1M-2	pH 6.5-2	pH 8-2
6	NaCl 0.2M-3	NaCl 0.2M-3	NaCl 0.1M-3	pH 7-1	pH 8.5-1
7	NaCl 0.5M-1	NaCl 0.5M-1	NaCl 0.2M-1	pH 7-2	pH 8.5-2
8	NaCl 0.5M-2	NaCl 0.5M-2	NaCl 0.2M-2	pH 8-1	pH 9-1
9	NaCl 0.5M-3	NaCl 0.5M-3	NaCl 0.2M-3	pH 8-2	pH 9-2
10	NaCl 1M-1	NaCl 1M-1	NaCl 0.5M-1	pH 8.5-1	
11	NaCl 1M-2	NaCl 1M-2	NaCl 0.5M-2	pH 8.5-2	
12	NaCl 1M-3	NaCl 1M-3	NaCl 0.5M-3	pH 9-1	
13				pH 9-2	

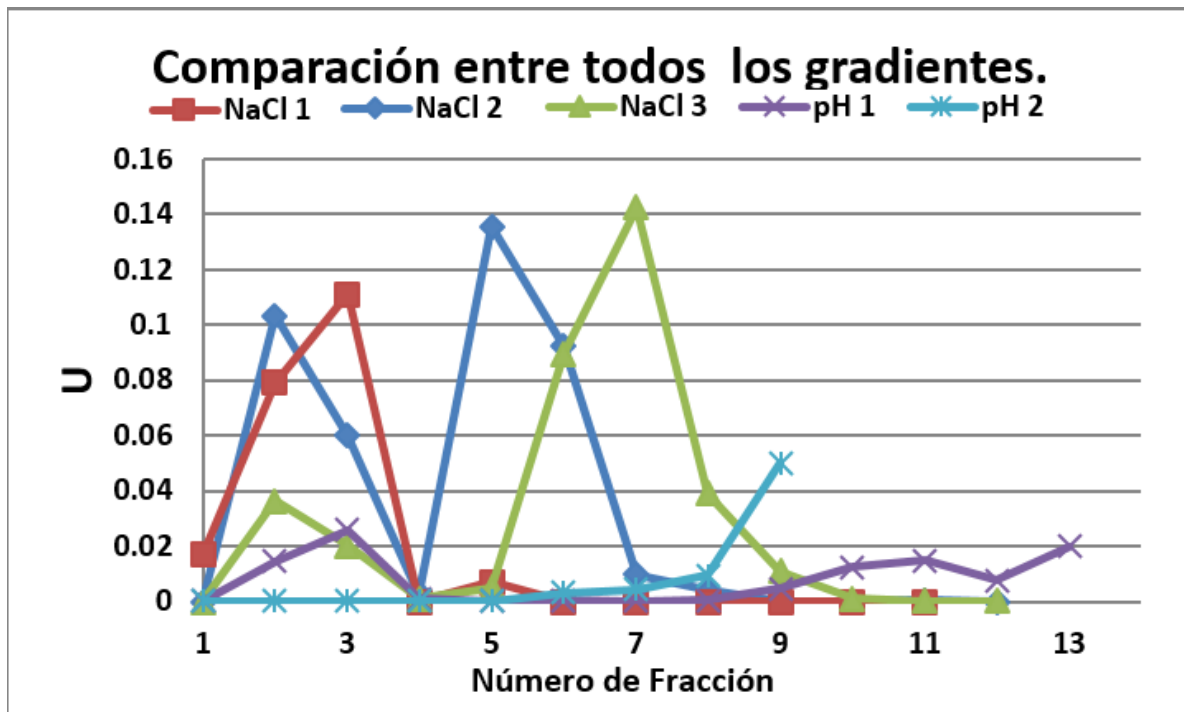


Figura 34. Actividad enzimática en unidades internacionales obtenida en las fracciones colectadas (ver tabla 22) en todas las cromatografías realizadas.

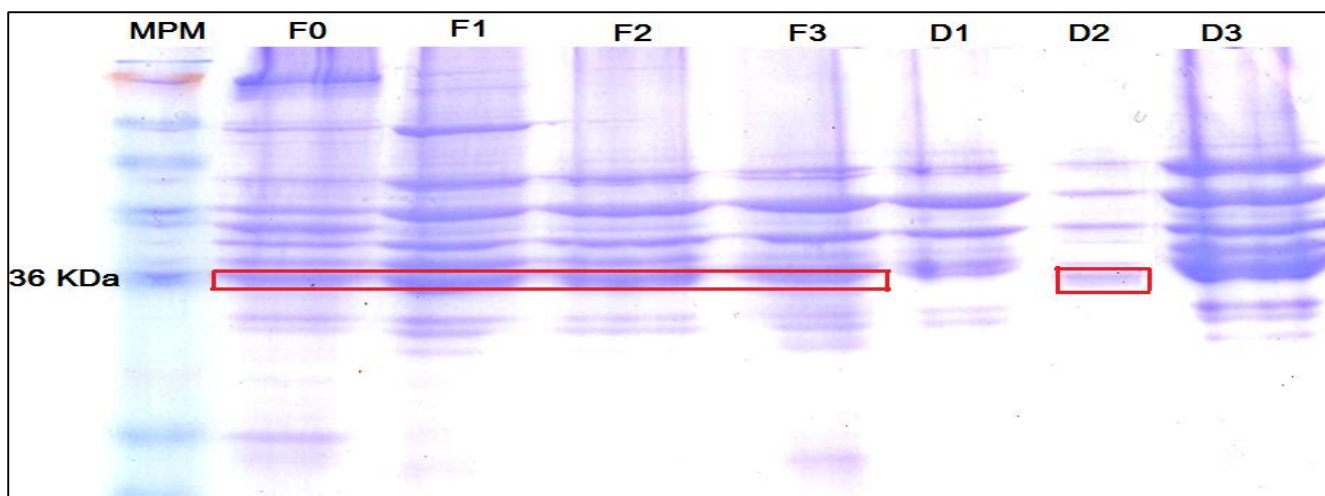


Figura 35. Patrones electroforéticos de las fracciones colectadas en los procesos de homogenización (F0), centrifugación (F1), precipitación con sulfato de amonio a un porcentaje de saturación de 55% (F2) y de 75% (F3), así como de las tres fracciones colectadas al realizar el desalado de la fracción F3 (D1, D2 y D3). Enmarcadas en rojo, las bandas en las que se encuentra la LDH.

La eliminación de varias de las proteínas contaminantes mediante los procesos de centrifugación y precipitación con sulfato de amonio se hace evidente al observar la figura 35, en la que es posible visualizar la desaparición gradual de algunas bandas conforme avanza el proceso de fraccionamiento. En los carriles correspondientes al desalado se puede observar presencia de bandas con el mismo desplazamiento electroforético, lo cual es un indicativo de la abundancia de las proteínas a las que corresponden dichas bandas, o de múltiples proteínas que tengan pesos moleculares iguales o muy similares. Al observar la actividad enzimática en las fracciones del desalado en la figura 23 es notable que en la fracción D2, que es la fracción con mayor actividad enzimática, hay una cantidad menor de proteínas, es decir, es en esta porción en la que se recupera a la LDH con un mayor grado de pureza, y que en la fracción D1, en la cual no se observa una banda en la posición de la LDH, tampoco se detecta actividad enzimática. No obstante, en la fracción D3, en la cual se registra elevada actividad enzimática también, sí hay una banda a la altura esperada de la LDH, lo cual es un indicativo de que esta banda puede corresponder a más de una proteína con el mismo peso molecular (figura 23).

En la figura 36 se observa que la fracción 0.2M-1, en la cual se presenta la mayor actividad (figura 29), hay una banda proteica muy definida cuyo corrimiento electroforético corresponde al esperado para la LDH. Sin embargo, no es la única banda presente en la fracción, hay por lo menos otras 6 bandas. Aunque la actividad obtenida es buena, el principal objetivo de esta investigación es la purificación de la enzima LDH, por lo que se desea obtenerla lo más aislada posible.

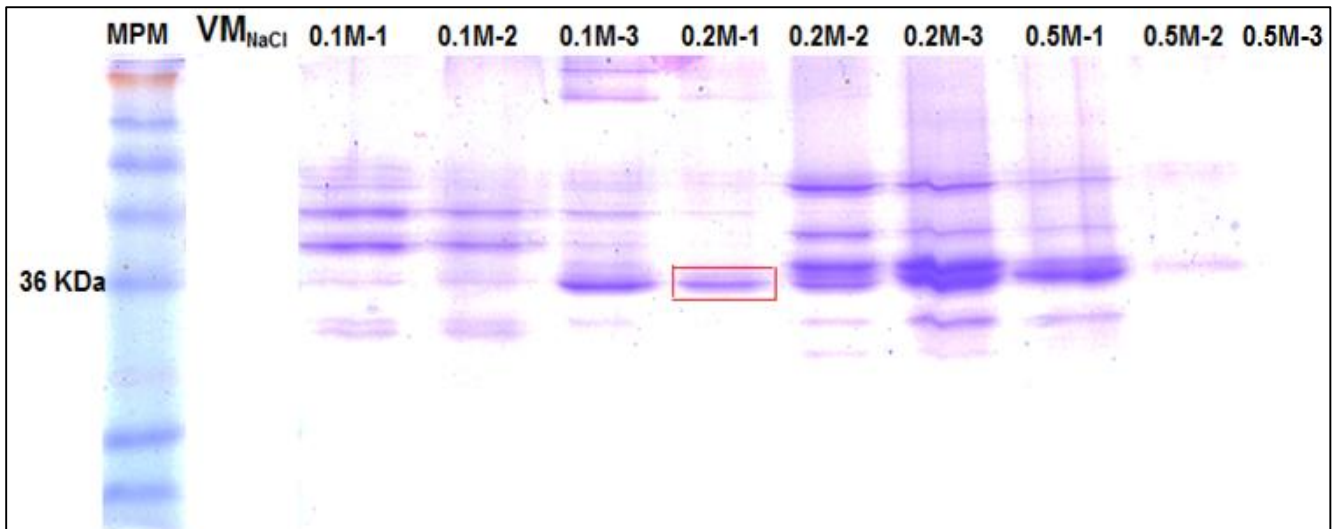


Figura 36. Patrones electroforéticos de las fracciones colectadas al aplicar las condiciones de elución del intento 3 de gradiente de $[NaCl]$ (tabla 4 en la sección “Metodología”, figuras 28 y 29). Se muestran de izquierda a derecha: marcadores de peso molecular (MPM), el volumen muerto (VM_{NaCl}), tres porciones obtenidas al aplicar una concentración de $NaCl$ de 0.1 M (0.1M-1 a 3), tres porciones obtenidas al aplicar una concentración de $NaCl$ de 0.2 M (0.2M-1 a 3) y tres porciones obtenidas al aplicar una concentración de $NaCl$ de 0.5 M (0.5M-1 a 3). Enmarcada en rojo, la banda en la que se encuentra la LDH en la fracción de mayor actividad enzimática.

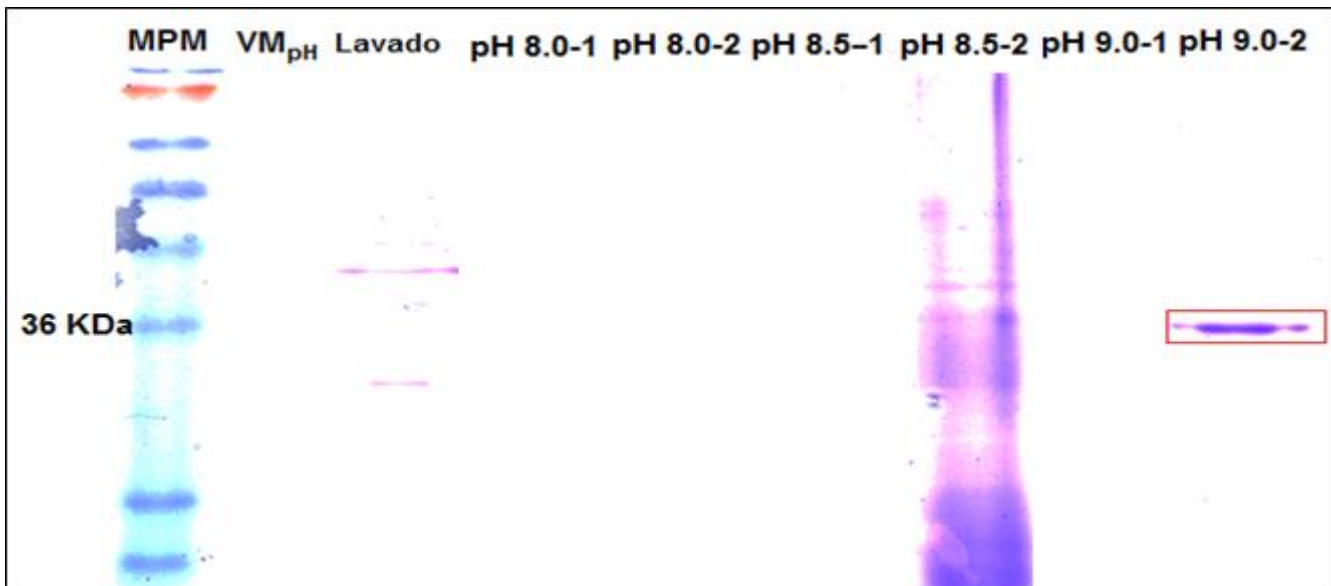


Figura 37. Patrones electroforéticos de las fracciones colectadas al aplicar las condiciones de elución del intento 2 de gradiente de pH (tabla 5 en la sección “Metodología”, figuras 32 y 33). Se muestran de izquierda a derecha: marcadores de peso molecular (MPM), el volumen muerto (VM_{pH}), lavado, dos porciones obtenidas al aplicar un pH de 8.0 (pH 8.0-1 y 2), dos porciones obtenidas al aplicar un pH de 8.5 (pH 8.5-1 y 2), y dos porciones obtenidas al aplicar un pH de 9.0 (pH 9.0-1 y 2). Enmarcada en rojo, la banda en la que se encuentra la LDH en la fracción de mayor actividad enzimática.

Tabla 23. Tabla de purificación de la LDH empleando CII con gradiente de [NaCl] (intento 3, tabla 4).

PASO	Fracción	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Enriquecimiento	Rendimiento (%)
HOMOGENIZACIÓN	F0	83	6328.25	6374.4	1.01	1.00	100.00
CENTRIFUGACIÓN	F1	48	703	3110.4	4.42	4.39	48.80
PRECIPITACIÓN (NH ₄) ₂ SO ₄ 55%	F2	50	291.34	2850	9.78	9.71	44.71
PRECIPITACIÓN (NH ₄) ₂ SO ₄ 75%	F3	4	166.26	1656	9.96	9.89	25.98
DESALADO	D2	0.8	15.55	1021.44	65.90	65.42	16.02
CII CON GRADIENTE DE NaCl	NaCl 0.2M-1	0.5	3.7	384	103.78	103.03	6.02

Tabla 24. Tabla de purificación de la LDH empleando CII con gradiente de pH (intento 2, tabla 5).

PASO	Fracción	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Enriquecimiento	Rendimiento (%)
HOMOGENIZACIÓN	F0	83	6328.25	6374.4	1.01	1.00	100.00
CENTRIFUGACIÓN	F1	48	703	3110.4	4.42	4.39	48.80
PRECIPITACIÓN (NH ₄) ₂ SO ₄ 55%	F2	50	291.34	2850	9.78	9.71	44.71
PRECIPITACIÓN (NH ₄) ₂ SO ₄ 75%	F3	4	166.26	1656	9.96	9.89	25.98
DESALADO	D2	0.8	15.55	1021.44	65.90	65.42	16.02
CII CON GRADIENTE DE pH	pH 9.0-2	0.750	1.3	324.00	249.23	247.43	5.08

Como se evidencia en la figura 37, los resultados obtenidos al aplicar las condiciones del intento 2 de CIC con gradiente de pH, tanto de actividad como de electroforesis, son consistentes, pues la fracción pH 9.0-2, en la que se obtiene la mayor actividad de LDH, muestra una única banda, cuyo desplazamiento electroforético concuerda con el obtenido hasta el momento para la LDH, en comparación con el gradiente de [NaCl].

Si bien la tinción de gel empleada no permite afirmar que las bandas de proteínas de 36 KDa correspondan únicamente a LDH, como se mencionó anteriormente (figura 35), la obtención de una banda única en el carril de la fracción de mayor actividad, es ya un indicativo de una purificación más exitosa.

Al comparar en las tabas de purificación de ambos procedimientos se corrobora que el mejor aislamiento se obtiene mediante en gradiente de pH, pues tanto la actividad específica como el enriquecimiento, que son los principales indicadores de purificación, son notablemente mayores para el gradiente de pH (tablas 23 y 24). Por lo tanto, se puede afirmar que aplicando el gradiente de pH, se logra una mejor purificación de la LDH que al aplicar un gradiente de [NaCl].

Dado que en una muestra se encuentran presentes numerosas sustancias, cuyas propiedades eléctricas difieren entre sí, bajo condiciones particulares algunas interaccionan con el intercambiador, unas con más fuerza que otras, mientras que otras no lo hacen. Se sabe que este es el fundamento de la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico, y por tanto se deben considerar las propiedades eléctricas tanto de la molécula de interés, del intercambiador y de las otras sustancias con propiedades eléctricas que se encuentren disueltas en los amortiguadores empleados, pues pueden interferir en la cromatografía. Ya que las propiedades de cada especie son específicas, las condiciones para su liberación del intercambiador también son particulares, aunque no necesariamente únicas.

Una vez que se ha logrado que la molécula de interés interaccione con el intercambiador, ésta puede ser eluida cambiando el pH (especialmente en el caso de las proteínas), alterando así su carga, o añadiendo al medio materiales que compitan con la muestra por el intercambiador, como los iones de una sal. De estas dos opciones, la más comúnmente empleada es la elución mediante sales, ya sea isocrática o en gradiente. No hay muchos reportes en los que se emplee un gradiente de pH para lograr la purificación, por lo menos de LDH, tal vez porque se reporta que es difícil obtener dicho gradiente sin aumentar la fuerza iónica, pues un amortiguador tiene

capacidad para soportar cambios pequeños de pH, como los que se aplican con cada amortiguador de pH diferente en una elución. Esto hace que sea necesario una mayor concentración de sales en el amortiguador para poder imponer un nuevo pH. Sin embargo, en esta investigación los mejores resultados se obtuvieron aplicando gradiente de pH, manteniendo una concentración constante en el amortiguador.

Al aplicar un gradiente de sales se realiza el desplazamiento de las proteínas por los cationes provenientes de la sal; al aplicar un gradiente de pH, se modifica la carga de las proteínas unidas al intercambiador, con lo cual su afinidad a éste se modifica. Al mismo tiempo, la composición del amortiguador también modifica la fuerza iónica, pudiendo presentarse una combinación de mecanismos de elución. Lo anterior, favorece la eliminación de algunas proteínas que, como se muestra en la figura 36, no es posible separar al aplicar un gradiente de [NaCl].

Por lo tanto, al analizar los resultados obtenidos de actividad enzimática recuperada mediante las tablas de purificación, y los geles de PAGE-SDS, se concluye que las condiciones de elución que permiten obtener un mejor aislamiento de la LDH mediante CIC son las del intento 2 del gradiente de pH. Sin embargo, según se muestra en la figura 33, con los valores de pH empleados en el gradiente no se logró observar si esta actividad es la máxima obtenida. Se infiere que aplicando un valor de pH más, se podrá observar un pico o tal vez un descenso en la actividad enzimática, con lo cual se obtendrá el cromatograma completo. De acuerdo con las observaciones mencionadas anteriormente, en experimentos posteriores se agregará al gradiente un amortiguador con pH de 9.5.

9.3. Implementación del protocolo obtenido

Se realizó la extracción y precipitación por triplicado, obteniendo:

Tabla 25. Detalle de los procesos de homogenización y precipitación con sulfato de amonio realizados por triplicado.

	Extracción 1	Extracción 2	Extracción 3
Masa de tejido muscular	20.05 g	20.06 g	20.09 g
Volumen F0	76 mL	78 mL	83 mL
Volumen F1	41 mL	43 mL	44 mL
Volumen F2	45 mL	47 mL	43 mL
Volumen H₂O destilada para re-suspender	2 mL	2 mL	3 mL
Volumen obtenido de F3	6 mL	6 mL	7.5 mL

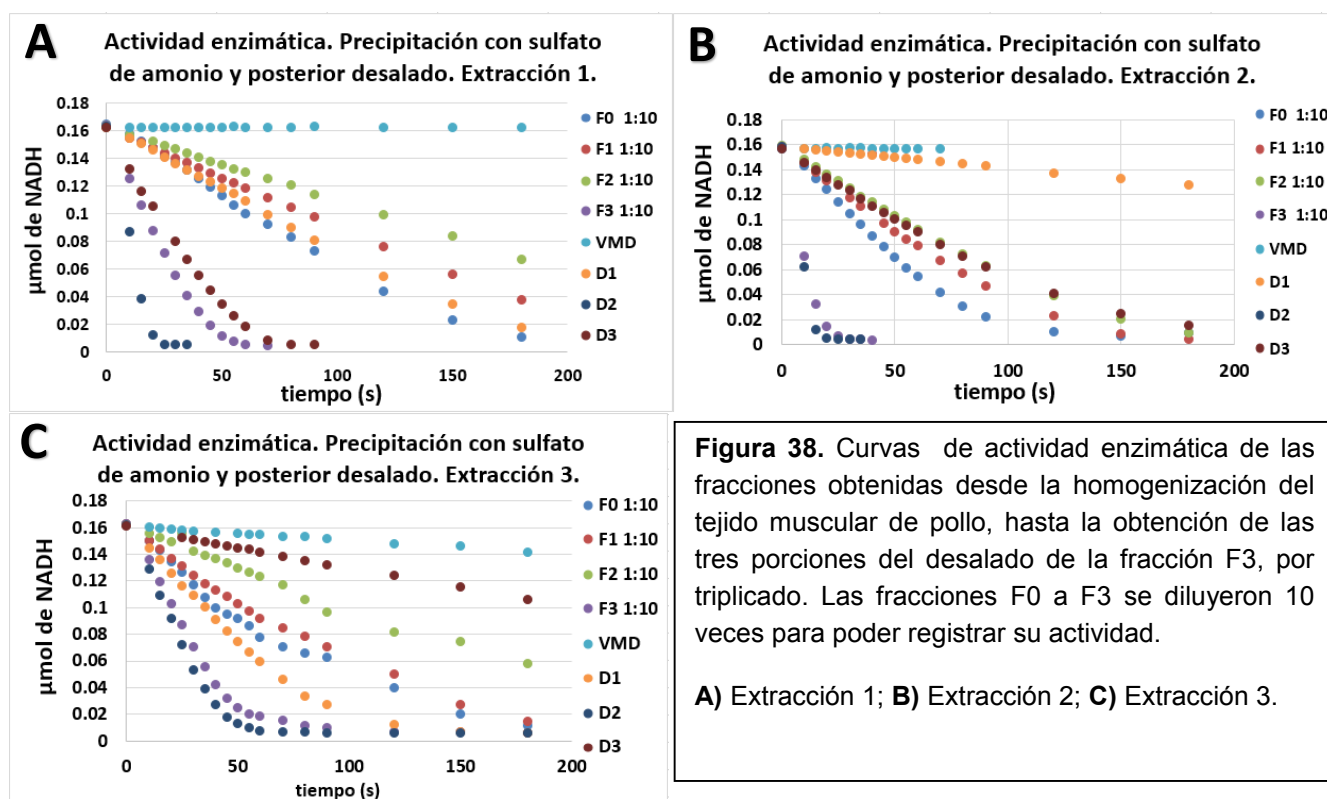
Posteriormente se desaló la fracción F3:

Tabla 26. Detalle del proceso de desalado realizado por triplicado.

Volumen de Fracción (µL)	Extracción 1	Extracción 2	Extracción 3
pH inicial*	8-9	8-9	8-9
Volumen de retención (VMD)	400	500	400
Porción incolora (D1)	600	300	400
Porción colorida (D2)	1000	1500	1200
Porción incolora (D3)	400	250	600
pH final*	8-9	8-9	8-9

*pH determinado en el amortiguador al salir de columna empleando tira reactiva.

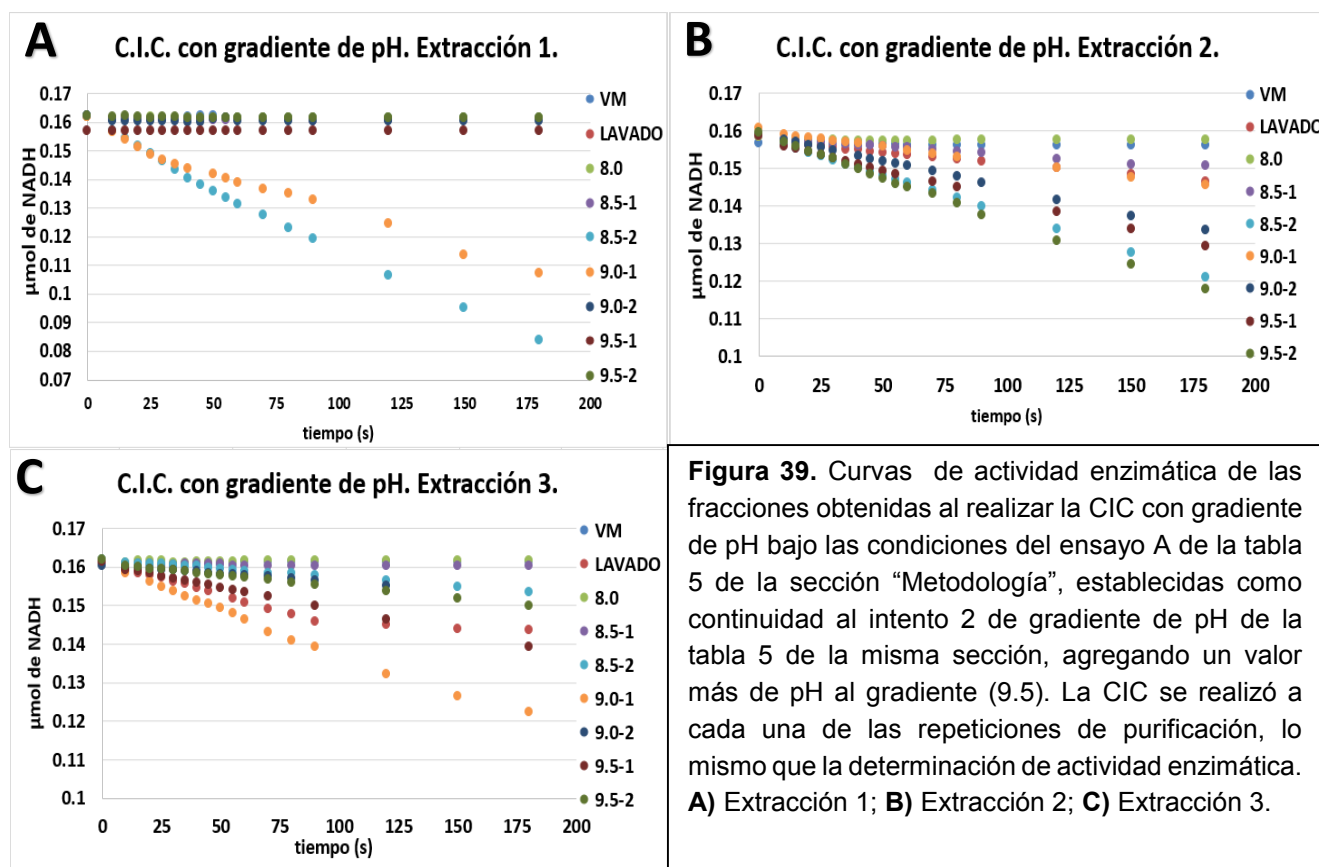
En la figura 38 se observa concordancia con los resultados obtenidos durante la primera purificación (comparado con figuras 22 y 23). Así mismo, en las tres repeticiones la variación de la actividad de una fracción a otra a lo largo de los procesos de precipitación y desalado es muy similar. No obstante, se observa una ligera influencia del volumen empleado para resuspender en la fracción F3, como es de esperarse, pues la cantidad total de enzima, que se espera sea similar en las tres extracciones, se diluye.



Aunque siempre se encuentra la mayor actividad enzimática en la fracción D2, ésta es ligeramente menor cuando se emplean 3 mL de agua destilada para resuspender el precipitado para obtener la F3 (tabla 25). No obstante, no es una diferencia que afecte al resto del proceso,

pues en todos los casos la tendencia de actividades se conserva. Además, hay una considerable fuga de enzima en la fracción D1 cuando se colectan de ésta más de 300 μL (extracciones 1 y 3), sin observarse una relación entre el volumen de D3 colectado y la fuga de LDH en ésta; un volumen de D2 colectado entre 1000 y 1500 μL ofrece una muy buena recuperación de enzima, y distinción con respecto a D1 y D3 en cuanto a cuál tiene mayor actividad (tabla 26).

La CIC se realizó, empleando la fracción D2 de cada una de las extracciones como muestra, bajo las condiciones del gradiente de pH ensayo A de la tabla 5 en la sección “Metodología”. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 39 y 40.



Los resultados de actividad mostrados en la figura 39 muestran poca correspondencia entre una repetición y otra. Pues se detecta actividad enzimática en varias de las fracciones colectadas, pero la de máxima actividad no es la misma en cada caso. Para poder observar la tendencia de actividad en cada repetición, se realizó el cálculo de las unidades enzimáticas (U) obtenidas en cada fracción de cada repetición, considerando que para cada una se obtuvieron diferentes volúmenes durante todos los pasos anteriores.

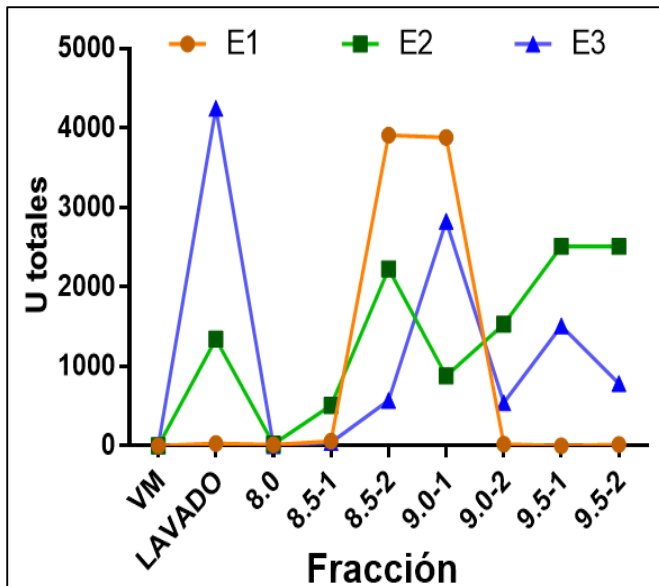


Figura 40. Se muestra el cálculo de unidades enzimáticas *totales* obtenidas mediante CIC en cada una de las repeticiones, con base en los resultados de actividad de la figura 39.

Estos cálculos se muestran en la figura 40, en la que se hace evidente que no hay correspondencia en la tendencia de actividad. Se atribuye lo anterior a la dificultad que representa coleccionar un volumen igual para cada fracción, así como al hecho de que al coleccionar la mitad del volumen de amortiguador se está interrumpiendo la elución. Considerando esto, se decidió coleccionar sólo una fracción con el total del volumen por cada amortiguador aplicado, según se indica en la tabla 5 (ensayo B, sección “Metodología”). Los resultados se muestran en las figuras 41 y 42:

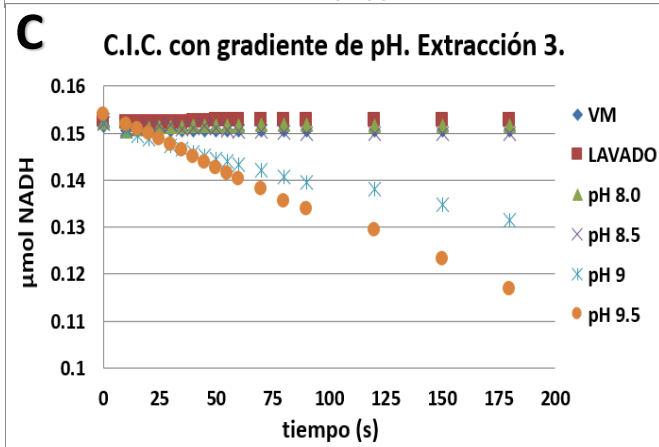
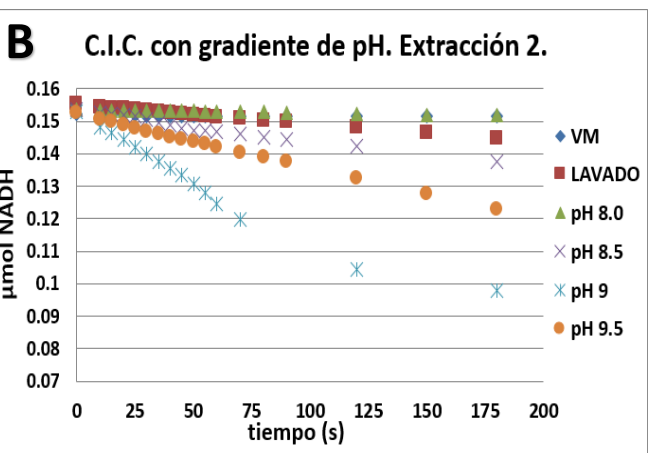
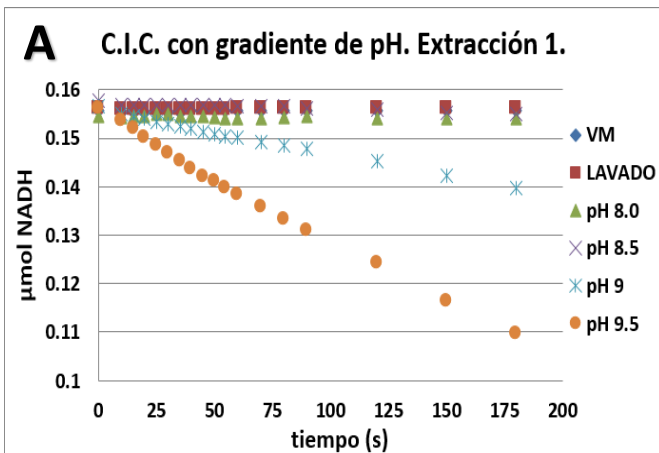


Figura 41. Curvas de actividad enzimática de las fracciones obtenidas al realizar la CIC con gradiente de pH bajo las condiciones del intento B de la tabla 5 de la sección “Metodología”. La CIC se realizó a cada una de las repeticiones de purificación, lo mismo que la determinación de actividad enzimática.
A) Extracción 1; **B)** Extracción 2; **C)** Extracción 3.

Se observa en la figura 41 que hay una mayor concordancia en la actividad enzimática de las fracciones recolectadas en cada repetición, sin afectarse la misma por el aumento de volumen con respecto al ensayo A. En las tres repeticiones se obtuvo la mayor actividad sólo en dos fracciones, correspondientes a los valores de pH 9.0 y 9.5. Se observó que en dos de las tres repeticiones la fracción colectada a pH 9.5 es la de mayor actividad, mientras que en la repetición restante, la mayor actividad se obtiene a pH 9.0. Para poder comparar resultados de manera más determinante, se realizó el cálculo de las unidades enzimáticas totales obtenidas en la última cromatografía realizada. Los resultados se muestran en la figura 42.

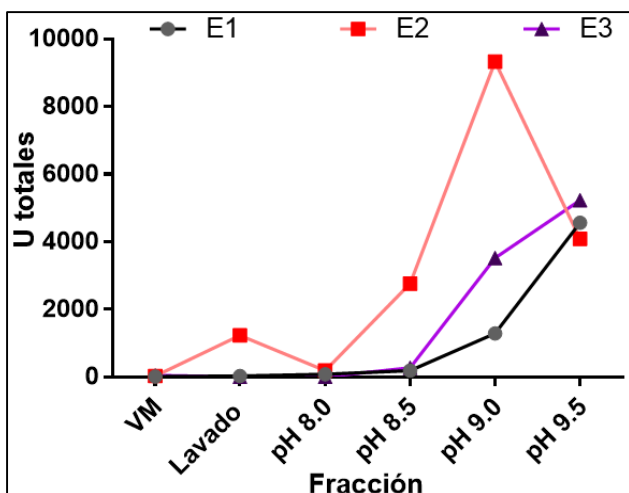


Figura 42. Se muestra el cálculo de unidades enzimáticas *totales* obtenidas mediante CIC en cada una de las repeticiones, con base en los resultados de actividad de la figura 41.

La tendencia mejora bastante con respecto a los obtenidos en el experimento anterior, y concuerdan con los obtenidos en las pruebas previas a la elección del gradiente a aplicar. Sin embargo, en la segunda repetición se obtuvieron resultados diferentes que en las repeticiones 1 y 3. A pesar de haber empleado las mismas condiciones en los tres procesos, no debe asumirse que los resultados de pH final en cada fracción obtenida sean iguales en las tres repeticiones, pues al aplicarse diferentes amortiguadores para crear un

gradiente, y considerando el intercambio de cationes que tiene lugar dentro de la columna durante la elución, los valores de pH en la fracción colectada pueden variar, generando una gama de valores de pH obtenidos más amplia e incluso diferente a la de los valores de pH aplicados. Por tanto, se realizó la determinación del pH real de cada fracción colectada, empleando para ello un potenciómetro. Los resultados que se obtuvieron tras dicha determinación se muestran en la tabla 27.

Tabla 27. Valores de pH real de las fracciones colectadas. Ensayo B (tabla 5).

	EXTRACCIÓN 1		EXTRACCIÓN 2		EXTRACCIÓN 3	
Fracción*	Volumen (µL)	pH	Volumen (µL)	pH	Volumen (µL)	pH
VM	~100	--	~100	--	~100	--
L	1500	6.99	1500	6.96	1500	6.99
pH 8.0	1500	7.27	1500	7.28	1500	7.25
pH 8.5	1500	8.05	1500	8.08	1500	8.06
pH 9.0	1500	8.38	1500	8.54	1500	8.40
pH 9.5	1500	8.85	1500	9.02	1500	8.85

VM=Volumen muerto; L=lavado; pH X=fracción obtenida al eluir empleando buffer Tris 50 mM al pH correspondiente.

Se observa que los valores de pH real obtenidos en las fracciones “L” a “pH 8.5” de las tres extracciones son muy similares. Sin embargo, hay una diferencia significativa en los obtenidos en las dos fracciones restantes de la segunda repetición. Con estas variaciones en el pH es posible observar más claramente el comportamiento de la actividad enzimática, y por tanto, el proceso de elución durante la aplicación de un gradiente de pH. Al graficar por separado los valores de actividad enzimática obtenida en cada fracción en función del valor de pH real obtenido se obtienen las curvas mostradas en la figura 43. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es posible analizar la variación de la actividad enzimática al graficar de manera conjunta los datos obtenidos. Se obtuvo un cromatograma típico, en el que la máxima actividad se obtiene a un pH de 8.54, con un gradiente real obtenido de 6.98 a 9.02, al aplicar amortiguadores con valores de pH en un intervalo de 7.0 a 9.5 (figura 44).

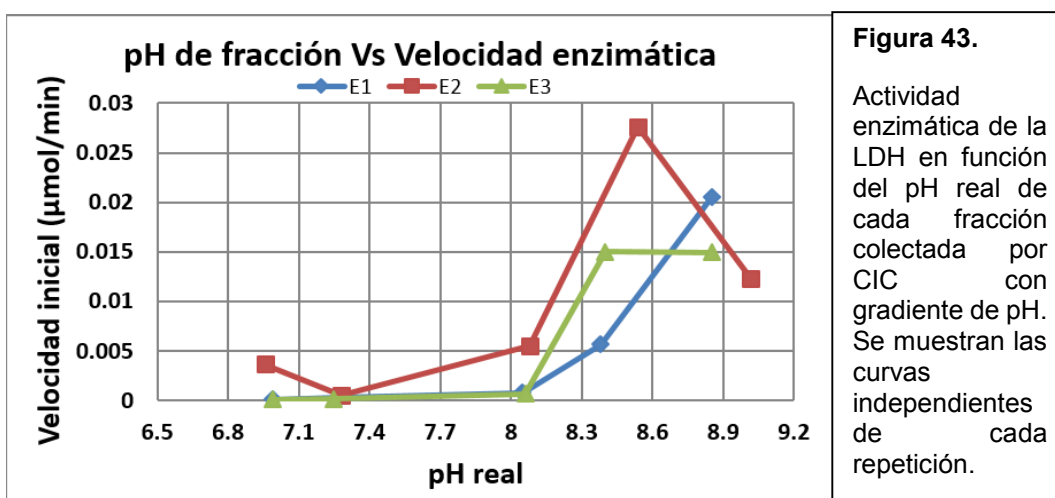
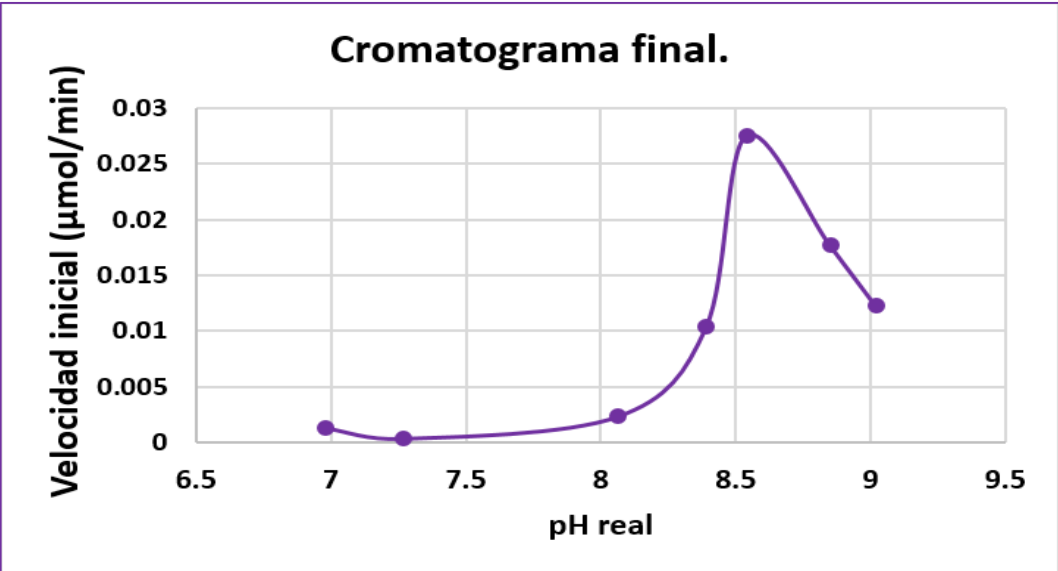


Figura 44.
Actividad enzimática de la LDH en función de los valores de pH real obtenido en cada fracción colectada por CIC con gradiente de pH. Se muestran los resultados conjuntos de las tres repeticiones, con los diferentes valores de pH.



Posteriormente, se realizó la PAGE-SDS de las fracciones obtenidas por extracción, precipitación con sulfato de amonio, la fracción D2 obtenida en el desalado mediante cromatografía de exclusión molecular (figura 45) y las obtenidas por CIC con gradiente de pH (ensayo B, tabla 5), correspondientes a la segunda repetición, por ser en la que se obtuvo la mayor actividad (figura 46).

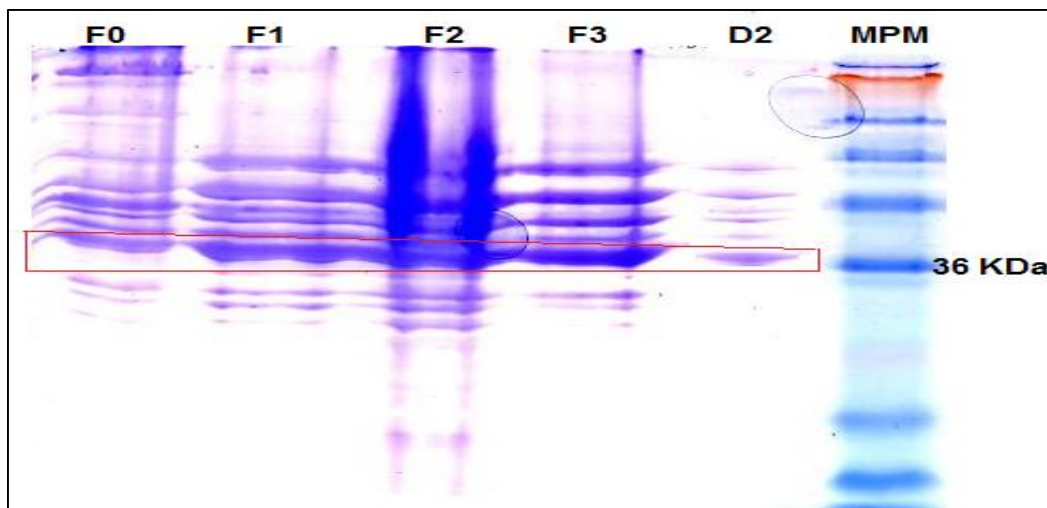


Figura 45. Patrones electroforéticos de las fracciones colectadas en los procesos de homogenización (F0), centrifugación (F1), precipitación con sulfato de amonio a un porcentaje de saturación de 55% (F2) y de 75% (F3), así como de la fracción D2. Enmarcadas en rojo, las bandas en las que se encuentra la LDH.

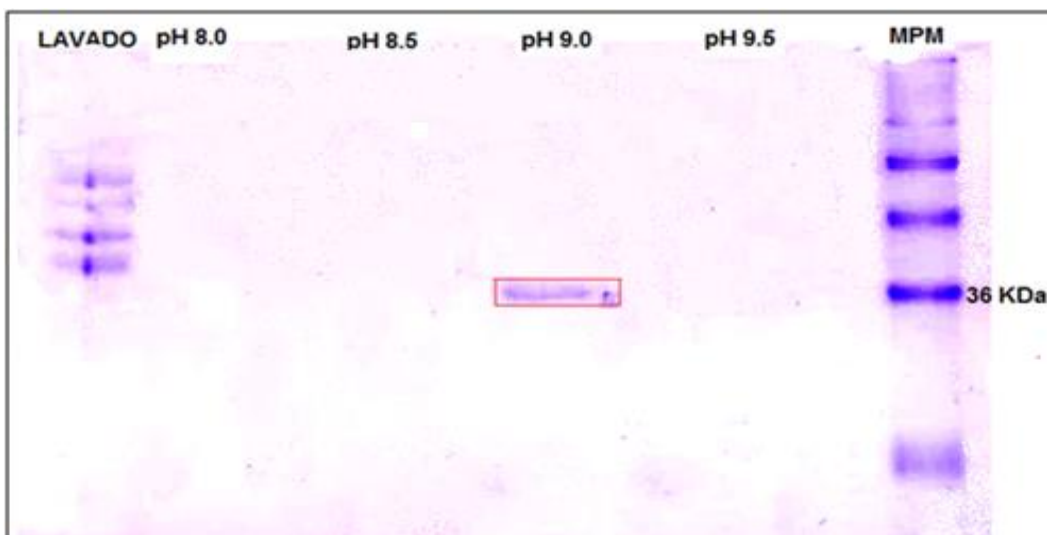


Figura 46. Patrones electroforéticos de las fracciones colectadas al aplicar las condiciones de elución del ensayo B de gradiente de pH (tabla 5 en la sección “Metodología”). Se muestran de izquierda a derecha: el lavado, una alícuota de las fracciones obtenidas al aplicar un pH de 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5. Enmarcada en rojo, la banda en la que se encuentra la LDH en la fracción de mayor actividad enzimática.

Los patrones electroforéticos mostrados en la figura 45 concuerdan con los obtenidos en experimentos anteriores (figura 35), mostrando la paulatina eliminación de proteínas contaminantes. En cuanto a la figura 46, se observa la eliminación de las proteínas contaminantes en el lavado de la columna, mientras que en la fracción de mayor actividad se obtuvo una única banda, muy bien definida, como se obtuvo anteriormente (figura 37).

Una vez realizado el cálculo (anexo 3), se concluye un peso molecular de aproximadamente 36.2 KDa. Ya que la electroforesis realizada fue desnaturalizante, lo que se esperaría observar es una proteína de alrededor de 35 KDa, según el peso molecular reportado para la subunidad M de la LDH de músculo esquelético de pollo (Fondy, T., Kaplan, N. 1965). Considerando el error generado por la regresión lineal realizada para determinar el peso molecular empleando los MPM, se concluye que la banda obtenida corresponde a las subunidades M de la LDH-5 del músculo esquelético de pollo (Heinova, D. *et al.* 1999; Holbrook, J. *et al.* 1982; Withycombe, W. 1967).

En las tablas 28 a 31 se muestran los parámetros de purificación para cada una de las repeticiones realizadas. En ellas se aprecia que la actividad específica de la LDH y el enriquecimiento incrementan con cada procedimiento realizado. En cuanto a significancia, se observa que el desalado es el primer paso que genera un incremento considerable, pues con este procedimiento la LDH se separa debido a su tamaño, en una pequeña fracción al pasar por la matriz porosa, lo que permite separarla de otras proteínas al coleccionar varias fracciones del volumen total de elución. Con la CIC con gradiente de pH, para la única banda generada en el gel de PAGE-SDS (figura 46), se obtiene una actividad específica de entre 500 y 900 U/mg, lo cual, con respecto al extracto inicial, obtenido mediante homogenización mecánica, indica que se logró una purificación de entre 35 a 42 veces, con rendimientos de entre 9.7% y 12.08%. En conjunto, los resultados muestran una satisfactoria purificación de la LDH.

Tabla 28. Tabla de purificación del primer aislamiento de LDH a partir de músculo esquelético de pollo.

Procedimiento	Fracción	Volumen de fracción (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Enriquecimiento
Homogenización	F0	76	3456.99	48640	14.07	100.00	1.00
Centrifugación	F1	41	1100.82	17630	16.02	36.25	1.14
Precipitación con sulfato de amonio (saturación al 55%)	F2	45	892.05	15300	17.15	31.46	1.22
Precipitación con sulfato de amonio (saturación al 75%)	F3	6	858.9	19800	23.05	40.71	1.64
Desalado (Cromatografía De exclusión molecular)	D2	1	49.92	11856	237.50	24.38	16.88
Cromatografía de Intercambio Catiónico con gradiente de pH		1.5	9.6	4800	500.00	9.87	35.54

Tabla 29. Tabla de purificación del segundo aislamiento de LDH a partir de músculo esquelético de pollo.

Procedimiento	Fracción	Volumen de fracción (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Enriquecimiento
Homogenización	F0	78	3903.6	83460	21.38	100.00	1.00
Centrifugación	F1	43	1617.9	51600	31.89	61.83	1.49
Precipitación con sulfato de amonio (saturación al 55%)	F2	47	1017.3	34310	33.73	41.11	1.58
Precipitación con sulfato de amonio (saturación al 75%)	F3	6	800	30480	38.10	36.52	1.78
Desalado (Cromatografía de exclusión molecular)	D2	1.5	90.4	21096	233.36	25.28	10.91
Cromatografía de Intercambio Catiónico con gradiente de pH		1.5	11.2	10080	900.00	12.08	42.09

Tabla 30. Tabla de purificación del tercer aislamiento de LDH a partir de músculo esquelético de pollo.

Procedimiento	Fracción	Volumen de fracción (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Enriquecimiento
Homogenización	F0	83	3001.6	64740	21.57	100.00	1.00
Centrifugación	F1	44	1362.2	33000	24.23	50.97	1.12
Precipitación con sulfato de amonio (saturación al 55%)	F2	51	907.1	23970	26.42	37.03	1.23
Precipitación con sulfato de amonio (saturación al 75%)	F3	7.5	458.9	13875	30.24	21.43	1.40
Desalado (Cromatografía de exclusión molecular)	D2	1.4	44.15	9156	207.38	14.14	9.62
Cromatografía de Intercambio Catiónico con gradiente de pH		1.5	7.2	6300	875.00	9.73	40.57

9.4. Caracterización de la LDH purificada

Para realizar la caracterización parcial de la LDH se realizaron las siguientes determinaciones:

9.4.1. *Efecto del pH*

La figura 47 muestra una curva típica de velocidad enzimática en función del pH. Para la LDH purificada en esta investigación el pH óptimo obtenido es de 7.0, según los valores de pH empleados en los amortiguadores. Este resultado concuerda con los reportados en investigaciones anteriores, en las que los valores de pH óptimo se encuentran alrededor de 7, dependiendo la isoenzima y especie de la cual fue aislada (De Gäde, G. 1979; Al-Jassabi, S. 2002; Masood-Ul-Hassan, J. 1995).

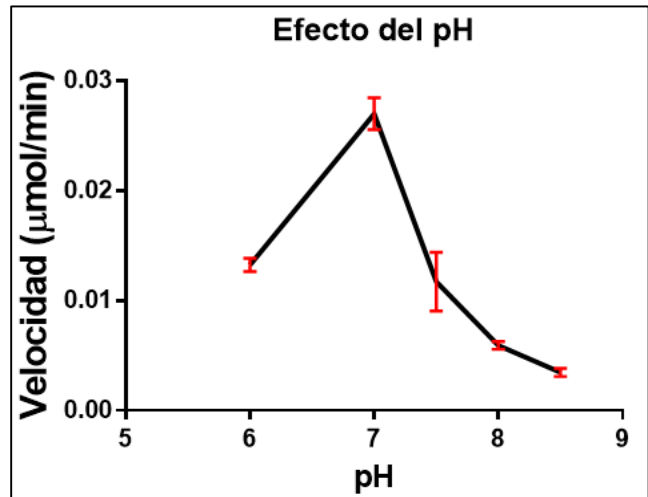


Figura 47. Variación de la velocidad enzimática de la LDH en función del pH del medio de reacción (Promedio \pm DE, n=3).

9.4.2. *Efecto de la temperatura*

En la figura 48 se observa una curva típica de actividad enzimática al incrementar gradualmente la temperatura a la cual se efectúa la reacción catalizada por la LDH. Se obtuvo una temperatura óptima de 45°C, en concordancia con los valores reportados en otras investigaciones (Coquelle, N. 2007; Kaletha, K. 1974). La energía de activación se calcula empleando la ecuación de Arrhenius, cuyo gráfico se muestra en la figura 49.

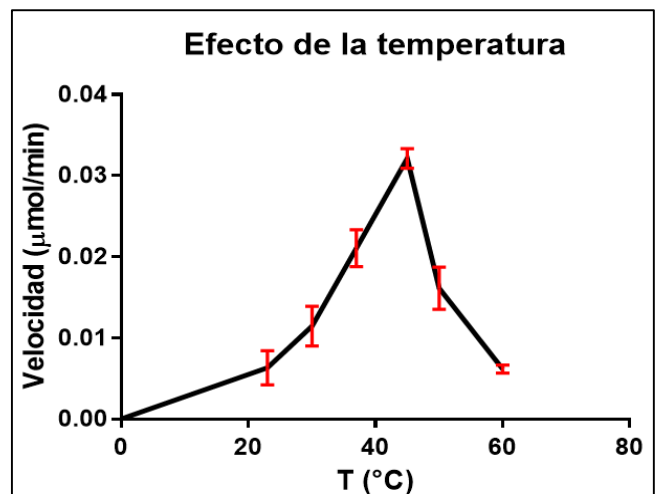


Figura 48. Variación de la velocidad enzimática de la LDH en función de la temperatura (Promedio \pm DE, n=3).

La teoría de colisión de partículas de Arrhenius indica que la constante de la velocidad de reacción (v) depende de la temperatura:

$$v = Ae^{-E_A/RT}$$

donde:

E_A es la energía de activación

R es la constante de los gases ($8.314 \frac{J}{mol \cdot K}$)

T es la temperatura absoluta

A es el número de colisiones entre las partículas reaccionantes

La forma lineal de la ecuación anterior es:

$$\ln(v) = -\frac{E_A}{R} \frac{1}{T} + \ln(A)$$

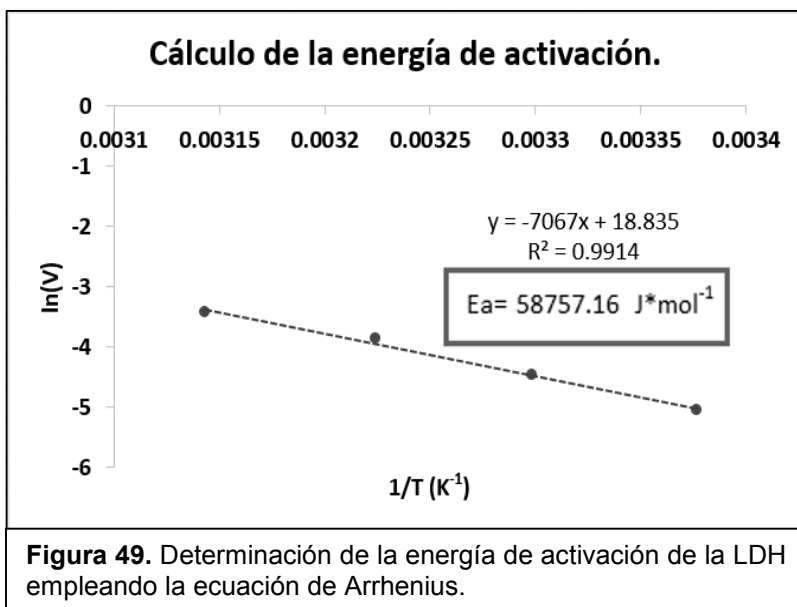
$$Y = m x + b$$

Por lo tanto, es posible despejar la E_A de la pendiente de la recta:

$$E_A = -m * R$$

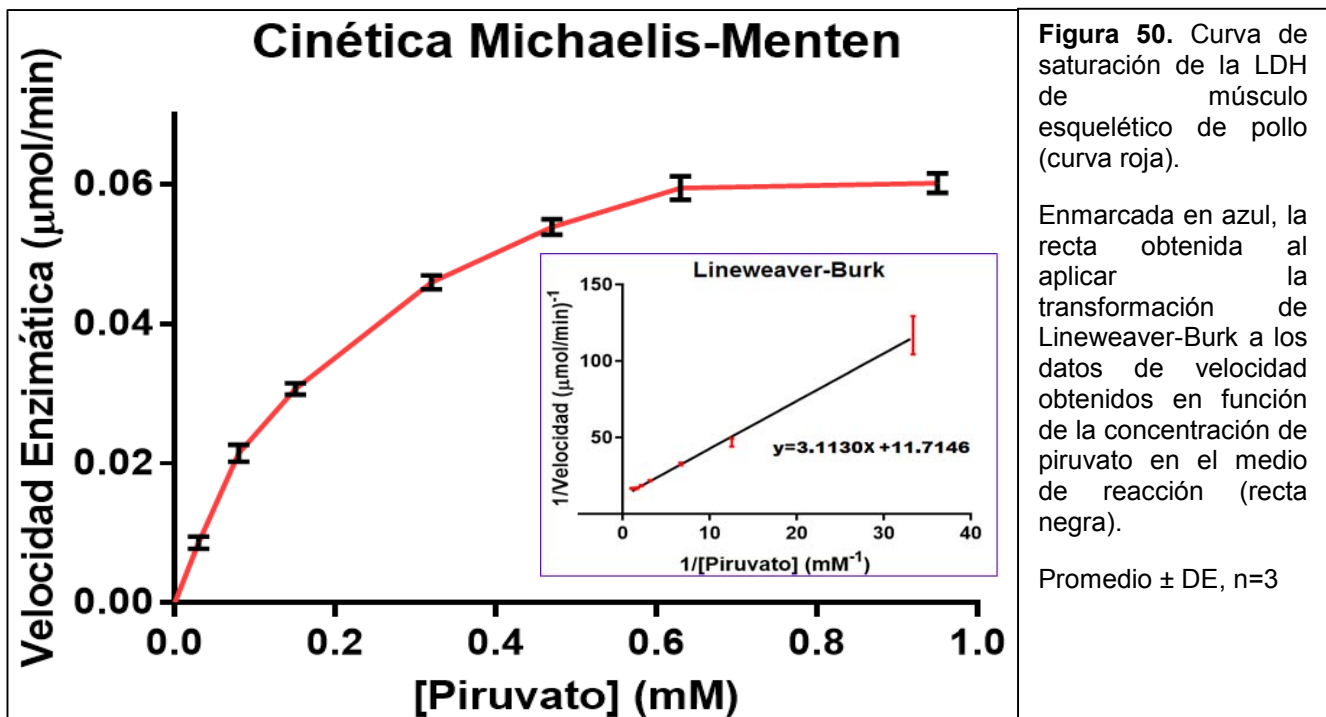
Así, de la recta de la figura 49:

$$E_A = 7067 K^{-1} * 8.314 \frac{J}{mol * K} = 58757.16 \frac{J}{mol}$$



Realizando el cálculo una vez obtenida la pendiente, se determinó la E_A , cuyo valor es de aproximadamente $58.76 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. La E_A calculada es la requerida para que la reacción de conversión de piruvato a lactato se efectúe en presencia de la LDH.

9.4.3. Efecto de la concentración de sustrato



La hipérbola resultante al determinar la velocidad enzimática de la LDH que se muestra en la figura 50 indica que la LDH sigue una cinética de tipo Michaeliano cuando se incrementa la concentración del sustrato (piruvato) en el medio de reacción. Es decir, al mantener la cantidad de enzima constante, la velocidad enzimática incrementa hasta alcanzar un valor máximo, debido a la saturación de los centros activos disponibles para catálisis por el piruvato.

Con la ecuación de la recta obtenida al realizar la transformación Lineweaver-Burk (figura 50, recuadro azul), se calculan los parámetros $V_{m\acute{a}x.}$ y K_M (tabla 31). Según se indicó en el apartado 5.5.5.2, la ecuación de la recta obtenida al aplicar la transformación de Lineweaver-Burk es:

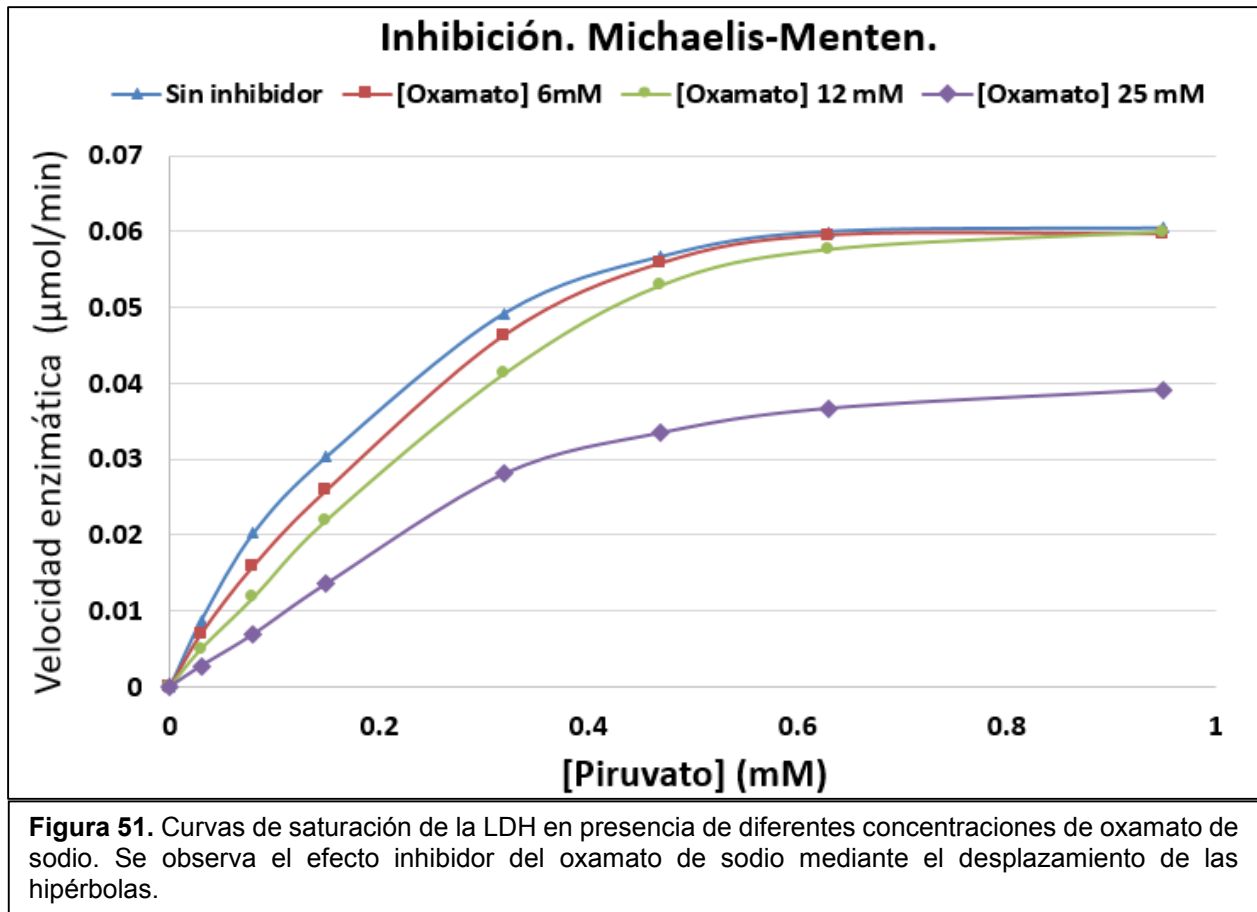
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x.}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x.}}$$

$$y = m \quad x + b$$

con la cual se pueden calcular $V_{m\acute{a}x.}$ y K_M cuando $x = \frac{1}{[S]} = 0$ y $y = \frac{1}{V_0} = 0$ respectivamente:

$$V_{m\acute{a}x.} = \frac{1}{b} \quad y \quad K_M = \frac{m}{b}$$

9.4.4. Efecto de un inhibidor



Es ampliamente conocido que el oxamato de sodio actúa como inhibidor competitivo de la Lactato Deshidrogenasa. Por similitud estructural y electrónica con el sustrato (piruvato) (Holbrook, J. *et al.* 1982), el oxamato logra ocupar el sitio activo de la LDH. Sin embargo, la reacción no puede llevarse a cabo, lo cual resulta en una disminución de la transformación efectiva de piruvato en lactato, fenómeno que se percibe como un decremento en la velocidad enzimática. No obstante, al ser una interacción de tipo reversible la que se da entre el oxamato y el sitio activo de la LDH, el oxamato es desplazado por el piruvato cuando la concentración de este último aumenta, logrando superar la inhibición, llegando así, a alcanzar la misma velocidad máxima que en un ensayo sin inhibidor presente en el medio de reacción ($V_{m\acute{a}x.}$). a pesar de ésto, la disminución inicial en la velocidad enzimática provoca un incremento en la concentración de piruvato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima, es decir, un aumento en la K_M , que gráficamente se observa como un desplazamiento de las curvas hiperbólicas hacia concentraciones mayores de piruvato. Se observa en la figura 51 que la

curva correspondiente a la concentración más alta de oxamato, no llega a la velocidad máxima que las otras tres curvas, aunque tampoco se ha llegado a un máximo, pues la tendencia de la curva sigue siendo el incremento de la velocidad. Se espera por tanto que al incrementar aún más la concentración de piruvato, se logre llegar a la velocidad máxima, y que el comportamiento de esta curva de inhibición siga siendo competitivo. Lo anterior se confirma al observar la figura 52, en la que se muestra la transformación de Lineweaver-Burk para las curvas de saturación, y se hace evidente que el comportamiento de las tres rectas correspondientes a ensayos de inhibición es el mismo, es decir, de tipo competitivo. Con las

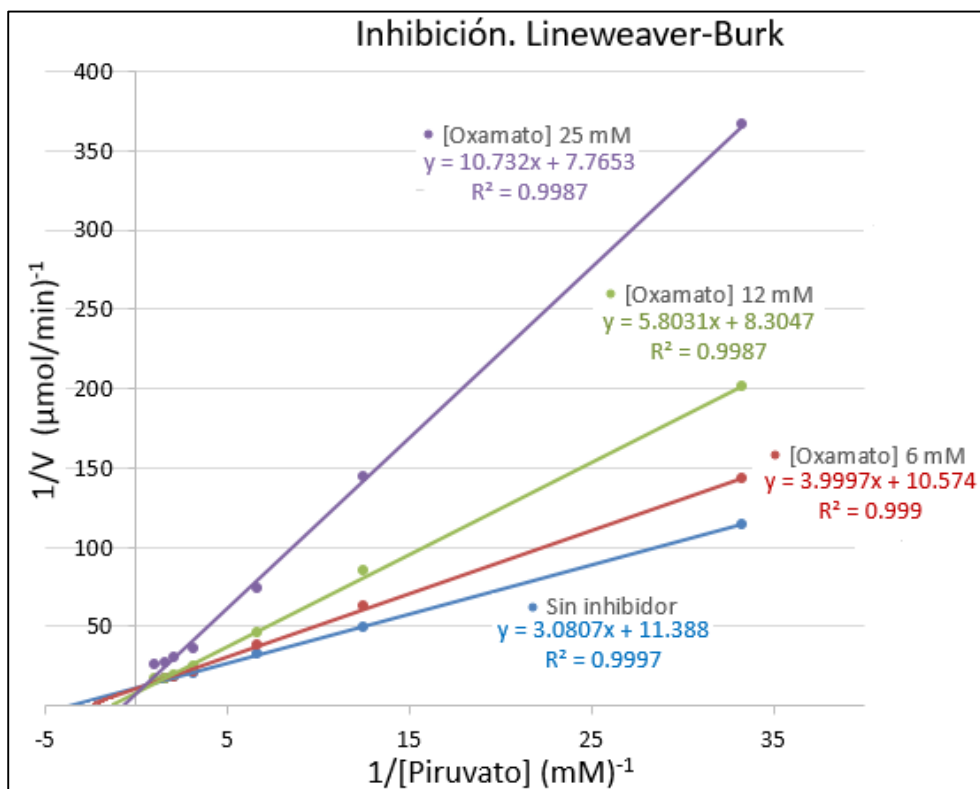


Figura 52. Transformaciones de Lineweaver-Burk de las curvas de saturación obtenidas al añadir diferentes concentraciones de oxamato de sodio al medio de reacción. Se observa que para la familia de rectas obtenidas la pendiente incrementa al incrementarse la concentración de oxamato de sodio, al mismo tiempo que la abscisa al origen disminuye.

ecuaciones de las rectas obtenidas, se pueden calcular los parámetros $V_{m\acute{a}x.ap.}$ y $K_{M.ap.}$. Al tratarse de una inhibición competitiva, los valores de $V_{m\acute{a}x.}$ y $V_{m\acute{a}x.ap.}$ deben ser, si no iguales, muy similares, mientras que los de K_M y $K_{M.ap.}$ deben ser diferentes, siendo $K_{M.ap.}$ cada vez mayor a la K_M .

Con las ecuaciones obtenidas para las rectas de las figuras

50 y 52, se calculan los parámetros $V_{m\acute{a}x.}$ y K_M para el ensayo de efecto de la concentración de sustrato, y los parámetros $V_{m\acute{a}x.ap.}$ y $K_{M.ap.}$ para los ensayos a diferentes concentraciones de oxamato de sodio. Tales cálculos se resumen en la tabla 31.

Tabla 31. Valores de $V_{m\acute{a}x.}$, K_M , $V_{m\acute{a}x.ap.}$ y $K_{M.ap.}$ de la LDH purificada.

Efecto de la concentración de sustrato (figura 50)		
Valor promedio	$V_{m\acute{a}x.} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}\right)$	$K_M \text{ (mM)}$
	0.085	0.266
Efecto de un inhibidor (figura 52)		
[Oxamato]	$V_{m\acute{a}x.ap.} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}\right)$	$K_{M.ap.} \text{ (mM)}$
Sin Inhibidor	0.088	0.271
6 mM	0.095	0.378
12 mM	0.120	0.699
25 mM	0.129	1.382

Con lo anterior se confirma la inhibición competitiva del oxamato de sodio en la actividad enzimática de la LDH, pues aunque los valores de $V_{m\acute{a}x.}$ y $V_{m\acute{a}x.ap.}$ no son exactamente iguales, sí son muy parecidos en cuanto a magnitud, a diferencia de los valores de K_M y $K_{M.ap.}$, cuya variación es mucho más significativa con cada incremento en la concentración de oxamato empleada.

El valor de K_M encontrado se asemeja al encontrado por algunos otros investigadores que se dieron a la tarea de encontrar este valor (Pesce, A. *et al.* 1964, Pesca, A. *et al.* 1967). Sin embargo, este parámetro es variable de organismo a organismo y también depende de las condiciones de experimentación. No obstante, tanto para los valores obtenidos de K_M como de $V_{m\acute{a}x.}$, se ha encontrado concordancia entre los valores obtenidos en ensayos independientes (Martínez, A. 2014).

Adicionalmente, con los valores de K_M y $V_{m\acute{a}x.}$, se determinó el valor de la constante catalítica (K_{cat}) y la eficiencia catalítica (ϵ) de la siguiente manera:

$$K_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x.}}{[E]_T}$$

en donde $[E]_T$ se refiere a la cantidad total de enzima presente en la alícuota empleada para en ensayo de efecto de la concentración de sustrato (Castillo, F. 2005).

Para determinar la $[E]_T$ se consideró el peso molecular determinado de 36.2 KDa. Considerando la equivalencia $1 \text{ Da} = 1 \text{ g/mol}$ (Castillo, F. 2005):

$$36,200 \text{ Da} \left(\frac{1 \text{ g} * \text{mol}^{-1}}{1 \text{ Da}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) = 36.2 * 10^6 \text{ mg/mol}$$

Se determinó mediante el método de Bradford una cantidad total de proteína de 0.35 mg en la fracción de 1500, y el ensayo se realizó empleando 1 μL de dicha fracción, por tanto:

$$1 \mu\text{L} \left(\frac{0.35 \text{ mg}}{1500 \mu\text{L}} \right) = 0.23 * 10^{-3} \text{ mg}$$

$$0.23 * 10^{-3} \text{ mg} \left(\frac{1 \text{ mol}}{36.2 * 10^6 \text{ mg}} \right) \left(\frac{1 * 10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \right) = 6.45 * 10^{-6} \mu\text{mol}$$

Por lo tanto:

$$K_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x.}}{[E]_T} = \frac{0.085 \mu\text{mol}/\text{min.}}{6.45 * 10^{-6} \mu\text{mol}} * \left(\frac{1 \text{ min.}}{60 \text{ s}} \right) = 219.64 \text{ s}^{-1}$$

Y dado que:

$$\epsilon = \frac{K_{cat.}}{K_M} = \frac{219.64 \text{ s}^{-1}}{0.266 \text{ mM}} = 825.71 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

10. PRUEBA PILOTO

El protocolo resultante, sólo en materia de purificación, ha sido implementado por los alumnos del grupo 2 del laboratorio de Bioquímica Experimental. Los resultados obtenidos por ellos concuerdan con los reportados en el presente trabajo de investigación, por lo que se contempla la posibilidad de implementarlo en un futuro próximo en la parte correspondiente a purificación de enzimas del temario de dicho laboratorio.

11. CONCLUSIONES

- ✓ Se encontraron las condiciones de elución que permiten optimizar los resultados obtenidos para la práctica de purificación enzimática mediante CIC en el laboratorio de Bioquímica Experimental.
- ✓ A pesar de las múltiples modificaciones realizadas al protocolo inicial, el gradiente de [NaCl] en la elución no permitió obtener resultados satisfactorios.
- ✓ La aplicación de un gradiente de pH en la elución permitió lograr una purificación satisfactoria de la LDH.
- ✓ Las condiciones específicas que arrojaron los mejores resultados fueron: equilibrar la resina de intercambio catiónico MacroPrep High S Support a un pH de 7.0, colocar una alícuota de 150 µL de la fracción colorida obtenida al desalar, realizar el lavado de la columna con el mismo amortiguador de equilibrio, y realizar la elución con 1.5 mL de amortiguadores TRIS 50 mM pH 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5 sucesivamente, colectando todo el volumen de cada amortiguador como una sola fracción.
- ✓ La CIC con gradiente de pH permitió obtener a la enzima Lactato Deshidrogenasa entre 35 y 42 veces enriquecida con respecto al extracto inicial. Estos valores son comparables a algunas purificaciones previas reportadas (Kaletha, K. 1974; Karamanos, Y. 2014; Al-Jassabi, S. 2002; Dawson, N. 2013).

- ✓ Las variaciones en el volumen empleado al resuspender para obtener la fracción F3 mostraron tener una ligera influencia en la actividad de la LDH obtenida en la misma fracción F3, pero sin afectar significativamente etapas posteriores del proceso al colectar una fracción D2 de aproximadamente 1000 μL .
- ✓ Se logró la caracterización parcial de la LDH, obteniéndose los valores mostrados en la tabla 32:

Tabla 32. Resumen de los parámetros de caracterización de la LDH.

CARACTERIZACIÓN FÍSICA	
Peso molecular de la subunidad	36.2 KDa
CARACTERIZACIÓN CINÉTICA	
pH óptimo	7.0
Temperatura óptima	45 °C
E_A	58.76 kJ* mol^{-1}
K_M	0.266 mM
V_{máx.}	0.085 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$
K_{cat.}	219.64 s ⁻¹
ε	825.71 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$
K_{M.ap.} (Oxamato 6 mM)	0.378 mM
V_{máx.ap.} (Oxamato 6 mM)	0.095 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$
K_{M.ap.} (Oxamato 12 mM)	0.699 mM
V_{máx.ap.} (Oxamato 12 mM)	0.120 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$
K_{M.ap.} (Oxamato 25 mM)	1.382 mM
V_{máx.ap.} (Oxamato 25 mM)	0.129 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$

- ✓ Los resultados obtenidos por alumnos de pregrado en el laboratorio de Bioquímica Experimental concordaron con los obtenidos en el presente trabajo de investigación.
- ✓ El protocolo obtenido es aplicable como parte del curso en laboratorios de pregrado, en sustitución al protocolo actualmente utilizado, pues con una metodología sencilla permite obtener los resultados que no se han alcanzado a la fecha.

12. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.

En vista de los resultados obtenidos hasta el momento, tanto de manera personal como al ser implementado en un grupo de la asignatura de Bioquímica Experimental, la purificación de LDH es posible, en un grado aceptable, al aplicar las condiciones determinadas mediante experimentación durante la realización del presente proyecto. No obstante, se observa que en algunos casos no se obtiene un cromatograma completo, es decir, un decaimiento en la curva de actividad en función del pH, por lo que se considera la opción de agregar un valor más, para asegurar la observación de dicho pico de actividad.

Al plantearse la posibilidad de implementar el protocolo generado, en sustitución a la técnica actualmente empleada para realizar la purificación por CII, se considera que será de gran utilidad, desde el punto de vista docente, realizar una exploración, mediante la aplicación de cuestionarios, sobre las posibles complicaciones que los alumnos pudieron encontrar durante la implementación del mencionado protocolo. De esta manera, se podrían efectuar adecuaciones que permitieran eliminar o por lo menos disminuir en el mayor grado posible dichas dificultades, sobre todo pensando en la cuestión del tiempo disponible para llevar a cabo la purificación y caracterización completas.

13. REFERENCIAS.

- Adeva, M., González-Lucán, M., Seco, M., Donapetry, C. (2013). **Enzymes involved in L-lactate metabolism in humans**. Mitochondrion. Vol. 13: 615-629.
- Al-Jassabi, S. (2002). **Purification and kinetic properties of skeletal muscle lactate dehydrogenase from the lizard *Agama stellio stellio***. Biochemistry (Moscow). Vol. 67(7): 786-789. Translated from Biokhimiya, Vol. 67 (7): 948-952.
- Areal, R. (2002). **Química de los polímeros. Una introducción**. 3ª edición. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 192-195.
- Armendariz, J. (2013). **Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud**. McGraw Hill. México, D.F. pp 101-103.
- Augoff, K., Hryniewicz-Jankowska, A., Tabol, R. (2015). **Lactate dehydrogenase 5: An old friend and a new hope in the war on cancer**. Cancer letters. Vol. 358 (1):1-7.
- Ayala, H. (2011). **Purificación e identificación de enzimas de *Bacillus pumilus* GMA1 con potencial en biocatálisis**. Tesis de licenciatura, Facultad de Química. U.N.A.M.
- Basaglia, F. (1989). **Some aspects of isozymes of Lactate Dehydrogenase, Malate Dehydrogenase and Glucosephosphate Isomerase in fish**. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 92B (2): 213-226.
- Berg, J. (2008). **Bioquímica**. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 35, 74, 75.
- Bishop, M., Everse, J., Kaplan, N. (1972). **Identification of Lactate Dehydrogenase isoenzymes by rapid kinetics**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 69 (7): 1761-1765.
- Campbell, N. (2007). **Biology**. 7ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pág. 152.
- Castillo, F. (2005). **Biología ambiental**. Editorial Tébar. Madrid, España. Pág. 301
- Clark, P., Kostuk, W., Henderson, A. (1976). **A simple and rapid procedure for the preparation of human LDH-1 and LDH-5 using an ion-exchange mini-column**. Clin. Chim. Acta. Vol. 69 (2):361-366.
- Coquelle, N., Fioravanti, E., Weik, M., Vellieux, F., Madern, D. (2007) **Activity, stability and structural studies of Lactate Dehydrogenases adapted to extreme thermal environments**. Journal of Molecular Biology. Vol. 374 (2): 547–562.
- Coordinación del laboratorio de Bioquímica (1997). Manual de prácticas de Bioquímica I. Facultad de Química, UNAM
- Dawson, N., Bell, R., Storey, K. (2013). **Purification and properties of white muscle Lactate Dehydrogenase from the anoxia-tolerant turtle, the red-eared slider, *Trachemys scripta elegans***. Enzyme Research. Vol. 2013: 1-8.

- De Gäde, G. (1979). ***L-Lactate specific, dimeric Lactate Dehydrogenase from the mantle muscle of the squid, Loligo vulgaris: purification and catalytic properties.*** Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 63B: 387-393.
- De Paula, A. (2006). ***Physical Chemistry.*** 8ª edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. pág. 840
- Devlyn, T. (2006). ***Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas.*** Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 415-426.
- Feduchi, E. (2010). ***Bioquímica: conceptos esenciales.*** Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. pág. 148.
- Ferrer, S. (2006). ***Estudio teórico de mecanismos de reacciones enzimáticas con transferencia de hidrógeno: Lactato Deshidrogenasa.*** Tesis de doctorado, Instituto de Ciencia Molecular. Universidad de Valencia.
- Fersht, A. (1980). ***Estructura y mecanismo de las enzimas.*** Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 85-99
- Fondy, T., Kaplan, N. (1965). ***Structural and functional properties of the H and M subunits of Lactic Dehydrogenases.*** Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 119 (3): 888-904.
- Fountain, J., Parks, M., Dickey, A., Mckee, R. (1970). ***Lactate Dehydrogenase isoenzymes in tissues of normal and tumor-bearing swiss mice.*** Cancer Research. Vol. 30: 998-1002.
- Freifelder, D. (2003). ***Técnicas de bioquímica y biología molecular.*** Editorial Reverté. España. pp 587-588.
- García, E. (2013). ***Expresión y caracterización por métodos espectroscópicos de un novedoso dominio bacterial de reconocimiento de peptidoglicano.*** Tesis de licenciatura, Facultad de Química. U.N.A.M.
- Heinova, D., Rosival, I., Avidar, Y., Bogin, E. (1999). ***Lactate dehydrogenase isoenzyme distribution and patterns in chicken organs.*** Research in Veterinary Science. Vol. 67: 309–312.
- Holbrook, J., Liljas, A., Steindel, S., Rossmann, M. (1982). ***Lactate Dehydrogenase,*** in Boyer, P. (Editor), ***The Enzymes.*** Vol. XI. Part A. Academic Press Inc., Londres. 3rd edition. pp. 191-292.
- Howell, B., McCune, S., Schaffer, R. (1979). ***Lactate to pyruvate or pyruvate assay for Lactate Dehydrogenase: a re-examination.*** Clin.Chem. Vol. 25 (2): 269-272.
- Javed, M., Yousuf, F., Hussain, N., Ishaq, M., Waqar, M. (1995). ***Purification and properties of lactate dehydrogenase from liver of Uromastix hardwickii.*** Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology. . Vol. 111B (1): 27-34.
- Kaletha, K., Zydowo, M. (1974). ***Differences in thermal susceptibility of the kinetics of Lactate Dehydrogenase from foetal and postnatal chick muscle .*** International Journal of Biochemistry. Vol. 5 (9-10): 741-746.

- Karamanos, Y. (2014). ***Purification and characterisation of Lactate Dehydrogenase: an undergraduate biochemistry laboratory experiment***. Advances in Biochemistry. Vol. 2(1): 14-23.
- Koolman, J., Röhm, K. (2004). ***Bioquímica: texto y atlas***. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. pp. 90, 96.
- Kopperschläger, G., Kirchberger, J. (1996). ***Methods for the separation of lactate dehydrogenase and clinical significance of the enzyme***. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications. Vol. 684 (1-2): 25-49.
- Koukourakis, M., Giatromanolaki, A., Simopoulos, C., Polychronidis, A., Sivridi, E. (2005). ***Lactate Dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer***. Clinical & Experimental Metastasis. Vol. 22: 25–30.
- Maestre, R. (2004). ***Expresión y determinación de la actividad enzimática de las isoenzimas de L-Lactato:NAD oxido-reductasa (LDH; EC. 1.1.1.27) en el desarrollo embrionario temprano de Betta splendens (Regan, 1909)***. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- Malamud, D., Drysdale, J. (1978). ***Isoelectric Points of Proteins: A Table***. Analytical Biochemistry. Vol. 86: 620-647.
- Martínez, A. (2014). ***Aislamiento y caracterización de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) de músculo esquelético de Gallus gallus domesticus***. Reporte de actividades de Servicio Social. Facultad de química. UNAM.
- Masood-UI-Hassan, J., Farzana, Y., Abida, H., Muhammad, I., Mohammad, W. (1995) ***Purification and properties of lactate dehydrogenase from liver of Uromastix hardwickii***. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 1B. (1): 27-34.
- McKee, J. (2009). ***Bioquímica: las bases moleculares de la vida***. 4ª ed. McGraw Hill. México, D.F. pp. 197-200.
- Müller-Esterl, W. (2008). ***Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida***. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp 105,106, 174-177.
- Nadeem, M., Nissar, A., Shahid, S., Imtiaz, A., Mahfooz, M., Asghar, M., Shakoori, A. (2011). ***Purification and characterization of Lactate Dehydrogenase from the heart ventricles of river buffalo (Bubalus bubalis)***. Pakistan J. Zool. Vol. 43 (2): 315-319.
- Olson, J., Marquardt, R. (1972). ***Purification and comparison of physical and immunological properties of the liver and breast muscle enzymes from chicken (Gallus domesticus)***. Biochim. Biophys. Acta. Vol. 268: 453-467.
- Pacheco, D. (2004). ***Bioquímica médica***. Editorial Limusa. México. D.F. pág. 97.
- Peretó, J. (2007). ***Fundamentos de Bioquímica***. PUV. Valencia, España. pp. 57- 73

- Pesce, A., McKay, R., Stolzenbach, F., Cahn, R., Kaplan, N. (1964). ***The comparative enzymology of Lactic Dehydrogenases. I. Properties of the crystalline beef and chicken enzymes.*** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 239 (6): 1753-1761.
- Pesce, A., McKay, R., Stolzenbach, F., Cahn, R., Kaplan, N. (1967). ***The comparative enzymology of Lactic Dehydrogenases. III. Properties of the H4 and M4 enzymes from a number of vertebrates.*** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 242 (9): 2151-2167.
- Porraz, R. (2012). ***Evolución dirigida de una Malato Deshidrogenasa con actividad de Lactato Deshidrogenasa en Escherichia coli.*** Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología. U.N.A.M.
- Sánchez, S. (2012). ***Material de apoyo para los estudiantes del curso Bioquímica experimental (0141).*** Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, U.N.A.M. pp 13, 14.
- Sasaki, T., Hyodo-Taguchi, Y., Iuchi, I., Yamagami, K. (1989). ***Purification and partial characterization of the muscle LDH-A4 and -B4 isozymes and the respective subunits of the fish, Oryzias latipes.*** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. Vol. 93B (1): 11-20.
- Segal, C., Ortega, G. (2005). ***Manual de prácticas de biología molecular de la célula I.*** Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. pp. 51, 52.
- Sheng, S., Liu, J., Dai, Y., Sun, X., Xiong, X., Huang, G. (2012). ***Knockdown of Lactate Dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma.*** The FEBS Journal. Vol. 279 (20): 3898-3910.
- Singh, R., Sastry, K., Agarwal, R., Pandey, N., Saxena, V., Mohan, J. (2012). ***Molecular and kinetic characterization of lactate dehydrogenase enzyme in the heart and breast muscle of japanese quail (Coturnix japonica).*** Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. Vol. 36(6): 628-634.
- Singh, R., Sastry, K., Pandey, N., Shit, N., Agarwal, R., Singh, R., Sharma, S., Saxena, V. (2011). ***Molecular characterization and expression of LDHA and LDHB mRNA in testes of japanese quail (Coturnix japonica).*** Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. Vol. 24 (8): 1060 -1068.
- Skoog, D. (2001). ***Fundamentos de química analítica. Vol. 2.*** 4ª edición. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 664-666.
- Smit, M., Duursma, M., Bouma, J. & Gruber, M. (1987). ***Receptor-mediated endocytosis of Lactate Dehydrogenase M4 by liver macrophages: a mechanism for elimination of enzymes from plasma. Evidence for competition by Creatine Kinase MM, Adenylate Kinase, Malate, and Alcohol Dehydrogenase.*** Journal of Biological Chemistry. Vol. 262 (27): 13020-13026.
- Spielmann, W., Erickson, R., Epstein, C. (1973). ***The separation of Lactate Dehydrogenase X from other Lactate Dehydrogenase isozymes of mouse testes by affinity chromatography.*** FEBS Letters. Vol. 35 (1):19-23.
- Teijón, J. (2006). ***Fundamentos de bioquímica estructural.*** 2ª edición. Editorial Tébar. Madrid, España. pp. 192-216.

- Vega, F. (2013). ***Purificación y caracterización de la cutinasa AN CUT1 de Aspergillus nidulans***. Tesis de licenciatura, Facultad de Química. U.N.A.M.
- Voet, D., Voet, J. (2004). ***Bioquímica***. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Uruguay. Pág. 146, 474.
- Voet, D., Voet, J. (2009). ***Fundamentos de Bioquímica***. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. pp 98-101.
- Withycombe, W. (1967). Lactate dehydrogenase isozyme in chicken tissues. *Nature*. Vol. 213: 513–514

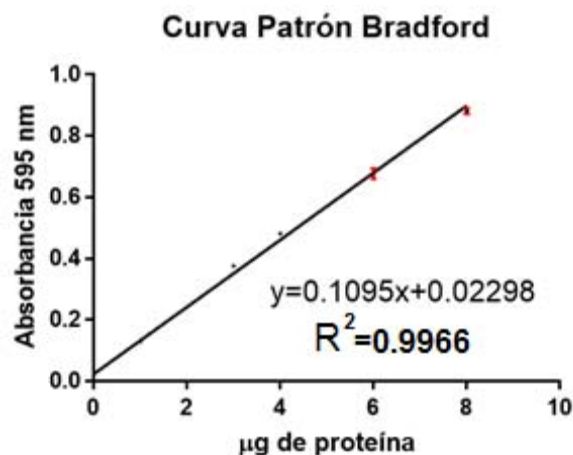
14. ANEXOS

Anexo 1. Determinación de proteínas por el método de Bradford: Curva de calibración con Albúmina Sérica Bovina.

La cuantificación de proteínas mediante el método Bradford (por Marion Bradford, 1976), es un método espectrofotométrico que se basa en la unión del colorante Comassie Blue G-250 a algunos residuos de las proteínas (principalmente aminoácidos básicos como la lisina, arginina e histidina). El colorante, en solución ácida, existe en tres formas cargadas diferentes, que se diferencian en su coloración: dos formas catiónicas de color rojo y verde, y una aniónica de color azul. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante, también de color azul. La intensidad de dicha coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra, y se determina mediante espectrofotometría, determinando la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm. La cuantificación se realiza mediante interpolación en una curva de calibración, realizada comúnmente con γ -globulina bovina o albúmina sérica bovina (BSA).

Este método ofrece las ventajas de ser sensible, simple, rápido, barato y de que pocas sustancias interfieren con la determinación, entre las cuales se encuentran los detergentes y las soluciones básicas.











$\mu\text{g/mL}$ de BSA	Agua (μL)	BSA $\frac{0.1 \text{ mg}}{\text{mL}}$ (μL)	Reactivo de Bradford* (μL)
0 (Blanco)	800	0	200
1	790	10	200
3	770	30	200
4	760	40	200
6	740	60	200
8	720	80	200
10	700	100	200



* Reactivo de Bradford: Bio-Rad Protein Assay (número de catálogo 500-0006).

Anexo 2. Marcadores de peso molecular empleados en la PAGE-SDS.

SeeBlue® Plus 2. Invitrogen. Estándar de proteínas pre-teñido. Novex®. Life technologies.

Protein	Approximate Molecular Weights (kDa)				
	Tris-Glycine	Tricine	NuPAGE® MES	NuPAGE® MOPS	NuPAGE® Tris-Acetate
 Myosin	250	210	188	191	210
 Phosphorylase	148	105	98	97	111
 BSA	98	78	62	64	71
 Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
 Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
 Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
 Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
 Lysozyme	16	16	14	14	n/a
 Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
 Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

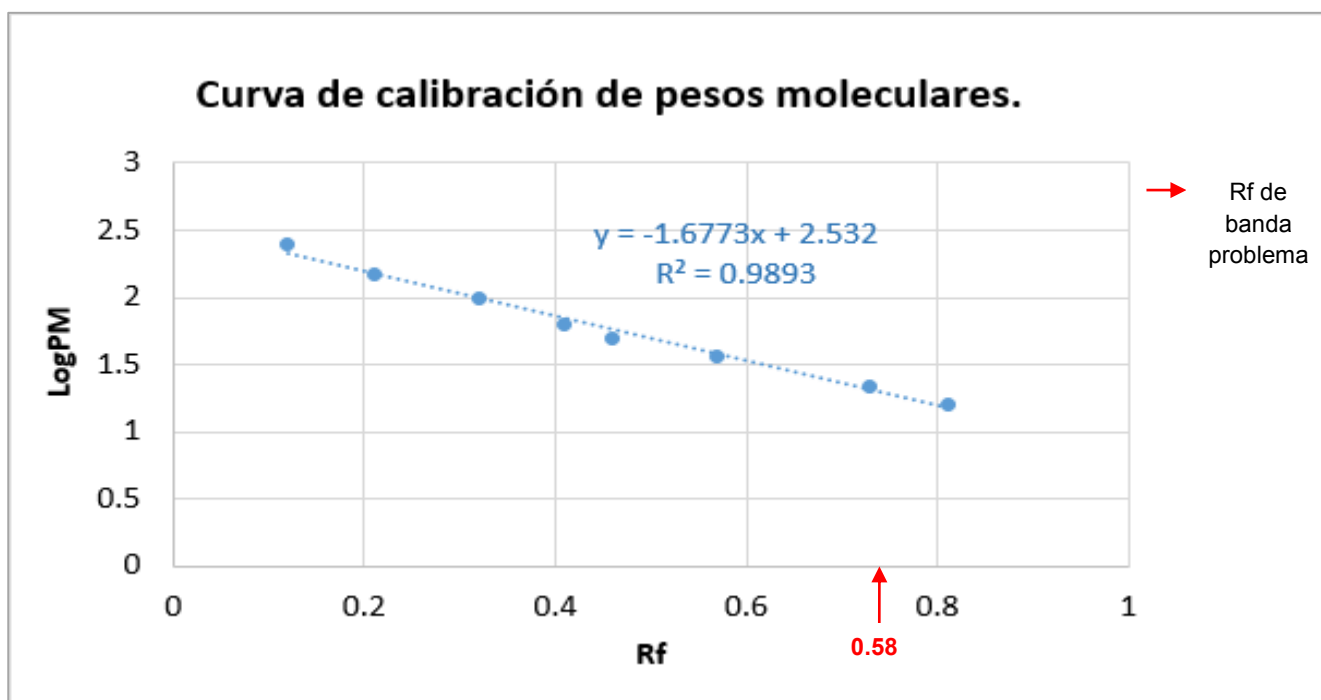
©1999-2002 Invitrogen Corporation. All rights reserved.

IM-1008F 072602

En cada gel se cargaron 4 µL de SeeBlue®Plus 2. Se consideran los pesos moleculares correspondientes al amortiguador Tris-Glicina (primera columna de la tabla).

Anexo 3. Curva LogPM Vs. Rf y determinación del peso molecular de la enzima purificada.

Proteína	PM (KDa)
Miosina	250
Fosforilasa	148
Albúmina Sérica Bovina	98
Glutamato Deshidrogenasa	64
Alcohol Deshidrogenasa	50
Anhidrasa carbónica	36
Mioglobina roja	22
Lisozima	16



$$\log_{10}PM = -1.6773 * R_f + 2.532$$

$$\log_{10}PM = -1.6773 * 0.58 + 2.532$$

$$\log_{10}PM = -0.9728 + 2.532$$

$$\log_{10}PM = 1.5192$$

$$PM = 10^{1.569} = 36.2 \text{ KDa}$$

Anexo 4. Información técnica de la resina de intercambio catiónico MacroPrep High S Support®.

Achieve High Productivity Using Macro-Prep High S Cation Exchange Support

Summary

Ion exchange chromatography is one of the most widely used techniques for protein purification. Macro-Prep High S support is a strong cation exchanger containing sulfonate functional groups and is ideal for purifying basic and neutral proteins and peptides. Macro-Prep High S support is an excellent choice for rapid purification. This methacrylate copolymer bead provides high-resolution separations at very high flow rates (Figure 1). Changes in pH or ionic strength of the buffer do not cause shrinking or swelling of the support. The superior mechanical and chemical stability of Macro-Prep High S support make it a preferred choice over other sulfonate cation exchangers on the market.

Chemical Stability

Macro-Prep High S ion exchange media is stable in most aqueous solutions commonly used in purification of biomolecules. Macro-Prep media will withstand treatment in solutions of acid, detergents, chaotropic agents, and pH <10 while retaining full functional performance. Routine cleaning or operation of Macro-Prep High S media above pH 10 is not recommended. Macro-Prep ion exchange media should not be sanitized or stored in NaOH.

Recommended Procedure

Macro-Prep High S support is easy to use. Rinse the support with 2–3 bed volumes of distilled water and equilibrate in running buffer. Samples are loaded in low-salt buffer, such as 20–50 mM acetate or phosphate, at a pH that is at least 1 pH unit below the isoelectric point of the protein of interest. Proteins can be eluted with an increasing salt (0–1 M NaCl or KCl) or pH gradient. Elution is followed by cleaning and regeneration steps of choice. For more detailed information, refer to the instruction manual.

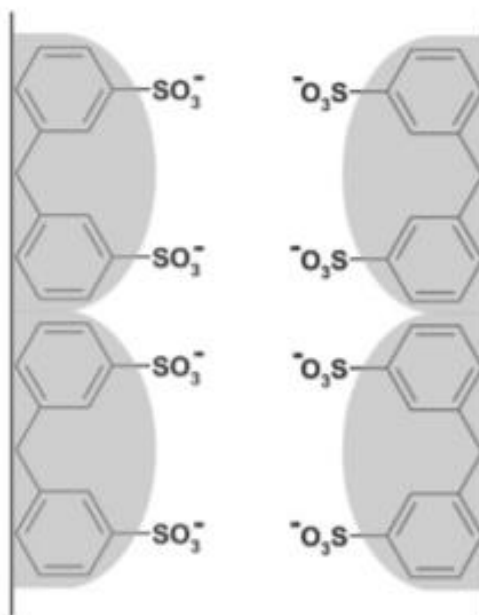
Properties of Macro-Prep High S Support

Type of support	Strong cation exchanger
Functional group	$-\text{SO}_3^-$
Typical dynamic binding capacity*	≥ 49 IgG/ml
Nominal particle size	50 μm
Nominal pore diameter	1,000 \AA
Recommended maximum linear flow rate	3,000 cm/hr
Autoclavability	30 min at 121°C
pH stability	1–10
Regeneration	in 1–2 M NaCl/KCl or 70% ethanol

* Determined with human IgG.

Chemical Compatibility of Macro-Prep High S Support

1% SDS	Yes
8 M guanidine-HCl	Yes
1 N HCl	Yes
100% ethanol	Yes



BIO-RAD

Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Web site www.bio-rad.com USA 800 4BIORAD Australia 61 02 9914 2800 Austria 01 877 89 01 Belgium 09 385 55 11 Brazil 55 21 3237 9400
Canada 905 712 2771 China 86 21 6426 0808 Czech Republic 420 241 430 532 Denmark 44 52 10 00 Finland 09 804 22 00 France 01 47 95 69 65
Germany 089 318 84 0 Greece 30 210 777 4396 Hong Kong 852 2789 3300 Hungary 36 1 455 8800 India 91 124 4029300 Israel 03 963 6050
Italy 39 02 216091 Japan 03 5811 6270 Korea 82 2 3473 4460 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 0318 540666 New Zealand 0508 805 500
Norway 23 38 41 30 Poland 48 22 331 99 99 Portugal 351 21 472 7700 Russia 7 495 721 14 04 Singapore 65 6415 3188 South Africa 27 861 246 723
Spain 34 91 590 5200 Sweden 08 555 12700 Switzerland 061 717 95 55 Taiwan 886 2 2578 7189 United Kingdom 020 8328 2000

Anexo 5. Información técnica del gel de exclusión molecular Sephadex® G-25.

Product Name:
Sephadex® G-25 - Coarse

Product Number: G25300
CAS Number: 9041-35-4
MDL: MFCD00132770

Product Description

Sephadex is a beaded gel filtration medium prepared by cross-linking dextran with epichlorohydrin under alkaline conditions.¹ General information and procedures for using gel filtration to separate proteins or to desalt protein solutions have been described.^{2,3}

This product can also be used for the separation of double-stranded DNA fragments. The exclusion limits for double-stranded DNA are as follows: G-25, 10 base pairs; G-50, 20 base pairs; and G-100, 25 base pairs. DNA grade Sephadex is available as part of our molecular biology product line. [Product numbers S 5772 (G-25 Superfine), S 5897 (G-50 Fine), S 6022 (G-50 Medium) and S 6147 (G-100)].

Precautions and Disclaimer

For Laboratory Use Only. Not for drug, household or other uses.

Preparation Instructions

This product should be placed in the usage buffer and allowed to swell for at least 3 hours at 20 °C or 1 hour at 90 °C. Once separation of the sample is complete, the gel should be washed with 2 column volumes of 0.2 M NaOH or a solution of non-ionic detergent, rinsed with water, and re-equilibrated with 2-3 column volumes of buffer. For storage, antimicrobial agents should be added to the suspension to prevent contamination (0.001% phenyl mercuric salts, 0.005% thimerosal, 0.05% chlorobutanol, 0.002% chlorhexine, 0.02% sodium azide, or 20% ethanol are acceptable). When necessary, the gel can be removed from the column and sterilized by autoclaving.

Storage/Stability

Sephadex does not melt and may be sterilized in the wet form at neutral pH by autoclaving for 30 minutes at 120 °C. This will not affect its chromatographic properties. If dry Sephadex is heated to more than 120 °C, it will start to caramelize.

Sephadex is stable in water, salt solutions, and organic and denaturing solvents. The pH stability is limited to low ionic strengths and short times when at the pH extremes of 2 and 13, particularly in the acid range. At low pH, partial hydrolysis of the matrix may occur. However, G-25 has been shown to withstand 0.1 M HCl for 1-2 hours and 0.02 M HCl for 6 months without any affect on its chromatographic properties.

The Sephadex resins are chemically resistant to 8 M urea. However, since the solutions would be very viscous, the flow rate would be much reduced in the presence of this urea concentration and would lead to high back pressure. The beads are not able to withstand increased pressure to get a reasonable flow rate. Sephacryl resins should be used in this case. Sephacryl is more rigid and can withstand higher pressures. The Sephacryl resin is also resistant to 8 M urea.

TEST

Loss on Drying
Particle Size Distribution
within 100 and 300 microns
Note

Sephadex is a registered trademark of GE Healthcare
Specification: PRD.0.ZQ5.10000038673

Specification

< 10 %
> 90 %



SIGMA-ALDRICH

Anexo 6. Protocolo de purificación:

Purificación de LDH de pechuga de pollo mediante Cromatografía de Intercambio Catiónico con gradiente de pH

M. en C. Luz del Carmen Castellanos Román

REACTIVOS

- Amortiguador "A": TRIS 20 mM, PMSF 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, pH 8.6.
- Amortiguador trizma 50 mM pH 7.0
- Amortiguador trizma 50 mM pH 8.0
- Amortiguador trizma 50 mM pH 8.5
- Amortiguador trizma 50 mM pH 9.0
- Amortiguador trizma 50 mM pH 9.5
- Sulfato de amonio pulverizado

MATERIAL Y EQUIPO

- Balanza granataria
- Tijeras de disección
- Licuadora
- Probetas graduadas de 50 y 100 mL
- Ultracentrífuga
- Tubos para centrifuga
- Balanza de platillos
- Espátula
- Agitadores magnéticos
- Parrilla con agitación
- Vasos de precipitado 100 y 50 mL
- Gasa
- Embudo de filtración

➤ Extracción de LDH

1. Cortar en cubos aproximadamente 20 gramos de pechuga de pollo, y licuar en dos y medio volúmenes de amortiguador "A" frío. Realizar la operación a 4°C **mediante pulsos**. Enjuagar el vaso de la licuadora con 10 mL del mismo amortiguador y agregar al licuado. Registrar el volumen del licuado (**F0**) y almacenar **tres alícuotas de 50 μ L** para posteriores análisis.
2. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos, a 4°C. Filtrar el sobrenadante con una gasa. Ésta es la fracción **F1**. Determinar su volumen y se almacenar **tres alícuotas de 50 μ L**.
3. Agregar **lentamente** la cantidad de sulfato de amonio pulverizado necesaria para alcanzar una concentración del 55 % de saturación (0.351 g/mL). Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos, a 4°C. Colectar el sobrenadante, correspondiente a la fracción **F2**, registrar el volumen final y se almacenar **tres alícuotas de 50 μ L**.
4. A la fracción F2 agregar **lentamente** sulfato de amonio pulverizado hasta alcanzar una concentración del 75 % de saturación (0.141 g/mL). Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos, a 4°C. Resuspender el precipitado en 1 mL (máximo 2 mL) de agua destilada, ésta es la fracción **F3**. Registrar el volumen final y se almacenar **tres alícuotas de 50 μ L**.

➤ **Desalado**

1. En una columna de 2.5 mL de Sephadex G-25[®], equilibrada con 3.0 mL de amortiguador "A", cargar 250 µL de F3, colectando el volumen vacío o muerto.
2. Eluir con 2.0 mL de amortiguador "A". Colectan por separado la primera fracción (incolora, ~500 µL), la segunda fracción (colorida, ~1000 µL) y la tercera fracción (incolora, ~500 µL).

➤ **Medir actividad de todas las fracciones.**

➤ **Determinar a cada fracción concentración de proteínas.**

➤ **Cromatografía de intercambio catiónico con gradiente de pH**

1. A una columna de MacroPrep High S Support[®] de 1.5 mL equilibrada con 3 mL de amortiguador Trizma 50 mM pH 7.0, se cargan **150** µL de la fracción de desalado con mayor actividad (porción colorida). Colectar volumen muerto. **Medir pH inicial con tira reactiva.**
2. Lavar la columna con 1.5 mL de amortiguador trizma 50 mM pH 7.0, colectando todo el volumen en una sola fracción.
3. Cuando el nivel del amortiguador alcance el borde de la resina, agregar 1.5 mL de amortiguador trizma 50 mM pH 8.0, colectando todo el volumen en una sola fracción.
4. Cuando el nivel del amortiguador alcance el borde de la resina, agregar 1.5 mL de amortiguador trizma 50 mM pH 8.5 y colectar todo el volumen en una sola fracción.
5. Cuando el nivel del amortiguador alcance el borde de la resina, agregar 1.5 mL de amortiguador trizma 50 mM pH 9.0 y colectar todo el volumen en una sola fracción.
6. Cuando el nivel del amortiguador alcance el borde de la resina, agregar 1.5 mL de amortiguador trizma 50 mM pH 9.5 y colectar todo el volumen en una sola fracción.

➤ **Determinar pH de cada fracción con el potenciómetro.**

➤ **Medir actividad de todas las fracciones.**

➤ **Determinar a cada fracción concentración de proteínas.**