

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y ESTUDIOS ELECTROFORETICOS
DE LA ENZIMA FOSFOGLUCOISOMERASA DEL
INSECTO Ceroplastes albolineatus

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE:
QUIMICO
PRESENTA
MARIA GUADALUPE GUERRA SANCHEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS. Tesis
ADQ. 1975
FECHA
PROC. H.C. 752



QUINICA

JURADO:

Presidente: Dr Alfonso Romo de Vivar

Vocal : Dra . Guadalupe Velez Pratt

Secretario : Dr. Alejandro Blanco Labra

1er Suplente: Dr Francisco Bolívar _

Zapata .

2o. Suplente: Dr Alfredo Ortega Hernández

Esta Tesis fué realizada en el departamento
de Bioquímica del Instituto de Química de la
Universidad Nacional Autónoma de México,
bajo la supervisión del Dr. Barbarín Arreguín.

Sustentante: María Guadalupe Guerra Sánchez

Asesor del tema: Dr Alejandro Blanco Labra

Supervisor técnico: Dr. Barbarín Arreguín.

10/11/11
Attestación de:
Dr. Barbarín Arreguín

I N D I C E

	Pág.
PROLOGO	1
INTRODUCCION	3
GENERALIDADES	5
METODOS Y MATERIALES	18
RESULTADOS	29
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFIA	44

PROLOGO

Ceroplastes albolineatus, perteneciente a la familia Coccidae, es un insecto que parasita el árbol conocido como "palo loco" o "candelero" (*Senecio praecox*). Este vegetal se localiza en toda la parte baja del Pedregal de San Angel de la Ciudad de México, y en algunas partes de la zona central de la República Mexicana (1). Se ha encontrado que insectos pertenecientes a esta familia, infestan por lo general árboles cítricos (2, 3).

La infestación de los árboles por el insecto, se presenta preferentemente durante los meses de mayo y diciembre, en los cuales el insecto alcanza su madurez. La hembra, que parasita el árbol, incrusta su probosis en la corteza del mismo, para así obtener sus nutrientes de la savia del árbol, constituida fundamentalmente por carbohidratos, en la que la sacarosa ocupa un lugar predominante.

Este insecto se caracteriza por presentar como producto de excreción, un material blanco ceroso que lo cubre completamente. Estudios realizados sobre este material (Ríos 1965), han demostrado que por saponificación se obtienen ácidos alifáticos de C_{28} , C_{30} y C_{32} , y alcoholes sesterterpénicos, moléculas de naturaleza terpenoide de 25 átomos de carbono (4, 5). Así mismo, del insecto se extrajo un pigmento de estructura antraquinoida (6), que le confiere gran tonalidad rojiza, llamado ácido ceroalbolínico (Ríos 1966).

La presencia de moléculas de gran contenido de carbono encontradas en el insecto, y el hecho de tener como base nutricio-

nal a los azúcares, sugiere la existencia de un ciclo glucolítico activo, dirigido a la formación de un compuesto de suma importancia en la integración del metabolismo: el Acetil-CoA, precursor no solo de ácidos grasos y esteroides, sino también de muchos otros compuestos que se encuentran en la naturaleza, como los terpenos y acetogeninas (7).

Este hecho, motivó el estudio de la degradación de los carbohidratos in vitro, a través de glucólisis anaeróbica, que consiste en una secuencia de reacciones catalizadas por enzimas ya conocidas. Como primer paso, iniciamos el análisis sobre actividades enzimáticas relacionadas con este ciclo.

Encontramos que entre las enzimas que fueron objeto de estudio, la que mayor actividad presentó fué la fosfoglucoisomerasa. Por tal motivo realizamos el presente trabajo, que tiene por objeto su purificación.

INTRODUCCION

Es ampliamente conocido que los carbohidratos son parte importante en la dieta de la mayoría de los organismos, a partir de los cuales obtienen energía para su mantenimiento. Las vías degradativas más importantes conocidas hasta ahora en condiciones anaeróbicas, son el ciclo glucolítico y el de las pentosas.

El establecimiento de las reacciones glucolíticas fué iniciada a partir de los resultados obtenidos en extractos de levaduras por los esposos Buchner (1897), desarrollándose notablemente con las aportaciones realizadas por investigadores como Embden, Meyerhoff, Harden y Young, Parnas, Cori, etc., por lo que se conoce también a este ciclo como secuencia Embden-Meyerhoff-Parnas.

A través de toda la ruta glucolítica se presenta la acción consecutiva de once enzimas, la mayoría de las cuales han sido cristalizadas y ampliamente estudiadas (7). Se extraen fácilmente de las células pues se consideran localizadas en la porción soluble del citoplasma, aunque algunas de ellas se han encontrado asociadas a elementos estructurales del extracto celular (8).

Los pasos más importantes de la ruta son aproximadamente los mismos para casi todas las formas de vida. Sin embargo, las diferencias en las velocidades de actividad entre enzimas que catalizan una misma reacción, se manifiestan en tejidos de un mismo organismo. Así, se tiene que en mamíferos, enzimas como la fosfoglucoisomerasa, triosa-fosfatoisomerasa, enolasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa, son más activas en músculo esquelético que en corazón (9).

De igual forma, estas diferencias en velocidades de actividad, han sido encontradas en tejidos de insectos (Chefurka 1958), lo que sugieren algunos autores, que este hecho contribuya en parte, al control de esta ruta metabólica y diferenciación en la escala evolutiva (10, 11).

De los once pasos que tienen lugar en la glucólisis anaeróbica, es de apreciarse la conversión reversible de la glucosa-6-P a fructosa-6-P, realizada por la enzima fosfoglucoisomerasa, de importancia en la regulación del metabolismo de la glucosa, por su posición estratégica hacia rutas metabólicas alternas. Esta enzima ha sido estudiada extensamente en tejidos de mamíferos, de los cuales se ha extraído en alto grado de pureza. Nos hemos interesado en esta enzima, y hemos establecido su presencia en el *Ceroplastes albolineatus*, realizando estudios sobre ella como inicio hacia el esclarecimiento de esta ruta metabólica en el insecto.

El desarrollo de esta tesis muestra la manera en que aislamos la enzima fosfoglucoisomerasa a partir del material celular del insecto, utilizando técnicas por cromatografía en gel y electroforesis.

GENERALIDADES

El mecanismo mediante el cual muchos organismos extraen energía química del azúcar más común, la glucosa, en ausencia de oxígeno, es conocida como fermentación. A través de todo el proceso, se libera energía que es conservada en el enlace químico del ATP*. Los tipos de fermentación más conocidos son:

- 1) Glucólisis.
- 2) Fermentación alcohólica.

Ambas presentan el mismo mecanismo en la conservación de energía, y difieren únicamente en las etapas finales:

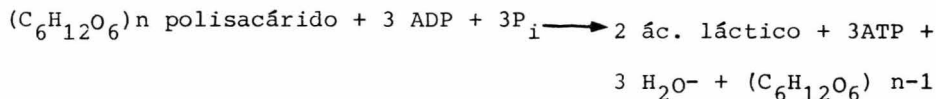
Glucólisis:

a) a partir de glucosa:



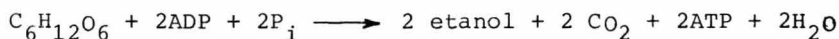
con 31% de eficiencia.

b) a partir de glucógeno:



con 43% de eficiencia.

Fermentación alcohólica:



con 29% de eficiencia en la conservación de la energía.

Durante el proceso glucolítico, se presenta la acción catalítica de un grupo de once enzimas, la mayor parte de las cuales han

* ATP: Adenosín trifosfato

ADP: Adenosín difosfato

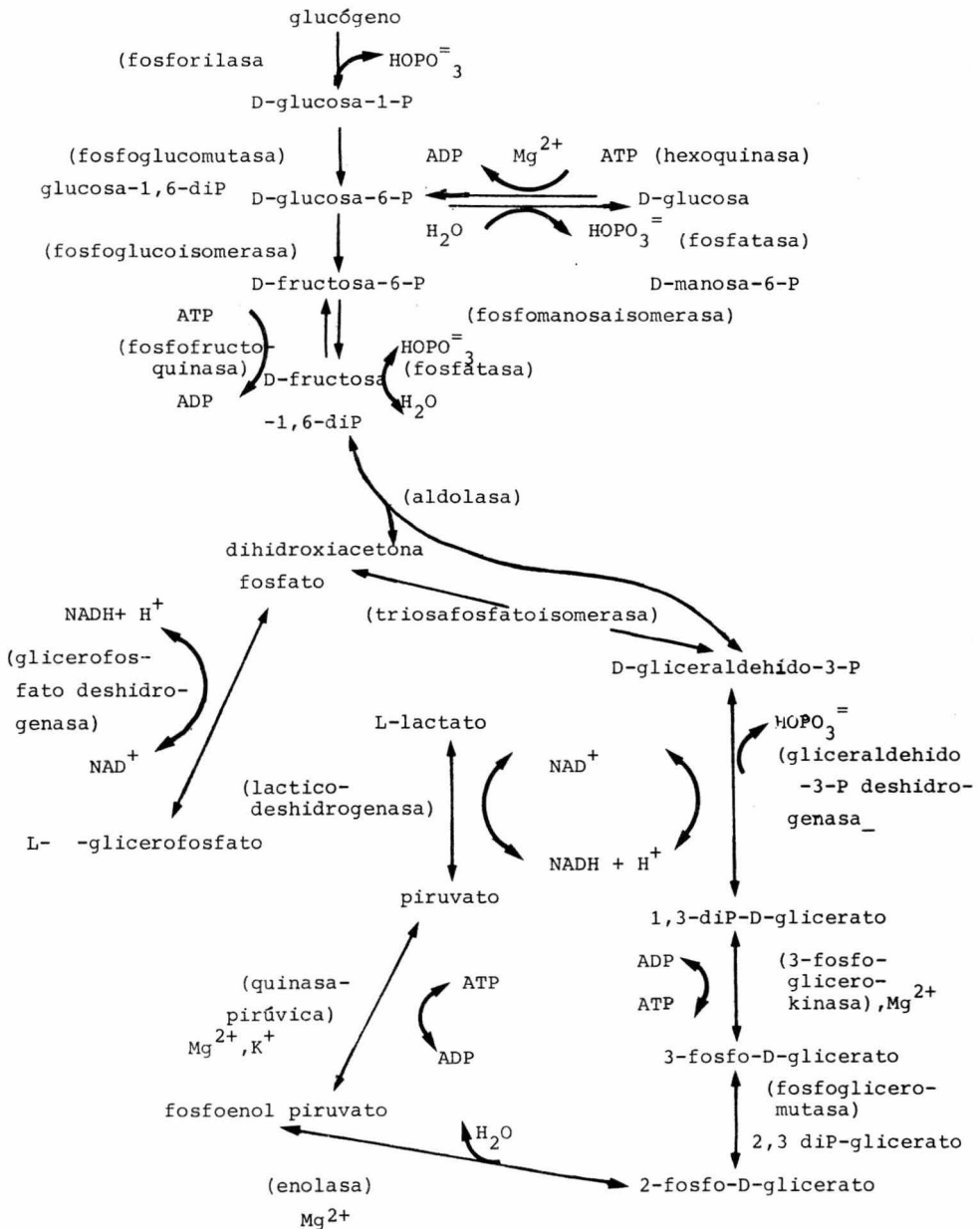


Fig. 1. Secuencia Embden-Meyerhoff-Parnás en tejidos animales.

sido cristalizadas y exhaustivamente estudiadas (Fig. 1). Este proceso es conocido también como Secuencia Embden-Meyerhoff-Parnas, debido a las contribuciones de estos investigadores al conocimiento de las reacciones individuales.

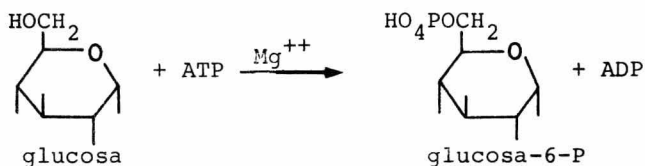
Aún cuando la glucólisis anaeróbica es similar en todos los organismos, la producción de ácido láctico depende de las necesidades presentes. Para algunos organismos, la degradación de los carbohidratos ofrece una eficiencia máxima, cuando son integrados a un proceso aeróbico. Esto se logra por la conversión del piruvato, metabolito precursor del ácido láctico, a Acetil-CoA y su incorporación al ciclo de los ácidos tricarbónicos y cadena de transporte de electrones, lo que trae como consecuencia un aumento de energía para la célula. En la glucólisis se presentan dos fases:

Fase I: reacciones que involucran la escisión de la glucosa a un compuesto de tres átomos de carbono (fosfato de gliceraldehído).

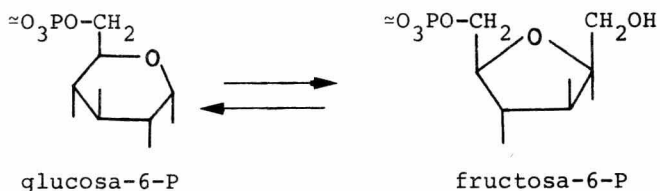
Fase II: reacciones de óxido-reducción, formación de ATP y consiguiente producción de lactato.

Prácticamente, el proceso glucolítico, del cual se conoce más, es en músculo esquelético; se inicia con el transporte de la glucosa a través de la membrana celular, lo que hace suponer un mecanismo de transporte de la glucosa a través de la membrana celular, lo que hace suponer un mecanismo de transporte específico hasta ahora desconocido (9). La primera reacción intracelular, es la conversión a glucosa-6-P, en presencia de

ATP, catalizado por la enzima hexoquinasa (inicio de Fase I):

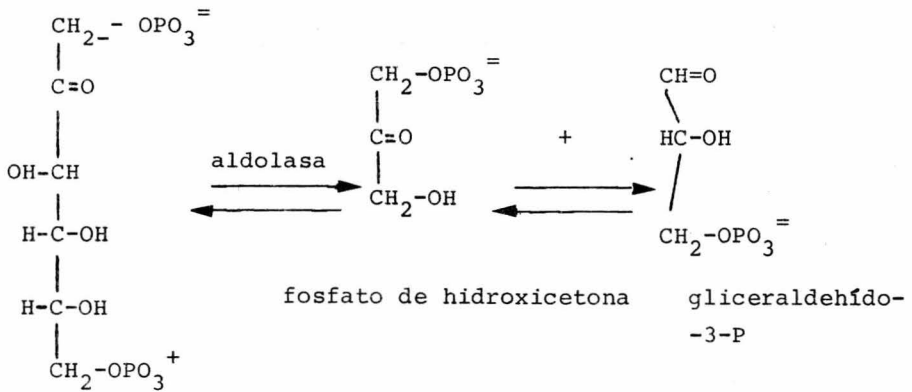


Esta reacción garantiza que los intermediarios de la glucólisis sean fosforilados y queden restringidos dentro del compartimiento citoplásmico, donde las enzimas glucolíticas están localizadas. La glucosa-6-P es convertida seguidamente a fructosa-6-P, por la acción de la glucosa fosfato isomerasa:



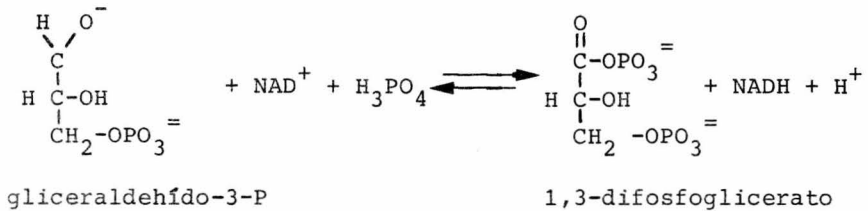
La fructosa-6-P, es posteriormente fosforilada con ATP, por la fosfofructo quinasa, para dar lugar la formación de la fructosa-1,6-diP y ADP.

En la siguiente reacción, se produce un rompimiento aldólico entre el tercer y cuarto átomo de carbono, dando lugar la formación de dos moléculas de triosa fosfato, las que son mantenidas en equilibrio por la acción de la enzima triosafosfato isomerasa. La escisión de la fructosa-1,6-difosfato, es realizada por la enzima aldolasa:

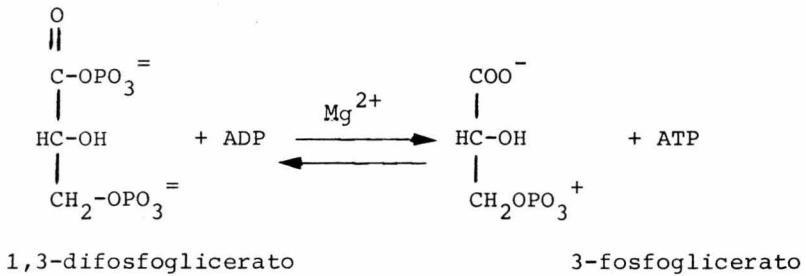


fructosa-1,6- diP

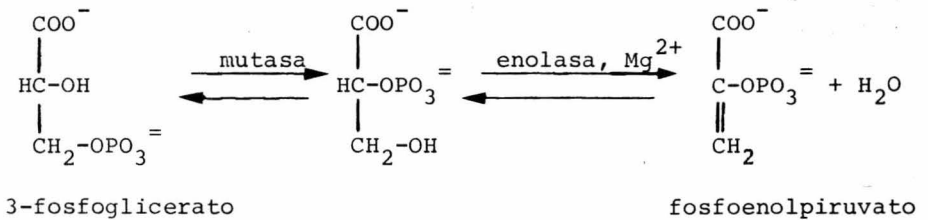
A partir de este momento, se inician las reacciones de óxido-reducción (Fase II), al ser oxidado el gliceraldehído-3-P a fosfoglicerato por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. La reacción global catalizada por esta enzima es:



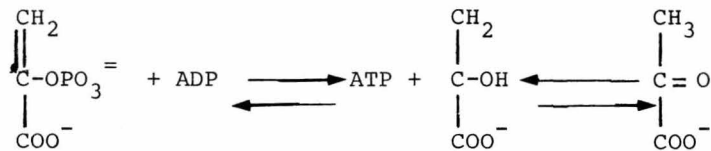
En esta reacción, el grupo aldehído oxida para formar un enlace anhídrido, con el fosfato generándose un enlace rico en energía. Otro componente importante en esta reacción, es el agente oxidante, el NAD (Nicotín adenín dinucleótido), de gran importancia en el transporte de electrones, el cual se reduce a NADH. La reacción siguiente, es la transferencia del grupo fosfato por la fosfoglicerato quinasa al ADP, para formar ATP y 3-fosfoglicerato.



El producto de esta oxidación, el 3-fosfoglicerato es convertido a fosfoenolpiruvato por la acción consecutiva de la mutasa y enolasa:

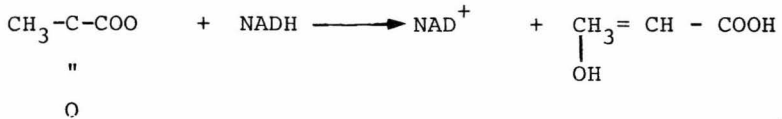


Finalmente, el fosfato rico en energía del enolpiruvato, es transferido al ADP, con la consiguiente formación de ATP y piruvato. Posiblemente, el producto final de la piruvato quinasa es el enol piruvato, pero éste es rápidamente convertido a una forma ceto más estable:



En la reducción del NAD^+ catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, se requiere que el NADH producido, sea oxidado con la misma rapidez con que se realiza la glucólisis.

En músculos esqueléticos, bajo condiciones anaeróbicas, esta oxidación es efectuada por la acción de la lactato deshidrogenasa al actuar sobre el piruvato, para la formación del ácido láctico (fin de Fase II):



Regeneración del NADH glucolítico en músculos de insectos.

Los músculos esqueléticos, al contraerse, obtienen la mayor parte de la energía de la glucólisis anaeróbica. Consecuentemente, la conversión del piruvato a lactato es más importante en estos músculos, a diferencia de los que constituyen órganos como el corazón, hígado y los de insectos voladores, considerados de carácter más aeróbico por presentar mayor actividad enzimática para el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y cadena de transporte de electrones de la mitocondria (9). En estos músculos, el piruvato se oxida dentro de la mitocondria y por consiguiente no participa en la oxidación del NADH glucolítico:



Esto sugiere la existencia de otra ruta para la oxidación del NADH glucolítico, en estos tejidos, que resulte más efectiva. En sistemas aeróbicos, la cadena de transporte de electrones de mitocondria, presenta un medio adecuado para la oxidación del NADH glucolítico. Sin embargo, la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna al piridín nucleótido, presenta un grave problema. Es necesario la existencia de un mecanismo eficaz pa-

ra el transporte de compuestos reductores o equivalentes que funcionen del citoplasma a la mitocondria. En tejidos de insectos voladores, se ha encontrado que esto que se logra por un proceso conocido como el ciclo del glicerol-1-P o lanzadera del glicerofosfato, con el mecanismo que se muestra a continuación:

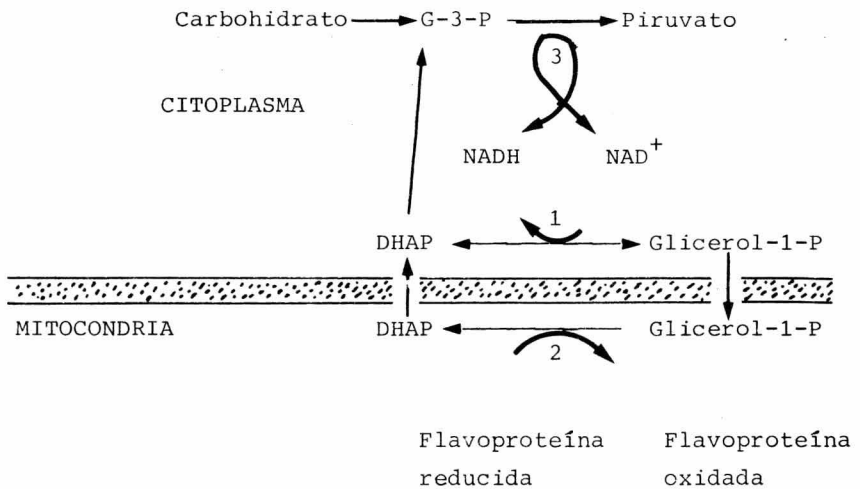


Fig. 2. Ciclo del glicerol-1-P. (1) glicerol-1-fosfato deshidrogenasa citoplásmica. (2) glicerol-1-fosfato deshidrogenasa mitocondrial. (3) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. G-3-P corresponde al gliceraldehído-3-P. El DHAP es la dihidroxiacetona fosfato.

En el citoplasma, la enzima glicerol-1-fosfato deshidrogenasa, cataliza la conversión de la dihidroxiacetona fosfato y NADH, a NAD⁺ y glicerol-1-P. Este entra a la mitocondria donde se oxida a dihidroxiacetona fosfato, por acción de la glicerofosfato deshidrogenasa mitocondrial (una enzima flavoprotéica) y de esta forma la dihidroxiacetona fosfato va de la mitocondria

al citoplasma, realizando un ciclo completo.

El ciclo del glicerol-1-P debe ser irreversible, con el fin de evitar dos pozas de piridín nucleótido; esta irreversibilidad es mantenida por la glicerol-1-fosfato mitocondrial. La energía liberada en la mitoncria no es conservada en moléculas de ATP, sino que es cedida como calor, de tal manera se asegura el carácter reversible de la reacción y la del ciclo como un todo. En músculos esqueléticos, la actividad de la glicerol-1-fosfato deshidrogenasa es muy baja comparada a la encontrada en músculos de insectos voladores (10), por lo que el ciclo del glicerol-1-P no presenta gran importancia cuantitativa para la oxidación del NADH glucolítico. En estos tejidos, se le atribuye a la malato oxaloacetato el realizar funciones similares al ciclo del glicerol-1-fosfato, conocido como la lanzadera del malato, de carácter irreversible (7).

Relación en la obtención de energía entre la glucolisis y el ciclo de los ácidos tricarbónicos.

La glucolisis anaeróbica en músculo esquelético, obtiene un total de energía de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa transformada. Sin embargo, en la mayoría de las situaciones anaeróbicas que ocurren fisiológicamente en el músculo, el sustrato para la glucolisis, es el glucógeno endógeno, produce tres moléculas de ATP por residuo de glucosa.

En condiciones aeróbicas, la oxidación completa de la glucosa a CO_2 y agua, produce 34 moléculas de ATP por residuo de glucosa (ó 38 si la oxidación mitocondrial del NADH glucolítico es to-

mado en cuenta). Por consiguiente, el metabolismo aeróbico es al menos diez veces más eficiente que el anaeróbico, en términos de la producción de energía por residuo de glucosa. De aquí que se presume que los insectos formen una clase altamente especializada que obtienen gran cantidad de energía mediante mecanismos con mayor carácter oxidativo (11).

CONTROL DE LA GLUCOLISIS.

En la célula, el control de la glucólisis es necesario con el fin de asegurar que los carbohidratos no sean degradados rápidamente, y que esto sólo suceda cuando el requerimiento de energía se presente.

Las necesidades energéticas varían de un organismo a otro, e inclusive de tejido a tejido. En el estudio del control de la glucólisis, se encuentran enzimas que catalizan reacciones cercanas o alejadas del equilibrio, siendo éstas últimas las que se consideran de mayor carácter regulatorio. Al primer tipo pertenecen enzimas como la fosfogluco isomerasa, fosfoglicero mutasa, enolasa, etc., en las que se encuentra gran actividad enzimática, mientras que la hexoquinasa, fosfofructoquinasa, y piruvato quinasa, presentan gran carácter regulatorio y menor actividad (9).

El estudio de las reacciones particulares del ciclo de la glucólisis anaeróbica, tanto de las consideradas como reguladoras y las que aparentemente se presentan en equilibrio, ha sido desarrollado ampliamente en tejido de mamíferos, y ha llamado considerablemente la atención las diferencias en actividades enzimáticas que presentan estas enzimas en tejidos de insecto (12).

Es de nuestro interés, enfocar la atención sobre la enzima fosfogluco isomerasa que aislamos del insecto *C. albolineatus*, y para ello damos a continuación una breve información sobre esta enzima en tejido de mamífero:

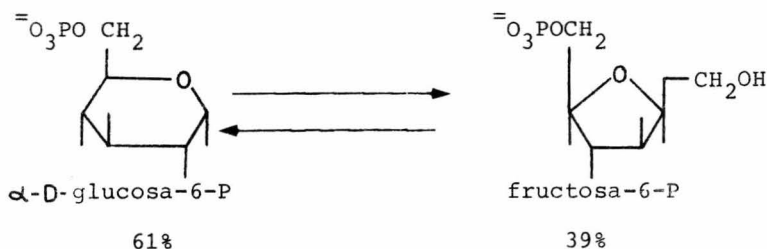
Esta enzima realiza la conversión de la glucosa-6-P a fructosa-6-P. Fué descubierta en 1933 por Lohmann al realizar estudios sobre músculo humano. Recibe el nombre de fosfohexosa isomerasa, pero su nomenclatura abarca distintas acepciones:

Nombre sistemático: D-glucosafosfocetol isomerasa

Nombre trivial: Glucosa fosfato isomerasa

Otros nombres no recomendables: Fosfohexosaisomerasa, oxoisomerasa (8).

En la mayoría de las preparaciones, la isomerización alcanza el equilibrio cuando el 39% del éster total es fructosa-6-P y el 61% es glucosa-6-P:

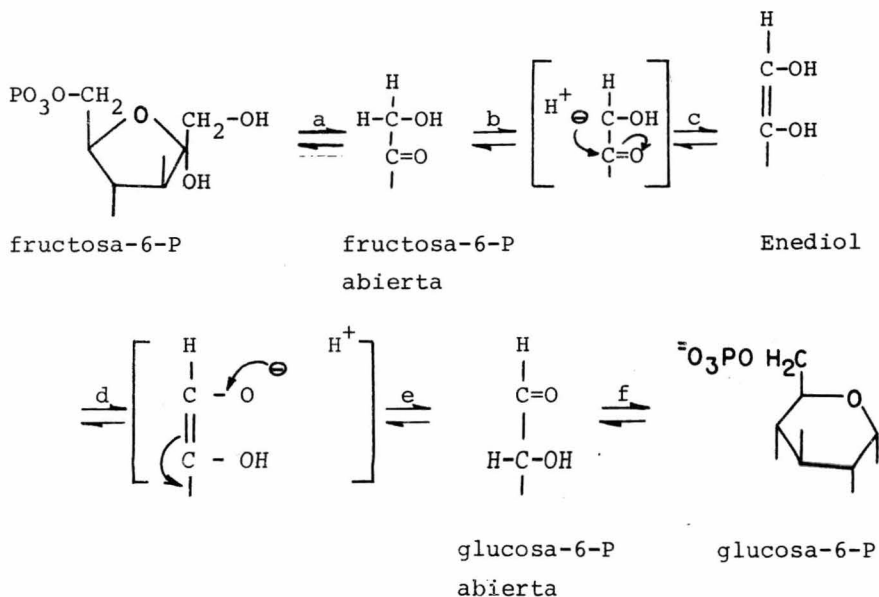


Ha sido preparada en alto grado de pureza de músculo de conejo (13), glándulas mamarias de bovino, levaduras, heritrocito humano, etc., e identificada en insectos como la cucaracha *Periplaneta americana* (Chefurka 1954) con porcentajes de isomerización muy cercanas a las presentadas por esta enzima proveniente de vertebrado (10).

Generalmente la fosfoglucoisomerasa de músculo de mamífero, se encuentra contaminada con la fosfomanosa isomerasa, la cual permite a la manosa-6-P entrar en la secuencia glucolítica. En algunos insectos, se encuentra con pequeño grado de actividad (12).

El mecanismo de acción para la fosfoglucoisomerasa, ha sido elucidado por Topper y Rose (14, 15), con la ayuda de D_2O aprovechando la reversibilidad de la reacción, en la cual se involucra la formación de un cis enediol intermediario. Cuando la fructosa-6-P se unclufa con agua deuterada, en presencia de la enzima, el producto de la reacción: glucosa-6-P, contenía un átomo de deuterio directamente unido al C_1 . Al hacer la osazona de este producto, se perdía el deuterio que debería corresponder al C_2 .

El mecanismo propuesto es el siguiente:



La reacción de la fosfoglucoisomerasa no requiere cofactores y es inhibida competitivamente por algunos azúcares fosfatados, tales como el 6-fosfogluconato, sorbitol-6-P y eritrosa-4-P (13). Otro de los inhibidores es el 2-desoxi-D-glucosa-6-P, el cual es formado por el correspondiente desoxiazúcar en presencia de hexoquinasa.

Los estudios electroforéticos e inmunológicos demuestran que presenta una sólo forma molecular. Su peso molecular ha sido estimado por el método de equilibrio de sedimentación, el cual corresponde a 125 000 daltons. Actualmente se ha encontrado que esta enzima proveniente de levadura presenta dos formas de cristalización (16).

Los datos reportados sobre esta enzima, obtenidos de distintas fuentes, indican que su velocidad inicial máxima de actividad es alcanzada a un pH cercano a 8, pero el valor exacto depende del substrato utilizado (17). La actividad decrece a pH de 6.5 o si éste aumenta hasta 10. La enzima es estable a temperaturas bajo cero (°C) y a pH entre 7 y 8 (18).

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

El insecto Ceroplastes albolineatus fué colectado en los terrenos del pedregal de San Angel cercano a la Ciudad Universitaria, incluyéndose la cera que los cubría. Se recolectaron cerca de 1163 g. colocándose de inmediato en recipientes enfriados con hielo.

En los experimentos de actividades enzimáticas se utilizaron dos enzimas acoplantes: la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y hexoquinasa. En los realizados para análisis electroforéticos se utilizó fosfoglucoisomerasa de músculo de conejo, albúmina y tripsina como proteínas patrones, que fueron obtenidas de muestras comerciales de Sigma Chem. Co. y Bohering Chem. El NADP y ATP utilizados en las reacciones enzimáticas y el resto de los reactivos, fueron todos de alta pureza química.

Todos los pasos para la purificación de la enzima se efectuaron entre 0° y 4°C, y los relacionados con pruebas electroforéticas, actividad enzimática y cantidad de proteína, se hicieron por duplicado.

METODOS

1. EXTRACCION.

Los insectos fueron homogeneizados en una licuadora Ultraturrax durante 5 min., con 300 ml de una solución de sacarosa 0.25 M y el homogenado se filtró a través de una gasa doblada cuatro veces, descartándose los residuos. El filtrado se centrifugó a 4,600 g durante 15 min. en Ultracentrífuga Beckman L-2 RV. El sobrenadante obtenido, se filtró de nuevo por gasa doblada, centrifugándose de nuevo a 78,480 xg. El primero y segundo sedimento de ambas centrifugaciones fueron descartados. Al sobrenadante final se le midió el pH (5) y se concentró por liofilización. Posteriormente se dializó contra cuatro litros de buffer de fosfatos de sodio 0.02 M (pH 6.2) a flujo continuo de 5 ml/min. (19). Una vez dializado, se determinó cantidad de proteína y se liofilizó hasta sequedad. A este producto seco, se le denominó EXTRACTO CRUDO (fig. 3).

Todos los análisis de proteína fueron realizados por el método de Lowry y col. (20).

2. IDENTIFICACIONES ENZIMATICAS.

Se realizó una exploración cualitativa para algunas enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos en el Extracto Crudo. Las enzimas a identificar fueron: hexoquinasa, invertasa, fosfogluco isomerasa y fosfomanosa isomerasa.

Para las identificaciones de las tres primeras enzimas, se utilizó un sistema acoplado a la enzima glucosa-6-fosfato deshi-

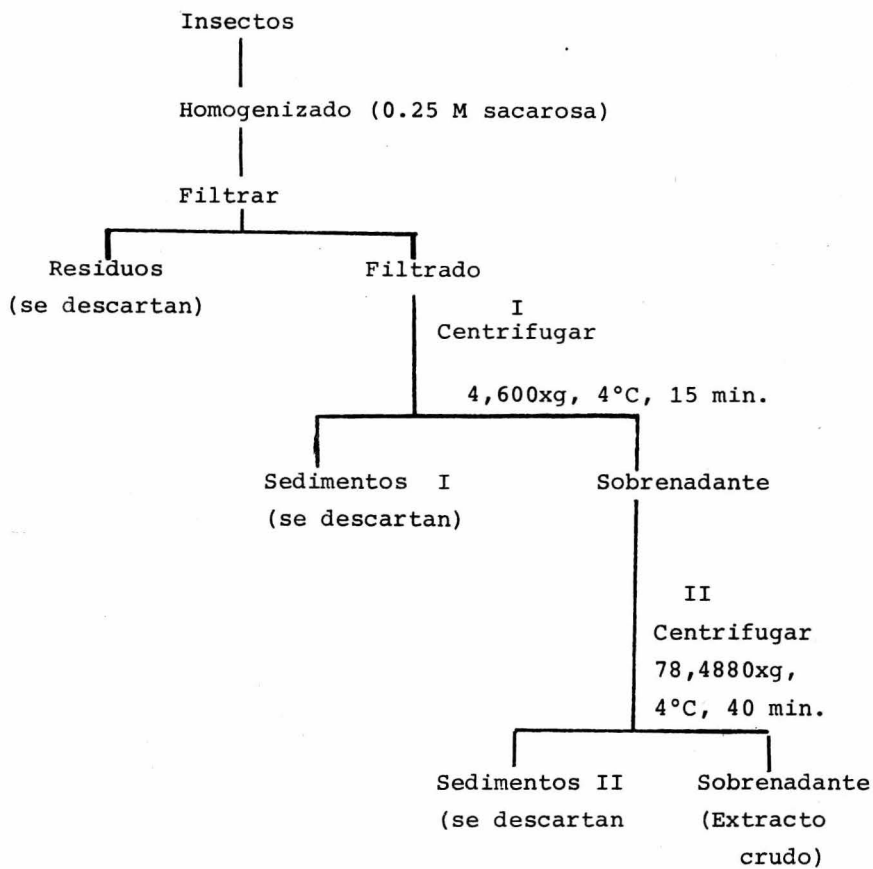
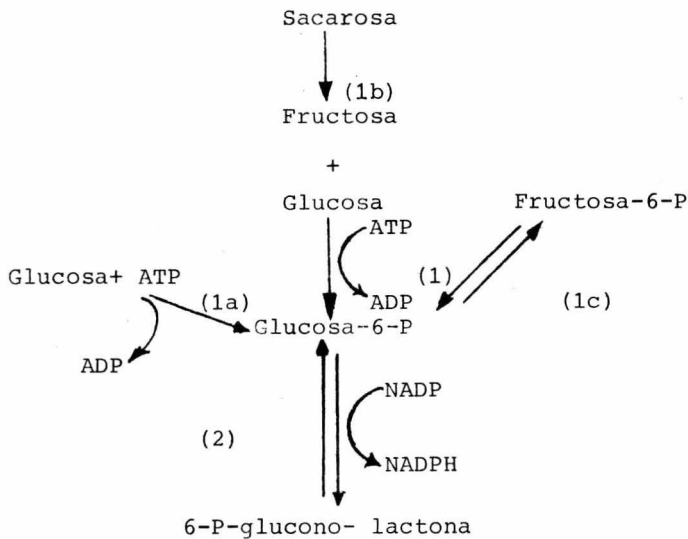


FIG. 3. Esquema de extracción de la porción soluble del insecto C. albolineatus.

drogenasa, adicionada en exceso, con el fin de transformar rápidamente toda la glucosa-6-P producida por la actividad de estas enzimas, hacia la correspondiente 6-P-glucono-δlactona, dando origen a la formación de NADPH- que puede ser determinada cuantitativamente por la absorción que presenta a 340 nm. A continuación se indican los sistemas de acoplamiento utilizados en el análisis enzimático del extracto crudo. Los números encerrados en círculos, corresponden a las enzimas que catalizan cada reacción:



1. Hexoquinasa comercial acoplante.
- 1a. Hexoquinasa de extracto crudo.
- 1b. Invertasa de extracto crudo.
- 1c. Fosfogluco isomerasa de extracto crudo.
2. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa comercial acoplante.

Para el análisis de invertasa, utilizamos hexoquinasa comercial como una enzima acoplante más, con el fin de aumentar

la actividad de la hexoquinasa proveniente del extracto crudo. En todas las determinaciones realizadas se mantuvieron constantes las concentraciones de enzima acoplante, extracto crudo, NADP, y los substratos correspondientes: (glucosa, sacarosa, y fructosa-6-P) utilizándose un buffer de fosfatos de sodio 0.05 M (pH 7.0).

Las incubaciones enzimáticas se realizaron de la siguiente manera:

Para hexoquinasa se tomaron 0.5 ml de cada una de las siguientes soluciones:

Glucosa 0.05 M, glucosa-6-P deshidrogenasa (10 mg/ml), ATP (10 mg/ml), NADP (2 mg/ml), $MgCl_2$ (0.01 M), buffer de fosfatos (0.05 M pH de 7.0), extracto crudo (10 mg/ml).

Para invertasa se tomaron 0.5 ml de cada una de las soluciones que mencionamos a continuación:

Sacarosa 0.5 M, glucosa-6-P deshidrogenasa, $MgCl_2$ (0.01 M), buffer de fosfatos, ATP, NADP y extracto crudo se tomaron en las mismas condiciones que en la incubación anterior. La hexoquinasa adicionada se tomó de una solución stock que contenía 10 mg/ml.

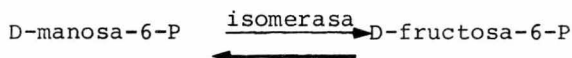
La incubación para fosfoglucoisomerasa contenía los siguientes materiales:

Buffer de fosfatos (pH 7.0 0.05 M) 1.0 ml, fructosa-6-P 1.0 ml, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (10 mg/ml) 0.5 ml, NADP (2 mg/ml) 0.5 ml, $MgCl_2$ (0.01 M) 0.5 ml, extracto crudo (10 mg/ml) 0.5 ml.

La actividad específica quedó definida como la cantidad de enzima que originaba la conversión de un micromol de substrato por minuto bajo las condiciones expuestas. Esta quedó expresada en términos de unidades de enzima/mg de proteína (18).

Análisis para presencia de fosfomanosa isomerasa.

El método se basa en la determinación colorimétrica de D-fructosa formada a partir de D-manosa (13).



La identificación de la fructosa-6-P formada se realiza mediante el método de Roe (21), que consiste en la deshidratación de la fructosa con HCl, desarrollándose un color rojo cereza que se logra en presencia de resorcinol alcohólico. El alcohol en este caso, se utiliza como disolvente del compuesto rojo formado.

La actividad específica se definió como la cantidad de enzima que causa la conversión de 1 μmol de manosa a fructosa por minuto bajo las condiciones descritas. La actividad específica es expresada en términos de unidades por miligramo de proteína.

3. ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA.

Para el análisis electroforético de las proteínas obtenidas en el desarrollo de este trabajo, se utilizaron geles de acrilamida al 5%, haciéndose las determinaciones considerando:

- 1) Los efectos de carga de la proteína y
- 2) el tamaño o peso molecular de las mismas.

1). Electroforesis por carga.

Esta se realizó en medio básico a pH 8.2 con el fin de obtener una carga negativa neta en la proteína. Los geles se prepararon de la manera siguiente:

Materiales:

a) Acrilamida 30 g.

N,N' metilénbisacrilamida 1 g

Agua 150 ml

b) N,N,N'N' tetrametiléndiamina diluído al 0.01%

c) Persulfato de amonio al 0.14%

d) Buffer tris-glicina 0.5 M pH 8.4

Se mezclaron las soluciones en el siguiente orden y proporción:

solución : a) 6 ml

b) 3 ml

c) 12 ml

d) 3 ml

Se llenaron los tubos de electroforesis (7 mm de diámetro por 75 mm de largo), hasta tres cuartas partes de su volumen, adicionándoles una o dos gotas de agua sobre la superficie de la mezcla en vías de polimerización, para evitar la formación del menisco. Una vez montadas las columnas conteniendo el gel, en el aparato de electroforesis, se aplicó la muestra mezclada previamente con una solución de sacarosa, con el fin de evitar la difusión de la proteína. El buffer para electroforesis, fué el mismo que se utilizó en la preparación de los geles, pero diluído a una molaridad final de 0.001 M. Con el fin de seguir el curso de la electroforesis, se adicionó a la muestra

cerca de 5 μ l de azul de bromo fenol al 0.05%. Una vez terminada la electroforesis se procedió a teñir los geles extrayéndolos primero, mediante el uso de una jeringa hipodérmica y colocándolos en tubos de ensaye con amido negro al 1% en solución acética al 4% -etanol al 10%, durante 15 minutos. Posteriormente se destiñeron con ácido acético al 4% por electroforesis, y se conservaron los geles en tubos de ensayo conteniendo esta solución.

2). Electroforesis por peso molecular.

Se siguió el método recomendado por Dunker y Ruecket (22) en el que se carga a la proteína negativamente al formarse un complejo micelar con el dodecil sulfato de sodio (SDS), utilizándose en la electroforesis un buffer de pH 7.2. Los geles fueron preparados siguiendo las indicaciones anteriores; excepto el buffer que fué de fosfatos de sodio pH 7.0 (0.1 M) en un volumen de 20 ml, y 0.1 ml de solución de SDS al 20%. Las muestras por analizar se incubaron con una cantidad igual de urea 8 M (100 μ l), 0.05 ml de una solución de SDS al 20% y 0.01 ml de β -mercaptoetanol, durante 30 minutos a 45°C. La tinción se hizo con amido negro en las mismas condiciones anteriores, y los geles se destiñeron dializándolos contra una solución acética al 7% durante toda la noche.

4. CROMATOGRAFIA EN GEL DE SEPHADEX.

El primer paso de purificación en el extracto crudo, consistió en pasarlo por una columna de gel. En esta ocasión se utilizó Sephadex G-75, el cual se dejó hinchar en solución de fosfato de sodio 0.01 M pH 6.2 durante 24 horas.

Se montó en una columna provista de camisa refrigerante, de las siguientes dimensiones: 2.5 x 75 cm, y con un volumen de cama de sephadex de 206 ml. El volumen de elución de la columna se determinó con la ayuda de dextrana azul al 2% obteniéndose un volumen de 51 ml, a una velocidad de flujo de 3.4 ml/min.

Una vez estabilizada la columna con buffer de fosfato de sodio 0.01 M (pH 6.2), se aplicaron 350 mg de extracto crudo, empleando para el desarrollo de la cromatografía el mismo buffer estabilizador. La elución de la proteína fué seguida por la absorción a 280 nm. Se determinó la cantidad de proteína por método de Lowry a cada una de las fracciones eluidas, así como su actividad enzimática para fosfoglucoisomerasa, en las mismas condiciones que para el extracto crudo. Una vez realizadas estas determinaciones, que se dializaron y liofilizaron a sequedad.

5. CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHADEX.

La fracción con máxima actividad para fosfoglucoisomerasa, se sometió a purificación con el propósito de aislar la enzima, usándose ahora una columna de DEAE-Sephadex A-50; este material posee una matriz de dextranas entrecruzadas que contienen una red tridimensional de polisacáridos a los cuales están unidos los grupos funcionales por enlaces tipo éster. Esta resina intercambiadora es de carácter débilmente básico con el grupo funcional dietilaminoetil ($-C_2H_4N^+(C_2H_5)_2H$).

La columna (35 x 1 cm) presentó una velocidad de flujo de 4.2 ml/hr y fué estabilizada con buffer de fosfato de sodio 0.02 M

(pH 6.2).

Se aplicaron 239 mg de proteína y la cromatografía se desarrolló con un gradiente creciente de buffer de fosfatos de sodio (pH 6.2) desde 0.001 hasta 0.4 M, colectándose en fracciones de 2.1 ml. La elución de la proteína fué seguida por la absorción a 280 nm.

Una vez realizada la cromatografía, se determinó actividad para fosfoglucoisomerasa en las fracciones eluidas, con el método utilizado para el extracto crudo. Posteriormente fueron dializadas contra el mismo buffer de cromatografía (10^{-3} M) y liofilizadas hasta sequedad.

RESULTADOS

1. EXTRACCION.

Durante el proceso de extracción para la separación del material soluble del insecto (Fig. 3 de métodos y materiales), se observaron los siguientes sedimentos:

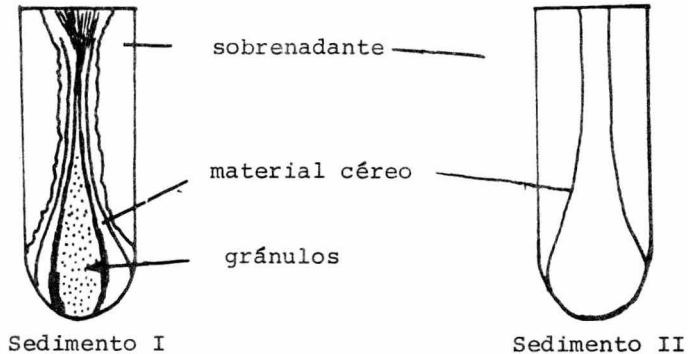


FIG. 4. Sedimentos obtenidos en el proceso de centrifugación de la porción soluble del insecto. Estos sedimentos fueron descartados.

El primer sedimento obtenido a baja velocidad ($4,600 \times g$) presentó gránulos y un sólido de aspecto céreo; en el segundo ($78,480 \times g$), sólo se hallaba este último, lo que indicó que no sedimentó completamente en el primer paso. Estos dos sedimentos fueron descartados. En ambos casos el sobrenadante era de color rojizo; el segundo sobrenadante (extracto crudo) presentó un pH de 5.0, eligiéndose por tal motivo una solución reguladora de pH 6.2 con el propósito de evitar cambios drásticos en el pH del insecto, durante la diálisis del mismo. Esperábamos que por diálisis se eliminara en parte el color que lo caracterizaba, sin embargo, el extracto crudo no presentó cambio aparente en la coloración, lo que sugiere que el pigmento sea de un tamaño tal que no le permite ser excluido por este método.

De los análisis de proteína, se encontró que un 4.4% del extracto crudo correspondía a proteína (o sea un 0.07% tomando como base el peso total de insectos colectados). Los datos encontrados sobre proteína total en el extracto crudo son mostrados en la siguiente tabla:

Tabla 1. Relación de proteínas totales en el extracto crudo.

	Cantidad de proteínas g)	Porcentaje relativo (%)
Extracto crudo	26.07	100
Proteína total en extracto crudo	0.927	4.4

2. ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA DEL EXTRACTO CRUDO.

Enseguida se procedió a realizar electroforesis en geles de acrilamida al 5% por los métodos ya descritos. Se aprecia (Fig. 5) que cuando la electroforesis se realiza por carga, que adquiere la proteína en medio básico, sólo se presentan 5 bandas, no así al efectuarse por pesos moleculares, en la cual el número asciende a siete bandas (Fig. 5b) en un rango por arriba de 60,000 daltones de peso molecular (Fig. 5c). Este último resultado dió una idea aproximada sobre el contenido de proteínas presentes en el extracto crudo, y nos permitió elegir el material de cromatografía para el siguiente paso a realizar: Separación de las proteínas del extracto crudo por cromatografía en gel de sephadex.

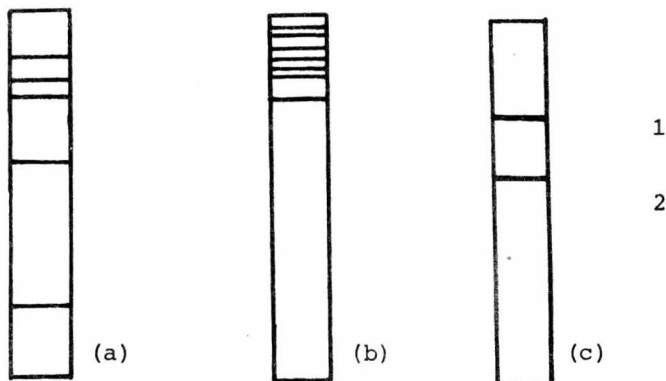


FIG. 5. Electroforesis del extracto crudo: (a) por carga en medio básico. (b) por peso molecular. En ambas electroforesis se observó que durante el desarrollo de las mismas, se presentaba la migración de una banda roja (pigmentación característica del extracto crudo), que aparecía teñida con amido negro. (c) patrones de comparación en la electroforesis por pesos moleculares: 1. albúmina (66,000); 2. tripsina (23,000 de p.m.)

3. IDENTIFICACIONES ENZIMATICAS DEL EXTRACTO CRUDO.

Posteriormente al análisis electroforético del extracto crudo, realizamos en el mismo, las determinaciones enzimáticas para hexoquinasa, invertasa, fosfoglucoisomerasa, y fosfomanosa isomerasa utilizando los métodos analíticos ya descritos. Los resultados de actividades son mostrados en la siguiente tabla:

Tabla 2. Actividades relativas de las enzimas hexoquinasa, invertasa, fosfoglucoisomerasa, y fosfomanosa isomerasa del extracto crudo. Las actividades específicas están expresadas en μ moles de substrato transformando/min/mg de proteína en el extracto crudo.

Reacción catalizada

en extracto crudo por:	Actividad específica (μ moles/min/mg)	Actividad total (unidades)
HEXOQUINASA	7.6×10^{-3}	7.04
INVERTASA	14.3×10^{-3}	13.00
FOSFOGLUCOISOMERASA	25.0×10^{-3}	23.17
FOSFOMANOSA ISOMERASA	5.0×10^{-3}	4.6

Como puede apreciarse, los valores más altos de actividad corresponden a la fosfoglucoisomerasa, por lo que procedimos al aislamiento de esta enzima del extracto crudo.

4. CROMATOGRAFIA EN GEL DE SEPHADEX.

Una vez efectuado el análisis de actividad enzimática y, sabiendo que se tenía en el extracto crudo proteínas de peso molecular elevado, procedimos a cromatografiar una porción del extracto crudo en Sephadex G-75.

Durante el desarrollo de la cromatografía pudimos observar la separación de cuatro zonas coloridas. Como se muestra en la figura 6, estas bandas presentaban coloraciones que iban desde una tonalidad ligeramente café hasta una zona completamente amarilla:

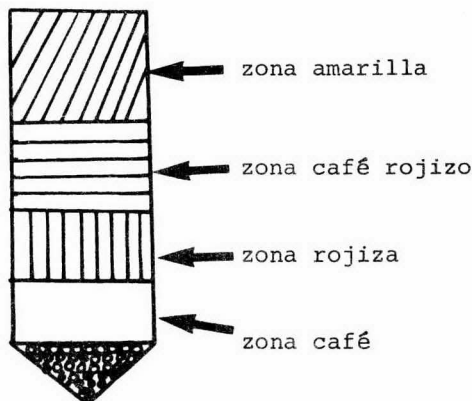


FIG. 6. Desarrollo de la cromatografía del extracto crudo, en la que se aprecian distintas zonas coloridas.

La elución de la cromatografía fué seguida a 280 nm. En la siguiente gráfica (Fig. 7), se muestran las fracciones obtenidas, las cuales fueron numeradas por orden de aparición (I, II, III y IV). La última zona que eluyó de la columna, constituyó la fracción F IV. Esta presentaba gran tonalidad amarilla, y mostró gran retención a la columna.

Con el propósito de conocer el valor total de proteína contenida en cada fracción, se procedió a determinar la cantidad de

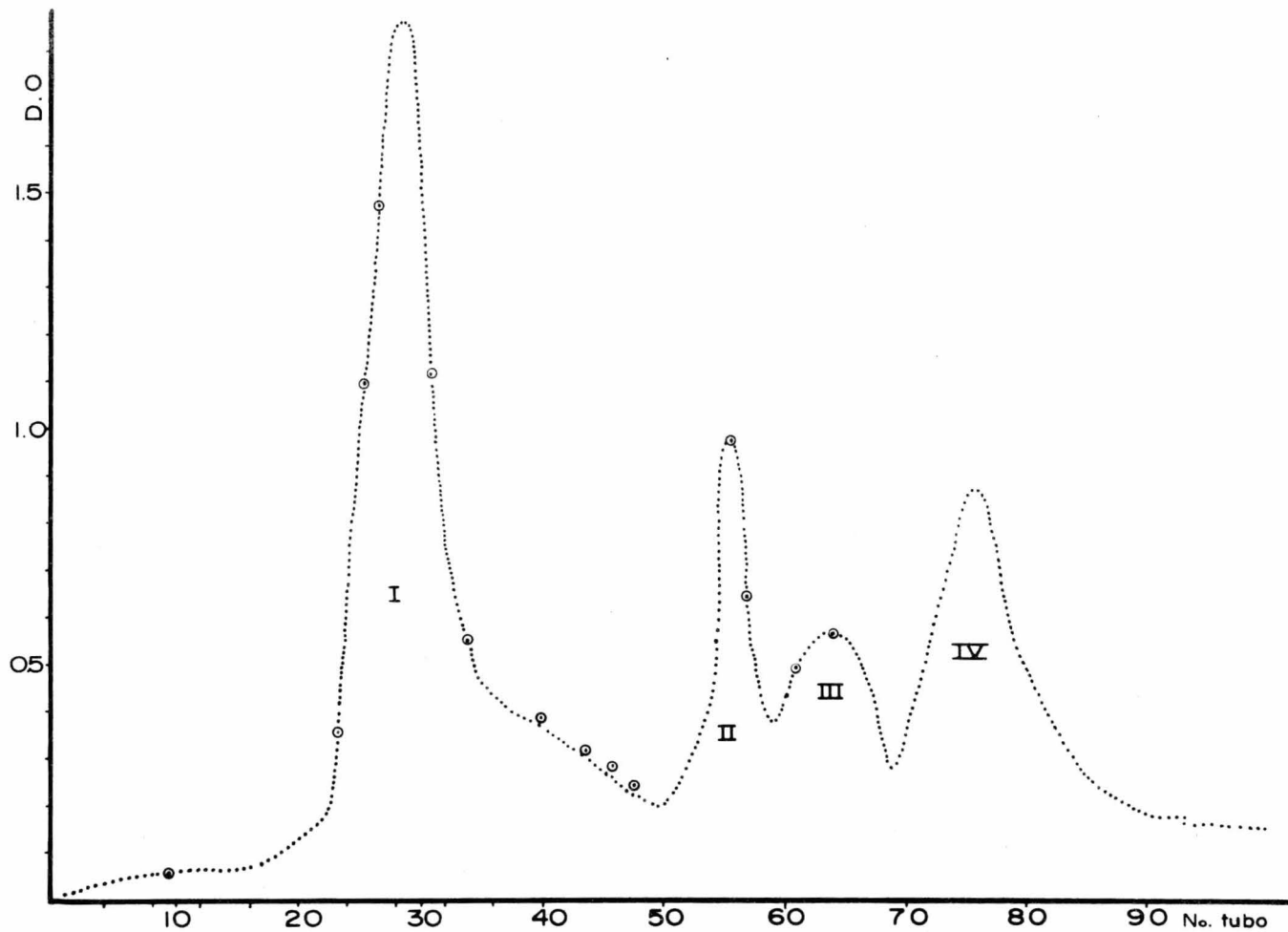


Fig.7 Cromatografía en columna de Sephadex G-75. Se aprecia la separación de cuatro bandas principales del extracto crudo (350mg.). Las lecturas se hicieron a 280nm.

proteína por el método de Lowry (20). En la tabla 3, se muestran los valores obtenidos:

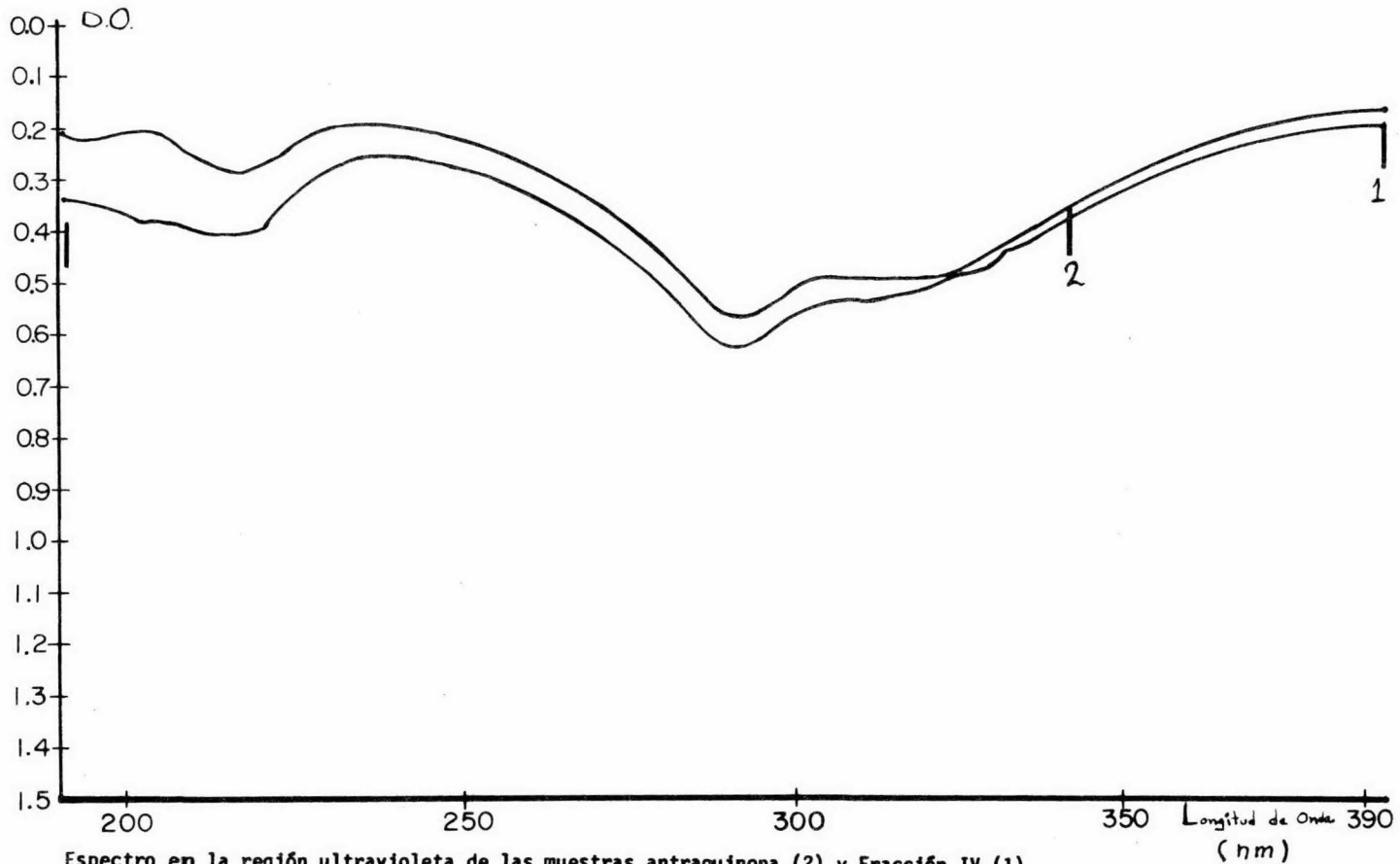
Tabla 3. Determinación de cantidad de proteína de fracciones obtenidas de la cromatografía del extracto crudo en Sephadex G-75. Se aplicaron 350 mg de extracto crudo (15.4 mg de proteína por método de Lowry).

Fracción	Proteína total (mg)
I	6.24
II	7.08
III	1.04
IV	-

Como se aprecia en la tabla anterior, la fracción FIV, no se presentó proteína detectable por el método químico utilizado. Este hecho, la gran tonalidad amarilla y retención que mostró durante la cromatografía, llamó nuestra atención y se decidió comparar su espectro de absorción en las zonas ultravioleta y visible, con el de un compuesto aislado del mismo insecto (4) y conocido como ácido ceroalbolínico.

En la figura 8, se muestra la gráfica de absorción en la región uv. de la fracción FIV y el ácido ceroalbolínico, donde se aprecian los máximos de absorción que presentaron ambas muestras a 292 y 215 nm. Esto demuestra que gran parte de la pigmentación presente en el extracto crudo, se debe a la presencia de este pigmento, el ácido ceroalbolínico, el cual interfiere en gran proporción, en la identificación de proteínas por métodos espectrofotométricos. Este pigmento, es una antraquinosa soluble en

Figura 8



Espectro en la región ultravioleta de las muestras antraquinona (2) y Fracción IV (1) obtenidas del insecto *C. albolineatus*, en el que se observa bandas de absorción semejantes.

agua, de gran carácter aromático ($C_{16}H_{10}O_8$; PM = 330) lo que explica la dificultad para ser excluido por diálisis y la gran retención que mostró en la cromatografía en gel de dextrana (Sephadex G-75), ya que compuestos de carácter aromático presentan interacciones con materiales de esta naturaleza.

Posteriormente, se procedió a determinar actividad enzimática para cada una de las fracciones obtenidas. La figura 9 muestra las velocidades iniciales de actividad para fosfoglucoisomerasa, en la cual destaca la fracción F-II con mayor actividad por lo que se eligió para su subsecuente purificación.

5. CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHADEX.

El siguiente paso para la purificación de la fracción F-II, conteniendo la mayor actividad enzimática para fosfoglucoisomerasa, consistió en pasarla por una columna de DEAE-SEPHADEX-A-50. El resultado de esta cromatografía se observa en la figura 10. Como se puede apreciar, la enzima se encuentra en la primera fracción eluída de la columna (a la cual se le llamó FIIa); se observa así mismo, que la curva de actividad se encuentra ligeramente recorrida, lo que indica alguna contaminación. Esto se debe a que la FIIa presentaba aún una ligera coloración amarilla (semejante a la tonalidad que presentaba la FIV), no obstante que la cromatografía fué de carácter de intercambio iónico.

Con el fin de intentar una separación óptima del pigmento y la enzima, realizamos otro experimento con una porción de la fracción FII utilizando las condiciones reportadas en los trabajos de Reitel (23), las que consisten en cromatografiar la

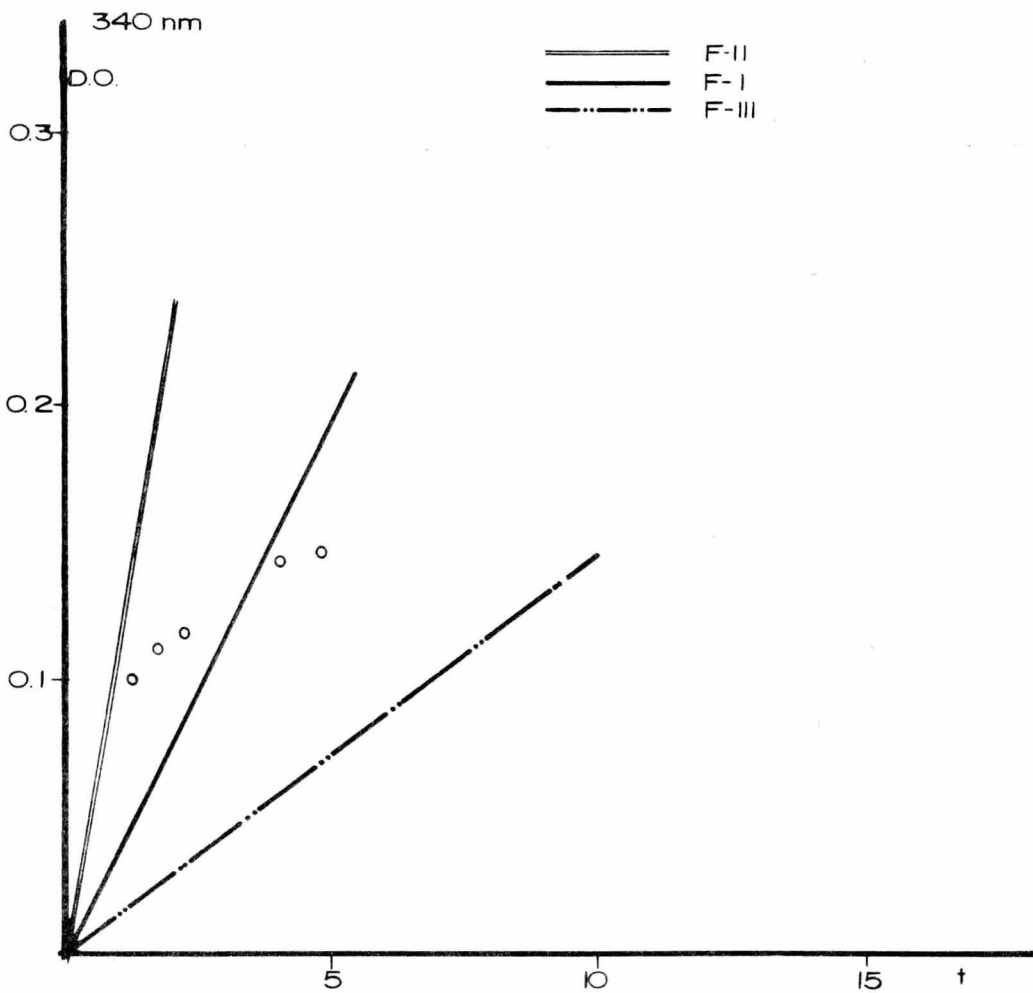


Fig. 9 Velocidades iniciales de actividad para Fosfoglucoisomerasa de Fracciones obtenidas en la cromatografía en Sephadex-G75 Se aprecia la mayor actividad de la fracción II, en relación a las fracciones restantes obtenidas. La fracción IV, no presentó actividad para ésta enzima.

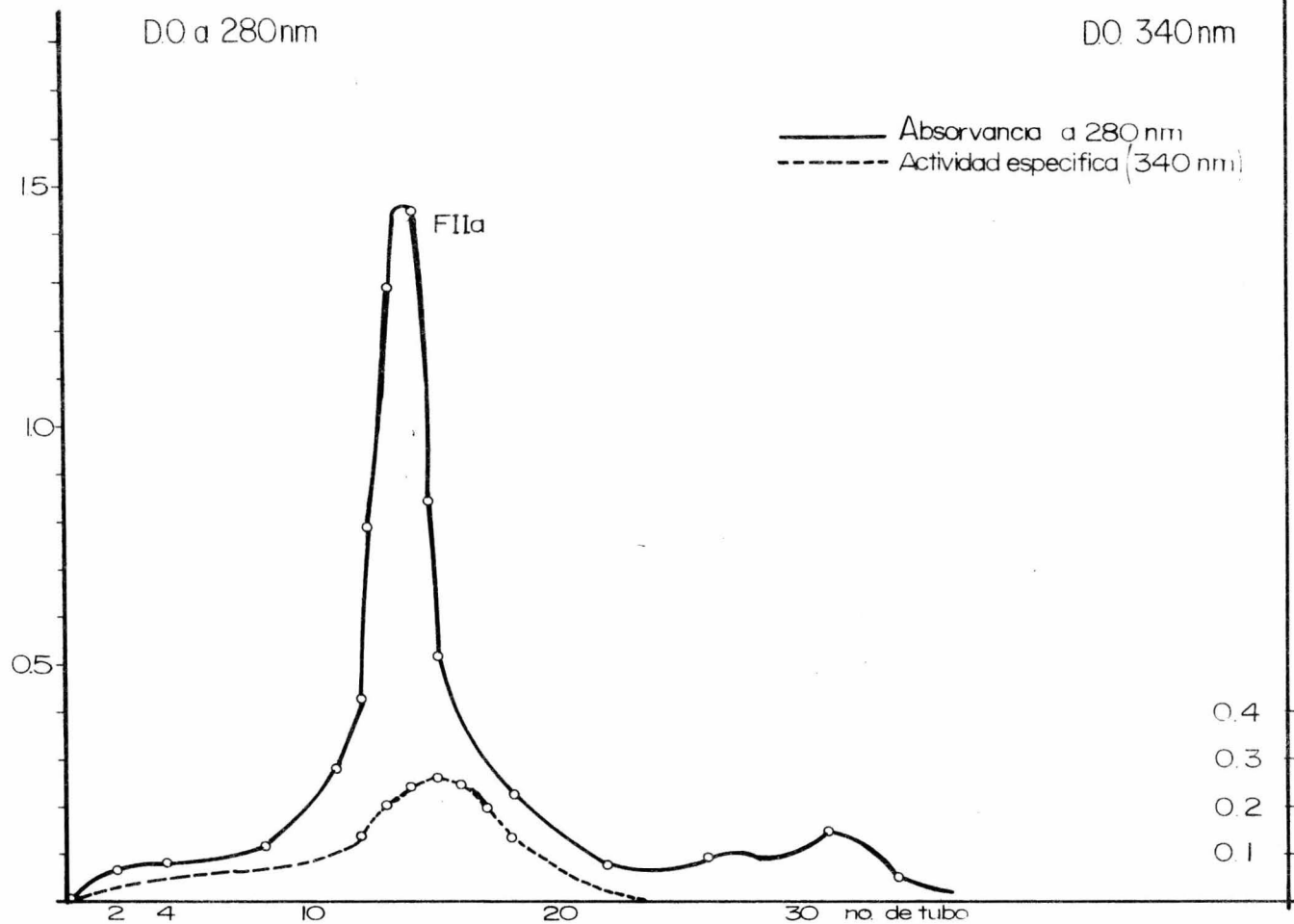


Fig 10 Cromatografía de fracción F-II en DEAE-Sephadex A-50. A la primera fracción que aparece, se le determinó actividad enzimática, observándose mayor actividad.

enzima por DEAE-celulosa, con un buffer de tris-acetato en gradiente de 0.001 M a 0.4 M y pH 7.3. Encontramos que la enzima eluía en la primera fracción, pero con pérdida en actividad, por lo que se decidió descartar esta técnica.

Un resumen de los resultados de la purificación efectuada para la fosfoglucoisomerasa son mostrados en la siguiente tabla:

Tabla 3. Purificación de la enzima fosfoglucoisomerasa de la porción soluble del insecto C. albolineatus.

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad específica (μ moles/min/mg)	Actividad total (unidades)	Purificación
1.Extracto crudo	927.08	25×10^{-3}	23.17	1
2.Sephadex- G-75 (FII)	7.08	37×10^{-3}	0.297	1.48
3.DEAE-Seph. (FIIa)	3.25	46.6×10^{-3}	0.139	1.84

Aún cuando la enzima fosfoglucoisomerasa de la fracción IIa, se encontraba ligeramente contaminada con el pigmento amarillo, los datos de la tabla anterior, muestran que la actividad ascendió ligeramente, a medida que se avanzaba en su purificación.

6. ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA AL 5% DE FIIa.

Con el propósito de comprobar la homogeneidad de la fracción FIIa que contenía la máxima actividad para fosfoglucoisomerasa, se pasó una muestra de esta fracción por electroforesis en gel de acrilamida al 5% utilizándose el método de peso molecular

descrito en la metodología de este trabajo. Simultáneamente, se aplicó una muestra de fosfoglucoisomerasa de músculo de conejo como proteína patrón, en las mismas condiciones que la muestra por analizar (FIIa).

En la siguiente figura se muestran los resultados obtenidos en la electroforesis:

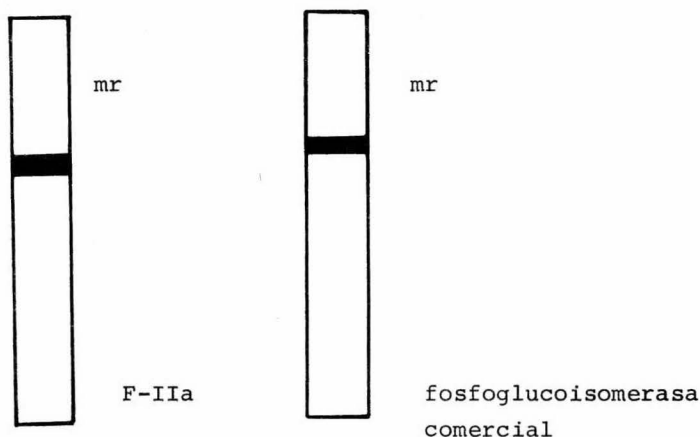


FIG. 7. Electroforesis en gel de acrilamida al 5% de las muestras FIIa y fosfoglucoisomerasa de músculo de conejo. Condiciones experimentales: 6mA por gel, tiempo: 3hs. Movilidad relativa de FIIa: 2.5 cm; movilidad relativa de fosfoglucoisomerasa de conejo: 2.4 cm.

Como puede apreciarse, la presencia de una sola banda en el gel correspondiente a la fracción FIIa, da un indicio de homogeneidad de la muestra purificada; su correlación con la fosfoglucoisomerasa comercial, de músculo de conejo utilizado como patrón, permite proponer que el peso molecular de la enzima

fosfoglucoisomerasa del insecto es cercano a 125 000 (como se reporta para enzima de músculo de conejo) (13). Este resultado muestra que la enzima se encontraba completamente aislada del extracto crudo. Sin embargo, la ligera coloración amarilla que presentaba nuestra enzima, dió motivo para intentar un nuevo método que permitiera su eliminación. Probamos el método por electroforesis recomendado por Weber y Osborn (24), que consiste en eluir la proteína del gel con dodecil sulfato de sodio (SDS 1%), a 37°C, y precipitarla con acetona fría; el precipitado se redissuelve en HCl 12 N, transfiriéndose a un tubo para hidrólisis, con el propósito de preparar la muestra para un análisis de aminoácidos, esperando que el pigmento contaminante quedará en la solución de acetona. Realizamos todos los pasos anteriores, y al redissolver nuestra muestra en ácido clorhídrico, se presentó de nuevo la coloración amarilla que contaminaba la fracción. Este resultado sugiere que las movibilidades del pigmento y enzima son iguales, formándose una probable asociación enzima-pigmento, extraña para enzimas pertenecientes al ciclo de la glucólisis.

CONCLUSIONES

De los resultados descritos anteriormente, podemos concluir lo siguiente:

1. Encontramos actividad para las enzimas invertasa, hexoquinasa, fosfoglucoisomerasa y fosfomanosa isomerasa, de las que la fosfoglucoisomerasa presentó mayor actividad.
2. El peso molecular que presentó la fosfoglucoisomerasa del insecto, es similar al observado por la misma enzima proveniente de músculo de conejo (125,000).
3. La enzima presenta una relación no identificada en este trabajo, con un pigmento presente en el insecto: el ácido ceroalbolínico.
4. Aún cuando la purificación se considera parcial por la presencia del pigmento, los resultados de actividad sugieren que el pigmento no altera las propiedades catalíticas de la enzima.
5. La dificultad encontrada para la separación del pigmento y la enzima, sugiere que se trate de una asociación directa, lo que representa un tema más de investigación.

BIBLIOGRAFIA

1. Lechuga, N. Senecio preacox y organismos que lo habitan. Trabajo de Tesis, (1970-1971), UNAM., México D.F.
2. De Petri, T. y col. Proc. Int. Citrus. Symp., 1st. 2: 909-15 (1968).
3. Nishino, T. y col. Nippon Dyo Dobutsu Koncho Gakkai-Shi. 13: 135-41 (1969).
4. Ríos, T. Chem. Ind. 1184 (1965).
5. Ríos, T. Tetrahedron Lett. 17: 1317-18 (1969).
6. Ríos, T. Tetrahedron 22: 1507-12 (1966).
7. Lehninger, A.L. Biochemistry. Worth Pub., Inc., N. Y. (1970).
8. Florkin, M. Comprehensive Biochemistry. Vol. 17, Cap. 3. Elsevier, Amsterdam, pág. 93-161 (1962).
9. Newsholme, E.H. y Start, C. Regulation in Metabolism. Cap. 3. John Wiley and Sons., N. Y., pág. 88-145.
10. Chefurka, W. Biochim. Biophys. Acta 28: 660 (1958).
11. Gilmour, D. The Biochemistry of Insects. Academic Press, N. Y., pág. 60-80 (1961).
12. Chiang, W. Insect Biochem. 2: 257-278 (1972).
13. Wood, W.A. Methods in Enzymology. Vol. IX, Academic Press, N. Y., pág. 557-575 (1966).
14. Topper, Y.J. Biol. Chem. 225: 469 (1957).
15. Rose, I.A. y O'Connell, E. J. Biol. Chem. 236: 3086 (1961).
16. Berman, H.M. y col. J. Biol. Chem. 249: 3983 (1974).
17. Salas, M., Viñuela, E. y Sols, A. J. Biol. Chem. 240: 561 (1965).

18. Colowick, S.P. y Kaplan, O.H. Method in Enzymology, Vol. III. Academic Press Inc. Publ., N. Y. pág. 154-155 (1957).
19. Arreguín, B. y Taboada, J. Bol. Inst. Química, UNAM., 20: 95 (1968).
20. Lowry, D.H. y col. J. Biol. Chem. 193: 265 (1951).
21. Roe, J.H. J. Biol. Chem. 103: 15 (1934).
22. Dunker, A.L. y Rueckert, R.R. J. Biol. Chem. 244: 5074 (1969).
23. Reitel, F.J. Phosphoglucose isomerase. II Mammary gland. En: Methods in Enzymology, Vol. IX, Academic Press, N. Y., pág. 565-568 (1966).
24. Weber, K. y Osborn, M. J. Biol. Chem. 244: 4406 (1969).