

2415



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"ZARAGOZA"

**AISLAMIENTO DE LA ENZIMA PIRUVATO
CINASA A PARTIR DE LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES
(PMN) HUMANOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

MARIA DE LA LUZ IRMA BECERRA TREJO
JUANA VILLEGAS RODRIGUEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INDICE

	pag.
- Abreviaturas empleadas -----	1
 CAPITULO I GENERALIDADES	
- Antecedentes históricos -----	2
- Importancia biológica de las enzimas -----	3
- Mecanismo enzimático -----	4
- Aislamiento de enzimas -----	8
- Métodos de separación de proteínas -----	10
- Metabolismo anaerobio productor de energía -----	20
- Piruvato cinasa -----	21
 CAPITULO II	
- Planteamiento del problema -----	30
- Objetivo -----	32
- Hipótesis de trabajo -----	32
 CAPITULO III MATERIAL Y METODOS	
- Material -----	33
- Equipo -----	35
- Reactivos -----	36
- Obtención de leucocitos PMN -----	39
- Determinación de viabilidad y pureza -----	41
- Rompimiento celular -----	42
- Proteínas totales -----	43

- Actividad enzimática -----	45
- Precipitación con sulfato de amonio -----	47
- Métodos para desalar -----	48
- Cromatografía -----	50
- Electroforesis -----	53
- Métodos para concentrar -----	56

CAPITULO IV

- RESULTADOS: ANALISIS Y DISCUSION -----	58
--	----

CAPITULO V

- CONCLUSIONES -----	81
----------------------	----

CAPITULO VI

- COMENTARIOS -----	86
---------------------	----

CAPITULO VII APENDICE

- Recomendaciones especiales -----	88
- Preparación de algunas soluciones -----	89
- Tabla de precipitación con sulfato de amonio -----	95

CAPITULO VIII

- BIBLIOGRAFIA -----	96
----------------------	----

ABREVIATURAS

- PC = Piruvato cinasa
- PMN = Leucocitos Polimorfonucleares
- PBS = Solución "balanceada" de fosfatos
- SSB = Solución salina "balanceada"
- F-H = Ficoll Hypaque
- ASB = Albúmina de suero de bovino
- ADP = Difosfato de adenosin
- PEP = Fosfoenol piruvato
- LDH = Deshidrogenasa del ácido láctico
- NADH = Dinucleótido de niacina y adenina
- DEAE = Dietil aminoetil
- CM = Carboximetil
- PAA = Poliacrilamida
- Bis = N,N'-bis acrilamida
- TEMED = N,N,N',N'-tetrametil etiléndiamina
- pp. = precipitado
- sobr. = sobrenadante
- V = Volts
- mA = Miliamperes
- W = Watts
- F-1,6-P2 = Difosfato-1,6 de Fructosa
- P M = Peso molecular

CAPITULO I

GENERALIDADES

ANTECEDENTES HISTORICOS

El estudio de las enzimas es un tema de particular interés. De hecho, gran parte de la historia de la bioquímica es la historia de la enzimología.

A principios del siglo XIX los químicos y los biólogos se mostraban fascinados y al mismo tiempo desconcertados, ante la notable capacidad de las células para realizar numerosas reacciones orgánicas.

El primer reconocimiento de una enzima se atribuye a Payen y Persoz (1) en 1833, cuando encontraron que el alcohol precipitaba el extracto de malta que contenía una sustancia termolábil, la cual convertía el almidón en azúcar.

El estudio del fenómeno de la digestión enzimática en el estómago inició en el período de 1750 a 1825. Sin embargo, fue desde la década de 1850 a 1860 que comenzó a aclararse la presencia de las enzimas en la célula con los trabajos de Pasteur acerca de los procesos de fermentación de células de levadura para convertir el azúcar en alcohol y de los que concluyó que dicho fenómeno sólo se llevaba a cabo en las células vivas.

La polémica originada en torno a tal suceso vino a aclararse cuando Buchner en 1897 logró la preparación de un extracto de levadura, libre de células, que convertía el azúcar en alcohol y dióxido de carbono.

no. A diferencia del método de Pasteur, el de Buchner no causó daño a las enzimas responsables de tal proceso, treinta años más de investigación permitieron concluir que estas sustancias eran proteínas que causaban la aceleración de las reacciones químicas en las células y fueron llamadas enzimas, que significa "en la levadura" denominación introducida por W. Kühne (1) desde 1878.

Trabajando con moléculas orgánicas, se encontraron métodos para acelerar las velocidades de las reacciones químicas, agregando pequeñas cantidades de ciertas sustancias a las que se identificaron como catalizadores. Ahora se sabe que un catalizador no cambia químicamente cuando actúa en una reacción por lo que se le puede usar varias veces. Un catalizador sólo acelera una reacción termodinámicamente posible, es decir que puede ocurrir espontáneamente sólo que a una velocidad menor. El comportamiento de las enzimas se apoya a la descripción anterior por lo tanto una enzima se define como un catalizador de naturaleza protéica.

IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS ENZIMAS

Gran parte de la expresión hereditaria de un organismo es el conjunto de instrucciones para formar las enzimas, con lo cual queda determinada la naturaleza y la velocidad de las reacciones que constituyen su metabolismo.

El concepto metabolismo implica actividades integradas por sistemas multienzimáticos, cuya finalidad es intercambiar materia y energía entre la célula y su entorno. Las funciones fundamentales del metabolismo son las sigs. (2) :

1) Obtener energía química del medio que rodea a la célula, ya sea de compuestos orgánicos nutritivos o de la luz solar.

2) Convertir nutrimentos en componentes y precursores macromoleculares.

3) Reunir esas moléculas para formar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros componentes para la construcción celular y la manutención de la vida.

4) Degradar aquellas sustancias que no le son útiles, o que le son perjudiciales, para su consecuente eliminación.

Se requiere de un alto grado de organización y de una maquinaria compleja, para mantener la constancia y exactitud en los miles de procesos que deben llevarse a cabo en el cumplimiento de dichas funciones.

En el organismo, la mayoría de las reacciones bioquímicas carecen de la energía de activación requerida para que la reacción se desarrolle tan rápidamente como es necesario. Este problema lo resuelven los catalizadores biológicos, las enzimas.

Por todo lo anterior se puede concluir que, para que exista vida es necesario el trabajo característicamente rápido que realizan las enzimas.

MECANISMO ENZIMÁTICO

Para que se lleve a cabo un mecanismo de acción enzimática, es preciso que la enzima tenga contacto con la ó las sustancias que participan en la reacción a catalizar y a las que se les da el nombre de sus-

tratos.

Las enzimas son proteínas que como tales, tienen una estructura primaria que se pliega de manera característica de tal modo que sus grupos reactivos quedan dispuestos para dar como resultado una estructura tridimensional con actividad biológica, éstos grupos reactivos forman la región donde se unirá el sustrato, denominado centro activo.

Los centros activos confieren especificidad a las enzimas; las que son altamente específicas sólo actúan sobre un sustrato, otras sobre unos cuantos compuestos muy relacionados y las de poca especificidad, catalizan reacciones de una amplia variedad de sustancias.

La estructura de la molécula del sustrato debe acoplarse a la estructura del centro activo de la enzima, de manera que las dos interactúen. La interacción suele compararse con la de una cerradura y su llave, en donde la enzima debe acomodarse para hacer el papel de la cerradura, lo cual sucede cuando el sustrato (llave) se acerca a ella (Hipótesis de ajuste inducido) (3). Es así como se forma el complejo enzima-sustrato, del que se desprenderá el producto formado como resultado de la reacción enzimática, que puede ser de alguno de los sigs. tipos:

- Oxido-reducción (oxidoreductasas).
- Transferencia de grupos químicos específicos (transferasas).
- Hidrólisis de diversos enlaces (hidrolasas)
- Eliminación de grupos cerrando con dobles enlaces en los productos (liasas).
- Interconversión de esteroisómeros o isómeros de posición (isomerasas).
- Unión de dos compuestos (ligasas).

Lo anterior se desprende de la clasificación propuesta por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica.

Una vez formado el producto, que es el sustrato modificado, el complejo se disocia, libera el producto y regresa la enzima a su estado original lista para catalizar otra reacción.

Aunque las enzimas no se destruyen durante las reacciones que catalizan, su promedio de vida es limitado, puede ser semanas ó meses, tiempo después del cual se degradan y son reemplazadas por moléculas enzimáticas recientemente sintetizadas.

Las células tienen la capacidad de controlar la velocidad de síntesis y degradación enzimática de tal modo que controlan la cantidad de enzima y la tasa general de formación de productos. La inhibición de algunas enzimas por componentes celulares específicos constituye un mecanismo de control. Hay tres tipos de inhibición (4):

† Inhibición competitiva.

El inhibidor es parecido al sustrato y compite por el sitio catalítico. El efecto desaparece con el aumento de la concentración del sustrato.

† Inhibición no competitiva.

El inhibidor, aunque no se parece al sustrato, se une a la enzima en algún lugar que no es el sitio activo, pero que causa efectos sobre ella; se forma el complejo E-S, sin embargo, no se lleva a cabo la reacción catalítica. El efecto no desaparece con el aumento de la concentración del sustrato.

† Inhibición incompetitiva.

El inhibidor sólo reconoce al complejo E-S y se une a él, formando un nuevo complejo E-S-I, impidiendo la formación del producto.

Las enzimas poseen gran actividad por lo que actúan en concentraciones muy pequeñas, algunas para ser activas sólo dependen de su estructura como proteínas; pero otras requieren la presencia de sustancias adicionales, como iones metálicos (cofactores) ó bien moléculas orgánicas complejas (coenzimas). Existen también precursores enzimáticamente inactivos (proenzimas) que son llamados zimógenos y que deben ser activados de modo característico para funcionar como catalizadores.

Algunas enzimas son variedades diferentes de una misma, pero se encuentran en tejidos diferentes ó bien dentro de una misma célula y son las llamadas isoenzimas que catalizan la misma reacción, comparten algunas características pero también difieren en algunas propiedades fisicoquímicas.

Los factores que condicionan la actividad enzimática son: la concentración de la enzima, la concentración del sustrato, el pH, y la temperatura, principalmente.

Las moléculas del sustrato van ocupando los centros activos de cada molécula de enzima; al ir aumentando la concentración del sustrato, la velocidad de la reacción catalítica se va incrementando hasta que todos los sitios han sido ocupados (saturación de la enzima) y la velocidad alcanza su valor máximo, el cual se vuelve constante hasta que finaliza la reacción.

Las enzimas trabajan a un pH característico en el que su actividad es máxima, por arriba ó por abajo de ese valor la actividad disminuye. El pH óptimo depende sobre todo de las reacciones en las que participan y no siempre es el pH de su entorno intracelular normal.

El Dr. R.L. Biltoven (5) confirmó que la temperatura óptima es una condición necesaria para la función enzimática, y por arriba o por abajo de ese valor también disminuye la actividad. Si la temperatura es de tan sólo 10 a 15°C más alta, la energía es suficiente como para romper unos cuantos enlaces, los enlaces próximos se debilitan y la estructura entera se desorganiza; a la pérdida de la conformación se le conoce como desnaturalización de la proteína.

AI SLAM I EN TO DE EN Z I M AS

Queda claro que las enzimas son de interés como componentes metabólicos de las células vivas, lo cual las hace estar íntimamente relacionadas con los procesos fisiológicos vitales del organismo; las características y naturaleza del metabolismo, son expresiones fieles de la herencia.

Es probable que el estudio de las enzimas fuera en un principio por sí mismo, un juego fascinante y el descubrimiento de las primeras, un mero accidente; sin embargo, al paso del tiempo su investigación ha tenido como base dilucidar los mecanismos de las reacciones en que participan y las alteraciones relacionadas con ellas.

Sin duda, los avances en enzimología y biología molecular se han realizado gracias a la purificación de las enzimas, con lo que ha sido posible establecer su naturaleza como proteínas, estructura, composición, propiedades físicas y químicas, así como sus características catalíticas; pero también es seguro que muchos de éstos avances han tenido como antecedentes la intención de aclarar los errores metabólicos causados por deficiencias enzimáticas y que son el origen de muchas enfermedades.

La purificación seria de las enzimas empezó hasta después de 1920 (1,6). Las primeras fueron llevadas a cabo por Willstatter y cols. entre 1922 y 1928. Para 1937, Dixon y Kodama (1) ya habían aislado la xantín oxidasa con algunas impurezas.

El siguiente trabajo importante fué la preparación de la primera enzima cristalizada, la ureasa, por Sumner (1) en 1926 y aunque los cristales no estaban muy puros fué un gran avance. Poco después vino el aislamiento de enzimas proteolíticas en estado cristalino por Northrop y cols. (7).

Por mucho tiempo la investigación estuvo centrada en las enzimas de la fermentación y los procesos digestivos, hasta que la importancia de otras enzimas intracelulares relacionadas con otros procesos fué también reconocida y la purificación de ellas comenzó en 1937.

Aún con todos los adelantos, el aislamiento y purificación de enzimas representa un verdadero trabajo artesanal, en ocasiones de difícil ejecución por muchas razones; por mencionar un ejemplo, que las en-

zimas se encuentran en la célula, generalmente como mezclas complejas con otras enzimas y proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos ó lípidos y una determinada enzima representa probablemente tan sólo el 0.1% del total en cierto tejido (8). Por otra parte, muchas enzimas se encuentran adsorbidas sobre estructuras celulares como microsomas y mitocondrias, o aún más, unidas covalentemente a la membrana u otros componentes, lo que dificulta su obtención.

En términos generales, lo que se pretende con el aislamiento es mantener las condiciones intracelulares de la enzima en cuestión, con el fin de garantizar la integridad de su actividad específica hasta donde sea posible y utilizarla en estudios subsiguientes.

MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

Una buena purificación debe tomar en consideración muchos factores, pero quizá uno de los más importantes es la selección adecuada, si es que existen alternativas, del material biológico del cual se partirá para el aislamiento.

Como la purificación de enzimas humanas ha tenido siempre por razones obvias, muchas limitaciones, se ha recurrido mucho a la obtención a partir de microorganismos y animales de experimentación.

Una vez hecha la selección de la fuente, debe tomarse en cuenta -dada la naturaleza proteica de las enzimas- el control cuidadoso de diversos factores como pH, temperatura, fuerza iónica y concentración de la proteína, lo que permitirá recuperar a la enzima en las mejores condiciones, lo que a su vez se verá reflejado en la determinación de la actividad enzimática y la cuantificación de proteína principalmente.

En cuanto a la selección de los métodos, éstos son en realidad los que se usan para la purificación de proteínas en general y que toman en cuenta características como: diferencias de carga neta, diferencias de peso molecular, diferencias en solubilidad y diferencias en la afinidad biológica por otras moléculas. Para facilitar su uso se han clasificado en tres grupos:

- Métodos de precipitación.
- Métodos cromatográficos.
- Métodos electroforéticos.

Precipitación

La precipitación es uno de los métodos más antiguos utilizado en la purificación de proteínas y aunque han aparecido nuevos métodos, sigue en uso debido principalmente a que es muy útil cuando se trabaja con grandes volúmenes de proteínas en solución. Además, es fácil de realizar y de bajo costo comparado con otros métodos.

En la práctica, se ha encontrado que son necesarios varios métodos para obtener proteínas con grado de pureza aceptable, por lo que casi siempre se usa la precipitación como primer paso en una purificación, ya que con ello se logra eliminar masivamente proteínas contaminantes.

Este método toma en cuenta la solubilidad de la proteína en general; las características y propiedades de las proteínas están determinadas por la naturaleza de sus aminoácidos y la interacción con el medio acuoso y otras proteínas (9).

Se conocen dos grupos que son parte sustancial de las proteínas cuya denominación está relacionada con su afinidad por el agua:

- Grupos no polares (hidrófobos) = no solubles en el agua.
- Grupos polares (hidrofilicos) = compatibles con el agua.

Al primer grupo pertenecen aminoácidos cuyas características eléctricas son neutras, se encuentran distribuidos generalmente hacia el interior de la proteína y son los responsables de mantener a las proteínas unidas entre sí. Es conveniente mencionar que puede haber también sobre la superficie de la proteína un número importante de residuos hidrofóbicos.

El grupo hidrofílico está representado por los aminoácidos de naturaleza ácida (cargas +) con grupos amino terminales que tienen un par electrónico libre y aminoácidos básicos (cargas -) con grupos OH libres capaces de formar puentes de hidrógeno con el agua.

En conclusión, se puede decir que la solubilidad de una proteína depende del número y la localización de sus grupos polares y no polares.

Una proteína dada se mantiene unida con otras proteínas, principalmente por los grupos no polares de los aminoácidos neutros (enlaces hidrofobos) como ya se explicó antes, pero cuando se pone en contacto con el agua pueden suceder dos cosas:

† Que las interacciones entre los grupos hidrofobos de la proteína sean más fuertes que las interacciones con el agua y los grupos polares de dicha proteína de tal manera que se formen grandes agregados de moléculas de proteína (precipitado).

† Que las interacciones entre el agua y los grupos polares de la proteína sean tan fuertes que la proteína se mantiene disuelta entre las moléculas del agua (sobrenadante).

Sobre estas bases se fundamenta el método de precipitación en el cual, las proteínas que precipitan se separan de las que no lo hacen por centrifugación ó filtración.

No todas las proteínas precipitan en el agua, ni en las mismas condiciones, por lo que se requiere encontrar una forma de aumentar ó disminuir la solubilidad para una precipitación más selectiva y específica. El método más utilizado es en el que se agrega un agente que modifica las características dieléctricas del agua y de las proteínas; ésto agente puede ser una sal.

La sal más usada para la precipitación, es el sulfato de amonio a saturación, los productos de su disociación; iones amonio (carga 1+) y los iones sulfato (carga 2-) compiten con los demás iones presentes en el medio, para unirse a las moléculas de agua, de tal manera que las proteínas se vuelven a asociar entre sí, formando grandes agregados de moléculas de proteína (precipitado).

La aplicación de dicho método depende de la solubilidad de las proteínas en medio acuoso, de la concentración de la sal, las especies iónicas presentes, de la temperatura, del pH, así como de otras condiciones específicas de la proteína (9).

Cromatografía

Los métodos de separación agrupados bajo el nombre general de cromatografía, son diversos tanto por lo que se refiere a su fundamento, como a su realización. Son de importancia porque permiten separar, aislar e identificar componentes de mezclas complejas.

La primera descripción detallada de una cromatografía se atribuye generalmente a M.S.Tswett, botánico ruso quien aisló clorofila de una mezcla de pigmentos vegetales en 1906. Colocó una pequeña muestra del pigmento en la parte superior de un tubo de vidrio empacado con polvos de carbonato de calcio y en seguida la hizo pasar a través del tubo con éter de petróleo. A medida que la muestra descendía, se iba separando en distintas bandas que se desplazaban a velocidades diferentes. Las bandas tenían colores diversos debido a la naturaleza de los pigmentos; por ello, de las palabras en griego cromos (color) y grafos (escritura), se le dio el nombre al proceso.

De cualquier forma, es difícil definir con rigurosidad el término cromatografía, y más ahora, debido a la variedad de sistemas y técnicas a las cuales ha sido aplicable.

En su sentido más amplio, la cromatografía se refiere a procesos que permiten la separación de una mezcla aprovechando las diferentes características físicas y químicas de cada uno de los componentes individuales de dicha mezcla (muestra).

Cualquiera que sea el tipo de cromatografía, la característica común de todas ellas es que los componentes de la muestra se distribuyen entre dos fases: la primera es estacionaria y puede encontrarse en estado líquido ó sólido, se le conoce con el nombre de ADSORBENTE y es el soporte sobre el cual se lleva al cabo la separación; la otra fase es móvil y se filtra a través de los intersticios ó sobre la superficie de la fase fija. El desplazamiento de la fase móvil se manifiesta en una migración diferencial de los componentes de la mezcla. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa y se le conoce con el nombre de ELUYENTE.

En cada tipo de cromatografía, se manejan diferentes mecanismos de separación, de manipulación de la muestra a separar y diferentes maneras de detectar los componentes. Así se clasifican como sigue:

- a) Cromatografía de exclusión molecular.
- b) Cromatografía de intercambio iónico.
- c) Cromatografía de afinidad.

- a) Cromatografía de exclusión molecular.

También conocida como cromatografía por filtración en gel ó tamiz molecular; separa las moléculas basándose principalmente en su tamaño, por un efecto de tamiz ó filtración empleando columnas empacadas con geles.

Existen diversas variedades de geles cuyos nombres y características difieren dependiendo de su fabricación. Los geles tienen una estructura tridimensional muy abierta o muy cerrada, formada por el entrelazamiento de cadenas largas de polímeros. La mayoría de estos geles tienen grupos químicos capaces de absorber agua u otros disolventes. En ambos casos, la absorción provoca el hinchamiento de la estructura dejando huecos en el gel. El gel más empleado para proteínas y para la mayoría de las macromoléculas de interés bioquímico es el Sephadex (nombre comercial) (10).

Si se hace pasar por una columna de Sephadex una mezcla de proteínas de distintos tamaños, las moléculas más pequeñas entran a los huecos del gel y se "retrasan", mientras que las moléculas grandes que por su tamaño no entran al gel hidratado (se excluyen), recorren rápidamente la columna. Las moléculas de tamaño intermedio salen inmediatamente después que las más grandes y las moléculas más pequeñas permanecen

mas tiempo en el gel y por lo tanto salen al final.

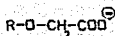
Como las moléculas se distribuyen de acuerdo a su tamaño (peso molecular) el método es muy socorrido precisamente para la determinación de pesos moleculares usando como referencia la velocidad de paso por la columna de proteínas de PM conocido. También encuentra aplicación para la eliminación de sales ó iones ya que son moléculas muy pequeñas.

b) Cromatografía de intercambio iónico.

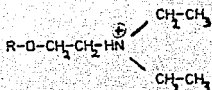
Este tipo de cromatografía ha tenido un gran desarrollo desde que su uso fue descrito por Peterson y Sorber en 1956. Se basa en interacciones de carga eléctrica.

El comportamiento iónico de las proteínas está determinado por el número y tipo de grupos ionizables en las cadenas polipeptídicas; tal comportamiento puede explicarse en función del pH. A un pH ácido, las proteínas tienen cargas positivas y a pH básico, tienen cargas negativas. Existe un valor de pH en el que el número de cargas positivas y negativas es el mismo (carga neta = 0) y se conoce como punto isoeléctrico de la proteína (11).

El fundamento de la cromatografía de intercambio iónico se basa en la interacción de las moléculas a separar con las cargas de las resinas utilizadas como fase estacionaria. Existe una variedad enorme de resinas que se aplican para este tipo de cromatografía; se trata de redes tridimensionales de polímeros entrelazados con cadenas cortas que tienen grupos funcionales ionizables. Los más conocidos son los polímeros de celulosa, dextranes y agarosa con grupos funcionales como carboximetil (CM) y dietilaminoetil (DEAE):



Carboximetil (CM)



Diethylaminoetil (DEAE)

Donde R representa a la resina que es el soporte de los iones; hay dos tipos de intercambio iónico:

1.- Intercambio aniónico.

Se lleva a cabo cuando la resina tiene cargas positivas en su superficie. Al hacer pasar sobre ella una mezcla de proteínas (disueltas en un amortiguador apropiado) aquellas que por las condiciones de pH adquieran carga negativa se pegarán a la resina por atracción electrostática; las proteínas que no se unan se difundirán a través de la columna saliendo. La recuperación de las proteínas que si fueron atraídas, puede hacerse cambiando el pH, lo que hace que cambie el comportamiento iónico de las proteínas y por lo tanto, su atracción por la resina.

2.- Intercambio catiónico.

Es el mismo mecanismo, solo que en este caso, la resina tiene grupos con cargas negativas y las proteínas con carga positiva son las que interactúan con ella, las que no, saldrán de la resina; el cambio de pH romperá las fuerzas electrostáticas para la recuperación de las moléculas que se pegaron a la resina (12).

c) Cromatografía de Afinidad.

Es un tipo de cromatografía de aparición relativamente reciente pero ha resultado de trascendente utilidad por la especificidad de

su aplicación. El primer trabajo, en 1910, fué una adsorción selectiva de amilasa sobre almidón; sin embargo el método tenía varios inconvenientes. En 1967 Axen, Porath y Ernback reportaron que moléculas con grupos amino primarios podían acoplarse a redes de polisacáridos activadas con bromuro de cianógeno; lo que marcó el inicio de la cromatografía de afinidad como una técnica de separación de uso común. A partir de 1974 han aparecido una infinidad de resinas acopladas con diferentes ligandos, que pueden ser: sustratos, anticuerpos, nucleótidos, etc.

Para hacer la separación se debe disponer de un ligando bioespecífico que pueda ser unido covalentemente a una matriz. Es importante que ese ligando inmovilizado sea capaz de retener por afinidad específica, la proteína de interés. Las sustancias que no se hayan unido, pasan de largo y después, por diversas formas, se libera la proteína aislada.

La cromatografía de afinidad es utilizada para el aislamiento de proteínas como: enzimas, anticuerpos, lectinas, glicoproteínas, proteínas plasmáticas, así como hormonas, ácidos nucleicos e interferón principalmente (13,14).

Electroforesis

La electroforesis se define como la migración de las partículas con carga hacia los polos positivo (ánodo) ó negativo (cátodo) de un campo eléctrico. Es uno de los métodos más utilizados en el estudio de la composición y en la separación de mezclas complejas de proteínas y sirve además como criterio de pureza.

La movilidad electroforética de las proteínas está dada en función de dos de sus características: la carga eléctrica y el peso molecular. Es así como se han ideado infinidad de técnicas electroforéticas diferentes que parten del mismo principio.

La electroforesis fué introducida por Tiselius en 1937 y desde entonces, con la aparición de técnicas más especializadas ha aumentado considerablemente su aplicación.

El proceso requiere de un soporte sobre el cual pueda llevarse al cabo la migración de las proteínas y un potencial eléctrico cuya magnitud provoque la movilización.

Los soportes más conocidos son el papel filtro, el acetato de celulosa, los geles de almidón, agarosa y poliacrilamida (PAA). Los soportes de PAA son los más utilizados, ya que permiten resoluciones de mayor calidad debido a que combinan las ventajas de la electroforesis con las de la filtración molecular y porque permiten un mayor número de separaciones en menor tiempo (15).

Los geles de PAA, son polímeros sintéticos de cadenas de tamaño variable de bajo peso molecular, de alta pureza, químicamente inertes; tienen pocos ó ningún grupo iónico y además gran resistencia mecánica. La preparación del gel es simple y rápida; por otra parte la dimensión promedio de los poros y por lo tanto la amplitud de fraccionamiento por tamaño y forma es controlable, lo que se consigue mezclando las concentraciones adecuadas de los dos compuestos monoméricos del gel (acrilamida y N,N bis-acrilamida).

Se preparan las placas y se coloca un número variable de muestras una junto a la otra; desde ese momento comienza la separación ya que el gel actúa como un tamiz para las mezclas de proteínas, que con-

tienen moléculas de muy diverso tamaño. Se aplica el potencial del campo eléctrico y las proteínas se moverán entonces dependiendo del número y la naturaleza de las cargas.

Una vez terminada la separación, la placa podrá tefirse (con negro amido ó azul brillante de Coomassie principalmente), lavarse, fijarse y conservarse, para poder comparar con mayor facilidad y precisión los patrones electroforéticos obtenidos (15).

METABOLISMO ANAEROSIO PRODUCTOR DE ENERGIA

El concepto metabolismo describe el conjunto de mecanismos responsables de mantener los procesos vitales de un organismo, sin embargo, el término en su expresión más sencilla quiere decir literalmente "cambio".

Todos los cambios, sean físicos ó químicos, necesitan energía para llevarse a cabo, (energía es la capacidad de producir ó desarrollar trabajo). De acuerdo con todo ello, la capacidad de producir cambios como en las reacciones degradativas (catabolismo), ó como en las reacciones de síntesis (anabolismo) del metabolismo en un organismo, ocurre gracias a la presencia de energía.

El almacenamiento y la obtención de energía se realiza a partir de hidratos de carbono, lípidos y proteínas; la energía encerrada en la estructura de estas moléculas orgánicas se transfiere en forma continua a moléculas de adenosín trifosfato (ATP), a su vez, la energía almacenada en la estructura de la molécula de ATP en forma de enlaces fosfato,

es transferida a otra; así la célula puede atender parcialmente las exigencias de energía para realizar sus funciones; en general, el proceso recibe el nombre de metabolismo anaerobio productor de energía.

Este tipo de metabolismo productor de energía está representado principalmente por la glucólisis. Otros mecanismos con el mismo objetivo, son variaciones complementarias de éste proceso básico.

En la glucólisis, la degradación de la glucosa, da como resultado moléculas de alta energía (ATP), y lactato como producto final; hay un producto intermedio importante, el piruvato, que por diversas reacciones puede dar origen a otras vías también fundamentales para mantener las funciones de un organismo.

La glucólisis se desarrolla por las acciones consecutivas de un grupo de 11 enzimas; establecer el papel de cada una de ellas en el proceso ha requerido muchos años de investigación.

Muchas de las enzimas han sido aisladas, lo que ha sido determinante para el esclarecimiento de cada una de las etapas de dicha vía metabólica, así como para estudiar los fenómenos en los cuales tales etapas se ven alteradas causando trastornos al funcionamiento normal del organismo (17).

PIRUVATO CINASA

E.C.2.7.1.40

La clasificación de la enzima está basada en el esquema establecido por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, que describe la naturaleza de la reacción, el tipo de reacción y

los sustratos sobre los cuales se lleva a cabo la reacción:

E.C. = Enzyme Commission Numbering.

2 = Transferasa.

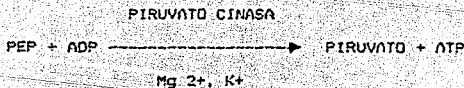
7 = Enzima que transfiere un grupo fosfato.

1 = Fosfotransferasa que actúa sobre un sustrato que tiene un grupo alcohol como aceptor.

40 = Sustrato de la enzima.

La piruvato cinasa cataliza la transferencia de fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) al adenosín difosfato (ADP) para formar adenosín trifosfato (ATP) y piruvato.

La enzima requiere para su actividad de cofactores como: iones Mg^{2+} ó Mn^{2+} y de un catión monovalente (19) que puede ser K^+ , Rb^+ ó Cs^+ (el K^+ es el activador fisiológico), con los cuales el ADP debe formar un complejo antes de unirse a la enzima.



La reacción es irreversible en las condiciones intracelulares, por lo cual el equilibrio está desplazado hacia la producción de piruvato (19).

El ion Ca^{2+} se considera como un inhibidor de la reacción ya que compete con los iones Mg^{2+} ó Mn^{2+} y si se une con la enzima, forma un complejo inactivo. También se ha demostrado inhibición por ATP y fenilalanina como lo indican Srivastava y Backer (20).

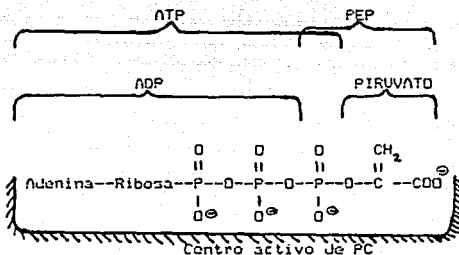
El aislamiento de la enzima ha permitido establecer su importancia en el control de la glucólisis y la gluconeogénesis por sus propiedades reguladoras y que su producto, el piruvato, sirve como sustrato de un gran número de vías metabólicas de tal manera que coloca a la enzima como intersección metabólica primaria.

El término alostérico significa "forma diferente" (del griego allos = otro y steric = forma). El mecanismo alostérico de la PC se cree, opera por la unión del K^+ y el complejo $NDP-Mg$ en un sitio específico de la enzima que no es el centro activo, lo cual produce un cambio en la estructura de la proteína que da como resultado una forma más activa, con lo que se facilita la entrada de la primera molécula de sustrato, esto a su vez facilita la entrada de otra molécula (cooperativismo), y así sucesivamente hasta que se satura la enzima, es entonces cuando la PC trabaja a su máxima capacidad (21).

En 1974, por un lado Flory y cols. (22) y por otro lado Hopkirk y Bloxham (23), determinaron que la fructosa 1,6-P₂ y la alanina son moduladores alostéricos de la enzima.

Las enzimas alostéricas constituyen un mecanismo regulador; lo que implica la unión de un modificador en la enzima (modulador alostérico) que altera la estructura de la proteína de acuerdo con las necesidades de la célula, es decir, favoreciendo la entrada del sustrato si es que se requiere elevar la concentración del producto ó bien, modificando la estructura de tal manera que se impide al sustrato embonar en el centro activo bloqueando la actividad enzimática en cuyo caso se llama inhibidor alostérico.

Reynard, Hass, Jacobsen y Boyer (24) proponen un esquema para describir de una manera sencilla el centro activo de la PC y la forma de acoplarse del PEP y ADP:



De lo anterior se derivaron varios conocimientos:

- Hay transferencia directa del grupo fosfato del donador al aceptor.
- Presencia de un centro activo al que pueden acoplarse el ADP ó el ATP y el PEP ó el Piruvato.
- Hay inhibición por ATP, ya que ATP y PEP se traslapan como lo muestra el esquema.
- La combinación ADP-PEP es la más adecuada para mantener el equilibrio cinético.

Los adelantos en el estudio de la piruvato cinasa han requerido en la mayoría de los casos el aislamiento y purificación de la enzima.

La PC ha sido principalmente preparada a partir del músculo de conejo. Büchner y Pfeleiderer (25) en 1955 la aislaron, mejorando ligo-

ramente los resultados (30% de rendimiento) de Kachmar y Boyer que ya la habían aislado (25-28%), aunque con evidencias de impurezas tales como la aldolasa (0.05%), la deshidrogenasa láctica (0.2%) y la glicerofosfato deshidrogenasa (0.09%).

Estos investigadores combinaron métodos de precipitación con sulfato de amonio y con solventes orgánicos, con calentamientos para inactivar proteínas y centrifugaciones sucesivas, lo cual hace el proceso muy largo y difícil de controlar.

Por otra parte, compararon sus respectivos métodos con el utilizado por Kubowitz y Ott (25) que en 1944 aislaron por casualidad la PC de músculo humano (ellos querían aislar en realidad la deshidrogenasa láctica) con un 10% de rendimiento y al aplicar el método, lograron aislar 1 g de la enzima con el 30% de su actividad.

Para 1959 Tietz y Ochoa (26, 27) habían mejorado mucho el proceso de purificación a partir de músculo de conejo, obteniendo un rendimiento del 40% en cristales bipiramidales hexagonales de aproximadamente 1 mm de largo con un aumento de actividad después de la cristalización del 30%. Además, pudieron concluir que la enzima constituye del 4 al 5% de las proteínas del extracto original.

La PC de músculo de conejo se aísla ahora con base en el método usado por Tietz y Ochoa. Por numerosos estudios se sabe que la enzima es un tetrámero de P.M. aprox. de 237 000 con subunidades de 57 000. Se ha obtenido PC hasta con 5 000 U/mg de proteína estable por 6-12 meses a temperatura de 4-5°C.

Bezares y cols. (28) en 1987 reportaron la secuencia de un péptido del sitio activo de la enzima de músculo de conejo, comparándola con la de otros tejidos animales.

El aislamiento fué mejorando con el desarrollo de la cromatografía; Tanaka y cols.(29) obtienen PC de hígado de rata con actividad específica de 650 U/mg de proteína con el sig. esquema de trabajo: extracto, precipitación con sulfato de amonio al 50 y 60%, diálisis, cromatografía en DEAE-celulosa, la determinación de actividad enzimática midiendo el piruvato formado a partir de PEP+NDP, y la de las proteínas por el método de Biuret. A partir de éste trabajo, se sugiere que hay isoenzimas de PC: PC-M la que está en músculo y PC-L la que se localiza en hígado (en hígado también hay PC-M y sin embargo, PC-L está en mayor proporción). Este conocimiento quedó apoyado por Flory y cols.(30, 31) que aislaron las dos PC de hígado con 65-70% de pureza, con una concentración de proteína (Lowry) de 0.1 mg/ml empleando DEAE-saphadox y saphadox G-25, encontrando que la enzima es mucho más estable en amortiguadores de fosfatos.

Hopkirk y Bloxham establecieron la importancia de la PC en el control del metabolismo hepático, puesto que la regulación de su actividad puede influir sobre la velocidad de la gluconeogénesis, la glucólisis y la síntesis de ácidos grasos. Para 1982 Blair, Cimbala y James (32) ya tenían un esquema de purificación que incluye cromatografía con gradiente de pH y cromatografía de afinidad, obteniendo 18% de pureza con actividad específica de 216 U/mg de proteína.

Después del trabajo de Kubowitz y Ott en 1944, pasó mucho tiempo antes de que se aislara la PC humana y fué hasta 1971 con los trabajos encabezados por Jacobson y cols. (33) que purificaron PC de eritrocitos humanos y pudieron concluir que hay 3 isoenzimas en tejidos de mamíferos: PC I (tipo L) que está presente en el hígado y los eritrocitos, PC II (tipo LM) que sólo ha sido encontrada en el riñón y la PC III (ti-

po M) que está en el músculo, el cerebro, el corazón, el hígado, el riñón y los leucocitos. Todas las formas requieren de Mg^{2+} ó Mn^{2+} y K^+ además de PEP y ADP para su actividad.

En 1972 Chern y cols. (34) purificaron PC de eritrocitos humanos con el esquema de trabajo que aquí se expone:

	Activ. espec. U/mg prot.	Rendimiento(%)
- Lisado de eritrocitos.	0.0026	100
- Precipitación con sulfato de amonio.	1.94	60.2
- CM-celulosa(pH 5.2 a 7.6)	8.45	24.9
- CM-celulosa(elución con F 1,6-P2)	39.7	13.5
- DEAE-celulosa (gradiente iónico 0.01-0.1 M)	77.4	8.24

A raíz de éste trabajo se pudo determinar que el pH óptimo de la enzima es 7.4 a 37°C, que es un tetrámero de P.M. = 225.400 (por sedimentación), el punto isoeléctrico es de 7.1, la hemoglobina y la catalasa se identificaron como impurezas en la preparación.

El aislamiento de la PC ha conducido necesariamente a otros estudios importantes como actividad de la enzima en algunas enfermedades como anemia hemolítica, policitemia y desnutrición (35, 36, 37, 38).

Se ha logrado el aislamiento de PC a partir de levadura (1969), de E. coli (1974), de Trypanosoma brucei (1980), del músculo esquelético bovino (1981), de la ardilla ártica (1981), del cerebro fetal de becerro del músculo de gato (1983), de Susycotypus conaliculatum (1984), y de la sangre de Rana ridibunda (1984).

En el caso de levaduras y bacterias, la obtención es mucho más sencilla, ya que se hacen cultivos en masa, con lo cual se puede controlar más el aislamiento de PC; aún así los rendimientos no superan el 50% no obstante, se logra un buen grado de pureza.

Aunque se ha logrado bastante con respecto al aislamiento de PC, resulta obvia la dificultad para relacionar la función y propiedades de la PC proveniente de E. coli por ejemplo, con la PC de tejidos humanos y de animales superiores.

Como se menciona en un principio, al fundamentar el tema del presente trabajo, no es posible hacer uso de tejidos humanos (músculo, hígado, corazón, cerebro, etc.) para el aislamiento de cualquier enzima, por cuestiones éticas obvias.

Es evidente que el tejido humano más accesible es la sangre; de la cual se puede elegir básicamente entre dos tipos de células, para el aislamiento de la PC: los eritrocitos y los leucocitos. La población de leucocitos PMN proporciona algunas ventajas sobre las células rojas y con base en ello, se utilizaron las primeras para los fines de este trabajo.

Recambio y promedio de vida.- Los eritrocitos normales pasan un promedio de 120 días en el torrente circulatorio. Después de dicho tiempo, dejan de funcionar al morir por vejez, de tal manera que el eritrocito es reemplazado en promedio cada cuatro meses.

Los PMN permanecen un promedio de 10 horas en la circulación, salen de ella debido principalmente a que se les necesita en los tejidos, cavidades corporales ó áreas inflamadas sin importar la edad del PMN, lo cual significa que la célula es reemplazada en promedio dos y

media veces al día, constituyendo la primera ventaja de los leucocitos PMN frente a los eritrocitos.

Metabolismo.— Como el eritrocito maduro es anucleado, tiene un metabolismo único representado casi exclusivamente por la glucólisis y tres vías que le ayudan a mantener sus funciones: vía de la metahemoglobina reductasa, hexosa monofosfato y la de Luebering Rapaport (39).

Las principales vías metabólicas asociadas con las células PMN, son la glucólisis, la de hexosa monofosfato y todo un mecanismo enzimático especializado para cumplir sus funciones fagocíticas. Esto último representa la segunda ventaja del PMN sobre el eritrocito: un metabolismo más complejo (40), por su tamaño, sus funciones y por lo tanto, la presencia de una mayor cantidad de enzimas.

La tercera ventaja, considerada más bien con base en las experiencias de los trabajos de investigación previos al presente, es que en el caso de los eritrocitos, la hemoglobina es la proteína que representa más problemas en el proceso de aislamiento, aunque también se menciona a la catalasa, y trabajando con la nata leucocitaria éste inconveniente se elimina considerablemente (34).

CAPITULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La desnutrición en México, es uno de los problemas más importantes de salud pública que se manifiesta en algunos sectores populares de la población, sin descartar que aún en los sectores sin aparentes problemas económicos hay individuos desnutridos.

La desnutrición se acompaña inicialmente de una serie de alteraciones metabólicas que, en algunas ocasiones, pueden detectarse antes de que se manifiesten cambios antropométricos y signos clínicos (por ej. en las vitaminas B1, B2 y B6). No es así en el caso de la desnutrición proteínico-energética, ya que las pruebas de laboratorio de uso común, no proporcionan información confiable en los inicios de dicho trastorno, por lo que se ve la necesidad de encontrar indicadores bioquímicos específicos y sensibles que permitan el diagnóstico oportuno.

Para ésto se ha recurrido al estudio de las reacciones enzimáticas con la intención de relacionar la actividad de ciertas enzimas con el estado nutricional. Dentro de estas investigaciones se incluye el estudio de las enzimas alostéricas de la ruta glucolítica, en donde la cinética enzimática muestra diferencias con respecto a la de individuos clínicamente sanos (41-43)

En un estudio realizado para determinar la actividad enzimática de hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa en "lisados" de

leucocitos PMN de un grupo de individuos con desnutrición proteínica energética, se encontraron alteraciones significativas en las dos primeras, no así en la piruvato cinasa. Con base en lo anterior, se ha pensado determinar la concentración de dicha enzima para ver si muestra relación con su actividad y otros parámetros (44).

La medición de la concentración de la enzima sugiere el montaje y estandarización de un sistema ELISA, el método requerirá de anticuerpos específicos y esto último necesita a su vez de la enzima a cierto grado de pureza, por lo que la finalidad del presente trabajo fue desarrollar una metodología para el aislamiento de la piruvato cinasa a partir de leucocitos polimorfonucleares.

La purificación de piruvato cinasa (PC), se ha hecho a partir de diversos tejidos animales, como la sangre humana -de eritrocitos específicamente- (34), el músculo del conejo, el hígado de la rata, etc. (45-53). Por consideraciones éticas y prácticas las biopsias en el hombre (para esta finalidad) han estado limitadas.

Es claro que el tejido más accesible en los seres humanos es la sangre, de la cual los leucocitos polimorfonucleares (PMN), por tener un recambio más rápido y un metabolismo intermediario más completo, en comparación con los eritrocitos, se han considerado como una alternativa más ventajosa para el aislamiento de la enzima PC.

OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar los métodos para aislar la enzima piruvato cinasa (PC) de leucocitos polimorfonucleares (PMN) humanos.

HIPOTESIS DE TRABAJO.

Si la enzima de leucocitos PMN humanos es una proteína, entonces es posible aislarla utilizando métodos cromatográficos y electroforéticos.

CAPITULO III

1 MATERIAL

- Matraces erlenmeyer de 250 ml, 500 ml y 4000 ml
- Frascos de policarbonato de 250 ml
- Pipetas graduadas de 1,5 y 10 ml
- Matríz kitsato de 250 ml y 4000 ml
- Frascos viales de 125 ml y 500 ml
- Tubos de ensayo de 13 x 100 y 10 x 75
- Vasos de precipitado de 10, 250 y 1000 ml
- Matraces aforados de 10, 100, 500 y 2000 ml
- Propipeta
- Pipeta de thoma para glóbulos blancos
- Pipetas Pasteur
- Espátula
- Barra magnética
- Gradillas
- Mangueras para vacío
- Tubo de vidrio de 1.0 y 2.5 cm de diámetro
- Varilla de vidrio de 1.50 m
- Pelo de angel
- Jeringas de 5 y 20 ml
- Mangueras para columna (de cromatografía)
- Frascos para liofilizadora
- Papel parafilm
- Gasas

- Termómetro
- Tijeras e hilo grueso
- Pinzas para disección
- Papel aluminio y encorado
- Picetas para agua y alcohol
- Pinzas para bureta
- Pinzas de tres dedos con nuez
- Probetas de 100 y 500 ml
- Agitador con gendarme
- Guantes de hule
- Pinzas para cricol
- Cronómetro
- Celdillas de vidrio para espectrofotómetro
- Celdillas de cuarzo para espectrofotómetro
- Picnómetro
- Parrilla de calentamiento y agitación magnética
- Cámara de Neubauer
- Pipetas automáticas de 1, 5, 10, 20, 100, 200 y 1000 ul
marca Eppendorf
- Membranas para diálisis
- Mascarilla de seguridad
- Cubrebocas

2 EQUIPO

- Centrífuga refrigerada de 10 a 25⁰ y de 0 a 25000 rpm. marca Beckman, mod. J-21B
- Espectrofotómetro con baño de incubación y graficador integrados, marca Gilford, mod. 250 (200-800 nm)
- Espectrofotómetro con graficador integrado, marca Beckman, mod. DU-70 (200-800 nm)
- Microscopio marca Zeiss, mod. estándar K-7
- Bomba para vacío
- Formador de gradientes de 1000 ml
- Balanza analítica marca Clio mod JP-150
- Balanza granataria marca Ohaus
- Agitador de pipetas Clay Adams mod. 1171
- Formador de conos Randolph mod. 250
- Homogeneizador Lourdes mod. v.v.
- Baño de agua Lab-Line mod. Imperial III
- Potenciómetro, marca POPE mod. 1502
- Liofilizadora Labconco
- Equipo Amicón
- Equipo de cromatografía:
 - Colector de fracciones marca LKB Bromma, mod. 2111
 - Bomba peristáltica marca LKB Bromma, mod. microperpex 2132
 - Detector LKB Bromma 2138 Uvicord S
 - Graficador LKB Bromma mod. 2210

- Equipo para electroforesis:

Equipo Multiphor II de electroforesis con fuente de poder marca LKB Bromma, mod. 2117

Bomba de agua Multitemp II marca LKB Bromma, mod. 2219

Kit para preparar placas de electroforesis. Cubeta para fijación y tinción de placas de gel marca LKB Bromma, mod. 2117

3 REACTIVOS

- Heparina
- Cloruro de amonio 0.87%
- Ficoll-Hypaque
- Acetona
- Alcohol etílico
- Silicón (Sigma) (Cotc)
- ASB
- Albúmina humana
- ADP
- PEP
- NADH
- LDH
- Cloruro de magnesio
- Cloruro de potasio
- Agua desionizada
- Sulfato de amonio

- Acido clorhídrico
- Hidróxido de sodio
- Carbonato de sodio
- Sulfato de cobre pentahidratado
- Tartrato de sodio y potasio
- Reactivo de Folin
- Azul brillante de Coomassie
- Acido fosfórico
- Cloruro de bario
- Mezcla crómica
- Líquido diluyente de blancos
- Azul tripan
- Piruvato cinasa de músculo de conejo
- Aldolasa
- Hexocinasa
- Rojo de metilo
- Sephadex G-25
- Carboximetil-celulosa (CM-celulosa)
- Dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa)
- Dietilaminoetil-sephacel (DEAE-sephacel)
- Azul de cibacron
- Fosfato de potasio monobásico
- Fosfato de potasio dibásico
- Fosfato de sodio monobásico
- Mercaptoetanol 1 mM
- Etilendiaminotetracetato 1 mM (EDTA)
- Glicina

- Tris (Tetrametil etanolamina)
- Azida de sodio
- Azul de bromofenol
- Acrilamida
- N,N'Bis-acrilamida
- Persulfato de amonio
- Tritón X-100
- Acido acético
- Acido tricloroacético
- Acido sulfosalicílico
- Alcohól metílico
- N,N,N'N'-tetramotilendiamina (TEMED)
- Glicerol

METODOLOGIA

La metodología que a continuación se expone, está adaptada para trabajar con el paquete leucocitario proveniente de aproximadamente seis litros de sangre (12 unidades).

1.0 OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS PMN.

1.1 Lavado de los paquetes leucocitarios.

Los paquetes leucocitarios obtenidos del banco de sangre (proceso de desleucocitación) se reciben en matraces erlenmeyer de 1 litro previamente siliconizados (pag. 88) que contienen 250 ml de SSB y 60 μ l de heparina. Como el volumen de sangre desleucocitada, es muy grande, la cantidad de eritrocitos contaminantes representa aproximadamente el 50% del volumen total de células proporcionadas por el banco de sangre, por lo que es necesario lavar de la siguiente manera:

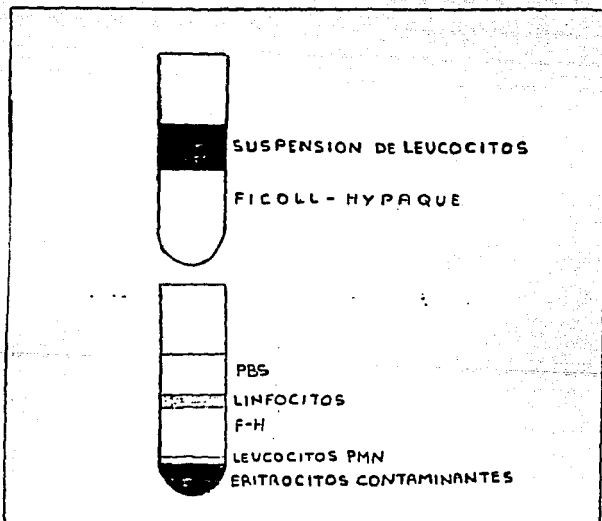
Agitar el matríz y llenar seis frascos de policarbonato de 250 ml hasta la mitad de su capacidad. Centrifugar a 6000 rpm a 4°C durante 15 min. (es necesario trabajar a 4°C para proteger a la enzima, sobre todo después del rompimiento celular). Eliminar los sobrenadantes con una pipeta pasteur conectada a un matríz-kitasato que a su vez estará conectado al sistema de vacío. Realizar esto tres veces ó más si es necesario hasta considerar que ha sido eliminada la mayor parte de los eritrocitos. Después del último lavado restituir los leucocitos en 300 ml de PBS (suspensión de leucocitos).

1.2 Separación por gradiente de densidad con ficoll-hypaque.

Colocar en cada frasco de policarbonato, 125 ml de F-H (pag. 90) con ayuda de una pipeta graduada de 10 ml y una propipeta. Agregar len-

tamente 65 ml de la suspensión de leucocitos de tal modo que queden dos capas sin permitir que ambas se mezclen. Centrifugar a 4000 rpm durante 30 min a 4°C.

Después de dicho tiempo se obtiene la separación de células como se muestra en el esquema 1. Extraer el PBS, los linfocitos y F-H con el sistema de vacío. Aparte, extraer los leucocitos PMN, en este paso con los PMN también se extrae algo de eritrocitos contaminantes.



Esquema 1: Separación de células PMN por gradiente de densidad con F-H (en el tubo de abajo se observa la separación después de la centrifugación).

1.3 Lavado de leucocitos PMN.

Repartir los leucocitos PMN en tres frascos de policarbonato y agregar hasta la mitad de su volumen una solución de cloruro de amonio 0.87%. Incubar en baño maria a 37°C durante 15 min moviendo constantemente, de ésta forma se consigue lisar los eritrocitos. Pasado éste tiempo centrifugar a 6000 rpm durante 15 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante y repetir el procedimiento hasta que se logre eliminar si es posible, toda la hemoglobina. Eliminar el cloruro de amonio y lavar las células con SSB, juntarlas y restituir en un volumen final de 150 ml de SSB. Guardar en un frasco vial a -75°C.

Los pasos 1.1, 1.2 y 1.3 se realizan con los paquetes leucocitarios obtenidos del banco de sangre, hasta obtener las células PMN provenientes de 100 litros de sangre.

2.0 DETERMINACION DE VIABILIDAD Y PUREZA.

2.1 Viabilidad.

Con la suspensión de PMN obtenidos, llenar hasta la marca de 0.5 una pipeta para cuenta de glóbulos blancos. Limpiar la suspensión adherida en el exterior de la pipeta con una gasa y completar hasta la marca de 1.1 con azul tripan al 0.4%. Homogenizar durante 1 min en el agitador de pipetas. Colocar una gota en el portaobjetos y observar al microscopio con el objetivo 40x. Contar las células vivas (amarillas) y las células muertas (azules) determinando su proporción.

2.2 Pureza.

Llenar con la suspensión de PMN la pipeta para glóbulos blancos hasta la marca de 0.5. Limpiar la suspensión adherida en el exterior de la pipeta con una gasa. Completar hasta la marca de 1.1 con líquido diluyente para blancos. Homogenizar durante 1 min en el agitador de pipetas.

Colocar el cubrehematímetro sobre la cámara de Neubauer. Descartar las primeras tres gotas de la pipeta y llenar la cámara por uno de los bordes. Permitir que el líquido penetre lentamente en la superficie de la cámara. Reposar por 2 min y observar al microscopio con el objetivo 10x. Contar los leucocitos PMN y linfocitos; contando en total 100 células para calcular el porcentaje de pureza.

3.0 ROMPIMIENTO CELULAR.

Descongelar las células PMN y centrifugar para eliminar los sobrenadantes (recordar que para éste proceso se deben haber reunido las células provenientes de 100 l de sangre). Juntar todas las células y restituir en un volumen final de 500 ml con SSB. Repartir la suspensión en dos matraces erlenmeyer de 500 ml. Sumergir los matraces en una mezcla de hielo seco y acetona (-60°C) hasta que se congelen perfectamente. Después, sumergir los matraces en baño maría a 65°C hasta que se descongelen también perfectamente. Este proceso de congelación-descongelación se repite seis veces (de ésta forma, se provoca por choque térmico el rompimiento de las células).

Completar el rompimiento sometiendo las células al homogenizador en porciones de 7 ml durante 3 min hasta terminar con los 500 ml, manteniendo el lisado en baño de hielo. La presencia de proteínas se manifiesta con la formación de espuma. Centrifugar el lisado a 6000 rpm durante 30 min a 4°C, de ésto se obtiene: 1) el lisado de proteínas citoplasmáticas (sobrenadante) y 2) los restos ó detritus celulares (sedimento).

A las dos partes determinarles proteínas totales y actividad enzimática.

4.0 PROTEINAS TOTALES Y ACTIVIDAD ENZIMATICA

4.1 Proteinas totales

4.1.1 Método de Lowry (pag.90)

Curva patrón: pesar 4 mg de NSB y disolver en 1 ml de NaOH

0.1 N (solución patrón).

Tubo	Agua (μ l)	React. C (ml)	Sol. Patrón (μ l)	Concentración (μ g)
1	195	1	5	20
2	190	1	10	40
3	180	1	20	80
Bco.	200	1	--	--

Preparar cada tubo por triplicado menos el blanco. Reposar los tubos por 10 minutos a temperatura ambiente. Agregar a todos los tubos 100 μ l de reactivo E.

Reposar la mezcla por una hora a temperatura ambiente, leer a 660 nm. Graficar los datos de absorbencia contra concentración.

Las muestras se preparan por cuadruplicado de la siguiente manera: a 20 μ l de muestra se le agregan 180 μ l de agua desionizada y 1 ml de reactivo C. Reposar 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación agregar 100 μ l del reactivo E. Reposar por una hora a temperatura ambiente. Leer a 660 nm y extrapolar en la curva patrón el valor de absorbencia para obtener la concentración.

4.1.2 Método de Bradford

Curva patrón: pesar 5 mg de ASB y disolver en 1 ml de NaOH 0.1 N, haciendo las siguientes diluciones:

Tubo	Sol. Patrón (ml)	Agua (ml)	React. Bradford (ml)	Concentración (mcg/ml)
1	1.0	- -	5	5.0
2	0.5 de 1	0.5	5	2.5
3	0.5 de 2	0.5	5	1.25
4	0.5 de 3	0.5	5	0.625
5	0.5 de 4	0.5	5	0.312
6	0.5 de 5	0.5	5	0.156
7	0.5 de 6	0.5	5	0.078
8	0.5 de 7	0.5	5	0.039

El blanco se prepara con 20 μ l de agua desionizada más 5 ml del reactivo de Bradford (pag.90).

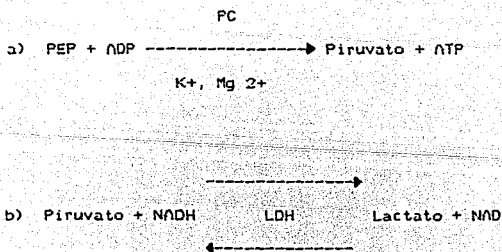
Agregar 5 ml del reactivo de Bradford a cada 20 μ l de muestra.

Leer a 595 nm después de 2 min y antes de una hora de haber añadido el reactivo de Bradford.

Graficar los datos de absorbencia contra concentración para la curva patrón. Extrapolar los datos de absorbencia de las muestras para obtener la concentración.

4.2 Ensayo enzimático.

La actividad específica para PC se detecta por medio de una reacción acoplada con LDH midiendo la oxidación de NADH:



La mezcla de reacción se prepara como sigue (pag.91):

	(ml)
Amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.4)	1.0
PEP 7.3 mM	0.1
ADP 6.1 mM	0.1
Cloruro de magnesio 100 mM	0.1
Cloruro de potasio 100 mM	0.1
LDH 100 U/ml	0.1
Muestra	0.2
Incubar a 37°C por 10 min	
NADH 2.65 mM	0.1

La disminución de absorbencia (oxidación de la coenzima NADH) se mide cada minuto durante 15 min a 340 nm.

4.3 Cálculo de la actividad específica.

Se realiza con la siguiente fórmula:

$$\text{ACTIVIDAD} = A \times 1.8 \times 1000$$

$$\text{ESPECIFICA} = \frac{\text{ACTIVIDAD}}{\text{prot. / ml} \times 0.2 \times 15} = \mu\text{moles NADH ox. / min / mg prot.}$$

Donde:

- A = (Absorbencia en min 1) - (Absorbencia en min 15)
- mg prot./ml = Concentración obtenida midiendo proteínas totales.
- 1.8 = Volumen total de la mezcla en ml.
- 0.2 = Volumen de la muestra en ml.
- 1000 = Factor para obtener el valor en μmoles
- 15 = Tiempo en min del ensayo enzimático.

Con base en lo anterior se hace el cálculo de actividad enzimática total, es decir para el total de mg de proteínas que se tienen.

5.0. PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

5.1 25% de saturación.

A 100 ml del sobrenadante agregar lentamente 14.4 g de sulfato de amonio sólido (pag.95) con agitación constante, procurando que el tiempo de adición de la sal sea aproximadamente de 30 min. Centrifugar a 4000 rpm por 20 min a 4°C. Separar sobrenadante y precipitado manteniéndolos en baño de hielo. Obtener de ambas partes la actividad enzimática y las proteínas totales.

5.2 35% de saturación.

A 100 ml del sobrenadante agregar lentamente 6.0 g de sulfato de amonio sólido con agitación constante, procurando que el tiempo de adición de la sal sea aproximadamente de 30 min. Centrifugar a 4000 rpm por 20 min a 4°C. Separar el sobrenadante y el precipitado manteniéndolos en baño de hielo. Obtener de ambas partes la actividad enzimática y las proteínas totales.

5.3 40% de saturación.

A 100 ml del sobrenadante agregar lentamente 6.2 g de sulfato de amonio sólido con agitación constante, procurando que el tiempo de adición de la sal sea aproximadamente de 30 min. Centrifugar a 4000 rpm por 20 min a 4°C. Separar el sobrenadante y el precipitado manteniend-

dolos en baño de hielo. Obtener de ambas partes la actividad enzimática y las proteínas totales.

Realizar el proceso hasta terminar de precipitar todo el sobrenadante original. Restituir todos los precipitados al 40% en 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 5.

6.0 METODOS PARA DESALAR.

El producto obtenido en el paso anterior tiene que ser desalado antes de pasar al proceso de cromatografía.

6.1 Diálisis.

Preparar una bolsa para diálisis de la siguiente manera: Cortar aproximadamente 15 cm de membrana de celulosa y, colocarla en un vaso de precipitados con agua hirviendo durante 15 min.

Con ayuda de unas pinzas de disección, sacar y cerrar uno de los extremos de la bolsa con hilo grueso; colocar entonces la solución a dializar (aprox. 60 ml) y cerrar el otro extremo, dejando una porción de hilo para poder sujetar la bolsa dentro de un matrás erlenmeyer con 4 l de agua desionizada. Mantener en cuarto frío con agitación constante. Cambiar el agua del matrás cada hora, hasta que la prueba del cloruro de bario sea negativa.

6.1.1 Prueba del Cloruro de Bario.

A 50 ml del agua de diálisis agregar 10 ml de una solución de Cloruro de Bario 1 M. La prueba es positiva si el agua toma un aspecto

lechoso y es negativa si el agua no sufre ningún cambio, ésto significa que el sulfato de amonio ha salido a través de la membrana de diálisis.

6.2 Columna de Sephadex G-25.

Calcular y suspender la cantidad de Sephadex G-25 (para una columna de 60 x 2.5 cm) en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 5 con mercaptoetanol 2 mM y EDTA 1 mM. Equilibrar la columna con la misma solución amortiguadora.

Aplicar la muestra (precipitado al 40%) a la columna con ayuda de una bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 20 ml/h. La columna se lava con 500 ml de la solución amortiguadora a la misma velocidad de flujo. El fraccionamiento se lleva al cabo con un colector de fracciones, un graficador y un detector de luz con las siguientes condiciones de trabajo:

Colector	Graficador	Detector
4 gradillas tipo ñ	Veloc.papel: 0.2 mm/min	280 nm
Escala: 40	Volts de plumillas: 100 mV	Sensibilidad:1
vol.fracc.: 300 U bomba.	Voltmetro : 100 mV	
vol.desecho: 500 U bomba.		
vol. manguera: 73 U bomba.		

7.0 CROMATOGRAFIA

7.1 Cromatografía en CM-celulosa con gradiente de pH.

La muestra desalada y liofilizada (pag.56) se disuelve en 15 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 5 conteniendo mercaptoetanol 2 mM y EDTA 1 mM. Calcular y suspender la cantidad de CM-celulosa (para una columna de 2.5 x 31 cm) en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 5. Equilibrar co la misma solución.

Se aplica la muestra a la columna con ayuda de una bomba peristáltica a 20 ml/h. Se lava la columna con 500 ml de la solución amortiguadora y una vez que salieron las proteínas que no se pegaron a la resina, se desarrolla un gradiente de pH 5 a pH 8.

En uno de los depósitos del formador de gradientes se colocan 500 ml de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 5 y en el otro, 500 ml de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 8, ambas con mercaptoetanol 2 mM y EDTA 1 mM

La cromatografía se realiza con la ayuda de un colector de fracciones, un graficador y un detector en las sigs. condiciones:

Colector	Graficador	Detector
4 gradillas tipo A	Veloc.papel:0.2 mm/min	280 nm
Escala: 40	Volts plumillas: 100 mV	Sensib.: 1
Vol. fracc.:300 U bomba	Voltmetro: 100 mV	
Vol. desecho:400 U bomba		
Vol. manguera: 73 U bomba		

Obtener la actividad enzimática y las proteínas totales de todas las fracciones.

7.2 Cromatografía en DEAE/celulosa.

Calcular y suspender la cantidad de DEAE-celulosa (para una columna de 100 x 1.0 cm) en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 6.8 con mercaptoetanol 1 mM. Equilibrar perfectamente la columna con la misma solución.

Las fracciones de la cromatografía anterior que dieron actividad enzimática, se concentran y se aplican a la columna con ayuda de una bomba peristáltica a 15 ml/h. Las proteínas se eluyen con 1000 ml de la solución amortiguadora a la misma velocidad de flujo, con las sigs. condiciones cromatográficas:

Colector	Graficador	Detector
4 gradillas tipo A	Veloc. papel: 0.2 mm/min	280 nm
Escala 40	Volts plumillas: 100 mV	
Vol. fracc.: 300 U bomba	Voltímetro: 100 mV	Sensib.: 1
Vol. desecho: 400 U bomba		
vol. manguera: 57 U bomba		

7.3 Cromatografía en DEAE-sephacel.

La muestra desalada y liofilizada se disuelve en 25 ml de solución amortiguadora de fosfatos 5 mM pH 6.8 con mercaptoetanol y EDTA 1.0 mM y azida de sodio al 2 %.

Calcular y suspender la cantidad de DEAE-sephacel (para una columna de 2.5 x 21 cm) en solución amortiguadora de fosfatos 5 mM pH 6.8 con mercaptoetanol 2 mM, EDTA 1 mM y azida de sodio al 2 %. Se equilibra la columna con la misma solución. Aplicar la muestra con ayuda de una bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 10 ml/h. Eluir las proteínas con 800 ml de la solución amortiguadora a la misma velocidad

de flujo, con las siguientes condiciones de trabajo:

Colector	Graficador	Detector
4 gradillas tipo A	Veloc.papel: 0.2 mm/min	280 nm
Escala: 40	Volts plumillas: 100 mV	Sensib.: 0.5
Vol.fracc.: 200 U bomba	Voltímetro: 100 mV	
Vol. desecho: 300 U bomba		
Vol. manguera: 78 U bomba		

Obtener la actividad enzimática y las proteínas totales de todas las fracciones.

7.4 Cromatografía en Azul de Cibacron con gradiente de ADP.

Las fracciones que dan actividad enzimática en la cromatografía anterior se juntan y, si es posible, se concentran.

Calcular y suspender la cantidad de azul de cibacron (para una columna de 1.0 x 22 cm) en solución amortiguadora tris-ácido clorhídrico 20 mM pH 7 con cloruro de magnesio 5mM, EDTA 0.5 mM, mercaptoetanol 1 mM y azida de sodio al 0.2 %. Equilibrar la columna con la misma solución.

Aplicar la muestra a la columna con ayuda de una bomba peristáltica a 10 ml/h. Lavar la columna con 500 ml de la solución amortiguadora y una vez que han salido las proteínas que no se pegaron a la resina, se desarrolla el gradiente con 1000 ml de la solución amortiguadora, conteniendo ADP 10 mM, bajo las siguientes condiciones:

Colector	Graficador	Detector
4 gradillas tipo A	Veloc.papel: 0.2 mm/min	280 nm
Escala : 40	Volts plumillas: 100 mV	Sensib.: 1.0
Vol.fracc.: 200 U bomba	Voltímetro: 100 mV	
Vol.desecho: 300 U bomba		
Vol.manguera: 149 U bomba		

A las fracciones que salen por debajo de la meseta en el cromatograma, determinarles proteínas totales y actividad enzimática.

8.0 ELECTROFORESIS

8.1 Preparación del gel.

Elegir la concentración de PAN (pag.93). Mezclar el agua destilada, el amortiguador y la solución de acrilamida en un matraz kitasato, deaerear por unos minutos. Agregar la soluc. de persulfato de amonio y el TEMED, mezclar cuidadosamente sin introducir mucho aire. Inmediatamente poner la solución dentro del molde, con ayuda de un embudo ó jeringa de plástico. Eliminar las burbujas de aire y cerrar el empaque de caucho sin atrapar aire. La reacción de polimerización se realiza en un tiempo aproximado de 40 min. Si la polimerización ocurre muy rápido, las cantidades de TEMED y/o persulfato de amonio, pueden disminuirse; la calidad de los reactivos, temperatura y otros parámetros pueden hacer necesario cambiar las cantidades de catalizadores.

Después de la polimerización poner el equipo sin pinzas de sujeción en el refrigerador por 15 min. Quitar el empaque de caucho y, si es necesario, completar la separación del molde y el gel formado con una espátula larga. Limpiar la acrilamida no polimerizada con papel filtro. El gel se guarda a 4°C; se recomienda no utilizar el gel hasta que pasen 12 h, ya que algo de polimerización puede ocurrir durante este tiempo; y si el gel no se ha utilizado a los cuatro días de su preparación se desecha.

8.2 Preparación de la muestra.

No es necesaria una preparación especial de la muestra, pero es requisito importante que ésta debe estar totalmente solubilizada, evitando utilizar soluciones amortiguadoras de alta fuerza iónica.

Preferentemente, la muestra debe estar dializada. La cantidad de muestra depende del propósito de la electroforesis. Como una guía general, una serie corta de diluciones con concentración entre 0.1 y 20 mg/ml dará una idea de la concentración óptima.

Para poder observar el desarrollo del proceso (pag. 92), se añaden 10 µl de azul de bromofenol a cada 250 ml de ASB (10 mg/ml) que se usa como proteína patrón.

8.3 Electroforesis.

Para electroforesis en gel de PAN, el equipo Multiphor debe de mantener una temperatura de 10°C con ayuda de la bomba de agua. Se recomienda aplicar al gel una corriente de 50 mA por 30 min antes de aplicar la muestra (preelectroforesis).

Después de la preelectroforesis, se aplican en cada uno de los pozos del gel (de preferencia por duplicado) 5 μ l de cada muestra.

Se concentran las muestras a una corriente de 20 mA durante 5-10 min, después de éste tiempo, se incrementa a 50 mA (con gel al 3.5%), ó a 40 mA (con gel al 7.5 %). Es necesario trabajar con corriente constante.

El tiempo de electroforesis depende de la naturaleza de las muestras a analizar, pues en los geles de PAA, la migración de las proteínas depende de su carga neta a pH 8.9 y de sus respectivos pesos moleculares.

8.4 Tinción y conservación de la placa de gel (pag. 94).

a) Fijación. Para prevenir la pérdida de proteínas poco solubles y para minimizar la difusión, inmediatamente después de la electroforesis, la placa de gel es colocada en una cubeta que contiene solución fijadora durante 30 min a temperatura ambiente.

b) Tinción. Inmediatamente después de la fijación, se transfiere la placa de gel a otra cubeta, en la que se ha vertido la solución de azul brillante de Coomassie, permitiendo que el gel se tinte por espacio de 1 h.

c) Decoloración. Transferir el gel a otra cubeta que contiene solución para destefir, hacer cambios de solución más ó menos cada 3 h hasta que el gel se haya destefido y sólo se observen las bandas de proteínas fijadas y teñidas.

d) Conservación. Para secar el gel sin que se rompa, debe ser empapado en solución conservadora durante 1- 2 h. A continuación se deja secar el gel a temperatura ambiente. Una vez seco, se empapa un pedazo de papel celofán (que pueda cubrir al gel) en solución conservadora y se coloca sobre la placa de gel. De ésta forma, el gel se puede guardar intacto.

9 METODOS PARA CONCENTRAR

9.1 Liofilización.

Repartir la muestra líquida en porciones de 20 ml en frascos viales de 125 ml. Poner en los depósitos de la liofilizadora suficiente mezcla de hielo seco y acetona.

Congelar la muestra distribuyéndola homogéneamente en las paredes del frasco con movimientos circulares. Conectar el frasco a la línea de vacío inmediatamente para evitar que se descongele. Cuando el frasco esté a temperatura ambiente, cerrar lentamente el sistema de vacío, retirar el frasco y taparlo; sacudir el frasco para desprender la proteína, producto de la liofilización.

Durante el proceso, es necesario vigilar constantemente que los depósitos de la liofilizadora tengan suficiente mezcla frigorífica. De lo contrario, la liofilización no se lleva a cabo adecuadamente, además de que la bomba de vacío corre riesgo de descompostura.

9.2 Concentración por Ultrafiltración.

Revisar las válvulas del tanque de nitrógeno (tanto la de salida como la de regulación de la presión) antes de comenzar a concentrar. En el recipiente (250 ml) del equipo de Amicon, adaptar la membrana de ultrafiltración, llenar hasta la marca con la solución a concentrar y cerrar perfectamente el sistema. Abrir la llave del gas, cuidando que la presión no sobrepase las 20 libras. Iniciar la agitación, que debe ser constante y lenta. Colocar un depósito en la salida de desechos del recipiente.

Cada vez que se termine el líquido en el recipiente (tener cuidado de que nunca quede completamente vacío), cerrar todas las llaves y volver a llenar como se explicó anteriormente.

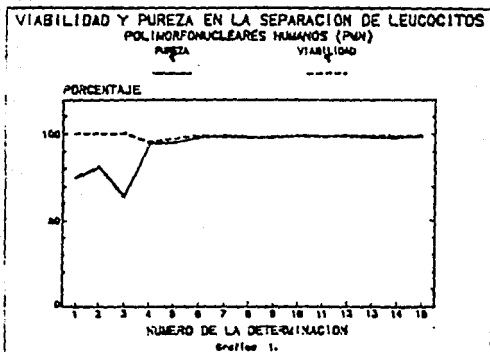
Cuando se consiga el volumen deseado, cerrar todas las llaves, y enjuagar la membrana en dicho volumen, para evitar pérdida de la muestra.

CAPITULO IV

RESULTADOS: ANALISIS Y DISCUSION

1.0 Fue necesario familiarizarse con las técnicas que servirían como base para seguir paso a paso el proceso de aislamiento de la enzima piruvato cinasa (PC). Estas técnicas son : separación de células polimorfonucleares (PMN) evaluando su viabilidad y pureza, determinación de actividad enzimática y proteínas totales. Para todo lo anterior se contó con 40 muestras de sangre del personal de la División de Nutrición Experimental y Ciencia de los Alimentos del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran, que permitieron hacer lo siguiente :

• Obtención de leucocitos PMN por gradiente de densidad con ficoll-nypaque, a los que se les hicieron pruebas de viabilidad y pureza. Los resultados fueron mejorando con la práctica, llegando a los siguientes datos: Viabilidad 98% Pureza 95%



Determinación de viabilidad con azul tripan y pureza por conteo en cámara de neubauer.

Como se sabe, la proporción de leucocitos PMN en sangre total es muy pequeña, por lo tanto, debe asegurarse una buena separación de células (pureza del 99%) para garantizar que se parte del total (ó casi el total) de PMN. Para ello, no sólo debe considerarse que la densidad del F-H debe ser 1.077, sino que, la proporción del F-H y el volumen de células a separar debe ser 2:1 respectivamente, y no 1:1 como generalmente se hace al trabajar con volúmenes de sangre pequeños.

* La liberación de las proteínas citoplasmáticas se comprobó por exámen microscópico (ya no se observaban células formos) además de que la presencia de proteínas se manifiesta con la formación de espuma, pruebas que indicaron cualitativamente si el proceso para romper a las células tenía que hacerse nuevamente.

* Se llevaron a cabo 40 ensayos enzimáticos, cada uno por cuadruplicado, observándose disminución significativa en la absorbencia por la oxidación de la coenzima NADH, lo cual indicaba dos cosas: primero, que la técnica se estaba realizando adecuadamente y después, que el rompimiento de las células se había logrado.

* Se realizaron 40 curvas patrón para la determinación de proteínas totales (método de Lowry) con el fin de obtener una buena correlación. Durante la elaboración de éstas curvas se pudo observar que los resultados variaban dependiendo del tipo de reactivo de Folin empleado. Las curvas obtenidas con el reactivo de Folin marca Sigma, proporcionaron mejores coeficientes de correlación, comparados con los obtenidos con reactivo marca Merck, por lo cual se decidió utilizar al primero en las determinaciones siguientes (Cuadro 1).

Con los resultados de las 40 curvas patrón se obtuvieron los coeficientes de variación (c.v.) intra e interensayo para cada punto de

la curva. Por el c.v. intraensayo obtenido se garantiza precisión en la determinación, sin embargo, el c.v. interensayo indica que es necesario hacer una curva patrón cada vez que se determinen proteínas totales por este método (Cuadro 2).

Cuadro 1
Análisis de regresión lineal para algunas curvas patrón.
(ASB)

Marca	r	m	b
Merck	0.9480	0.0056	0.218
"	0.9647	0.0067	0.169
"	0.9274	0.0075	0.301
"	0.9660	0.0091	0.219
"	0.9877	0.0085	0.134
"	0.9715	0.0134	0.121
"	0.9832	0.0080	0.206
Sigma	0.9996	0.0095	0.116
"	0.9994	0.0105	0.109
"	0.9994	0.0122	0.072
"	0.9998	0.0092	0.130
"	0.9999	0.0073	0.121
"	0.9990	0.0063	0.075
"	0.9992	0.0992	0.111

Cuadro 2

Comparación entre los c.v. intra e interensayo en la determinación de proteínas totales (método de Lowry)

Concentración (μg)	c.v. intraensayo	c.v. interensayo
80	0.5867	23.470
40	0.5201	20.804
20	0.5850	23.401

n = 40

PROCEDIMIENTO I

2.0 OBTENCION DE CELULAS PMN.

Para poder llevar a cabo el proceso de aislamiento, se requería de leucocitos PMN provenientes de aproximadamente 100 l de sangre humana total, por lo que fué necesario acudir al banco de sangre. Esto se realizó a lo largo de dos meses dependiendo del número de donadores que asistían al banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría, que proporcionó el paquete de leucocitos. Es importante comentar ésto, ya que de ésta forma se obtuvieron varias porciones de paquetes leucocitarios, por lo que se utilizaron por separado en las etapas siguientes, puesto que juntarlos dificultaba su manejo. Los paquetes leucocitarios obtenidos tenían una cantidad importante de eritrocitos, que se consideraron como contaminantes por lo que fué necesario tratar de eliminarlos, lavando con SSB. De la nata leucocitaria se obtuvo la población de leucocitos PMN, no fué posible determinar la pureza de éstas células debido al volumen tan grande con el que se trabajó; se intentó haciendo diluciones de hasta 1 : 1x10, sin embargo, ni en estas condiciones, se logró un conteo de células adecuado; además de que es evidente que diluciones tan grandes ya no proporcionan datos confiables. Por consiguiente, la viabilidad de las células tampoco se verificó por la técnica que se menciona en la metodología; no obstante, el hecho de trabajar con el paquete leucocitario obtenido el mismo día y guardar las células en SSB a - 75°C, garantizaba el buen estado de los leucocitos PMN.

3.0 PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.

Hasta este punto el problema consistía en determinar la proporción de saturación a la cual precipitaría la fracción proteínica con mayor actividad enzimática de PC; ésto se resolvió realizando varios ensayos preliminares (Cuadro 3).

Como se tenían datos de la proporción de saturación a la que precipita la PC de diversos tejidos animales y bacterias (45-53) y en eritrocitos humanos (34), fueron estos, los que se utilizaron como base para buscar el esquema de precipitación para la enzima de leucocitos PMN humanos.

Con el objeto de mantener a la enzima en las mejores condiciones posibles, se tuvo la necesidad de realizar el proceso de precipitación con sulfato de amonio inmediatamente después de cada rompimiento celular manteniendo precipitados y sobrenadantes en baño de hielo.

Cuadro 3

Primer ensayo de precipitación con sulfato de amonio.

saturación (%)	Proteínas totales (mg/ml)		Actividad específica (U/mg proteína)	
	pp.	sobr.	pp.	sobr.
L.O.	3.452	3.358	0.195	1.233
35	1.947	2.615	2.231	2.615
45	- -	2.211	- -	2.265

- - no se pudo determinar.

L.O. Lisado original (150 ml) proveniente de 6 l de sangre.

Unidad de activ. enzim. = μ moles NADHox/min/mg prot.

Como se observa, la proporción de saturación empleada en éste caso no sirvió para la enzima de leucócitos PMN por lo que había que probar otro esquema de precipitación.

El segundo ensayo dió los siguientes resultados (Cuadro 4):

Cuadro 4
Precipitación con sulfato de amonio.

Saturación (%)	Proteínas totales (mg/ml)		Actividad específica (U/mg)	
	pp.	sobr.	pp.	sobr.
L.O.	3.086	3.900	3.089	4.93
25	1.938	5.221	4.373	0.110
35	1.514	3.966	13.802	1.384
40	0.141	4.026	43.036	1.746
45	0.658	4.432	25.010	2.237
50	0.846	4.139	13.65	- -

- - no se pudo determinar

L.O. Lisado original (100 ml) proveniente de 10.5 l de sangre.

Unidad de Activ. enzim. = μ moles NADHox/min/mg prot.

Comparando resultados, se puede ver como se obtiene en el precipitado al 40% la fracción proteínica con actividad enzimática más elevada, por efecto de eliminación de otras proteínas en las precipitaciones al 25 y 35%. En los últimos dos puntos, aún cuando se siguen eliminando proteínas, la actividad de PC no es tan elevada como al 40%, por lo que se decidió precipitar a esa proporción directamente en el siguiente ensayo, pues se supuso que no tenía objeto pasar por los demás puntos, obteniéndose lo que se expone en el cuadro 5.

Cuadro 5
Precipitación con sulfato de amonio al 40%

Saturación (%)	Proteínas totales (mg/ml)		Actividad específica (U/mg)	
	pp.	sobr.	pp.	sobr.
L.O. (1)	2.99	3.50	2.73	5.22
40 (1)	--	0.55	--	10.575
L.O. (2)	2.36	3.00	2.65	4.044
40 (2)	--	2.00	--	6.25

-- no se pudo determinar

L.O. (1) lisado original (100 ml) proveniente de 10 l de sangre

L.O. (2) lisado original (100 ml) proveniente de 10 l de sangre

Unidad de Activ. enzim. = μ moles NADHox/min/mg prot.

Los resultados del cuadro 5 permitieron concluir que se cometió un error al querer precipitar la enzima directamente, ya que como se observa, el sobrenadante al 40% contiene casi el total de las proteínas del lisado original y casi nada se quedó en el precipitado, contrario a lo que se esperaba. Esto indicaba que la eliminación de proteínas debía hacerse paulatinamente como en el ensayo anterior, por lo que fué necesario repetir el esquema de precipitación, obteniéndose los siguientes resultados (Cuadro 6).

Cuadro 6
Precipitación con sulfato de amonio.

Saturación (%)	Proteínas totales (mg/ml)		Actividad específica (U/mg)	
	pp.	sobr.	pp.	sobr.
L.O.	2.46	4.88	2.46	0.967
25	2.51	4.64	2.83	0.435
35	1.29	3.68	3.809	2.420
40	0.450	3.86	32.74	1.74
45	1.292	4.52	12.69	1.94
50	0.275	3.92	6.42	- -

- - no se pudo determinar

L.O. lisado original (100 ml) proveniente de 11 l de sangre
Unidad de Activ. enzim. = $\mu\text{moles NADHox/min/mg prot.}$

Los resultados permiten ver nuevamente que en el precipitado al 40% de saturación se tiene la actividad enzimática más elevada.

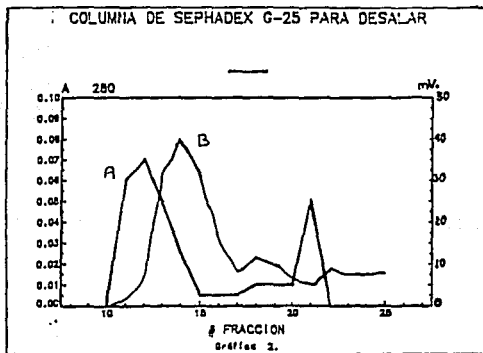
Es importante hacer notar que hay diferencias entre uno y otro proceso (cuadro 4 y 5), sin embargo, lo que sí es claro es que en el precipitado al 40% siempre se tiene la fracción proteínica con la actividad enzimática de PC más elevada por lo cual se decidió que el esquema de precipitación para la enzima PC de PMN sería al 25,35 y 40%, y esto se hizo con las células PMN restantes (provenientes de 50 l), ya que hasta éste momento se habían utilizado los paquetes leucocitarios de 50 litros de sangre.

4.0 CROMATOGRAFIA.

4.1 Desalación de la muestra. Antes de iniciar la separación por cromatografía se tuvo que eliminar el sulfato de amonio del precipitado obtenido en el paso anterior, para lo cual se probaron dos métodos:

a) Método 1. Columna de Sephadex G-25.

En la gráfica 2 se puede observar que el sulfato de amonio sale casi al mismo tiempo que la proteína, este hecho indicaba que la muestra no se estaba desalando completamente, por lo que se decidió probar otro método.



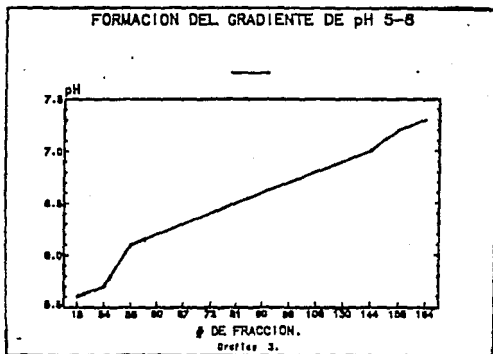
La curva A representa la resolución del precipitado al 40%. La curva B representa la resolución de la sal (sulfato de amonio).

b) Método 2. Diálisis.

Antes de dializar se liofilizó la muestra con 25.8 mg de proteína restituida en un volumen final de 15 ml. Esta cantidad de proteína se desala perfectamente contra 4 l de agua desionizada (cambios de agua cada hora) durante un tiempo de 4 horas con agitación constante en cuarto frío. Después de éste tiempo, la prueba con cloruro de bario fué negativa.

4.2 Cromatografía en CM-celulosa con gradiente de pH

En la gráfica 3 se observa la formación del gradiente de pH (5-8) en una columna de CM-celulosa. Esto se hizo para probar el formador de gradientes en el intervalo de pH que se requería, antes de aplicar la muestra.

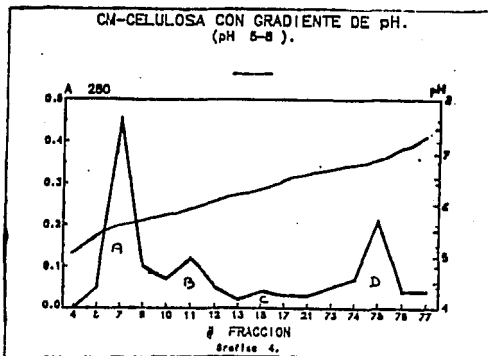


El gradiente se hizo con 500 ml de soln. amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 5 y 500 ml de soln. amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 8 midiendo el pH en cada fracción.

Una vez que se comprobó que el formador de gradientes funcionaba correctamente, se aplicó a la columna 25.8 mg de proteína dializada y disuelta en 15 ml de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 5.

En la gráfica 4 se pueden observar las fracciones (5-10) con actividad enzimática de PC en un volumen de fracción de 25 ml. Se liofilizaron las fracciones y se restituyeron en un volumen final de 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 6.8. En éste paso se obtuvieron los siguientes resultados:

- 6.10 mg de proteínas
- 4.37 U/mg de proteína
- 26.72 unidades totales



Cromatografía de 25.8 mg de proteína liofilizada.

A : fracciones con actividad enzimática de PC.

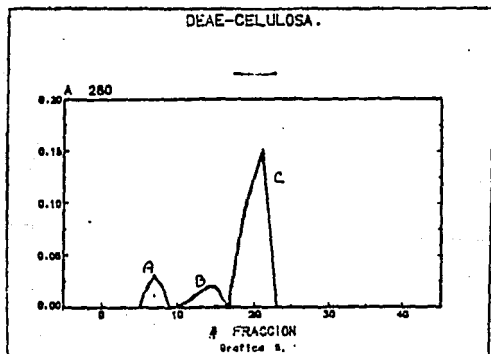
B,C,D : fracciones sin actividad enzimática.

4.3 Cromatografía en DEAE-celulosa.

La proteína obtenida en el paso anterior (4.2) se aplicó en una columna de DEAE-celulosa con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 6.8.

En la gráfica 5 se observan las fracciones 10-17, las que dieron actividad enzimática de PC. Se liofilizaron las fracciones y se restituyeron en un volumen final de 2 ml. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- 0.03 mg de proteínas
- 1 239.86 U/mg de proteína
- 39.76 unidades totales



Cromatografía de 5.102 mg de proteína liofilizada.

B : fracciones con actividad enzimática.

A,C : fracciones sin actividad enzimática.

Como la cantidad de proteína (PC) obtenida era tan pequeña, la determinación de proteínas totales tuvo que realizarse por el método de Bradford y no por el de Lowry. El ensayo enzimático se llevo a cabo en un espectrofotómetro DU-70 a diferencia de las otras determinaciones que se realizaron en un Gilford 250.

En el cuadro 7 se concentran los resultados de tal manera que se puede seguir cada uno de los pasos del aislamiento con su respectivo rendimiento. Las figuras 1, 2 y 3 de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAA) muestran el proceso en sus primeras dos etapas (obtención del lisado y precipitación).

Cuadro 7

Aislamiento de la enzima PC de leucocitos PMN humanos.

Paso	Proteínas (mg)	Activ. especif. (U/mg prot.)	Unidades totales	Rendimiento (%)
lisado orig.	2 925.00	7.11	20 800.55	100
precipitación	25.80	123.62	3 189.39	15.32
CM-celulosa	6.10	4.37	26.72	0.12
DEAE-celulosa	0.03	1 239.86	39.76	0.19

Unidad de actividad enzimática = μ moles NADHox/min/mg prot.

Unidades totales = unidades de actividad enzimática en el total de prot.

5.0 ELECTROFURESIS.

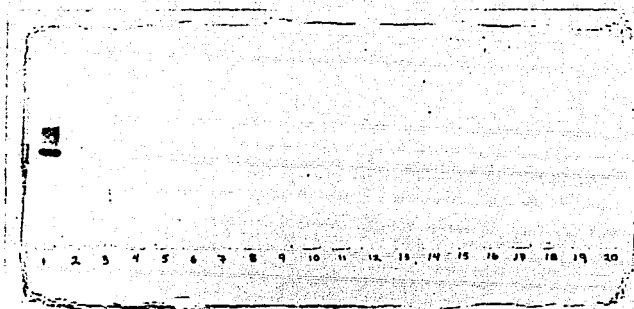


Fig. 1. Electroforesis en gel de PAA

Contenido de los pozos

1: ASB (10 mg/ml)

3: Lisado original

Condiciones electroforéticas

PAA al 3.5% pH 8.9

260 V

50 mA

14 W corr. cte. /2 horas.

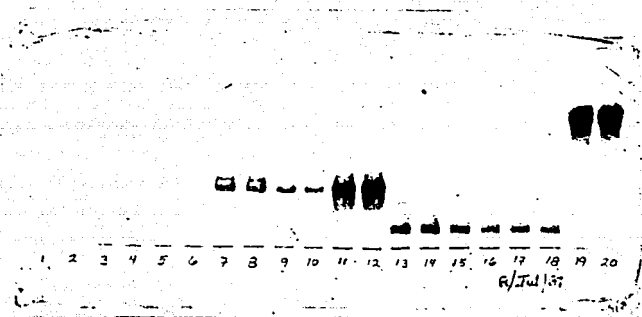


Fig. 2. Electroforesis en gel de PAA.

Contenido de los pozos	Condiciones electrof.
1,2: pp. 40% (parte 1)	PAA AL 3.5 % pH 8.9
3,4: pp. 40% (parte 2)	250 V
5,6: pp. 40% (parte 3)	50 mA
7,8: sobr. 40% (parte 1)	14 W corr. cte. / 2 horas
9,10: sobr. 40% (parte 2)	
11,12: sobr. 40% (parte 3)	
13-18: PC músculo de conejo (1mg/ml)	
19,20: ASB (10mg/ml)	

Se observa que como los precipitados no están completamente solubilizados ni libres de sal no aparecen, cosa que no sucede con los sobrenadantes; sin embargo éstos últimos no contienen PC como se puede verificar por las bandas características de PC de músculo de conejo empleada como patrón.

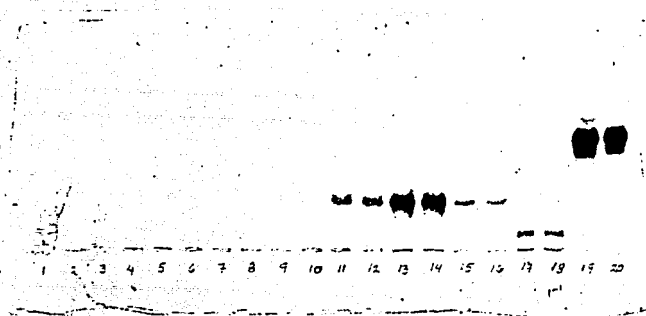


Fig. 3 Electroforesis en gel de PAA

Contenido de los pozos	Condiciones electroforéticas
9: lisado original	PAA al 3.5% pH 8.9
11-16: pp. 40% dializados (partes 1,2,3)	250 V 50 mA
17,18: PC musc. conejo (1mg/ml)	13 W corr. cte. /1.5 horas.
19,20: ASB (10 mg/ml)	

Se observa que después de haber eliminado la sal, las proteínas si aparecen, sin embargo tampoco se observa la banda de PC, posiblemente por la concentración en la que se encontraba y a la presencia de muchas otras proteínas que tal vez afecten su migración. La concentración de la enzima era tan pequeña que no fué posible detectarla por electroforesis después de las cromatografías; sin embargo los valores de actividad enzimática y proteínas indicaban la presencia de la enzima.

Con el objeto de conservar y concentrar la proteína y, en el afán de ver cristales como producto del trabajo, se liofilizó la proteína, sin embargo al proceder de ésta manera, lo único que se consiguió fué perder la enzima en el sistema de vacío de la liofilizadora.

Analizando los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento y en vista del error cometido al liofilizar, se intentó nuevamente el aislamiento, proceso durante el cual se pudieron hacer cambios en lo que a cromatografía se refiere, ya que fué en ésta etapa del proceso en donde se registraron las mayores pérdidas.

PROCEDIMIENTO II

1.0 OBTENCION DE CELULAS PMN.

Se procedió a separar los leucocitos PMN del paquete leucocitario provenientes de 60 l de sangre total. El rompimiento celular rindió los siguientes resultados:

Proteína liofilizada.

2 051.75 mg de proteínas

12.57 U/mg proteína

25 790.49 unidades totales

2.0 PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.

El proceso de precipitación dió los siguientes resultados:

Precipitado al 40% liofilizado.

852 mg de proteínas.

13.20 U/mg de proteína

11 246.4 unidades totales.

3.0 CROMATOGRAFIA

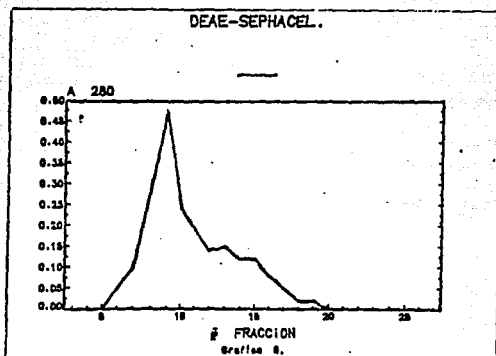
3.1 Cromatografía en DEAE-sephacel.

Las fracciones 7-12 de la gráfica 6, dieron actividad enzimática de PC, y fueron obtenidas en un volumen de 25 ml, producto de la cromatografía de 852 mg de proteína. Las fracciones se liofilizaron y restituyeron en un volumen final de 10 ml de solución amortiguadora tris-HCl 20 mM pH 7. Se obtuvieron los siguientes resultados:

600 mg de proteínas.

8.5 U/mg de proteína.

5 100 unidades totales.



En la gráfica no se observa una buena separación de las proteínas, sin embargo se pudo distinguir bastante bien el pico formado por las fracciones 7-12 que presentaban un color rojo y en las que se demostró actividad enzimática de PC.

3.2 Cromatografía en azul de cibacron con gradiente de ADP.

Los 10 ml del producto obtenido en el paso anterior (DEAE-sephacel) se aplicaron en una columna de azul de cibacron con solución amortiguadora tris-HCl 20 mM pH 7.

Una vez que pasaron a través de la columna las proteínas que no se pegaron por afinidad a la resina (gráfica 7 : A) , se aplicó un gradiente de ADP 10 mM. Como se ve, la concentración de ADP para eluir a la PC es muy grande, esto dió como resultado una gran dilución de la enzima.

Las fracciones obtenidas con el gradiente de ADP y que en la gráfica aparecen por abajo de la meseta (gráfica 7 : 8), fueron concentradas por ultrafiltración, hasta un volumen final de 3 ml y dieron los siguientes resultados:

1.138 mg de proteínas.

934.13 U/mg de proteína

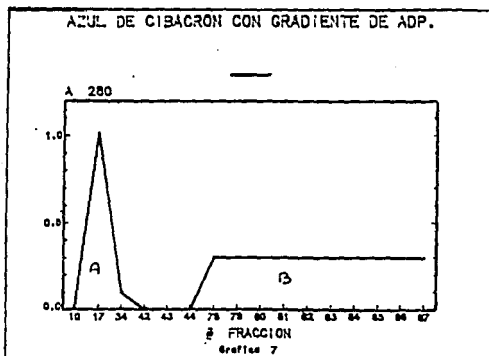
1 063.03 unidades totales.

Cabe mencionar que no toda la PC se pegó en la columna, puesto que al liofilizar las fracciones de A y medir actividad enzimática y proteínas se encontró lo siguiente:

245.4 mg de proteínas.

0.062 U/mg de proteína

15.2768 unidades totales.



A: representa la proteína que no se pegó por afinidad a la columna. B: representa la PC eluida con ADP. En éste último paso se obtiene una meseta y no un pico, puesto que el nucleótido no absorbe luz en esa región del espectro.

En el cuadro 8 se concentran los resultados del proceso de aislamiento paso a paso con sus respectivos rendimientos y las figuras 4 y 5 de electroforesis en gel de PAA muestran algunos pasos del proceso.

ESTE TRABAJO NO DEBE
 SER REPRODUCIDO SIN
 EL CONSENTIMIENTO DEL
 AUTOR

Cuadro 8
Aislamiento de la PC de leucocitos PMN humanos

Paso	Proteínas (mg)	Activ. espec. (U/mg prot.)	Unidades totales	Rendimiento (%)
lisado orig.	2 051.77	12.57	25 790.49	100
precipitación	852.0	13.20	11 246.40	43.60
DEAE-sephacel	600.0	8.5	5 100.0	19.77
Azul-cibacron	1.138	934.13	1 063.03	4.12

Unidad de activ.enzim. = μ moles NADHox/min/mg prot.

Unidades totales = unidades de actividad enzimática en el total de proteínas.

4.0 ELECTROFORESIS

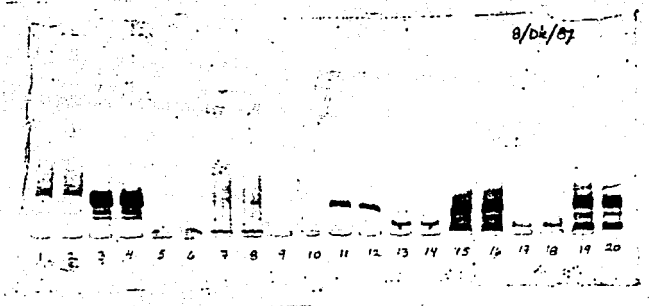


Fig 4 .Electroforesis en gel de PAA.

Contenido de los pozos	Condiciones electroforéticas
1,2: NSB (10 mg/ml)	PAA al 7.5 % pH 8.9
3,4: lisado eritrocitos	250 V
5,6: pp. 40 %	40 mA
7,8: pp. 40 % dializado	9 W corr. cte./1.5 horas.
9,10: sobr. 40%	
11,12: sobr. 40% liofilizado	
13,14: pp 40 % dializado y liofilizado (se observa claramente la banda característica de PC.)	

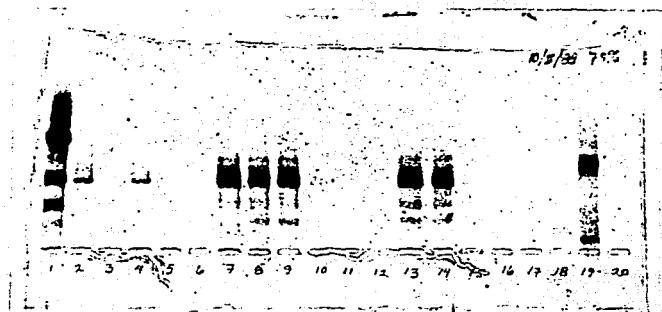


Fig. 5. Electroforesis en gel de PAA.

Contenido de los pozos	Condiciones electroforéticas
1: NSB (10 mg/ml)	PAA al 7.5 % pH 8.9
2: acuglobin (6.6 mg/ml)	250 V
4: sobr. 40% liofilizado	40 mA
5: pp. 40% dialisado	14 W corr. etc./3 horas
6: fracción de DEAE-sephacel sin actividad enzim.	
7: pp. 40% inyectado a DEAE- sephacel.	
8,9: fracción 7-12 de DEAE- sephacel con activ.enzim.	
10 -12: fracciones de DEAE- sephacel sin activ.enzim.	
13,14: fracción A de azul de cibacron.	
15,16: fracción de azul de cibacron sin activ.enzim.	

Se observa la banda característica de PC en el precipitado al 40% (dializado y liofilizado), en las fracciones separadas por DEAE-sephacel con actividad enzimática de PC y en A (liofilizada) separada por azul de cibrón.

La cantidad de enzima obtenida en el procedimiento II es mucho mayor que la obtenida en el procedimiento I; sin embargo, tampoco fue suficiente como para detectarla por electroforesis.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Las técnicas que en éste estudio fueron mejores para el aislamiento de la PC son las siguientes:

- Obtención del lisado de leucocitos PMN (choque térmico y homogenización).
- Precipitación secuencial con sulfato de amonio (25, 35 y 40% de saturación).
- Diálisis en agua destilada.
- Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-sphacel).
- Cromatografía de afinidad en azul de Cibacron con gradiente de ADP.
- Electroforesis en gel de PAA al 7.5%
- Concentración de la proteína por ultrafiltración.

La proteína que constituye el mayor contaminante del lisado es la hemoglobina, por lo tanto, debe eliminarse por completo desde el inicio. Se sugiere incluso que este hecho podría reducir los pasos del proceso de separación, cuando menos en cuanto a cromatografía se refiere.

El método de Bradford para cuantificar proteínas totales se adapta mejor a las necesidades de este trabajo, puesto que es más sensible, más rápido y sencillo.

La columna de intercambio catiónico (CM-celulosa) eliminó aproximadamente el 75% de las proteínas contaminantes, bajando el rendimiento. Por otra parte, la columna de intercambio aniónico (DEAE-sephacel) sólo elimina el 30% de las proteínas contaminantes pero no a la hemoglobina, sin embargo, comparando los dos caminos, se concluye que el intercambiador aniónico es la mejor opción para mejorar el rendimiento.

La cromatografía de afinidad con azul de cianacron es determinante en la metodología, pues se elimina la hemoglobina. La PC de leucocitos PMN humanos tiene gran afinidad por la resina, ya que se requiere de una concentración de ADP 10 mM para eluir a la proteína.

La electroforesis en gel de PAA al 7.5% da una mejor resolución de las bandas en comparación con la que se obtiene en geles al 3.5%. Es necesaria una concentración mínima de PC de 1 mg/ml para detectarla por electroforesis.

CAPITULO VI

COMENTARIOS.

Es bien sabido que no es conveniente el almacenamiento prolongado de materiales biológicos, sin embargo, se hace hincapié en ello para que la obtención de los paquetes leucocitarios se haga en un tiempo máximo de 15 días y que el rompimiento de las células se realice hasta que se haya reunido la cantidad requerida con el objeto de proteger a la enzima de la desnaturalización.

Las determinaciones de actividad enzimática y proteínas totales deben hacerse siempre después de cada paso del proceso, ya que son los datos que indican la presencia de la enzima. Aún con los volúmenes de sangre tan grandes con los que se trabajó, se comprobó que no es necesario hacer diluciones para realizar éstas determinaciones.

Debe tomarse en cuenta el volumen total sobre el que se hace la determinación para el cálculo de rendimientos a lo largo del proceso.

El esquema de precipitación que se presenta, resultó ser el que proporcionó el precipitado con actividad enzimática más alta; sin embargo, no se descarta la posibilidad de encontrar otras condiciones de la técnica que mejoren los resultados.

Es conveniente mencionar que todavía falta determinar claramente el punto de saturación de la resina de azul de cibacron, y si existen

otras condiciones de pH ó fuerza iónica con las cuales se mejoren los resultados.

Es necesario dializar las muestras y, de preferencia, concentrar la proteína antes de la electroforesis.

La metodología que aquí se presenta queda sujeta todavía a algunos cambios, establecer una metodología para el aislamiento de una proteína en especial puede llevar muchos años.

CAPITULO VII

APENDICE

RECOMENDACIONES ESPECIALES.

Todo el material de vidrio debe estar perfectamente lavado y tratado con mezcla crómica para la eliminación de toda clase de materia orgánica.

Para evitar que las células se adhirieran al vidrio, la siliconización se llevó a cabo en los matraces erlenmeyer que se mandaban al banco de sangre, en los matraces kitasato y pipetas de los sistemas de extracción al vacío.

Siliconización.

Agregar el silicón en el material a tratar y girar lentamente hasta que está impregnado completamente. Regresar el exceso de silicón a su envase. Invertir el material para que el silicón que no se impregnó en las paredes sea desechado sobre una gasa. Permitir que el material seque perfectamente antes de utilizarlo.

Trabajar en campana extractora, utilizar guantes y cubrebocas, porque ésta sustancia es muy tóxica.

PREPARACION DE ALGUNAS SOLUCIONES

SSB pH 7.4

Reactivo	Cantidad (g)
Cloruro de calcio	0.14
Cloruro de sodio	8.00
Cloruro de potasio	0.40
Sulfato de magnesio	0.20
Fosfato monobásico de potasio	0.06
Fosfato dibásico de sodio	0.24
Glucosa	1.00
Cloruro de magnesio	0.20
Rojo de fenol	0.02
Agua desionizada	c.b.p. 1000 ml.

Disolver los reactivos en 500 ml de agua, ajustar el pH y aferrar a 1000 ml.

PBS

Reactivo	Cantidad (g)
Cloruro de sodio	8.00
Fosfato dibásico de sodio	2.90
Fosfato monobásico de potasio	0.20
Cloruro de potasio	0.20
Azida de sodio	0.20
Agua desionizada	c.b.p. 1000 ml.

F-H densidad = 1.077

Pesar 45.00 g de Hypaque y disolver en 300 ml de agua caliente con agitación. Una vez disuelto agregar 30.75 g de Ficoll. Seguir agitando hasta que la solución esté clara, esperar a que enfrie y aforar a 500 ml. Determinar la densidad de la solución con el picnómetro a 25°C

En caso de no utilizar el medio inmediatamente, es necesario esterilizarlo para evitar la contaminación. El F-H estéril dura 6 meses.

Reactivos para el Método de Lowry:

Reactivo A: - Carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio

0.1 N.

Reactivo B - Sulfato de cobre pentahidratado al 0.5 % en tartrato de sodio y potasio al 1 %.

Reactivo C - Solución de cobre alcalina: mezclar 50 ml del reactivo A con 1 ml del reactivo B. Descartar después de un día.

Reactivo E - Reactivo de Folin diluido a 1 N con agua.

Reactivos para el Método de Bradford:

Solución de Azul brillante de Coomassie: 100 mg en 100 ml de alcohol etílico.

Reactivo de Bradford: 5 ml de Azul brillante de Coomassie

10 ml de Acido fosfórico al 85 %

Agua destilada c.b.p. 100 ml.

Utilizar el mismo día.

Reactivos para el ensayo enzimático:

PEP	16 mg en 5 ml de agua desionizada
ADP	16 mg en 5 ml de agua desionizada
NADH	11.3 mg en 5 ml de agua desionizada
LDH	100 ul en 5 ml de agua desionizada

Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM:

Fosfato dibásico de potasio	3.484 g
Fosfato monobásico de potasio	13.473 g
EDTA	0.744 g
Mercaptoetanol	280 ul

Aforar a 2000 ml.

Se ajusta al pH que se requiera con fosfato dibásico de potasio antes de aforar.

Solución amortiguadora Tris-ácido Clorhídrico 20 mM pH 7.0

Tris	4.845 g
Cloruro de magnesio	4.336 g
EDTA	0.374 g
Ázida de sodio	0.200 g
Mercaptoetanol	280 ul

Con el ácido clorhídrico ajustar el pH a 7.0. Después, aforar a 2000 ml.

Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 6.8

Fosfato dibásico de potasio 1.045 g

Fosfato monobásico de potasio 1.905 g

EDTA 0.744 g

Mercaptoetanol 280 μ l

Aforar a 2000 ml.

Reactivos para la electroforesis en gel de PAN.

Solución amortiguadora Tris-glicina pH 8.9 (soluc.patrn).

Glicina 75.1 g

Azida de sodio 2.5 g

Tris c.p.p. pH 8.9

Disolver la glicina y la azida en aproximadamente 3000 ml de agua, titular con tris a pH 8.9. Aforar a 5000 ml con agua.

Solución amortiguadora para los depósitos del electrodo.

Un volumen de solución patrón se mezcla con un volumen igual de agua desionizada.

Solución amortiguadora para la muestra.

5 ml de la solución patrón se aforan a 100 ml con agua desionizada.

Solución de Azul de bromofenol al 0.25 %

Pesar 25 mg del colorante y aforar a 10 ml con solución amortiguadora para la muestra.

Solución de Acrilamida.

Disolver 22.2 g de acrilamida y 0.6 g de bis en 75 ml de agua. Agitar hasta que la solución esté clara y aferrar a 100 ml con agua. Se filtra la solución y se guarda en frasco ámbar a 4°C. Desechar a las dos semanas.

NOTA: la acrilamida y el bis son muy tóxicos, por lo tanto hay riesgo de contaminación por inhalación ó contacto con la piel. Es necesario usar guantes, lentes protectores, mascarilla y trabajar en campana extractora.

Solución de Persulfato de amonio.

Pesar 0.150 g de persulfato y aferrar a 10 ml con agua desionizada, utilizar el mismo día.

Preparación del gel de PAA.

Reactivo	Cantidad en ml para:	
	PAA 3.5 %	PAA 7.5 %
Agua	19.3	7.5
Soluc. Patrón frís-glicina	33.0	33.0
Soluc. Acrilamida	10.4	22.2
Persulfato	3.2	3.2
TEMED	0.05	0.05

Solución Detergente.

Agregar 0.1 ml de Tritón X-100 a 100 ml de agua desionizada.

Solución Fijadora.

57.0 g de Ácido tricloroacético

17.0 g de Ácido sulfosalicílico

150 ml de Metanol

350 ml de Agua desionizada

Se disuelven los ácidos en la mezcla agua-metanol.

Solución para la Tinción.

Azul brillante de Coomassie 1.25 g

Metanol 230 ml

Agua desionizada 230 ml

Ácido acético 40 ml

Disolver el colorante en la mezcla metanol-agua con agitación durante una hora. La solución puede ser usada varias veces, pero debe ser filtrada si aparecen precipitaciones del colorante.

Solución para Decolorar.

Mezclar 1500 ml de alcohol etílico con 500 ml de ácido acético y aforar a 5000 ml con agua desionizada.

Solución Conservadora.

Mezclar 300 ml de alcohol etílico, 100 ml de ácido acético y 100 ml de glicerol. Aforar a 1000 ml con agua desionizada.

TABLA 1. Sulfato de amonio (gramos a ser agregados en 1 litro)

De a											
% 1	% 2	5	10	15	20	25	30	35	40	45	
0		27	55	84	113	144	176	208	242	277	
	5		27	56	85	115	146	179	212	246	
		10		28	57	86	117	149	182	216	
			15		28	58	88	119	151	185	
				20		29	59	89	121	154	
					25		29	80	91	123	
						30		30	61	92	
							35		30	62	
								40		31	
									45		
										50	

(Tomado de Scopes R. "Protein purification, principles and practice" Ed. Springer-Verlag, N.Y., U.S.A. 1986 pag.114)

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dixon E.Y. and Webb E., "Enzymes" Ed. Longmans, London, England (1958).
- 2.- Lehninger, Albert L., "Bioquímica" 5a ed., Ed. Omega, Barcelona, España (1972).
- 3.- Vander A.J. and Sherman J., "Fisiología humana" 3a ed., Ed. Mc.Graw-Hill, México (1984).
- 4.- Bowman W.C. and Rand M.J., "Bases bioquímicas y patológicas" 2a ed., Ed. Interamericana, México (1984).
- 5.- Mc.Gilvery R., "Conceptos bioquímicos" Ed. Reverte, España (1972).
- 6.- Haldane J.B., "Enzymes" Ed. Longmans, Green Co. Ltd. London, England (1930).
- 7.- Northrop J.H., Kunitz M. and Herriott R.M., "Crystalline Enzymes" 2nd. ed., Columbia University Press, N.Y. (1948).
- 8.- Schwimmer S., "Advances in enzymology" vol. 14: 375-405 Interscience Publishers, N.Y. U.S.A. (1975).

9. - Scopes R., "Protein purification, principles and practice"
Ed. Springer-Verlag, N.Y., U.S.A. (1986).
10. - "Gel filtration" Theory and Practice. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden (1984).
11. - "A practical guide to Ion Exchange Chromatography", LKB Bromma, Sweden (1984).
12. - "Ion Exchange Chromatography" Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden (1983).
13. - "Affinity Chromatography" Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden (1983)
14. - Wilchick M. and Jakoby W.B., "Methods in enzymology" vol. XXXIV (part B): 3-10, Academic Press. N.Y. U.S.A. (1974).
15. - "Polyacrylamide gel Electrophoresis" Laboratory techniques). Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden (1984).
16. - "SDS and conventional polyacrylamide gel electrophoresis" LKB Bromma, Sweden (1977).
17. - Valentine W. N. and Tanaka K. R., "Methods in enzymology" vol. IX : 468-473, Academic Press. N.Y. U.S.A. (1966).

18. - Kachmar H. and Boyes S., "The potassium activation and calcium inhibition of pyruvic phosphoferasa" J. Biol. Chem. 200: 669-682 (1953).

19. - McQuate J.F. and Ulter M., "Equilibrium and kinetics studies of PK reaction" J. Biol. Chem. 234: 777-780 (1959).

20. - Srivastava L.K. and Baquer N.Z., "Purification and properties of rat brain PK" Arch. of Biochem. and Biophys. 236: 703-713 (1985).

21. - Carminatti H., et. al. "Allosteric properties of skeletal muscle PK" J. Biol. Chem. 241: 7284-7288 (1971).

22. - Flory B.D., et. al. "Kinetics of the activation of rat liver PK by Fructose 1,6-P2 and methods for characterizing hysteretic transitions" Biochem. J. 141: 119-125 (1974).

23. - Bloxham D. and Hopkirk T.J., "Biosynthesis of rat liver PK" Biochem J. 192: 507-516 (1980).

24. - Reynard A.M., et. al. "The correlation of reaction kinetics and substrate binding with the mechanism of PK" J. Biol. Chem. 230: 2277-2283 (1961).

25. - Büchner T. and Pfleiderer G., "Methods in enzymology" vol. I: 435-440, Academic Press: N.Y. U.S.A. (1955).

- 26.- Tietz A. and Ochoa S., "Fluorokinase and pyruvic kinase" Arch. of Biochem. and Biophys. 78: 477-493 (1958).
- 27.- Tietz A. and Ochoa S., "Methods in enzymology" vol. V: 365-369, Academic Press, N.Y. U.S.A. (1962).
- 28.- Bezares G., et. al. "Isolation and sequence determination of an active site peptide of rabbit muscle P.K." Arch. of Biochem. and Biophys. 253: 133-137 (1987).
- 29.- Tanaka T., et. al. "Evidence for the presence of two types of PK in rat liver" Biochem. Biophys. Res. Commu. 21: 55-60 (1965).
- 30.- Flory W. and Koeppe R. "Lack of temperature-sensitivity of rat liver PK" Biochem. J. 133: 391-394 (1973).
- 31.- Flory W., et. al. "Kinetic properties of rat liver PK at cellular concentration of enzyme, substrates and modifiers" Biochem. J. 141: 127-131 (1974).
- 32.- Blair J., Cimbala M. and James A., "Hepatic PK quantitative measurements of phosphorylation in vitro and in the isolated rat hepatocyte" J. Biol. Chem. 257: 7595-7602 (1982).
- 33.- Jacobson K. and Black J., "Conformational differences in the active sites of muscle and erythrocyte PK" J. Biol. Chem. 246: 5504-5509 (1971).

34.- Chern C.J., et. al. "Purification of human erythrocyte PK"
J. Biol. Chem. 267: 7173-7180 (1972).

35.- Audit I., et. al. "PK hyperactivity genetically determined:
metabolic consequences and molecular characterization" Blood, 56: 902-
909 (1980).

36.- Elder E., et. al. "Three PK variants with increased affi-
nity for PEP" Brit. J. Haem. 47: 371-381 (1981).

37.- Miwa S., et. al. "Seven PK variants characterized by the
ICSH recommended methods" Brit. J. Haem. 45: 575-583 (1980).

38.- Edwards R. and Watts D., "Specific spectrophotometric assay
for the M isoenzyme of PK in plasma samples containing mixtures of the
muscle (M) and liver (L) isoenzymes" Clin. Chem. 27: 906-909 (1981).

39.- Hillman R. S. y Finch A. "El eritrocito" Sa. Ed. El Ma-
nual Moderno, México (1987).

40.- Boggs D. R. y Winkelstein A. "El leucocito" Ed. El Ma-
nual Moderno, México (1985).

41.- Takashi Y., Metcalf J. and Frenk S. "Reduced PK activity,
altered growth patterns of ATP in leukocytes and protein caloric malnu-
trition" Am. J. Clin. Nut. 21: 162-166 (1968).

42.- Martinez C. S. "Desnutrición y función inmunológica" Rev. Med. IMSS, 19: 381-386 (1981).

43.- Benneton R., et. al. "Metabolic and enzyme activities of neutrophils in malnutrition" Nut. Rev. 230: 232 (1979).

44.- Silencio J.L. "Evaluación de la actividad de enzimas leucocíticas como indicadores del estado de nutrición (tesis aún sin publicar), Fac. Química (1988).

45.- Jacobson G., et. al. "Purification, catalytic and regulatory properties of Rana ridibunda erythrocyte PK" Comp. Biochem. Physiol. 79: 245-250 (1984).

46.- Plaxton W.C. and Storey K.B., "Purification and properties of aerobic and anoxic forms of PK from red muscle tissue of the channelled whelk of Buccutypus canaliculatum" Eur. J. Biochem. 143: 257-265 (1984).

47.- Flynn I.W. and Bowman I.B., "Purification and characterization of PK from Trypanosoma brucei" Arch. Biochem. and Biophys. 200: 401409 (1980).

48.- Clarke F.M. and Morton D.I., "Glycolytic enzyme binding in fetal brain of bovine" Biochem. and Biophys. Res. Comm. 109: 388-393 (1982).

- 49.- Hunstrey J.R. and Suelter C.H. "Purification and some properties yeast PK" J. Biol. Chem. 297: 4815-4818 (1969).
- 50.- Harkins J. C., et. al. "A comparison of the structure and activity of cat and trout muscle PK" Eur. J. Biochem. 136: 341-346 (1983).
- 51.- Morse A. and Behrisch H., "Regulation of enzyme activity in the hibernator. A kinetic and spectroscopic study of muscle PK from the Arctic ground squirrel" Can. J. Biochem. 59: 762-769 (1974).
- 52.- Waygood E. and Sanwal B., "The control of PK of E. coli " J. Biol. Chem. 249: 265-274 (1974).
- 53.- Nagao Y., et. al. "Difference in physical and chemical properties between muscle type and spleen type isoenzymes of PK in rat" Biochem. Biophys. Res. Comm. 104: 713-719 (1982).
- 54.- "Blue sepharose Cl-6B for affinity chromatographic" Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden (1976).
- 55.- Gordon H. "Electroforésis de proteínas en geles de PMA y de almidón" Serie: Técnicas de laboratorio en Biología Molecular y Bioquímica. Ed. El Manual Moderno. México (1975).
- 56.- "Ficoll-Paque for in vitro isolation of lymphocytes and leukocytes PMN" Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Sweden (1983).

57.- Ferdinand W. "The enzyme molecule" . Ed. England, London, England (1976).

58.- Pecsok R. "Métodos modernos de análisis químico" Ed. Linmar, México (1973).

59.- Marchand J. and Leroux J., "The energy metabolism of human blood PMN cells" Exp. J. Biochem. 31: 483-495 (1972).