



4
ZEJ

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSTGRADO DEL CCH**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**" PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA
PSEUDOHEVEINA DE Hevea brasiliensis "**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A :

GABRIELA JUAREZ MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dra. ADELA RODRIGUEZ ROMERO

MEXICO, D. F.

1995

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.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por permitirme llegar a esta meta.

A Ma. de los Angeles Martínez y Almeida y a Guillermo G. Juárez Rivera, por ser mis padres y a toda mi familia por haberme apoyado.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero, por haber dirigido esta tesis, por ser una gran maestra y una amiga.

A mis sinodales: Q. Oralia Ladrón de Guevara, Dra. Goar Gevorkian, Dr. Manuel Soriano, Dr. Edgar Zenteno y Dr. Carlos Kubli, por una revisión crítica de este trabajo.

Al Dr. Barbarín Arreguín, al Dr. Roberto Arreguín y al Dr. Ricardo Lascrain, por sus comentarios y ayuda.

A la UNAM, por ser una magnífica Universidad y haberme permitido realizar mis estudios en ella.

A Sinuhé por su apoyo en la parte computacional y estética de esta tesis, así como por su comprensión y ayuda en todo momento y sobre todo por ser mi mejor amigo y compañero y a toda su familia.

A mis compañeros de laboratorio: Alejandra, Maru, Nora, Paty, Enrique, Panneer, Víctor, por hacer del laboratorio más que un lugar de trabajo, un segundo hogar.

A mis compañeros de generación: Alejandra, Carla, Lucía, Norma, Tania, Gino y Mario, por haber compartido los buenos y los malos ratos durante toda la carrera y ser una gran generación.

A todos los integrantes del Departamento de Biomatemáticas, de los Carrancas del Instituto de Investigaciones Biomédicas y a los integrantes del laboratorio 9 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, a Ernesto Guerrero y Abelardo por su valiosa ayuda y amistad.

A mis amigas Alejandra Arauz, Doraliz Vera, Diana Miranda y Mónica Gutiérrez, por ser las mejores amigas aunque cada una hayamos tomado un camino distinto.

A Beatriz, Diana, Jazmin, Leonor, Agustín, Felipe, Francisco P, Julio, Moises, Roel y Ulises, por ser grandes compañeros.

A todo aquel comprometido con el conocimiento y con los demás, que este en busca de la excelencia y de nuevos retos.

INDICE

i. Abreviaturas.	1
I. Introducción.	2
1 Proteínas.	2
2 Lectinas.	3
2.1 Lectinas de plantas.	3
2.2 Lectinas de animales.	4
2.3 Lectinas de lutóides de <i>Hevea brasiliensis</i> .	4
3 Características de la planta.	5
3.1 Clasificación de <i>Hevea brasiliensis</i> .	6
II. El porque de la tesis.	7
III. Objetivos.	8
IV. Diseño experimental.	9
V. Materiales y Métodos.	10
1 Purificación.	10
2 Caracterización.	11
2.1 Cuantificación de proteínas.	11
2.1.1 Absorción a 280 nm.	11
2.1.2 Método del ácido bicinconínico.	11
2.2 Coeficiente de extinción.	12
2.3 Dicroísmo circular.	12
2.4 Espectrometría de masas.	13
2.5 Determinación cualitativa de aminoácidos.	13
2.6 Enfoque isoelectrico.	14
2.7 Purificación mediante cromatografía de afinidad.	14
2.8 Pruebas de cristalización.	14
2.9 Biotinilación de las proteínas.	16
2.10 Pruebas de actividad biológica.	17
2.10.1 Pruebas de unión a bacterias.	17
2.10.2 Pruebas de unión a leucocitos.	17
2.10.3 Pruebas de especificidad por carbohidratos.	17
VI. Resultados	18
1 Purificación	18
1.1 Permeación en gel.	19
1.2 Intercambio catiónico.	20
1.3 HPLC Intercambio catiónico (heveína).	21
1.4 HPLC Intercambio catiónico (pseudoheveína).	22
2 Coeficiente de extinción.	23
3 Dicroísmo circular.	24
4 Espectrometría de masas.	25
5 Columna de afinidad (Fetúina-agarosa).	26
6 Determinación cualitativa de aminoácidos.	27
7 Enfoque isoelectrico.	28
8 Pruebas de cristalización.	29
9 Pruebas de actividad biológica.	30
8.1 Pruebas de unión a bacterias.	30
8.2 Pruebas de unión a leucocitos.	31
8.3 Pruebas de especificidad por carbohidratos.	32
VII. Discusión.	33
VIII. Conclusiones.	35
IX. Bibliografía.	36

i. ABREVIATURAS

WGA	Agglutinina de germen de trigo.
BCA	Acido bicinconinico.
BSA	Albúmina sérica bovina.
DAB	Diaminobenzil.
DC	Dicroísmo circular.
ELISA	Ensayo Inmuno Enzimático.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
NBT	Nitro azul de tetrazolium.
PNPP	Paranitrofenilfosfato.
PBS	Amortiguador salino de fosfatos.

INTRODUCCION

1. PROTEINAS

Las proteínas del griego *protaios* que significa primario, es un término reservado para aquellos polipeptidos que existen de manera natural y que tienen una estructura terciaria definida bajo condiciones fisiológicas. Son las sustancias más abundantes en la mayoría de las células.

Las propiedades químicas básicas de las proteínas son tan amplias que constituyen una gran parte de la bioquímica. Las proteínas son extremadamente importantes ya que están involucradas en todos los procesos bioquímicos y fisiológicos de los seres vivos.

Algunas proteínas conocidas como inmunoglobulinas sirven como defensa contra infecciones; otras proteínas almacenan y transportan partículas que van desde electrones hasta macromoléculas a través de las membranas; muchas hormonas son proteínas que transmiten información entre células específicas o entre órganos y regulan muchas de las funciones celulares. Las proteínas controlan la expresión genética uniéndose a secuencias específicas de aminoácidos, "prendiendo" y "apagando" genes. Las proteínas son importantes en los músculos y otros sistemas que convierten la energía química en energía mecánica, ciertos ensamblajes de proteínas están involucrados en la contracción muscular y la movilidad de las células. También son necesarias para ver, oír y otros sentidos; muchas otras proteínas son estructurales, es decir, que proveen la arquitectura filamentosa dentro de las células, así como el material del que están hechas las uñas, cabello, tendones y huesos⁽¹⁾.

A pesar de la diversidad biológica en sus funciones las proteínas son relativamente homogéneas, en el sentido de que todas están compuestas por cadenas polipeptídicas construidas de las combinaciones apropiadas de los 20 residuos de aminoácidos y que solamente difieren en su secuencia. Su diversidad funcional se debe parcialmente a la diversidad química de los aminoácidos que la conforman, pero principalmente a la diversidad de estructuras tridimensionales que las proteínas puedan adquirir⁽²⁾.

Cuando dos aminoácidos se combinan mediante un enlace peptídico, la molécula formada tiene un grupo amino en un extremo y un grupo carboxilo en el otro. De esta forma nuevos aminoácidos pueden unirse dando origen a un polipeptido⁽³⁾. Sin embargo, algunas proteínas no constan de una sola cadena peptídica, sino de varias unidas entre sí mediante otros tipos de enlace, sobre todo puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo y amino. Existen otros tipos de enlace entre cadenas polipeptídicas como los hidrofóbicos, los electrostáticos, los puentes disulfuro, los puentes salinos, etc.

Las proteínas pueden dividirse en:

Proteínas estructurales.- Las proteínas de este tipo están presentes en la célula en forma de largos filamentos delgados, en la que ellos mismos son polímeros de muchas moléculas de proteínas. El uso más prominente de tales filamentos intracelulares es proporcionar el mecanismo contráctil de todos los músculos. Sin embargo, los filamentos también se organizan en microtúbulos que forman el citoesqueleto de las células. Fuera de las células la colágena y las fibras de elastina forman el tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, tendones, ligamentos, uñas, cabello, etc.

Proteínas globulares.- Son proteínas individuales o agregados de unas cuantas moléculas en forma globular en lugar de fibrilar. Estas proteínas son por lo general enzimas y, en contraste con las proteínas fibrilares, son a menudo solubles en el líquido celular o forman parte integral de estructuras membranosas o se encuentran adheridas a estas estructuras. Las enzimas entran en contacto directo con el sustrato en el interior de la célula y catalizan reacciones químicas⁽⁴⁾.

2. LECTINAS

Originalmente el término lectina del latín *legere*, que selecciona o que elige, fue propuesto por Boyd y Shapleigh en 1954 para referirse a un grupo de proteínas de semillas de plantas, de las cuales algunas de ellas aglutinaban específicamente a eritrocitos humanos de algún tipo sanguíneo. En 1980 Goldstein definió a las lectinas como proteínas que se unían a carbohidratos (o glicoproteínas), que no tenían un origen inmune y que aglutinaban células y/o precipitaban glicoconjugados¹⁰. Kocourek y Horejsl en 1981 propusieron que se definiera a las lectinas en base a su actividad biológica *in vitro*, debido a que la función de las lectinas en los organismos vivos era aún incierta¹¹.

La característica más importante de las lectinas es su capacidad de unión a carbohidratos y de aglutinar células. Esta actividad depende de la existencia de dos o más sitios de unión en la lectina, de tal forma que pueda unirse a células adyacentes que tengan glicoconjugados en su superficie. Debido a esto se piensa en las lectinas como proteínas que se unen a carbohidratos de manera bi o multivalente. Sin embargo, los estudios estructurales y funcionales de las lectinas revelaron que debían contener un segundo sitio de unión que interactuara con un ligando diferente a un carbohidrato. Otro aspecto importante desde el punto de vista estructural es que las proteínas que se unen a carbohidratos de forma bivalente son estructuralmente parecidas a las proteínas que sólo tienen un sitio de unión a los mismos. Barondes en 1988 propone una redefinición del término: una lectina es una proteína que se une a carbohidratos e incluye en esta categoría a las proteínas monovalentes, es decir las que presentan un solo sitio de unión¹².

Las lectinas, son herramientas muy útiles para el estudio de los carbohidratos y sus derivados, se han usado con propósitos preparativos y analíticos en la bioquímica, la biología celular, la inmunología y áreas relacionadas particularmente con el estudio de los glicoconjugados. Las lectinas son usadas para diferenciar entre células normales y malignas, entre células embrionarias y adultas, entre los diferentes tipos sanguíneos y entre diferentes tipos de microorganismos o sus diferentes formas morfológicas o etapas de diferenciación. Los virus y partículas subcelulares como el núcleo y la mitocondria también son aglutinados por lectinas. Otro de los efectos de las lectinas sobre las células es la estimulación mitogénica, que puede ser inhibida de manera reversible mediante bajas concentraciones de azúcares. Algunas lectinas pueden mimetizar los efectos de la insulina sobre los adipocitos, esto estimula la lipogénesis, el transporte de glucosa y su oxidación e inhibe la lipólisis. Algunas lectinas son tóxicas y suelen ser muy selectivas en su acción sobre las células, teniendo efectos citotóxicos mayores sobre las células transformadas que en las células normales. Debido a esto se han hecho intentos para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* usando sólo a las lectinas o en combinación con fármacos anticancerígenos. De hecho se ha intentado usarlas como acarreadores de agentes quimioterapéuticos, debido a la habilidad que presentan algunas de ellas para interactuar de manera específica con ciertos tipos celulares¹³.

Actualmente se han caracterizado varias lectinas aisladas de diversas fuentes tales como: plantas, animales y microorganismos, y es posible agruparlas en familias de proteínas homólogas que comparten propiedades estructurales¹⁴.

2.1 LECTINAS DE PLANTAS

Lectinas de leguminosas.- Se han caracterizado más de 70 lectinas de esta familia, la mayoría aisladas de semillas, las que generalmente están compuestas de dos o cuatro subunidades de 25 a 30 KDa. Cada subunidad presenta un sitio de unión a carbohidratos el cual en algunos casos requiere de Ca^{2+} y Mn^{2+} . Asimismo exhiben entre ellas una homología mayor al 20%. Los aminoácidos que participan en la coordinación de estos iones metálicos incluyen ácido aspártico y asparagina, que forman puentes de hidrógeno con el monosacárido en el sitio de unión. Los iones metálicos sirven para ayudar a posicionar los residuos de aminoácidos en el sitio de unión a carbohidratos pero no interactúan directamente con el carbohidrato.

Lectinas de los cereales.- La más estudiada de estas lectinas es la aglutinina del germen de trigo (WGA). Las lectinas de esta familia son muy similares a la WGA en cuanto a su especificidad por N-acetilglucosamina y por el ácido siálico. Generalmente están compuestas por dos subunidades de 18 KDa aproximadamente. Estas lectinas se diferencian de casi todas las de origen vegetal por poseer varios puentes disulfuro que estabilizan la molécula.

2.2 LECTINAS DE ANIMALES

Lectinas tipo C.- (Calcio dependientes). Estas lectinas poseen uno o más dominios de reconocimiento a carbohidratos, requiriendo de Ca^{2+} para su unión a los mismos. Los residuos de aminoácidos que unen tanto al Ca^{2+} como al carbohidrato, se localizan el extremo carboxilo terminal. Estas lectinas se unen a glucosa, N-acetilglucosamina y a L-fucosa, pero no a galactosa. La masa molecular de una subunidad es menor a 15 KDa debido a que las lectinas de este tipo consisten en un dominio de reconocimiento a los carbohidratos de aproximadamente 120 aminoácidos en asociación con otros dominios.

Lectinas tipo S.- (Tiol dependientes) Se sabe poco acerca de esta familia, se unen específicamente a galactosa. La masa molecular de sus subunidades varía desde 14 a 35 KDa¹⁰.

2.3 LECTINAS DE LUTOIDES DE *Hevea brasiliensis*

HEVEINA

El látex del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) está compuesto por un fluido citoplasmático que se encuentra en células especializadas llamadas laticíferos. Cuando al árbol se le causa daño, estas heridas son selladas por la coagulación del látex, que involucra que los cuerpos lutoides se revienten y las partículas de hule que se encuentran en ellos formen agregados para poder sellar la herida, esto es vital para la defensa de la planta en contra de una posible invasión patógena¹¹.

La heveína es la proteína más abundante en los cuerpos lutoides representando el 70% de la proteína total. Estos orgánulos se encuentran presentes en el sedimento del ultracentrifugado del látex. Esta proteína tiene un alto contenido de azufre (5%) y un bajo peso molecular de 4,730; además tiene un punto isoeléctrico cercano a 5, está constituida por 43 aminoácidos, posee cuatro puentes disulfuro y está clasificada como una proteína de unión a quitina. Una característica interesante es que en solución no puede ser coagulada por medio del calor¹².

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo varios estudios conformacionales y estructurales con esta proteína. En primer término se comparó la heveína con la WGA debido a que sus secuencias de aminoácidos presentaban un 56% de homología. Estudios de dicroísmo circular apoyan la hipótesis de trabajo en la cual la conformación de la cadena polipeptídica de WGA y la heveína es similar. También se determinó la estructura tridimensional de esta proteína por difracción de rayos x a una resolución de 2.8 Å, confirmando la similitud entre estas dos proteínas¹³.

Recientemente un grupo de investigación en Singapur propuso que la heveína está involucrada en el proceso de coagulación del látex. Aparentemente la heveína forma un puente entre moléculas de una glicoproteína de 22 KDa que se encuentra en la superficie de las partículas de hule. Esta glicoproteína presenta varias unidades de N-acetilglucosamina. Estos autores indican que se requiere de la presencia de Ca^{2+} para que se lleve a cabo la unión entre la heveína y la glicoproteína¹⁴.

Por otra parte, también se ha observado que la mayoría de las lectinas presentan formas moleculares, tal es el caso de la heveína que presenta de dos a cuatro isoformas, dependiendo del clon y la edad del árbol, así como de la estación del año en que se recolecte el látex. Una de estas formas es la pseudoheveína descrita por primera vez por Tata en 1975¹⁵.

3. CARACTERISTICAS DE LA PLANTA

Hevea brasiliensis, es un árbol alto, recto y frondoso de las zonas tropicales de México, Centroamérica y del norte de Sudamérica. Llega a medir hasta 25 m de altura, no es muy corpulento ya que el grosor de su tronco cuando más es de 70 cm de diámetro y su copa tiene forma más o menos piramidal. La corteza de su tronco es café grisáceo, lisa o ligeramente agrietada y frecuentemente muestra cicatrices en forma de hendiduras diagonales que son los cortes hechos para la extracción del látex.

Las hojas de *Hevea brasiliensis* son grandes, miden de 20 a 45 cm de largo por 10 a 20 cm de ancho, están dispuestas alternadamente, son de un vistoso color verde oscuro que contrasta con un tono amarillento a lo largo de la nervadura principal, además tiene pequeñísimos pelos rígidos en ambas caras de su lámina.

El clima donde se da este tipo de árboles es el ecuatorial, que es cálido y muy húmedo sin estación seca, la temperatura media anual está entre 25 y 28°C; aunque no existe estación seca, en algunos meses del año disminuye la precipitación pluvial.

El árbol del hule conserva sus hojas todo el año en las zonas más húmedas de su área de distribución, y contribuye a imprimir la característica siempre verde de las selvas tropicales; sin embargo, en las zonas de su distribución en las que no hay suficiente retención de humedad, los árboles pierden sus hojas, hecho que evita la excesiva pérdida de agua a través de la superficie foliar. Las flores del árbol del hule son pequeñas y poco vistosas por ser verdosas, se encuentran agrupadas en receptáculos en forma de copa rodeados por una multitud de pequeñas hojas verdes amarillentas, algunas de estas florecillas presentan sólo estambres y otras sólo pistilo, es decir, unas son masculinas y otras femeninas. Cuando los ovarios de las flores femeninas maduran se transforman en pequeños frutos jugosos de color rojo anaranjado brillante.

Es importante aclarar que en México, así como otros países del mundo, existen varias plantas productoras de hule. Se debe indicar que el árbol más importante tanto en cantidad como en la calidad de su hule, es originario de las selvas amazónicas de Brasil. Se le ha llamado de diversas formas: "heve", "xiringa", "Gomero de Pará" y comercialmente se le llama caucho. De este árbol se obtiene la mayor parte de la producción mundial del hule comercial, aunque no es Brasil el principal productor, ya que lo inaccesible de la selva amazónica y las innumerables dificultades para la explotación a partir de árboles silvestres, hicieron que esta última se abandonara. El cultivo de Hevea en Asia tuvo su origen en las semillas recogidas en Brasil por Sir Henry Wilckham en 1876 que germinaron en el Jardín Botánico de Kew, cercano a Londres, y de allí se enviaron al Oriente. El lugar de propagación y distribución fue Ceilán, de ahí se enviaron a la Península Malaya e Islas de la Sonda de las cuales se obtiene la mayor producción mundial. Esta planta también se introdujo a la India, a Birmania y a Zaire.

Durante la Segunda Guerra Mundial se establecieron algunas plantaciones de este árbol en la región de Pichualco, en el estado de Chiapas y en la zona limítrofe de los estados de Veracruz y Oaxaca (1944).

3.1 CLASIFICACION DE *Hevea brasiliensis*.

Clase	Angiosperma
Subclase	Dicotiledoneae
Superorden	Rosidae
Orden	Euphorbiales
Familia	Euphorbiaceae
Género	<i>Hevea</i>
Especie	<i>brasiliensis</i> (L.)



Figura 1. Zonas donde crece *H. Brasiliensis*

EL PORQUE DE LA TESIS.

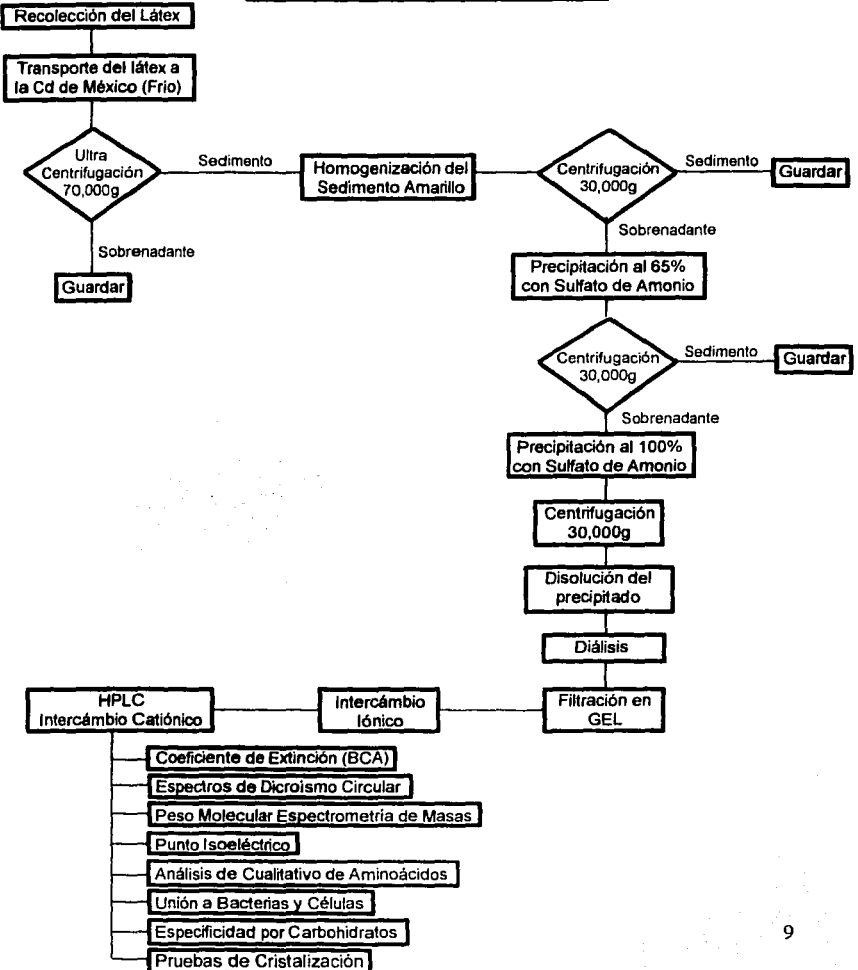
En nuestro laboratorio se tenía la necesidad de tener una proteína que fuera abundante, con un bajo peso molecular y muy estable, para usarla como modelo para una serie de estudios estructurales y conformacionales. En un principio se utilizó la heveína como modelo para iniciar el estudio estructural de macromoléculas, siendo la primera estructura proteica resuelta por difracción de rayos x en latinoamérica. Se sabía que la heveína poseía isoformas, por lo que se decidió buscar la siguiente isoforma más abundante, purificarla, caracterizarla y usarla como modelo para una nueva serie de estudios estructurales.

Por otro lado, el conocer más acerca de las propiedades fisicoquímicas de esta proteína nos podrá ayudar a comprender el papel de las isoformas dentro de la planta y muy en especial dentro de *Hevea brasiliensis*.

OBJETIVOS

- a) Purificar la forma molecular más abundante de la heveína.**
- b) Caracterizar dicha forma molecular con el propósito de comparar sus características fisicoquímicas con las de la heveína.**

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y METODOS

I. PURIFICACION

El látex de *Hevea brasiliensis* fue recolectado en el campo experimental "El Palmar" Veracruz, y transportado a la Ciudad de México a baja temperatura. Después de 5 horas el látex se centrifugó a 70,000 g y el sedimento fue congelado a -25°C hasta su uso.

El sedimento anterior fue homogeneizado con una solución de NaCl 0.1N, pH 6.0 a 4°C por 3 minutos a alta velocidad en un Ultra Turrax, hasta tener una mezcla homogénea del sedimento. En todos los pasos subsecuentes la temperatura fue mantenida a 4°C. Después de una centrifugación a 30,000g durante treinta minutos, el sedimento fue extraído dos veces más con la misma solución. Posteriormente se juntaron todos los extractos, ajustándose el pH a 6.0 y agregándose lentamente y en agitación el suficiente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido para obtener un 65% de saturación a 0°C, esta mezcla fue guardada toda la noche en refrigeración. Al día siguiente se centrifugó a la misma velocidad y se tomó el sobrenadante, que se llevó a 100% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nuevamente esta mezcla se guardó toda la noche y se centrifugó. El precipitado se disolvió y dializó contra agua destilada. Se emplearon membranas de diálisis Spectrapor con retención de peso molecular de 3500, las cuales se colocaron en un aparato de diálisis continua por 6 horas. Dicho aparato permite el movimiento de la bolsa de diálisis y de su contenido, así como el recambio del agua destilada nueva por la que ya tiene sales ⁽¹⁸⁾.

Nuevamente se dializó esta fracción contra un amortiguador de fosfatos 0.05M pH 6.8 y se aplicó en una columna de permeación en gel Aca 54 (5% acrilamida y 4% agarosa) (2.6x85cm), equilibrada con el mismo amortiguador. Este gel permite separaciones de moléculas en base a su peso molecular, y su rango de separación es de 5 a 75 KDa. Esto significa que las moléculas más pequeñas son capaces de penetrar por los espacios de la cama cromatográfica, por lo que se mueven más lentamente que aquellas que no logran entrar por estos espacios. De esta forma, los componentes de la fracción se eluyen en orden decreciente de peso molecular. Esto se realizó a temperatura ambiente, en un sistema LKB que consiste en un colector de fracciones Ultrac II, una bomba peristáltica Varioperpex, un monitor de absorbancia equipado con un filtro para 280 nm modelo Uvicord S y un registrador. La muestra se eluyó con el mismo amortiguador, a una velocidad de flujo de 16 ml/h, registrándose la absorbencia a 280 nm y colectándose fracciones de 2 ml.

La fracción que tenía mayor absorción, que está compuesta de heveína principalmente, fue concentrada por liofilización y después fue dializada contra agua destilada. Posteriormente la muestra fue dializada contra un amortiguador de glicina y HCl 0.2M pH 3.5 y fue aplicada a una columna de intercambio iónico. Aquí las proteínas se unen a los intercambiadores iónicos como resultado de las interacciones electrostáticas entre éstas y la matriz. La retención se incrementa en proporción a la densidad de la carga, tanto de la matriz intercambiadora como de la proteína. La matriz intercambiadora consta de grupos cargados que se hallan covalentemente unidos a ella, los cuales están asociados a iones móviles que pueden ser intercambiados reversiblemente con otros iones de la misma carga sin que se altere la matriz. Las proteínas, debido a la presencia de grupos carboxílicos y amino se pueden comportar como ácidos o como bases si se encuentran adecuadamente cargadas y pueden unirse a la matriz con diferente fuerza dependiendo de la magnitud de su carga neta. La elución de las proteínas retenidas se logra mediante el aumento de la fuerza iónica del eluyente. Cada componente de la muestra se separa con diferente tiempo y velocidad ya que poseen distinta afinidad por el intercambiador ^(19,20).

En este caso se utilizó una columna de intercambio catiónico CM-Sefarosa, que tiene una matriz de carboximetilos unidos a partículas de sefarosa. Se seleccionó esta columna ya que a este pH la heveína tengan carga positiva. La columna fue equilibrada previamente con el mismo amortiguador en el que fue dializada la muestra, la elución se llevó a cabo con un flujo de 12 ml/h aplicando un

gradiente de NaCl (0.0 - 0.3M). Este gradiente permite que las partículas que se encuentran unidas a la matriz sean desplazadas por los iones Na^+ .

Nuevamente la absorción de cada tubo fue leída a 280 nm y se separaron dos fracciones, ambas fueron dializadas contra agua y concentradas por liofilización, luego fueron dializadas contra un amortiguador de glicina-HCl 0.2M, pH 3.5 y aplicadas por separado en una columna de cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico.

Para esto se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC-LKB) y una columna de intercambio catiónico TSK-SP-5-PW de 7.5x75mm, con una matriz de polímero de vinilo y una fase de sulfopropilo. Esta se equilibró con un amortiguador de glicina-HCl 0.2 M, pH 3.5. Para la elución se usó un gradiente de NaCl de 0 a 1.0 M en el mismo regulador. La velocidad de flujo se ajustó a 0.6 ml/min, detectándose las fracciones en un detector espectral 190-370 nm. La absorción de cada tubo fue leída a 280nm y se separaron las fracciones que fueron dializadas contra agua destilada y concentradas por liofilización.

2. CARACTERIZACION

2.1 CUANTIFICACION DE PROTEINAS

2.1.1 ABSORCION A 280 nm

A las proteínas que habían sido purificadas se les leyó su absorción a 280 nm, ya que en esta región, las proteínas se pueden cuantificar y detectar por medio de su absorbencia y su coeficiente de extinción. La absorbencia de cada proteína depende del número y la posición de sus residuos de aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano, así como de los puentes disulfuro existentes entre las cisteínas⁽¹⁾.

2.1.2 METODO DEL ACIDO BICINCONINICO (BCA)

Este es un método espectrofotométrico muy sensible para la determinación de la concentración de proteína. El ácido bicinconínico (BCA), en su forma de sal de sodio soluble en agua es sensible, estable y altamente específico hacia el ión cuproso (Cu^+). El método combina la reacción de Biuret en la cual los enlaces peptídicos de la proteína reaccionan con el Cu^{2+} en un medio alcalino para producir Cu^+ . Este último, en presencia del BCA, da por resultado una reacción color púrpura que involucra a dos moléculas de BCA con una del ión cuproso Cu^+ . Este complejo es soluble en agua y tiene un máximo de absorción a 562 nm⁽¹⁾⁽²⁾.

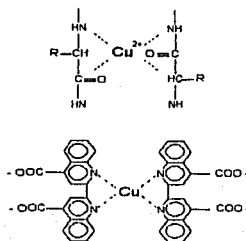


Figura 2. Reacción del ácido bicinconínico con la proteína.

El reactivo comercial de Pierce consta de las siguientes soluciones:

Reactivo A: Carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinónico y tartrato de sodio en solución acuosa de hidróxido de sodio 1N.

Reactivo B: Solución acuosa de CuSO_4 al 4%.

Reactivo C: 100 partes de reactivo A más 2 partes de reactivo B.

PROCEDIMIENTO

1) Se preparó la curva de calibración con albúmina de suero bovino. Con valores de $20\mu\text{g/ml}$ hasta $180\mu\text{g/ml}$, se agitó la mezcla de reacción y se incubó a 37°C durante 30 minutos con agitación constante. Posteriormente se leyó la absorción de cada tubo a 562 nm . Este mismo procedimiento se utilizó con la muestra.

La cantidad de proteína contenida en la muestra se determina interpolando el dato de absorbencia en la curva de calibración ⁽¹⁰⁾⁽¹⁰⁾.

2.2 COEFICIENTE DE EXTINCIÓN

A la muestra de pseudoheveína previamente dializada contra agua destilada se le midió su absorción a 280 nm y se cuantificó el contenido de proteína usando el método de BCA. Para calcular el coeficiente de extinción se siguió la siguiente fórmula:

$$E_{280}^{1\%} = \frac{A_{280}}{(c)(l)}$$

Donde:

$E_{280}^{1\%}$ = coeficiente de extinción a 280 nm .
 c = concentración de proteína en mg/ml .
 l = longitud del paso de la luz en cm .

2.3 DICROISMO CIRCULAR

La luz puede tratarse como un movimiento ondular de campos magnéticos y eléctricos que forman ángulos rectos entre sí. Cuando un electrón interactúa con la luz, oscila a la frecuencia de la misma en dirección del campo eléctrico y en fase con este. En el caso de la luz normal, los vectores del campo eléctrico de las ondas luminosas se orientan en todos los planos posibles. La luz del plano polarizado es aquella en la que los vectores del campo eléctrico de todas las ondas luminosas quedan en el mismo plano, es decir, el de polarización. Esta se produce haciendo pasar la luz normal por un dispositivo conocido como prisma de Nicol. En una molécula un electrón no tiene la libertad de oscilar en forma idéntica en todas las direcciones, es decir, su polarizabilidad es anisotrópica.

Cuando los electrones de la moléculas oscilan en respuesta a la luz polarizada en un plano, debido a esa polarizabilidad anisotrópica tienden a oscilar fuera del plano de polarización. A causa de esta interacción con los electrones oscilantes, la luz sufre cambios en sus campos eléctrico y magnético. Por lo tanto, cuando la luz polarizada en un plano interactúa con una molécula, el plano de polarización gira lentamente. Si un compuesto hace que el plano de polarización gire en la misma dirección que las manecillas del reloj (positiva) en relación a la llegada del haz, se dice que es dextrorrotatorio, si lo hace al contrario es levorrotatorio.

Las señales de DC de proteínas en la zona del ultravioleta lejano son debidas fundamentalmente a los cromóforos de amida del enlace peptídico. Aunque este cromóforo es planar, su inclusión en una estructura polimérica tridimensional puede considerarse como una "perturbación" que lo hace ópticamente activo. Debido a esto, la señal de DC de los enlaces peptídicos (240 a 190 nm) es diferente para los distintos tipos de estructuras que son: alfa hélice, hojas plegadas β , giros β y cadenas desordenadas. De esta forma los espectros de DC reflejan la conformación de la cadena principal. Cuando más de una conformación esta presente, el espectro observado es la combinación de espectros de conformaciones individuales.

La zona espectral de 250 a 310 nm es de gran importancia en el estudio de proteínas. En esta región se observan las señales de DC de los residuos de aminoácidos aromáticos y de los enlaces disulfuro. Frecuentemente alguno o algunos de estos residuos se encuentran en o cerca del sitio activo de una enzima y por lo tanto los cambios de la señal de DC causados por variación de las condiciones ambientales pueden ser usados para estudiar cambios en la estructura del sitio activo.

Los espectros de dicroísmo circular de la pseudoheveína a una temperatura de 25°C, fueron obtenidos en el laboratorio del Dr. Andrés Hernández en la UAM Iztapalapa. Se utilizó un espectropolarímetro JASCO J500A, el cual se calibró con ácido (+) - 10 - camforsulfónico. Las muestras utilizadas fueron las que se obtuvieron por cromatografía de alta resolución. Estas fueron dializadas contra un amortiguador de fosfatos 10mM, pH 7.0⁽²⁴⁾.

2.4 ESPECTROMETRIA DE MASAS

En años recientes la espectrometría de masas ha resultado ser una técnica muy poderosa para determinar la estructura primaria de las proteínas. En este método la muestra es evaporada en el vacío, después es fragmentada de forma no específica con un rayo de electrones que da por resultado varios fragmentos de la proteína y sólo los fragmentos que tengan una carga neta positiva son detectados y separados en base a su razón masa/carga.

Las más recientes técnicas de espectrometría de masas no requieren modificar químicamente a los péptidos ya que no necesitan que estos sean volátiles. El problema de la involatilidad de una proteína o de un péptido se puede solucionar por medio de la técnica de electrospray, en donde la solución de proteína en un solvente volátil es esparcida en forma de spray dentro del espectrómetro de masas, de tal forma que el solvente que se encuentra en pequeñas gotas, es evaporado rápidamente en el vacío, dejando a la molécula de proteína suspendida. La solución inicial se encuentra a un pH ácido, en donde la proteína tiene una carga neta positiva.

En este procedimiento las proteínas multiméricas tienden a disociarse en monómeros, así como los cofactores no permanecen unidos a la proteína, debido probablemente a que las proteínas tienden a desdoblarse durante el proceso de atomización y evaporación⁽¹⁾.

Esta determinación se llevó a cabo tanto para la heveína como para la pseudoheveína por la técnica de electrospray y fue realizada en el laboratorio del Dr. Douglas Gage del Departamento de Bioquímica de la Universidad Estatal de Michigan, EUA.

2.5 DETERMINACION CUALITATIVA DE AMINOACIDOS

La composición de aminoácidos de una proteína se puede determinar hidrolizando completamente los enlaces peptídicos. Un método para hidrolizar la cadena polipeptídica es someterla en condiciones reductoras a HCl 6N a 110°C de 24 a 72 horas.

La mayoría de enlaces peptídicos se hidrolizan a velocidades similares, exceptuando los enlaces peptídicos entre los aminoácidos no polares, particularmente valina, leucina e isoleucina, los cuales requieren mayor tiempo de hidrólisis o la adición de ácidos orgánicos como el ácido trifluoroacético.

Para determinar la identidad de los aminoácidos presentes en el hidrolizado se utilizan analizadores automáticos de aminoácidos en donde primero se corre un patrón con el cual se comparará la muestra problema. Los aminoácidos son separados cromatográficamente en base a su tiempo de retención⁽¹⁾.

El desarrollo de métodos utilizando el cloruro de dabsilo como derivatizante en columnas de fase reversa de HPLC, ha cambiado significativamente la determinación de aminoácidos en los últimos años. La alta absorción molar de los derivados de dabsilo en una región espectral limpia, su estabilidad en el tiempo y su comportamiento diferencial en las columnas de fase reversa de HPLC, permiten hacer una determinación de aminoácidos rápida y libre de interferencia, en donde se pueden detectar aminoácidos como la prolina que con otros derivatizantes no es posible detectar⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾.

Tanto la heveína como la pseudoheveína fueron hidrolizadas 24 horas, conforme al método anteriormente descrito. Los hidrolizados fueron derivatizados con cloruro de dabsilo y analizados en un aparato de HPLC Beckman System Gold, utilizando una columna C18 - Ultrasphere - dabsyl, en fase reversa⁽²⁷⁾.

2.6 ENFOQUE ISOELECTRICO

Las proteínas se sometieron a enfoque isoelectrico en microplacas (0.35x0.43x50 mm) con gradiente de pH de 3 a 9 en un Phast System de Pharmacia. Se utilizó un kit de calibración de puntos isoelectricos de Pharmacia para obtener la curva patrón, graficando el pH contra la movilidad relativa (Rf) de las proteínas.

Los patrones que se utilizaron fueron: amilogucosidasa, inhibidor de tripsina de soya, β - lactoglobulina A, anhidrasa carbónica β de bovino, anhidrasa carbónica β humana, banda básica de mioglobina de caballo, banda ácida de lectina de lenteja, banda media de lectina de lenteja, banda básica de lectina de lenteja y tripsinógeno⁽²⁸⁾.

2.7 PURIFICACION DE LA PSEUDOHEVEINA Y HEVEINA MEDIANTE UNA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Una muestra al 100% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue dializada contra agua destilada y posteriormente contra un amortiguador de fosfatos pH 6.8, 20 mM de NaCl, 1 mM de CaCl_2 , y aplicado a una columna de fetuina (1x20cm). Esta había sido equilibrada previamente con el amortiguador mencionado. Para hacer la primera elución se utilizó el mismo regulador sin CaCl_2 , posteriormente se hizo una segunda elución con agua destilada y finalmente una tercera elución se llevó a cabo con 200 mM de N-acetilglucosamina. Se utilizó un flujo de 5 ml/h, registrándose la absorbencia a 280 nm⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾.

2.8 PRUEBAS DE CRISTALIZACION

1) PRIMERA PRUEBA

Para las pruebas de cristalización se utilizaron dos métodos.

Método de la Gota Asentada. Para este fin se utilizaron cajas Limbro para cultivo de tejidos. La orilla de un pocito se engrasa con grasa para vacío y dentro del pozo se coloca un dispositivo, el cual tiene una pequeña depresión en la parte superior. Posteriormente se agregan al pocito 850 μl de la solución precipitante, mientras que en la cavidad del dispositivo se agregan 10 μl de la muestra más 15 μl de la solución precipitante. Finalmente el pozo se tapa con un cubreobjetos.

Método de Gota Colgante. A un pocito se le agregan 850 μ l de la solución precipitante. Por otra parte en un cubreobjetos previamente silicizado se agregan 15 μ l de la solución precipitante más 10 μ l de la muestra, una vez formada la gota se procede a voltear el cubreobjetos sobre el pocito, de tal forma que la gota quede colgando del cubreobjetos hacia adentro del pocito ⁽³²⁾.

Soluciones para la cristalización.

- 1) 40 mM de Tris-HCl, pH 7.43, MPD 60%.
- 2) 40 mM de Tris-HCl, pH 7.35, MPD 60%, CaCl_2 .

Concentraciones de la muestra.

Heveína 20mg/ml
Pseudoheveína 18mg/ml

2) SEGUNDA PRUEBA. SEMBRADO DE CRISTALES

En esta etapa sólo se utilizó el método de la gota colgante. Se utilizaron 6 pozos para cada una de las proteínas. En los primeros 3 se agregaron 800 μ l de la solución precipitante sin calcio, en el cubreobjetos se colocó una gota con 8 μ l de la muestra y 5 μ l de la solución precipitante sin calcio. En los otros 3 se agregaron 800 μ l de la solución precipitante con calcio y en el cubreobjetos se formó una gota con las cantidades ya mencionadas, pero en este caso se utilizó la solución que contenía calcio ⁽³³⁾.

Sembrado de cristales.

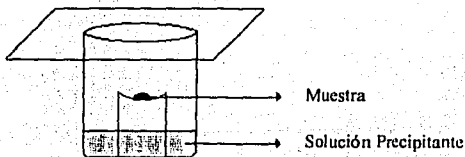
Soluciones para la cristalización.

- 1) Tris-HCl 40 mM, pH 7.55, MPD 60%.
- 2) Tris-HCl 40 mM, pH 7.51, MPD 60%, CaCl_2 .

Concentración de las muestras.

Heveína 20 mg/ml.
Pseudoheveína 18 mg/ml.

Gota Asentada



Gota Colgante

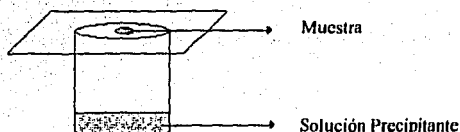


Figura 3

2.9 BIOTINILACION DE LA HEVEINA Y LA PSEUDOHEVEINA

La biotina es una vitamina que se encuentra naturalmente en todas las células, los tejidos con más alto contenido de biotina son el hígado, el páncreas y el riñón. Incluso las células cancerosas tienen mayor cantidad de biotina que las células normales. El peso molecular de la biotina es de 244.31 y su fórmula molecular es $C_{10}H_{16}N_2O_3S$.

La streptoavidina es una proteína de unión a biotina aislada de un cultivo de *Streptomyces avidinii*. La streptoavidina se une a 4 moléculas de biotina por mol de proteína.

Los conjugados de biotina-streptoavidina son muy usados como marcadores moleculares al hacerlos reaccionar con un sustrato adecuado.

Se disolvieron 2 mg de heveína y pseudoheveína en 1 ml de un amortiguador de bicarbonato 50 mM, pH 8.5; antes de usarse se agregó 1 mg de Sulfo-NHS-biotina a 1 ml de agua destilada y se añadieron 74 μ l de cada una de las proteínas por separado. Se colocó la muestra de reacción en un tubo y permaneció toda la noche en agitación. Para eliminar el compuesto que no reaccionó se centrifugó a 1000 g 30 minutos. Después se llevó la muestra al volumen original en mg de fosfato de sodio 0.1M pH 7.0.

2.9.1 COMPROBACION DE LA BIOTINILACION DE LAS PROTEINAS

Se colocaron poco a poco 5 ml de muestra en un filtro millipore de 0.45 micras, dejando secar de tal forma que la muestra no se expandiera sobre el papel. Este filtro se sumergió 30 minutos en gelatina al 0.1% con Triton X-100 al 0.01% en PBS, se lavó con PBS-Triton 0.01% durante 15 minutos, se introdujo en una solución de streptoavidina-peroxidasa 1:2000 durante 15 minutos, se lavó 2 veces más y se sumergió en una solución que contenía 100 ml de H₂O₂ al 0.3% y DAB (1 mg/3.3 ml de PBS) durante 15 minutos, la reacción se paró secando el papel⁽¹⁾.

2.10 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

2.10.1 PRUEBAS DE UNIÓN A BACTERIAS

Las fosfatasa alcalinas son una familia de isoenzimas que se encuentran distribuidas en una gran variedad de especies y tejidos. Las fosfatasa alcalinas tienen dos grandes ventajas sobre otros marcadores. La primera es que cuando es necesario se puede aumentar su sensibilidad dejándolas actuar por un tiempo mayor, debido a que la razón de reacción permanece lineal. La segunda es que existe un gran número de sustratos para estas fosfatasa que no son peligrosos y no requieren un manejo especial. Algunos de estos sustratos como el NBT no se decoloran, aunque a veces presentan un ruido de fondo.

El NBT es un polvo amarillo, con un peso molecular de 817.6 y su fórmula $C_{10}H_{10}O_6Cl_{12}$. Es un excelente sistema para teñir. Cuando reacciona con la fosfatasa alcalina, produce un precipitado insoluble color púrpura oscuro.

Las bacterias usadas en estas pruebas fueron: *Bacillus sp.*, *Azospirillum* y *Rhizobium trifoli*, obtenidas del laboratorio de Fisiología Vegetal de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Las bacterias fueron fijadas a los portaobjetos con metanol durante 30 minutos, después se incubaron con BSA al 0.1% en PBS 10 minutos, se lavaron con Tris 0.1M pH 9.8 y se incubaron con 5 μ l de las proteínas biotiniladas durante 20 minutos, se lavaron 2 veces con Tris 0.1M pH 9.8 Triton 0.001% y se incubaron con avidina fosfatasa alcalina 1:200 por 20 minutos, se lavaron dos veces y posteriormente se incubaron con 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil fosfato/NBT, la reacción fue monitoreada aproximadamente 20 minutos hasta ver un tono azul en las bacterias, se paró la reacción lavando nuevamente las bacterias.

2.10.2 PRUEBAS DE UNIÓN A LEUCOCITOS Y PLAQUETAS

En este experimento se usaron leucocitos y plaquetas humanas donadas por el Dr. Raúl Chavez del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Estas células fueron fijadas con metanol a unos portaobjetos durante 30 minutos, posteriormente se siguió la misma metodología usada para la prueba de unión a bacterias.

2.10.3 PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD POR CARBOHIDRATOS.

Para estas pruebas se utilizó la línea celular VERO. Estas estaban fijadas en placas para ELISA. Las células se incubaron con BSA al 0.1% en PBS durante 10 minutos y se lavaron con Tris 0.1 M, pH 9.8, unas se incubaron N-acetilglucosamina y otras con metil manosido y a otras no se les agregó ningún azúcar como control. Se lavaron 2 veces y se incubaron con las proteínas biotiniladas (heveína, pseudoheveína y concanavalina A, esta última fue el control positivo) nuevamente se lavó y se incubó con avidina fosfatasa 1:200 durante 30 minutos, se lavó e incubó con PNPP durante 20 minutos, se tomaron 100 μ l de las muestras y se colocaron en placas para ELISA y se le agregó a cada pocito 50 μ l de una solución NaOH 3N para parar la reacción. Estos fueron leídos a 410 nm ⁽¹¹⁾.

El PNPP (p-nitrofenil fosfato) es muy usado en las pruebas ELISA. Es un polvo amarillo con una fórmula molecular $C_7H_5NO_6PNa_2 \cdot 6H_2O$ y tiene un peso molecular de 371.1. La fosfatasa alcalina usada junto con el PNPP constituye una de las mejores combinaciones de enzima-sustrato usadas para ELISA debido a que posee una gran sensibilidad y una excelente estabilidad. Cuando la fosfatasa alcalina y el PNPP reaccionan, se produce una solución color amarillenta en la que se puede leer su absorción a 405 nm.

RESULTADOS

La fracción del 65-100 % de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ del homogeneizado del látex fue aplicada a una columna de permeación en gel (Fig. 4), dando por resultado 3 fracciones. Las fracciones A y B son proteínas no identificadas, mientras que la fracción C que es la más abundante corresponde a una mezcla de heveína y pseudoheveína, esta última fracción fue aplicada a una columna de intercambio catiónico CM- Sefarosa (Fig.5), donde se logra una separación parcial de la heveína y de las pseudoheveínas (A y B). En este caso la fracción más abundante corresponde a la heveína, estas fracciones fueron aplicadas por separado a una columna de HPLC de intercambio catiónico TSK-SP-5-PW (Fig. 6 y Fig. 7) donde aparecen 4 fracciones, la más abundante corresponde a la heveína No. 1, mientras que a las otras tres se les denominó pseudoheveína I, pseudoheveína II y pseudoheveína III, esta última fracción se deshecho ya que la cantidad de esta proteína era mínima.

27 Abs. 280 nm

Permeación en Gel.
Columna ACA 54.
Amortiguador. Fosfatos 0.05m, pH 6.8.

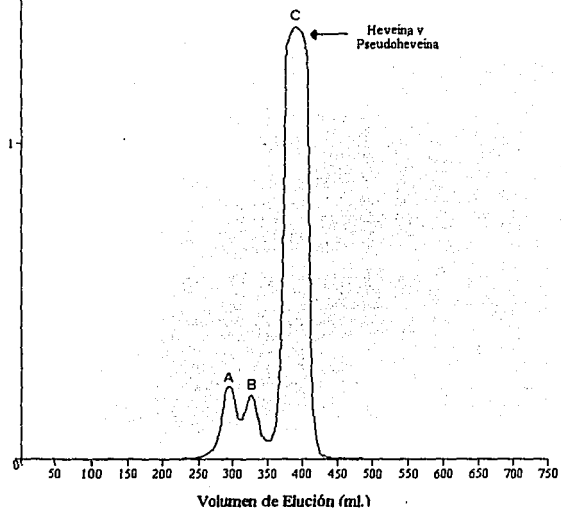
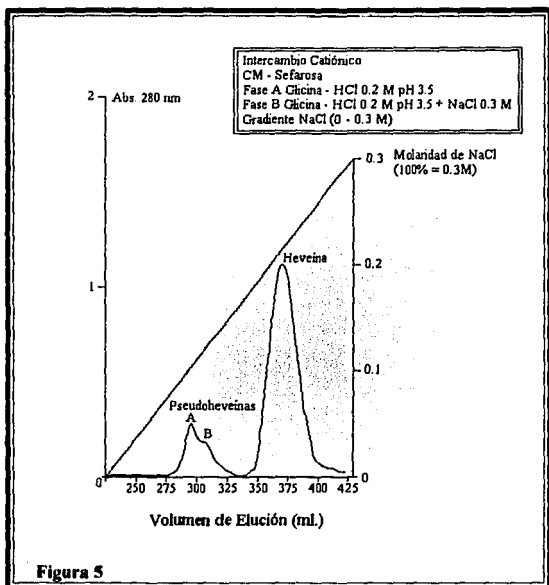


Figura 4



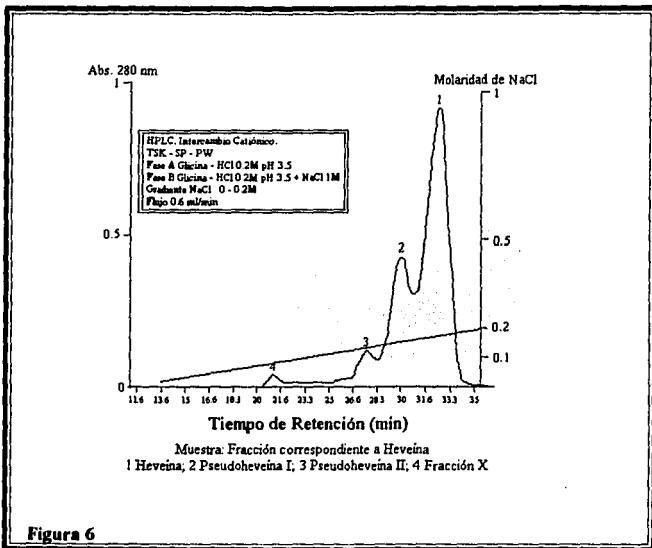
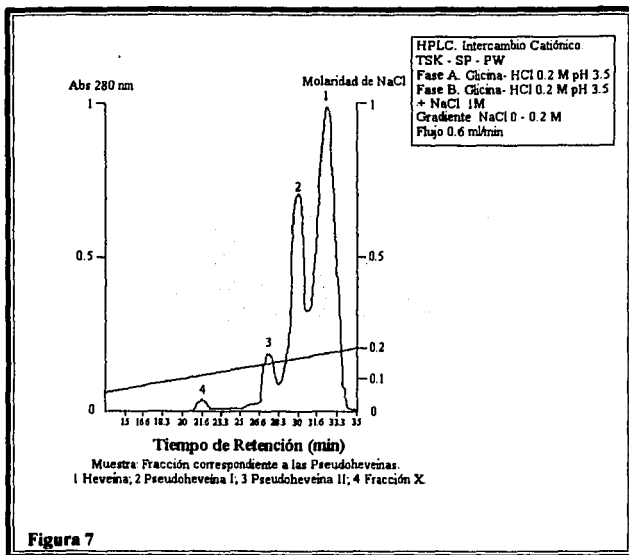


Figura 6



2. Coeficiente de Extinción

A las fracciones que contenían a la pseudoheveína y a la heveína se les leyó su absorbencia a 280 nm resultando: heveína 51.65 y pseudoheveína 147.4. Posteriormente a la pseudoheveína se le sometió al método de BCA para cuantificar la cantidad de proteína presente en la muestra. La solución que contenía a la pseudoheveína presentó una concentración de 17.1435 mg/ml, por lo tanto $E_{280}^{1\%} = 27.6$ para la pseudoheveína.

3. Dicroísmo Circular

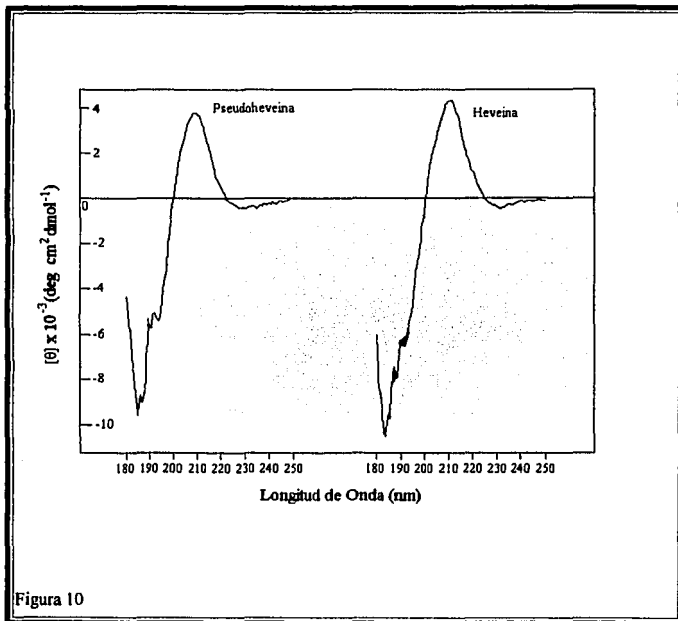


Figura 10

En la figura 10 se puede ver que los espectros de dicroísmo circular tanto de la heveína como de la pseudoheveína son similares en las condiciones descritas.

4. Determinación del peso molecular por espectrometría de masas

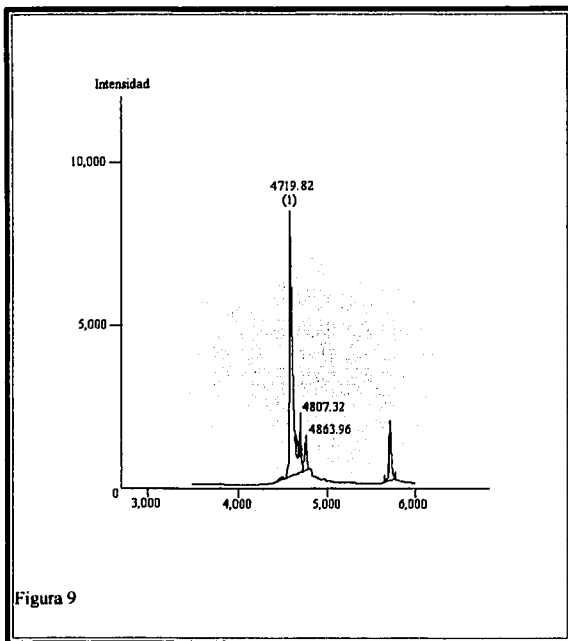
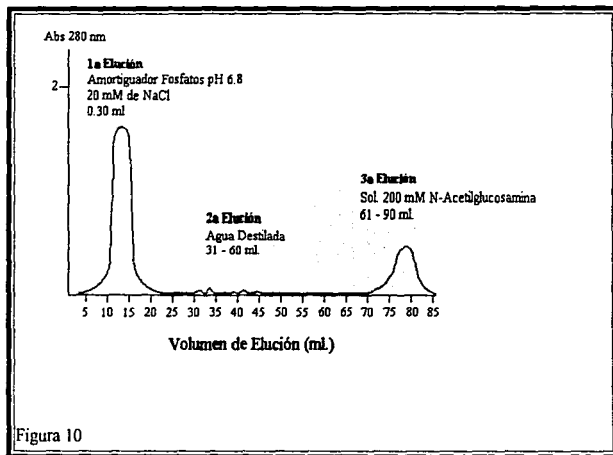


Figura 9

En la figura 9 se observa que el valor de 4719.82 corresponde a la heveína, mientras que el valor de 4807.32 a la pseudoheveína I y el de 4863.96 a la pseudoheveína II.



5. Cromatografía de afinidad (fetuina-agarosa)

Se aplicaron 10 mg. de proteína del extracto crudo del precipitado del 100% de saturación con sulfato de amonio, que previamente había sido dializado contra los amortiguadores mencionados en materiales y métodos. Aquí observamos en la primera elución se eluyeron aproximadamente 7 mg de proteína, la cual no tuvo ninguna interacción con la columna; en la segunda elución la cantidad de proteína eluida fue nula, mientras que en la tercera elución se recuperaron aproximadamente 3 mg.

6. Determinación cualitativa de aminoácidos

Tabla 1.

Resultados de la determinación cualitativa de aminoácidos. (a) y (b) determinaciones hechas en el laboratorio, (c) determinación de aminoácidos reportada en la literatura⁽³⁴⁾.

Heveína (a)	Pseudoheveína (b)	Heveína (c)
Cys	Cys	Cys
Gly	Gly	Gly
Lys	Lys	Lys
Leu	Leu	Leu
Pro	Pro	Pro
Ser	Ser	Ser
Trp		Trp
Thr	Thr	Thr
Asp	Asp	Asp
Glu	Glu	Glu
Tyr	Tyr	Tyr
His		His
		Gln
		Arg
		Ala
		Asn

7. Enfoque isoelectrico

El punto isoelectrico de la pseudoheveína se determinó en microplacas de IEF (gradiente de pH 3 a 9) (Fig. 11), con una muestra que se unió a la columna de afinidad. La microplaca fue leída en un densitómetro laser, el cual indica la intensidad de cada banda expresada como el área bajo la curva, se encontraron dos bandas con puntos isoelectricos de 4.9 y 4.6 por lo que se determinó que la pseudoheveína tiene un punto isoelectrico de 4.6.

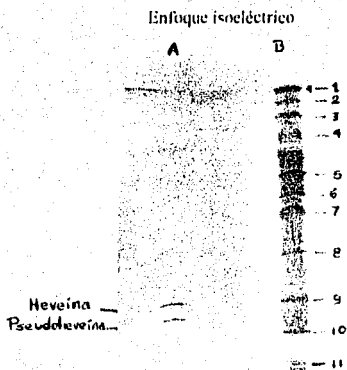


Figura 11.

A. Muestra. (Lo que se unió a la columna de afinidad)

B. Patrones

Patrones	pI	Patrones	pI
(1) Tripsinógeno	9.3	(7) Anhidrasa carbónica humana B	6.55
(2) Banda básica de lenteja	8.65	(8) Anhidrasa carbónica de bovino B	5.85
(3) Banda media de lectina de lenteja	8.45	(9) B - Lactoglobulina A	5.2
(4) Banda ácida de lectina de lenteja	8.15	(10) Inhibidor de tripsina de soya	4.55
(5) Banda básica de mioglobina de caballo	7.35	(11) Amiloglucosidasa	3.5
(6) Banda ácida de mioglobina de caballo	6.85		

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

8. Pruebas de Cristalización.

Las condiciones de cristalización ya habían sido determinadas en nuestro laboratorio⁽¹¹⁾, por lo que se intento obtener cristales de la heveína y de la pseudoheveína utilizando condiciones similares de cristalización. En los primeros experimentos se obtuvieron pequeños cristales en forma de agujas o espigas por lo que se decidió tomar estos cristales como semillas para iniciar una segunda etapa de cristalización, utilizando la técnica de sembrado por el método de gota colgante.

Aproximadamente 15 días después de haber sembrado los cristales en soluciones preequilibradas de las proteínas se observaron los siguientes resultados:

1) En las gotas que contenían calcio se formó sólo un precipitado de heveína, mientras que la pseudoheveína formó pequeños cristales en forma de filamentos y otros con forma regular (romboide).

2) En las gotas que no contenían calcio la heveína formó pequeños cristales en forma de filamentos, mientras que la pseudoheveína formó pequeños cristales en forma de erizos, es decir varios cristales planos con un centro común.

9. PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

9.1 Pruebas de unión a bacterias

En estas pruebas se pudo observar que la heveína se une a *Bacillus* sp., *Rhizobium trifoli* y a *Azospiridium*, mientras que la pseudoheveína solo se une a *Bacillus* sp y a *Azospiridium* (Fig. 12).

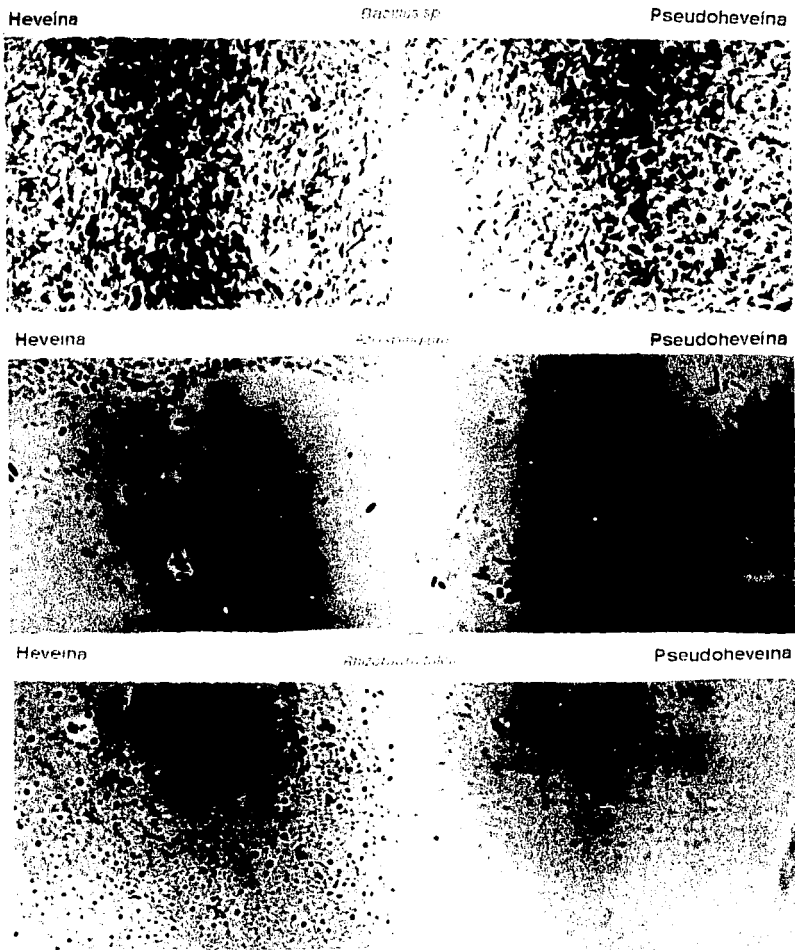


Figura 12.

9.2 Pruebas de union a leucocitos

Aquí se observo que ambas proteínas son capaces de unirse a los leucocitos humanos (Fig. 13)

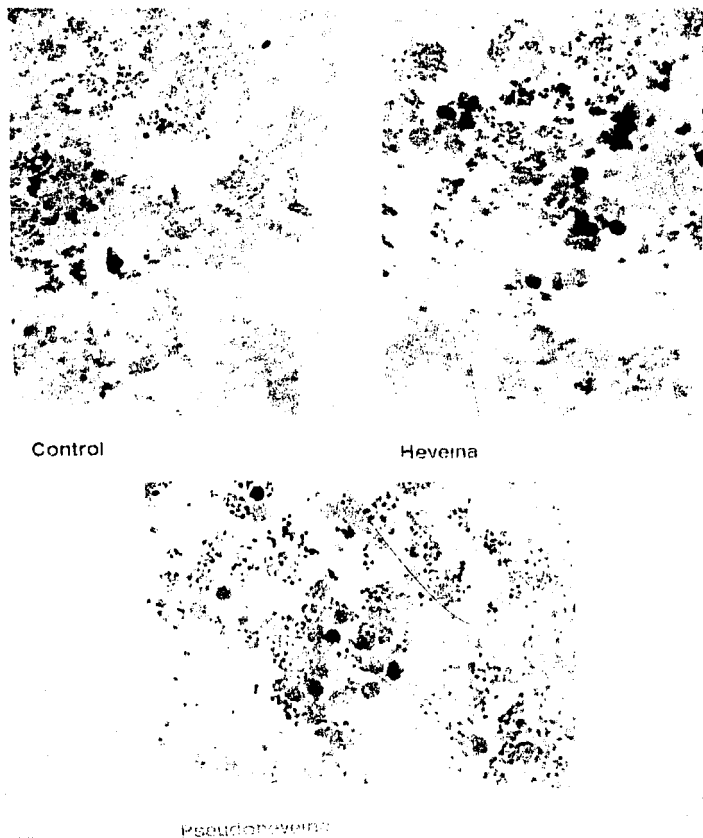


Figura 13.

Tabla 2.

Ensayo de especificidad de la pseudoheveína por un carbohidrato.

Heveína Abs 410 nm	Pseudoheveína Abs 410 nm	Concavalina A Abs 410 nm	Azúcar
0.169	0.139	0.14	Metil - manosido
0.108	0.142	0.187	N - acetilglucosamina
0.148	0.153	0.226	Control

DISCUSION.

La heveína presenta formas moleculares que varían en número y abundancia dependiendo de muchos factores como son: el clón de donde se obtiene el látex, la edad del árbol, la estación del año en la que se recolecte el látex, etc.

La pseudoheveína es la segunda forma molecular más abundante de la heveína, la separación de estas formas moleculares se logró utilizando columnas de intercambio catiónico convencionales y de alta resolución. Todas las isoformas que son menos abundantes que la heveína se eluyeron antes que esta proteína cuando se utilizó un amortiguador con un pH ácido, lo que nos indicaba que todas ellas tenían un punto isoelectrónico más ácido que la heveína. Esto se confirmó al someter a la heveína y a la pseudoheveína a un gel de enfoque isoelectrónico obteniéndose los puntos isoelectrónicos de 4.9 para la heveína y de 4.6 para la pseudoheveína.

Las proteínas purificadas fueron caracterizadas en base a su peso molecular que fue de 4719.82 Da para la heveína y de 4807.32 Da para la pseudoheveína, comparando el peso molecular obtenido para la heveína con el reportado para la misma 4730 Da ⁽³⁵⁾se observa que son similares y la pequeña diferencia que existe entre ambos pudiese deberse a que los métodos usados para determinar el peso molecular son diferentes.

El coeficiente de extinción para la pseudoheveína fue de 27.6 que es mayor al reportado para la heveína que es de 25.6 ⁽¹⁹⁾, esto significaría que en nuestra muestra existía menor cantidad de proteína.

Los espectros de dicroísmo circular son muy similares entre ambas proteínas, por lo que su conformación en solución es casi la misma, esto concuerda con otros estudios hechos a formas moleculares de proteínas diferentes ⁽³⁶⁾ donde se observa que las isoformas tienen espectros de dicroísmo circular sumamente similares entre sí.

Comparando el contenido de aminoácidos encontrado para la pseudoheveína con el reportado para la heveína se observa que la pseudoheveína presenta un 69% de los aminoácidos que tiene la heveína. Es necesario aclarar que este es un ensayo preliminar, ya que es posible que exista una mayor similitud entre estas dos proteínas por lo que en lo futuro se realizarán ensayos cuantitativos de aminoácidos y se intentará hacer la secuenciación de la pseudoheveína.

En nuestro laboratorio se había observado que la heveína aglutina eritrocitos humanos del tipo A y es parcialmente inhibida por N-acetilglucosamina por lo que se decidió intentar separar a la heveína de la pseudoheveína por medio de una columna de afinidad. Para tal fin se seleccionó una columna de agarosa-fetúina. La fetúina es una glicoproteína que se encuentra en el suero fetal de becerro, se sabe que 3 de sus 6 cadenas laterales están unidas a un residuo de arginina, posee de 20-25% de carbohidratos, principalmente manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico y ácido siálico. ⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾

A la columna anteriormente mencionada se le aplicó el precipitado del 100% de saturación con sulfato de amonio que previamente había sido dializado contra agua destilada y contra los amortiguadores mencionados en materiales y métodos, aquí observamos que había una fracción que permanecía fuertemente unida a la columna y al eluiria notamos que correspondía a una mezcla de heveína y pseudoheveína, esto se logró detectar en un gel de enfoque isoelectrónico. Este resultado nos indicaba que ambas proteínas eran lectinas, ya que según Barondes una lectina es cualquier proteína capaz de unirse a algún azúcar y no necesariamente tiene que tener la capacidad de aglutinar células ⁽⁷⁾.

Al comprobar que la pseudoheveína es capaz de unirse a azúcares, tratamos de buscar diferencias en cuanto a la actividad biológica de estas dos proteínas, por lo que se decidió ver si se unían estas proteínas a diferentes bacterias, encontrándose que si hubo diferencias entre heveína que era capaz de unirse a todas las bacterias utilizadas, mientras que la pseudoheveína sólo se unió a *Bacillus sp* y a *Azospiridium*. Esto puede deberse a que la pseudoheveína reconoce azúcares diferentes a los que reconoce la heveína en la superficie de la membrana de estas bacterias ⁽³⁹⁾. Es importante enfatizar que esta es la primera vez que se usa a la heveína y a la pseudoheveína para diferenciar distintos tipos de

bacterias. Asimismo se hicieron otras pruebas biológicas para ver si la heveína y la pseudoheveína son capaces de unirse a leucocitos, resultando que ambas proteínas se unen a ellos, con esto vemos que ambas proteínas son capaces de unirse a células humanas. También se hicieron pruebas de especificidad por carbohidratos para ver si ambas proteínas reconocían a los mismos azúcares, en esta prueba observamos que la heveína es parcialmente inhibida por N-acetilglucosamina, esto concuerda con lo reportado en la literatura⁽¹¹⁾ mientras que la pseudoheveína no reconoce a ninguno de los azúcares utilizados, por lo que se sugiere hacer más pruebas utilizando diferentes azúcares para determinar con exactitud por cual de ellos la pseudoheveína tiene mayor especificidad.

Por otro lado esta es la primera vez que se usa una columna de afinidad para separar a la heveína y a la pseudoheveína de las demás proteínas presentes en el extracto crudo del látex de *Hevea brasiliensis*. Al comparar los resultados obtenidos en la purificación de estas proteínas por medio de la columna de afinidad y los resultados obtenidos al purificarlas por medio de las columnas de permeación en gel e intercambio catiónico, se observaron mejores resultados usando la columna de fetuina - agarosa, ya que esta es una columna muy específica con la que se pueden ahorrar pasos en la purificación, esto es importante ya que mientras más pasos de purificación se realicen, existe mayor riesgo de desnaturar a una proteína, además para cristalizar a una proteína es importante su "historia de purificación" es decir que no se obtienen los mismos resultados al tratar de cristalizar una proteína que haya pasado por varias etapas de purificación que una que haya tenido menos de estas etapas, así como también es importante si se purificó en un medio ácido o en un medio alcalino, etc.

En cuanto a la cristalización se observó que ambas proteínas cristalizan de manera diferente bajo las mismas condiciones; esto nos podría indicar que existen diferencias estructurales muy pequeñas entre ambas proteínas, ya que los espectros de difracción circular son muy similares entre sí. Para poder detectar estas pequeñas diferencias se necesitaría resolver la estructura tridimensional de la pseudoheveína por medio de rayos-X, para poderla comparar con la estructura de la heveína.

Recientemente Beintema y colaboradores⁽⁴⁰⁾ describieron algunas de las características de una de las formas moleculares de la heveína a la que llaman pseudoheveína. Sin embargo, esto es diferente a la que aquí se describe, la pseudoheveína descrita por Beintema es más básica que la heveína y se encuentra en una proporción 1:10 en relación con la heveína, mientras que nuestra proteína es más ácida y se encuentra en una relación de 1:7 aproximadamente. Tata⁽⁴¹⁾ mencionó por primera vez la presencia de diferentes formas moleculares de la heveína a las que denominó pseudoheveínas, es decir que no sólo existía una forma molecular de la heveína sino varias.

Recientemente Gidrol y colaboradores⁽⁴³⁾ propusieron que la heveína está involucrada en el proceso de coagulación del látex, uniéndose a una glicoproteína de 22 KDa que se encuentra en la superficie de las partículas de hule y esta unión está mediada por la N-acetilglucosamina, aunque aún se desconoce la función de las isoformas dentro de la planta, se sabe que en diferentes especies de plantas existen diferentes lectinas con varias formas moleculares que reconocen pequeñas diferencias entre los distintos azúcares que son expresados en la superficie de las membranas celulares.

Desde el punto de vista básico este trabajo nos permite conocer algunas características de la pseudoheveína y quizá si se realizan más estudios estructurales y funcionales podríamos llegar a conocer el papel de las isoformas dentro de las plantas y en especial la función de la pseudoheveína en la *Hevea brasiliensis*. Por otro lado desde el punto de vista aplicativo el hecho de tener una lectina tan pequeña (4807 Da) nos ayudaría a estudiar algunos fenómenos biológicos como son la diferenciación entre diferentes microorganismos y células en las diferentes etapas de diferenciación, virus y partículas subcelulares, citotoxicidad, etc, sin una interferencia estérica grande.

CONCLUSIONES.

1. La heveína y la pseudoheveína son proteínas muy similares desde el punto de vista fisicoquímico.

2. La proporción de pseudoheveína en relación a la heveína es aproximadamente de 1:7 .

3. Nuestros resultados indican que la pseudoheveína tiene un peso molecular de 4807.84 Da, un coeficiente de extinción de $E_{1\%}^{1\text{cm}}_{280} = 2.76$ y su punto isoeléctrico es de 4.6.

4. A partir de los espectros de dicroísmo circular vemos que su conformación es muy similar al de la heveína, es decir, ambas tienen una conformación al azar.

5. En la determinación cualitativa de aminoácidos se observó que la pseudoheveína presenta un 69% de similitud en comparación con los aminoácidos que presenta la heveína reportada.

6. La pseudoheveína es capaz de unirse a bacterias tales como: *Bacillus sp* y *Azospiridium*. Esto es importante ya que confirma que la pseudoheveína es una lectina y que además es capaz de diferenciar entre distintos tipos de bacterias.

7. La pseudoheveína es capaz de unirse a células humanas, en este caso se unió a los leucocitos, si se realizan otras pruebas con diferentes células posiblemente se logre encontrar una aplicación a esta lectina tan pequeña.

8. Los cristales de pseudoheveína y heveína, bajo las mismas condiciones de cristalización son morfológicamente diferentes.

9. Se estableció un método de purificación utilizando por primera vez una columna de afinidad (fetuina-agarosa) para purificar a la heveína y a la pseudoheveína de las demás proteínas presentes en el extracto crudo del látex de *Hevea brasiliensis*.

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Greighton, T. (1993) "Proteins Structure and Molecular Properties". 2nd edition. W.H. Freeman and Co. NY.
- 2) Rawn, D. (1989) "Proteins Energy and Metabolism". Neil Patterson Publishers. Burlington North California.
- 3) Welch, C; Arnon, D; Cochran H; et. al. (1987) "Ciencias Biológicas de las moléculas al hombre". 15ª edición. Compañía Editorial Continental México.
- 4) Guyton, A.(1992) "Tratado de Fisiología Médica". 8ª. edición. Interamericana Mc. Graw-Hill, España.
- 5) Goldstein, I. J; Hughes, R, C; Monsigny, M. et al. (1980). Nature 285,66.
- 6) Liener, I; Sharon, N.(1986) "The lectins Properties Functions and Applications in Biology and Medicine". Academic Press Inc.
- 7) Barondes, S. (1988) "Bifunctional properties of lectins. lectins redefined". TIBS. Dic, 480-482
- 8) Zenteno, E; Ochoa, J. (1988) " Purification of a lectin from *Amaranthus leucocarpus* by affinity chromatography". Phytochemistry, 27, 2, 315- 317.
- 9) Sharon, N. (1993)" Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view". TIBS, June, 221-226.
- 10) Lee, H; Broecker, W; Raikhel, N.(1991) "Co - and Post- translational processing of hevein preprotein of latex of the rubber tree. (*Hevea brasiliensis*)". Journal of Biological Chemistry. 266, 24, 15944-15948.
- 11) Rodríguez, A; Tablero, M. et. al. (1986) "Crystallization of hevein; a protein from latex of *Hevea brasiliensis*. (rubber tree)". Journal of Crystal Growth. 76, 710.
- 12) Rodríguez, A; Ravichandran, K,G; Soriano, M.(1991) "Crystal structure of hevein at 2.8Å resolution". FEBS Letters. 291,2,9278-9283.
- 13) Gidrol, X; Chrestin, H. et. al. (1994) "Hevein, a Lectin-like Protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) Is Involved in the Coagulation of Latex". Journal of Biological Chemistry. 269, 12, 9278-9283.
- 14) Tata, S,J. (1975) "Hevein: its isolation, purification and some structural aspects". Proc. Int. Rubber Conference. 11,499-517. Rubber Res. Inst. Malaysia, Kuala Lumpur.
- 15) Martínez, F; Viesca C.(1986) "El Hule en México". Ed. Copilco, México. 71-74
- 16) Contreras, A.(1942) "Estudios climatológicos, Areas geográficas de dispersión.*Parthenium argentatum*, *Hevea brasiliensis*, *Castilloa elastica* ". Dirección de Geografía Meteorología e Hidrología de la Secretaría de Agricultura, México.
- 17) Jury, T,J; Reynolds, D,F; Cutler, F,J; et al. (1987) "The Euphorbiales Chemistry, Taxonomy and Economic botany". Linnean Society. Academic Press . London. 89-94.
- 18) Arreguín, B; Taboada, J. (1968) "Un aparato de diálisis continua". Bol. Inst. Quím. UNAM,

19) Rossomando, E.F., "Ion-exchange chromatograph". "Guide to protein purification". Methods in Enzymology, Edited by M.P. Deutscher, A.P., Vol. 182, 1990.

20) Chicz R. M.; Regnier F. E. "High-Performance Liquid Chromatography: effective protein purification by various chromatographic modes". "Guide to protein purification". Methods in Enzymology, Edited by M. P. Deutscher, A.P., Vol 182, 1990.

21) Smith P; Krohn, R; Hermanson, G; et al.(1985) "Measure of protein using bicinchoninic acid". Anal. Biochem, 150, 76-85.

22) Kley, H; Hales. (1977) "Assay for Protein Dye Binding". Anal. Biochem. 81, 485-487.

23) Hill, H; Straka J. (1988) "Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents". Anal. Biochem. 170, 203-208

24) Cassim, J; Yang, J.(1969) "A computerized calibration of the Circular Dichrometer". Biochemistry. 8, 1947-1951.

25) G, Hughes; S, Frutiger; C, Fonck. (1987) "Quantitative high - performance liquid chromatographic analysis of Dabsyl - amino acids within 14 min". Journal of Chromatography. 389, 327 - 333.

26) J, Vendrell; F, Avilés. (1986) "Complete amino acid analysis of protein by dabsyl derivatization and reversed phase liquid chromatography". Journal of Chromatography. 358, 401- 413.

27) Gorbics, L; Urge, L; Otvos, L. (1994) "Comparative and optimized dabsyl-amino acid analysis of synthetic phosphopeptides and glycopeptides". Journal of Chromatography A. 676, 169-176.

28) "IEF pl Instruction Manual". (1988). Pharmacia Inc. 1-16

29) Berman, E; Bendel, P. "One and two dimensional 90.5-MHz ¹³C-NMR spectroscopy of the N-linked triantennary oligosaccharide units of calf fetuin". (1986). FEBS. 204, 257-260.

30) Berman, E. "Reinvestigation of the Carbohydrate chains of calf fetuin using ¹³C-NMR Spectroscopy". (1986). Carbohydrate Research. 33-46.

31) (1992) "Avidin- Biotin Chemistry : a handbook". Pierce Company. 155-156.

32) Carter, C,W; Carter, C,W Jr. (1979) "Protein Crystallization using Incomplete Factorial Experiments". Journal of Biological Chemistry. 254, 12219-12223.

33) Cudney, B; Newhouse, Y; Mc Pherson, A. et al. (1994) "Screening and Optimization Strategies for Macromolecular Crystal Growth". Acta Crystallografica, D50, 414-423.

34) Wajujono, L; Scholma, R, A; Beintema, J, J; et al. (1976) "Atlas of Protein Sequences and Structure". National Biomedical Press, Washington, D.C. Vol. 5, 308.

35) Rodríguez, A; Tablero, M; Arreguin, B. et. all. (1988) "Preliminary X-ray Investigation of an Orthorhombic Crystal of Hevein". Journal of Biological Chemistry. 263, 9, 4047-4048.

36) Solís, S; Arroyo, A; Hernández, A. (1992) "Circular dichroism of cystein proteinases from papaya latex. Evidence of differences in the folding of their polypeptide chains". Biochimica et Biophysica Acta. 1118, 288-292.) "Avidin- Biotin Chemistry: A handbook". (1992). Pierce Company. 155-156

37) Begbie, R. "Studies on fetuin from foetal bovine serum. The composition and amino acid sequences of glycopeptides from fetuin". (1974). *Biochemica et Biophysica Acta*. 549-567.

38) E, Berman; P, Bendel. (1986) "One- and two dimensional 90.5MHz ^{13}C -NMR spectroscopy of the N-linked triantennaryoligosaccharide units of calf fetuin". *FEBS letters*. 204, 2. 257-260.

39) Singleton, P; Sainsbury, D. (1987) "Dictionary of Microbiology and Molecular Biology". 2nd Edition. John Wiley and Sons Ltd. UK 76-80.

40) Ukun, M, S; Hofsteenge, C; Beitema, J,J. (1994) "Demonstration by mass spectrometry that pseudo-hevein and hevein have ragged C-terminal sequences". *Biochimica et Biophysica Acta*. 1209, 144-148