



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

“CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA  
RECOMBINANTE Hev b 5 DE *Hevea brasiliensis*”

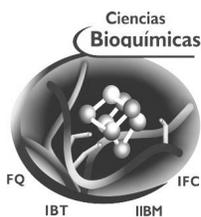
TESIS

Que para obtener el grado académico de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

QFB. Angela Gabriela Carpio Rodríguez



DIRECTOR DE TESIS  
DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO

MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



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.

# RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Adela Rodríguez Romero en los laboratorios Bioquímica 3 y Biología Molecular, en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:  
Dr. Ruy Perez Montfort Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Dr. Enrique Rudiño Piñera Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química en la predicción del modelo estructural de Hev b 5.

Se reconoce la colaboración del Dr. Guillermo Mendoza Hernández, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina en la identificación y confirmación de las secuencias de las proteínas trabajadas en este proyecto.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Patricia Cano Sanchez.

Se reconoce al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por financiar el proyecto con el convenio 82947 y por la beca otorgada para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Enrique Rudiño Piñera	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. Gohar Gevorgyan Markosain	IIB, UNAM
Secretario	Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig	Instituto de Química, UNAM
Suplente	Dr. José Federico del Río Portilla	Instituto de Química, UNAM
Suplente	Dra. Romina Rodríguez Sanoja	IIB, UNAM

# AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ayudarme a forjar mis sueños.

Al Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, por la oportunidad de seguir aprendiendo.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero, por las enseñanzas, los consejos, y la guía durante este tiempo.

Al Dr. Vicente Rubio Zamora, Dr. Santiago Ramon-Maiques, Dr. Mariano Polo Ilaqua, Dr. César Pedroza Roldán, por ser parte fundamental en mi formación científica.

A mis compañeros en Valencia y Lethbridge (Nadine, Leonor, Enea, Sergio, Fernando, José, Clara, Evelina, Fan, Jeffry, Mackenzie, Kirsten, Kristen, Marion, Evan, Luc, Harland, Dominick, Kiki, HJ, Uthe, Laura, Raja)

A mis compañeros de Laboratorio: Dra. Deyanira Fuentes, M. en C. Carol Martínez, M. en C. Ernesto Ladrón de Guevara, M. en C. Israel Mares, QFB. Christian Galicia, Biol. Gerardo Angel, Bioq. Carmen Jaimes, Biol. Erika Guerra.

# DEDICATORIAS

Diosito.... =D

Mami, por ser la complice de mis sueños, gracias por el inmenso amor que me das.  
La verdá!!!!

Pa, por apoyarme a tu manera, hay algo que quiero decirte: “El señor Miyagui era un desgraciado”.

Hugo, merci pour la patience et l'amour. “Ronronnais Chaton, ronronnais”

Mis maravillosos amigos no importa donde se encuentren, los llevo siempre muy cerca en mi corazón.

To my wonderful friends no matter where you are, you are always very close to my heart.

Meus amigos maravilhosos, não importa onde vocês estão, sempre levá-los muito perto do meu coração.

Miei meravigliosi amici sono sempre vicini al mio cuore.

# INDICE

	Página
RECONOCIMIENTOS .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
DEDICATORIAS .....	iii
LISTA DE TABLAS .....	4
LISTA DE FIGURAS .....	4
ABREVIATURAS .....	6
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	10
JUSTIFICACIÓN .....	11
HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	12
CAPITULO 1	
ANTECEDENTES .....	13
1. Sistema inmune .....	13
2. Hipersensibilidad .....	14
2.1 Hipersensibilidad tipo I .....	16
2.2 Hipersensibilidad tipo II .....	17
2.3 Hipersensibilidad tipo III .....	17
2.4 Hipersensibilidad tipo IV .....	17
2.5 Hipersensibilidad tipo V .....	17
3. Alergia al látex proveniente del árbol de <i>Hevea brasiliensis</i> .....	18
3.1 <i>Hevea brasiliensis</i> .....	18
3.2 Látex .....	19
3.3 Alergia al látex .....	20
3.4 Hev b 5 .....	22
4. Proteínas desestructuradas .....	23
CAPITULO 2	
MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
1. Síntesis de cADN a partir de ARN .....	24

	Página
2. Clonación de cADN .....	24
3. Purificación del ADN .....	25
4. Vectores de expresión .....	25
5. Purificación de los plásmidos .....	25
6. Secuenciación de plásmidos .....	26
7. Sobreexpresión .....	26
8. Cromatografía de afinidad .....	27
9. Corte de la proteína de fusión con enterocinasa .....	28
10. Espectrometría de masas .....	28
11. Secuenciación proteica .....	28
12. Isoelectroenfoque .....	28
13. Cromatografía de intercambio anionico .....	29
14. Dicroísmo circular .....	29

### CAPITULO 3

#### RESULTADOS

1. Síntesis de cADN a partir de RNA .....	30
2. Clonación de cADN .....	31
3. Vectores de expresión .....	32
4. Análisis de los plásmidos purificad.....	33
5. Secuenciación de plásmidos .....	34
6. Cinética de expresión .....	35
7. Sobreexpresión .....	36
8. Cromatografía de afinidad .....	36
9. Corte de la proteína de fusión con enterocinasa .....	38
10. Secuenciación proteica .....	39
11. Isoelectroenfoque .....	40
12. Cromatografía de intercambio aniónico .....	41
13. Caracterización estructural .....	44
14. Dicroísmo circular .....	49

	Página
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	52
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	57
BIBLIOGRAFÍA .....	58

## LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA 1 Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad .....	15
TABLA 2 Alérgenos de <i>Hevea brasiliensis</i> reconocidos por IUIS .....	22
TABLA 3 Secuencia de Aminoácidos de <i>Hevea brasiliensis</i> .....	23
TABLA 4 Composición de aminoácidos de Hev b 5 .....	47

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Origen y desarrollo de las reacciones alérgicas (tipo I).....	16
FIGURA 2 Corte de la corteza de <i>Hevea brasiliensis</i> .....	18
FIGURA 3 Recolección de látex del árbol del Hule .....	19
FIGURA 4 Geles de agarosa de mARN y amplificación del gen de Hev b 5	30
FIGURA 5 Geles de agarosa de amplificación del gen Hev b 5 .....	31
FIGURA 6 Geles de agarosa mostrando la digestión de los plásmidos ....	32
FIGURA 7 Análisis con enzimas de restricción .....	33
FIGURA 8 Cromatogramas de secuenciación para el gen Hev b 5 en el vector pET 32 a.....	34
FIGURA 9 Alineamiento entre la secuencia de rHev b 5 en pET 32a .....	34
FIGURA 10 SDS-PAGE al 15%. Cinética de expresión .....	35
FIGURA 11 SDS-PAGE al 15%. Sobre-expresión de Hev b 5 .....	36

	Página
FIGURA 12 SDA-PAGE al 12%. Columna de afinidad .....	37
FIGURA 13 Cromatografía de afinidad a níquel de la proteína de fusión...	37
FIGURA 14 Pruebas de corte con enterocinasa .....	38
FIGURA 15 Corte con enterocinasa de la proteína TRX-Hev b 5 .....	39
FIGURA 16 Secuenciación proteica de la digestión de la proteína de fusión rHev b 5. ....	40
FIGURA 17 Isoelectroenfoque .....	41
FIGURA 18 Perfil de intercambio aniónico de 200 µg de proteína rHev b 5	42
FIGURA 19 Perfil de intercambio aniónico de 2 mg de proteína rHev b 5 ..	43
FIGURA 20 Predicción de desorden estructural .....	44
FIGURA 21 Análisis de estructura primaria de la proteína Hev b 5 .....	45
FIGURA 22 Clasificación carga-hidropatía .....	46
FIGURA 23 Predicción de estructura secundaria para Hev b 5 .....	47
FIGURA 24 Modelo de estructura terciaria para Hev b 5 .....	48
FIGURA 25 Espectro de dicroísmo circular de rHev b 5 en TRIS-HCl 5 mM pH 8 .....	49
FIGURA 26 Espectro de dicroísmo circular de rHev b 5 en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7,5 .....	50
FIGURA 27 Espectro de dicroísmo circular de rHev b 5 en amortiguador de acetatos 10 mM pH 4,2 .....	50

# ABREVIATURAS

cADN	Cadena Complementaria de Ácido Desoxiribonucleico)
Da	Dalton, unidad de masa que equivale a una doceava parte de la masa de un átomo de carbono 12
DC	Dicroísmo Circular
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilendiamino tetracético)
EM	Espectrometría de Masas
EtOH	Alcohol etílico
FIRA	Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura
IgE	Inmunoglobulina E
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
IUIS	International Union Immunological Societies (union internacional de sociedades inmunológicas)
LB	Luria Bertani
M	Molar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización por láser asistida por matriz)
MBP	Maltose Binding Protein (proteína de unión a maltosa)
mM	miliMolar
mRNA	Messenger RNA (ácido ribonucleico mensajero)
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NK	Natural Killer
pb	Pares de bases
pl	Punto Isoléctrico
PM	Peso Molecular
rHev b 5	Proteína recombinante Hev b 5
ARN	Ácido Ribonucleico

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (dodecilsulfato de sodio)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)
TA	Temperatura Ambiente (25°C)
TOF	Time Of Flight (tiempo de vuelo)
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TRX	Tiorredoxina
VC	Volumen de Columna
μM	Micro Molar

# RESUMEN

¿Cuáles son las características bioquímicas y estructurales de Hev b 5?

La pregunta anterior acota el campo problemático dentro del cual se ha inscrito el trabajo.

El presente documento presenta los resultados del estudio y caracterización de la proteína recombinante Hev b 5 del árbol de *Hevea brasiliensis*, la cual es una proteína ácida de la que sólo se conoce su secuencia nucleotídica y de aminoácidos reportadas en 1996.

Hev b 5 ha sido sumamente estudiada como proteína de fusión asociada a la proteína de unión a maltosa (MBP). De esta forma, en conjunto se han hecho innumerables pruebas de la capacidad alergénica de Hev b 5, sin lograr demostrar que esta capacidad es exclusivamente debida a ella, pues siempre es estudiada unida a la MBP.

El material con el que se inició este proyecto fue ARNm del látex de *H. brasiliensis* clona GV42 extraído por la M. en C. Carol Martínez, a partir del cual posteriormente se sintetizó el ADN de una sola cadena y se amplificó el gen Hev b 5. Este último se insertó en un vector de expresión (pET 32a) para producir a Hev b 5 como proteína de fusión asociada a la tiorredoxina (TRX), además de tener un péptido de polihistidinas para facilitar su purificación.

La proteína se sobreexpresó en un sistema bacteriano (*Escherichia coli* cepa Rossetta Gammi). El producto de esta expresión se purificó utilizando una cromatografía de afinidad a níquel. Después se separó Hev b 5 de TRX mediante un corte con enterocinasa, para después separarlas con la ayuda de una cromatografía de intercambio iónico.

La proteína rHev b 5 se caracterizó obteniendo la masa molecular, punto isoeléctrico (pI) y una aproximación a la presencia de estructura secundaria.

El trabajo aporta conocimiento nuevo sobre esta proteína con respecto a lo reportado por Slater y colaboradores. Determinamos la masa molecular de 16080 Da; un pI de aproximadamente 5.85, distinto al de 3.5 que Akasawa y colaboradores reportaron en 1996 (Akasawa, 1996); además de determinar que no contiene

estructura secundaria en condiciones diversas, lo que sugiere que pertenece al grupo de proteínas intrínsecamente desestructuradas.

# ABSTRACT

Which are the biochemical and structural characteristics of Hev b 5?

The previous question delimits the problem area within which the work was oriented.

Here we present the results of a study of the over-expression, purification and characterization of the recombinant protein Hev b 5 from the latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. To date only the nucleotide and aminoacid sequence of the acid protein are known (1996).

Recombinant Hev b 5 has been highly studied as a fusion construct with maltose binding protein (MBP). All the Immunological tests have been performed with the fusion protein and therefore have not be successful in showing how effective is rHev b 5 to elicit allergic reaction in humans.

In this work the mRNA was extracted from *H. brasiliensis* latex, clone GV42.

Subsequently, single stranded DNA was synthesized and the Hev b 5 gene was amplified and inserted into the expression vector pET 32a to produce the allergen as a fusion protein associated with thioredoxin (TRX) and a polyhistidine tag to facilitate purification. The protein was overexpressed in a bacterial system (*Escherichia coli* strain Rosetta Gammi).

The expression product was purified using affinity chromatography. TRX and the polyhis tag were separated from Hev b 5 using enterokinase and they where further purified by ion exchange chromatography.

The protein was further characterized by means of MALDI-TOF spectrometry to obtain its molecular mass (16080 Da). We also determinated its isoelectric point using IEF gels and obtained several Circular Dichroism spectra in different buffers.

The PI was 5.85 and the CD spectra showed no secondary structure. From these results we conclude that this protein belongs to a group of intrinsically disordered proteins. In the prescence of metal ions, such as Ni<sup>2+</sup> the spectrum was different.

# JUSTIFICACIÓN

La alergia al látex del árbol de *Hevea brasiliensis* es un problema de salud pública pues alrededor del 2% de la población mundial padece de ella; pero se acentúa especialmente en países Asiáticos, Africanos y Latinoamericanos. En particular, la hipersensibilidad causada por los productos manufacturados con este material es elevada entre los sectores relacionados con el cuidado de la salud, pacientes expuestos a múltiples procedimientos quirúrgicos, así como el personal del ramo de la producción del hule.

En México se tiene conocimiento por datos recabados por nuestro grupo de trabajo en colaboración con la Dra. Socorro Orozco del Instituto Nacional de Pediatría, que el 1.9% de la población en general, el 24% de los profesionistas de la salud y más del 50% de pacientes pediátricos expuestos a múltiples cirugías son alérgicos a los productos manufacturados con el látex de *Hevea brasiliensis* (datos no publicados).

Por lo tanto, consideramos importante estudiar estructural, bioquímica e inmunológicamente a los principales alérgenos del látex identificados en reacciones de hipersensibilidad de tipo I (mediada por IgE).

En este trabajo se decidió seleccionar a la proteína Hev b 5, ya que se encuentra en cantidades importantes en los productos quirúrgicos manufacturados con hule natural.

Un aspecto relevante es conocer si la proteína está plegada y contiene epítomos conformacionales o lineales.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## Hipótesis

- La proteína recombinante Hev b 5 no está estructurada y por lo tanto no presenta epítopos conformacionales.

## Objetivo General

- Caracterizar estructural y bioquímicamente a la proteína recombinante Hev b 5 del látex de *Hevea brasiliensis*.

## Objetivos Particulares

- Obtener la proteína recombinante de Hev b 5 a partir de mRNA de látex.
- Purificar a la proteína Hev b 5 por métodos cromatográficos.
- Caracterizar a Hev b 5; obtener su masa molecular, punto isoeléctrico y su contenido de estructura secundaria.

# CAPITULO 1

## ANTECEDENTES

En este trabajo resulta importante identificar las características bioquímicas e inmunológicas de uno de los principales alérgenos de hule natural, Hev b 5. A la fecha no existen trabajos sobre las características inmunológicas de este alérgeno como proteína recombinante sola, ya que sólo se ha estudiado como proteína fusionada a la proteína de unión a la maltosa.

### 1. Sistema inmune

A lo largo de los años, el significado de inmunidad se acuñó como protección contra la enfermedad, específicamente contra enfermedades infecciosas (Abbas, *et.al.*, 2003). Las células y las moléculas responsables de la inmunidad conforman el sistema inmune, y la respuesta colectiva y coordinada frente a sustancias extrañas se denomina respuesta inmune.

El sistema inmune es un sistema de protección sofisticado, pues logra hacer la distinción entre lo propio y lo que no lo es para posteriormente erradicar lo extraño de una forma eficiente. Sin embargo, algunas sustancias extrañas no infecciosas pueden desencadenar respuestas inmunitarias exacerbadas.

La respuesta inmune puede ser dividida en dos mecanismos de defensa: la innata y la adquirida.

La respuesta innata está compuesta por elementos humorales (sistema del complemento) y celulares (mastocitos, fagocitos y linfocitos Natural Killer). Los principales responsables de la inmunidad adquirida, adaptativa o específica son los linfocitos T y B, que tienen receptores de reconocimiento a patógenos extremadamente específicos llamados receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) y receptores de células B (BCR, por sus siglas en inglés) respectivamente.

La función de estas células se puede dividir en tres fases: reconocimiento, activación y función efectora.

Los excesos, defectos o errores de la inmunidad causan enfermedades como las alergias, inmunodeficiencia y autoinmunidad. (Regueiro, *et.al.*, 2002).

## **2. Hipersensibilidad**

En 1819 John Blostok hizo la primera descripción clínica detallada de la fiebre del heno (rinitis alérgica); posteriormente, en 1873 Charles Harrison Blackley demostró que los pólenes del pasto eran los causantes de la fiebre (Comtois, 1995).

En 1903 Maurice Arthus comprobó que las inyecciones de suero de caballo aplicadas a un conejo (toleradas las primeras tres veces) produjeron lesiones necróticas en la piel de este último.

Fue en el año de 1906 que Clemens Freiherr von Pirquet introdujo el término de "alergia" (Ring, 2003).

Sesenta años más tarde Ishizaka en Estados Unidos (Ishizaka, 1967) y Gunnar Johansson en Suecia identificaron a la inmunoglobulina E (IgE), como el anticuerpo reactivo de la alergia inmediata (Cennerliet, 1999).

Phillip Gell y Robin Coombs, científicos británicos, diseñaron un esquema de clasificación de las diversas formas de alergia, dependiendo de los mecanismos de daño en los tejidos. Esto fue publicado en el libro "Aspectos clínicos de la inmunología" en 1963 (The Times, 2006). Dicha clasificación aun se mantiene vigente pero con ciertas modificaciones. (TABLA 1).

La alergia actualmente se define como una respuesta inmune exagerada a antígenos extraños e inofensivos (alérgenos) en individuos sensibilizados y con una predisposición genética.

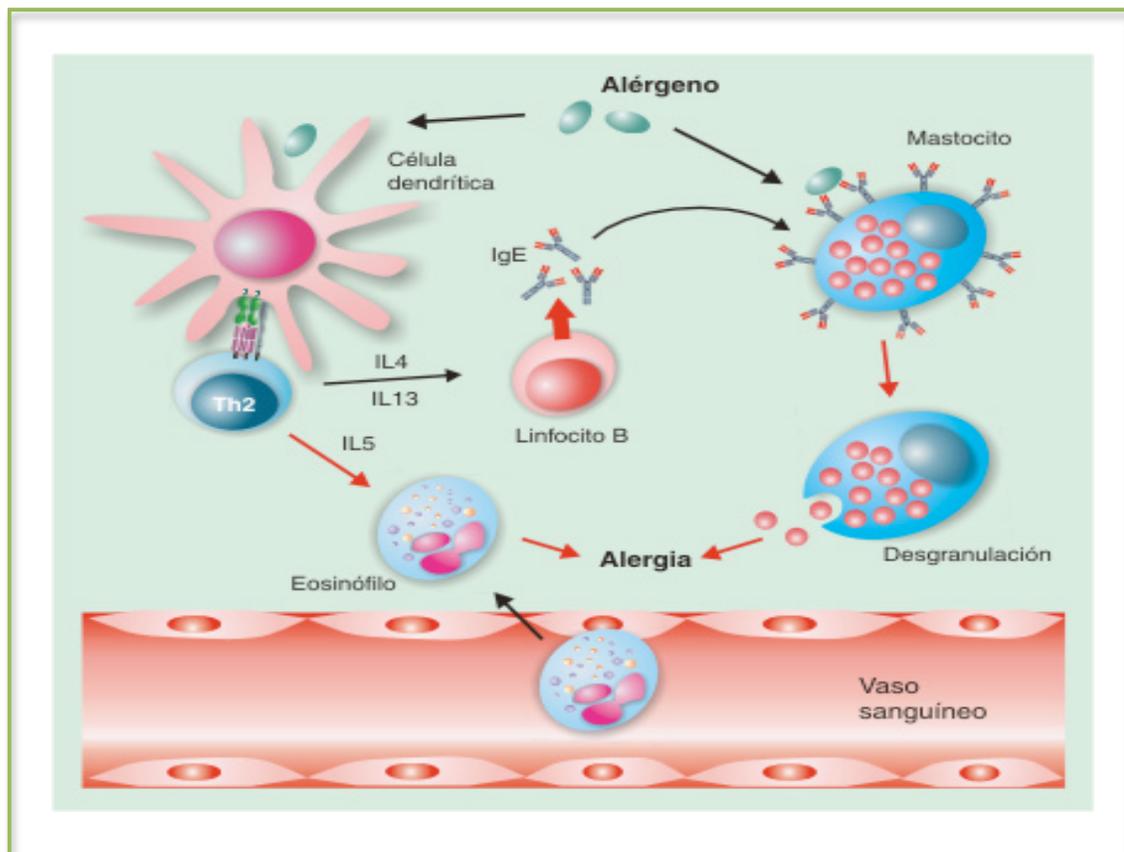
Las alergias se caracterizan porque en el primer contacto con el alérgeno no se origina ningún tipo de reacción, debido a que estas moléculas son procesadas rápidamente. Por ello, el primer contacto o fase de sensibilización no produce ningún tipo de manifestación clínica, aunque si se generan las células de memoria específicas para este alérgeno, de tal forma que tras una re-exposición al mismo se producirá la reacción de hipersensibilidad con sintomatología clínica.

**TABLA 1. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad**

Hipersensibilidad	Mecanismos Inmunitarios	Mecanismos de lesión histica y enfermedad
<b>Tipo I</b>	Anticuerpos IgE	Mastocitos y sus mediadores
<b>Tipo II</b>	Anticuerpos IgM, IgG (anticuerpos contra antígenos en la superficie celular o matriz extracelular)	Opsonización y fagocitosis de las células. Reclutamiento y activación de los leucocitos (neutrófilos, macrófagos) mediados por el complemento y el receptor Fc.
<b>Tipo III</b>	Inmunocomplejos circundantes formados por antígenos y anticuerpos IgM o IgG	Reclutamiento y activación de leucocitos mediados por el complemento y el receptor Fc.
<b>Tipo IV</b>	1) Linfocitos T CD4+ (hipersensibilidad retardada) 2) LTC CD8+ (citólisis mediada por linfocitos T)	1. Activación de macrófagos, inflamación mediada por citocinas. 2. Muerte directa de la células diana, inflamación mediada por citocinas
<b>Tipo V</b>	Anticuerpos IgG	Actúa contra los componentes de la superficie celular, se pierde la actividad de la célula

## 2.1 Hipersensibilidad tipo I

También llamada hipersensibilidad inmediata, alergia atópica o simplemente atopia (que significa reacción anómala o fuera de lugar). El organismo reacciona frente a alérgenos solubles, mediante una respuesta de tipo IgE Fc-dependiente. Este tipo de reacción es prácticamente inmediata, desarrollándose la respuesta en segundos o minutos. Este tipo de hipersensibilidad se esquematiza en la FIG. 1.



**FIGURA 1. Origen y desarrollo de las reacciones alérgicas (tipo I).** En la primera exposición al alérgeno, el cual es captado por las células presentadoras de antígenos, donde son procesados y presentados a los linfocitos Th2. Los linfocitos Th2 promueven la proliferación y diferenciación de los linfocitos B específicos al alérgeno y lo favorece mediante la secreción de citocinas (IL4 e IL13). Los linfocitos B secretadores de IgE armarán al mastocito. En una segunda exposición el mastocito activado secretará las sustancias vasoactivas produciéndose la reacción alérgica. Fuente: Regueiro J., *et.al.* 2002

## **2.2 Hipersensibilidad tipo II**

En este caso el alérgeno también es una molécula soluble, pero se une a la superficie de la célula o matriz extracelular donde genera neoantígenos, que son reconocidos por los anticuerpos de tipo IgG. Estos anticuerpos activan al complemento destruyendo las células que llevan unido al alérgeno.

## **2.3 Hipersensibilidad tipo III**

Si los antígenos son solubles también puede formar inmunocomplejos con anticuerpos de isotipo IgG; estos inmunocomplejos al depositarse causan reacciones inflamatorias locales Fc-dependientes, activándose también el sistema del complemento y provocando la destrucción de estos complejos por fagocitosis.

## **2.4 Hipersensibilidad tipo IV**

Está originada por la respuesta de células T, tanto frente a antígenos solubles como antígenos asociados a células. El antígeno es una proteína extraña o una sustancia química que reacciona y modifica a las proteínas propias, generando neoantígenos que son reconocidos por las células T.

Su re-exposición a los linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+, dan lugar a una reacción de hipersensibilidad, llamada de tipo retardado, ya que tarda varios días en producirse, causando daño en los tejidos debido a la secreción de citocinas inflamatorias o procesos de citólisis.

## **2.5 Hipersensibilidad tipo V**

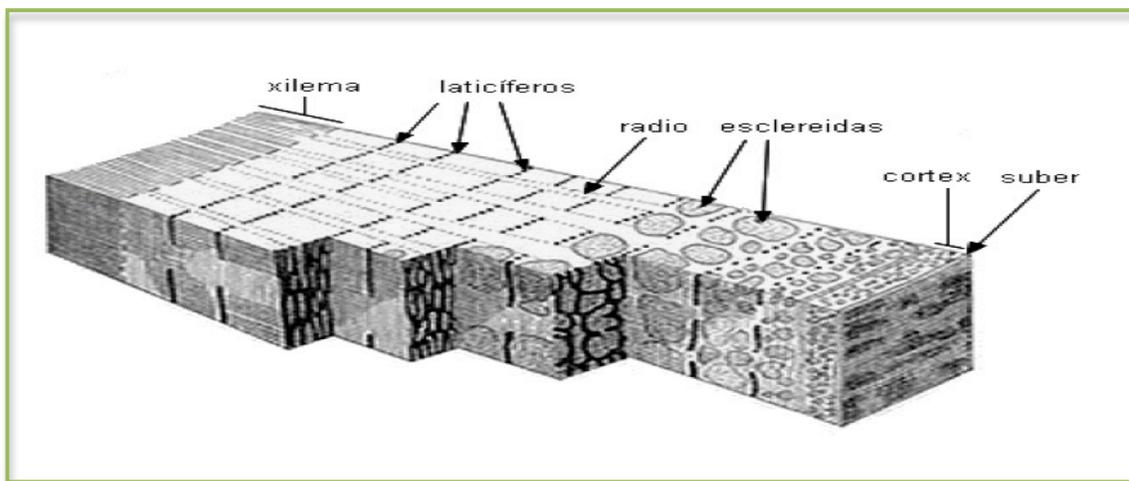
También llamada hipersensibilidad estimuladora o neutralizante, la cual es mediada por los anticuerpos IgG. En este caso las células reconocidas por los anticuerpos no son destruidas, al contrario son estimuladas para secretar diversas sustancias, tal es el caso en la enfermedad de Basedow-Graves (tiroiditis autoinmune de etiología desconocida, donde se estimula la secreción de hormonas tiroideas y es la causa de la tirotoxicosis) o inhiben la recepción de un agonista (miastenia gravis) (Sopena *et.al.*, 2006, Rajan, 2003).

### 3. Alergia al látex proveniente del árbol *Hevea brasiliensis*

#### 3.1 *Hevea brasiliensis*

De acuerdo al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) el árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) es una planta tropical de rápido crecimiento que prospera en una gran diversidad de ambientes. Es un árbol perene que puede alcanzar alturas de hasta 20 metros por lo que es fuente constante de madera, sus raíces pueden alcanzar profundidades de hasta 3 metros en un radio de hasta 10 m.

El tallo está formado por la corteza y una gruesa capa llamada xilema (madera), entre estas dos capas se encuentra el llamado cambium que es el responsable del crecimiento del árbol (FIGURA 2). La corteza del árbol es una parte de suma importancia dentro de este organismo pues es ahí donde se genera y eventualmente se puede extraer de manera sistemática el látex (INIFAP, 2009).



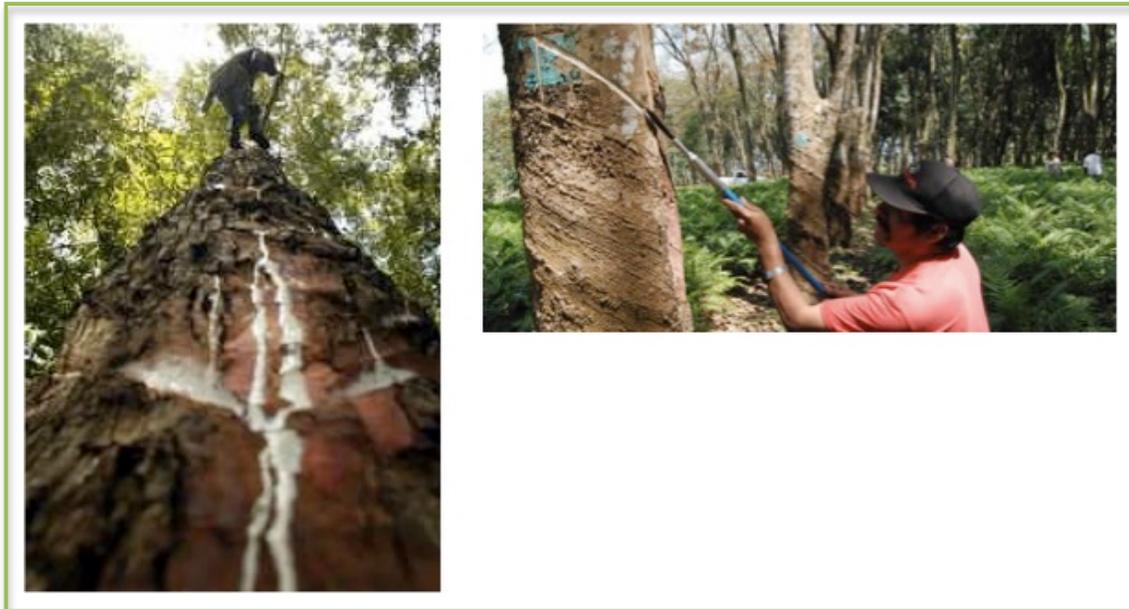
**FIGURA 2. Corte de la corteza del *Hevea brasiliensis*.** En este podemos observar las diferentes capas del árbol del hule, es el los llamados cuerpos laticíferos de donde se extrae el látex.

Fuente: [www.biologia.edu.ar](http://www.biologia.edu.ar)

El látex del hule se define como un líquido blanquecino de apariencia lechosa formado en las células de los vasos laticíferos, ubicados entre la corteza y la madera del árbol. Su composición química es variable según la estación del año, la edad de los árboles, etcétera (FIRA, 1998).

### 3.2 Látex

El látex se obtiene al hacer una incisión en la corteza del árbol del hule, el fluido es el citoplasma de las células laticíferas (FIGURA 3).



**FIGURA 3. Recolección del látex del árbol del hule.**

A) Plantación en Tabasco. Fuente: La Jornada ([www.lajornada.unam.mx](http://www.lajornada.unam.mx))

B) Fuente: [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)

En general, la composición del látex es agua, entre el 55 y 60 % del volumen total; hule o poliisopreno del 28 - 44%; proteínas del 2 - 2.5%; cenizas del 0.7 - 9%; resinas 1.6 %, y azúcares 1-1.5%, de acuerdo a los estudios realizados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (INIFAP, 2009).

El hule natural es cis-1,4-poliisopreno (Sando, *et.al.*, 2008), siendo el producido por *H. brasiliensis* superior en sus propiedades físicas tales como elasticidad, maleabilidad, resistencia eléctrica, resistencia a la compresión, resistencia a la rotura en comparación con el hule sintético. El hule natural tiene características de flexibilidad y barrera contra patógenos que lo hacen único y para lograr estas propiedades es necesario que el material pase por una serie de procesos químicos, que en su conjunto se denomina “vulcanización”.

Charles Goodyear descubrió el proceso de vulcanización del hule natural por accidente. Éste consiste en calentar el látex de *H. brasiliensis* en presencia de azufre

y otros compuestos químicos con el fin de convertirlo en una pasta firme y resistente, (Goodyear Corp., 2009).

El hule natural es un material que hoy en día se utiliza como materia prima en la elaboración de más de 40,000 productos como: material quirúrgico, guantes, preservativos, llantas, etcétera.

Para obtener el producto en estado líquido se adiciona amoníaco al látex recién recolectado del árbol, con el fin de evitar su coagulación y posteriormente es filtrado para evitar las impurezas como basura, y remanentes de la corteza del árbol. Cuando se desea obtener el hule en estado sólido, el látex se deposita en charolas de coagulación adicionándole una solución de ácido fórmico o acético al 2% por cada litro de este material, lo cual permite acelerar el proceso de separación de agua y sólidos, dando origen a láminas de látex solidificado

### **3.3 Alergia al látex**

La alergia o hipersensibilidad de tipo I al látex representa hoy en día un problema de salud pública, donde se ven inmersos el personal relacionado con el cuidado de la salud, pacientes que son sometidos a frecuentes cirugías, y personas relacionadas con la industria del hule.

La primera respuesta de hipersensibilidad de este tipo fue descrita en 1927. Este padecimiento es reconocido internacionalmente como un problema de salud mundial que se ha incrementado durante las últimas décadas, sobre todo en países en vías de desarrollo.

Las respuestas alérgicas a los productos de látex incluyen dermatitis de contacto, broncoespasmos asmáticos, y “shock” anafiláctico que amenaza la vida. (Slater, *et.al.*, 1994; Landwehr, *et.al.*, 1996).

En estudios sobre la prevalencia de la alergia al látex, se ha reportado que es menor al 2% en la población en general (Cremer, *et.al.*, 1998; De Queiroz, *et.al.*, 2009), mientras que es considerada una enfermedad ocupacional importante entre los profesionales del área de la salud con una prevalencia del 20% (Filon, *et.al.*, 2008; Suneja, *et.al.*, 2008; Buss *et.al.*, 2007; Wan, *et.al.*, 2007; Hemery, *et.al.*, 2005),

así mismo los trabajadores de la industria del hule presentan una prevalencia de un 10% (Tarlo, *et.al.*, 1990).

Además, los pacientes jóvenes con trastornos que requieren procedimientos quirúrgicos repetidos presentan una prevalencia mayor, por ejemplo, hasta el 70% de los pacientes con espina bífida han sido diagnosticados con alergia al látex mediado por IgE.(Ausili, *et.al.*, 2007; Wagner, *et.al.*, 2001; Majed, *et.al.*, 2009).

Las personas que sufren de alergia al látex como riesgo ocupacional están expuestas principalmente a las proteínas de látex por vía cutánea y por inhalación, los pacientes quirúrgicos se exponen, además, por vía subcutánea. Cabe destacar que estos reportes provienen de países como Francia, Brasil, Malasia, Reino Unido.

Aproximadamente 200 proteínas han sido descritas en el hule natural, de las cuales catorce (Hev b 1 a Hev b 14) son reconocidos por la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) como los alérgenos del látex (<http://www.allergen.org/Allergen.aspx>). En la TABLA 2 se presenta la información actualmente conocida de dichas proteínas. Es importante resaltar que a Hev b 5 no se le atribuye ninguna función.

De estas proteínas, Hev b 1, Hev b 3 y Hev b 7 son alérgenos importantes para los pacientes con espina bífida (Wagner B, *et.al.*, 2001; Yeang HY, *et.al.*, 1996; Michael T, *et.al.*, 1996.) y Hev b 2, Hev b 5, Hev b 6.01 y Hev b 13 son alérgenos relevantes en la alergia que manifiestan los trabajadores al servicio de la salud (Yagami, *et.al.*, 2009).

**TABLA 2. Alérgenos de *Hevea brasiliensis* reconocidos por IUIS**

Alérgeno	PM (kDa)	Función Biológica
Hev b 1	14	Factor de elongación del hule
Hev b 2	34	$\beta$ -1,3-glucanasa
Hev b 3	24	Proteína de unión a partículas pequeñas de hule
Hev b 4	53-55	Homologo de lecitinasa
Hev b 5	16	Proteína ácida
Hev b 6	20	Precursor de heveina
Hev b 7	42	Proteína tipo patatina
Hev b 8	15	Profilina
Hev b 9	51	Enolasa
Hev b 10	26	Super oxido dismutasa (Mn)
Hev b 11	30	Quitinasa clase I
Hev b 12	9	Factor de transferencia lipídica
Hev b 13	42	Esterasa
Hev b 14	30	Hevamina, lisoizima quitinasa

### 3.4 Hev b 5

Hev b 5 se ha reconocido como uno de los principales alérgenos implicados en la hipersensibilidad de tipo I presente en los trabajadores sanitarios (Filon, *et.al.*, 2008; Suneja, *et al.*, 2008; Buss *et.al.*, 2007; Wan, *et.al.*, 2007; Hemery, *et.al.*, 2005). Además, se ha reportado su presencia en en varias marcas de guantes de exploración quirúrgica en diversos lugares alrededor del mundo (Yeang, *et.al.*, 2000).

Pese a haber diversos estudios de este alérgeno a nivel inmunológico, poco se sabe de sus propiedades fisicoquímicas y estructurales.

En la base de datos de IUIS se encuentra descrita como una proteína ácida de la cual solo se conoce su secuencia de nucleótidos y aminoácidos; TABLA 3 (Slater, *et.al.*, 1996; Akasawa, *et.al.*, 1996). Se ha logrado expresar como proteína de fusión con la proteína de unión a maltosa; pero nunca como proteína recombinante pura (Akasawa, 1996).

**TABLA 3. Secuencia de aminoácidos de *Hevea brasiliensis***

Hev b 5	
<b>Secuencia</b>	MASVEVES AATALPKNETPEVTKAEETKTEE PAAPPASEQETADATPEKEEPTAAPAEPEAP APETEKAEVEVEKIEKTEEPAPEADQTTPEEK PAEPEPVAE EEPKHETKETETEAPAAPAEGE KPAEE EKPI TEAAETATTEVPVEKTEE

#### 4. Proteínas desestructuradas

Por años las proteínas se han considerado como unidades funcionales ligadas a la estructura que poseen, tal como se menciona en el libro “Lehninger Principles of Biochemistry”:

*- La función de una proteína depende de su estructura -*

Entonces, si las proteínas no tienen estructura no son funcionales, o al menos ese es el concepto que se ha manejado. Sin embargo, en los últimos veinte años este paradigma estructura-función ha sido reevaluado debido a las múltiples evidencias que sugieren que un gran número de proteínas carecen de estructura en su forma funcional (Uversky, 2002).

Estas proteínas se conocen como “nativamente desplegadas” o “intrínsecamente desordenadas” (Dunker, 2001), y presentan un bajo contenido de aminoácidos hidrofóbicos y alto de aminoácidos polares y cargados.

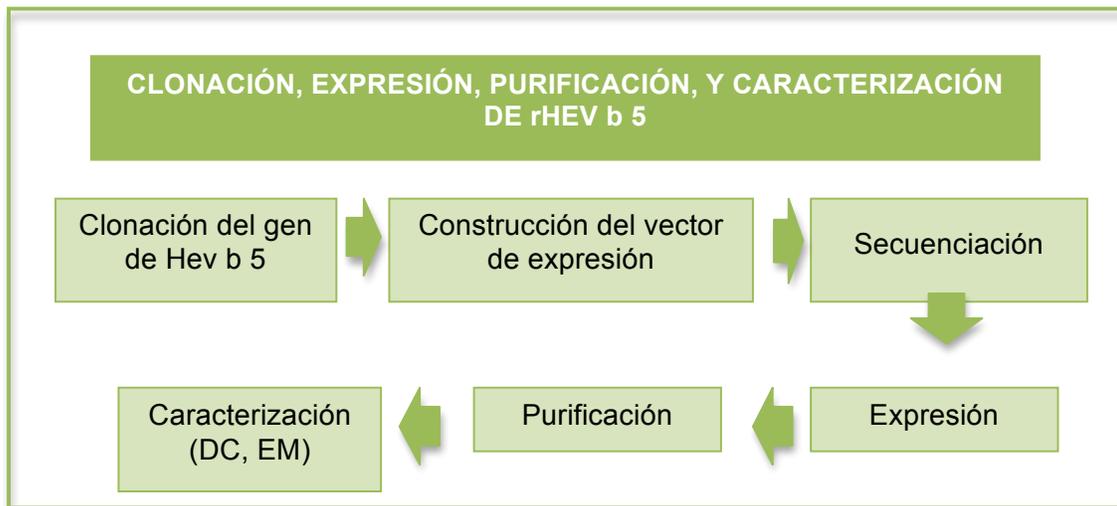
En comparación con las enzimas cuya actividad va asociada a una estructura terciaria, las proteínas “intrínsecamente carentes de estructura” (Wright, 1999), no tienen estructura terciaria en su forma nativa; sin embargo, al unirse a su o sus ligandos específicos pueden estructurarse.

A estas proteínas se les han atribuido diferentes tipos de actividad como señalización celular, remodelación de la cromatina, regulación de la transcripción, además de que pueden funcionar como switches moleculares, participando en el ensamblaje de otras proteínas (Sánchez-Puig, 2005).

# CAPITULO 2

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estrategia Experimental



#### 1. Síntesis de cADN a partir del mRNA

El ADN de cadena sencilla se sintetizó a partir de una muestra de mRNA obtenido de látex (Martínez C., 2010), siguiendo el protocolo descrito en el kit “Protoscript First Strand cADN Synthesis” de New England Biolabs.

#### 2. Clonación del cADN

El cADN sintetizado se uso para la amplificación del gen Hev b 5 empleando una ADN polimerasa termoestable de alta fidelidad (Phusion enzyme, Finnenzyme) junto con los cebadores 5' CAG CCA TGG CCA GTG TTG AGG TTG AAT 3' y 5' CAA AGC TTT TAT TCC TCT GTT TTT TCC 3'

Estos cebadores fueron diseñados además para introducir el sitio de corte *NcoI* al inicio de ATG y el sitio de *HindIII* (New England Biolabs) “downstream” al codón de término.

Los pasos seguidos para la clonación fueron los recomendados para la polimerasa (Phusion enzyme, Finnenzyme).

### **3. Purificación del ADN**

El ADN de Hev b 5 así como los vectores digeridos se purificaron utilizando el kit “MinElute” de QIAGEN siguiendo el protocolo de extracción en gel. La purificación del ADN de Hev b 5 se hizo antes y después de digerir.

La electroforesis de separación de ADN se realizó en una matriz de agarosa al 1%, teñida con una solución de bromuro de etidio.

### **4. Vectores de expresión**

El ADN amplificado y purificado fue digerido con *NcoI* y *HindIII* e insertado direccionalmente en los correspondientes sitios de los plásmidos pET 32 a, pET 28 b y pET 22 b usando T4 ligasa (Novagen).

A continuación se llevó a cabo la transformación en *E. coli* DH5 $\alpha$  utilizando la técnica de choque térmico. La selección de transformantes se llevó a cabo en medio Luria-Bertani (LB) con una concentración final de 0.1 mg mL<sup>-1</sup> de ampicilina para los plásmidos pET 22 b, 32 a y kanamicina 0.1 mg mL<sup>-1</sup> para el plásmido pET 28 b;.

En pET32 a, la proteína Hev b 5 es una proteína de fusión con la tioredoxina, además de contar con un péptido 6 histidinas. Mientras que para pET 22 b se espera que la proteína sea enviada a periplasma lo que teóricamente facilitaría la purificación de la proteína ya que la cantidad de proteínas presentes en el periplasma es menor que dentro de la célula procarionta. Por último, con la proteína en pET 28 b se espera que se exprese sin proteína de fusión (TRX ni cola de polihistidinas).

### **5. Purificación de los plásmidos**

Para poder comprobar que los tres vectores de expresión contenían la secuencia para la proteína Hev b 5 se purificaron los plásmidos, utilizando tanto una extracción directa como una columna del kit “QIAprep Spin Miniprep” de QIAGEN.

En la extracción directa, las células colectadas de un cultivo de 12 h se rompen con un choque alcalino (NaOH y SDS), lo que produce la liberación del contenido celular compuesto por ADN genómico y plasmídico desnaturalizado. Al extraerlo, se adicionó acetato de potasio pH 5,5 con lo que se neutraliza la mezcla y permite la re-naturalización del ADN plasmídico, que queda en suspensión, mientras que el ADN genómico y el resto de los componentes celulares se precipitan por la alta concentración de sales. Finalmente, la mezcla se centrifugó para aislar el sobrenadante, rico en ADN plasmídico y en ARN, el cual se elimina con una ribonucleasa.

Una vez que se aislaron los plásmidos se realizó un análisis con enzimas de restricción *NcoI* y *HindIII* para verificar la presencia del gen de Hev b 5 en las construcciones.

## **6. Secuenciación de plásmidos**

Los plásmidos se mandaron secuenciar, la técnica utilizada para tal fin se basa en la separación de ADN por tamaño utilizando la secuenciación por terminador fluorescente. En esta técnica se marcan cada uno de los cuatro didesocinucleótidos que terminan la cadena con un colorante con fluorescencias a diferentes longitudes de onda. Se hace la detección y registro de la coloración fluorescente, y los datos resultantes se dan como cromatogramas conocidos como electroferogramas.

## **7. Sobreexpresión**

Los plásmidos aislados con la construcción correcta fueron utilizados para transformar a células de *Escherichia coli* Rosetta-gami.

Las células se dejaron crecer a 37°C en medio líquido LB suplementado con 0.1 mg mL<sup>-1</sup> de ampicilina, 0.03 mg mL<sup>-1</sup> de kanamicina, 0.025 mg mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol, 0.05 mg mL<sup>-1</sup> de tetraciclina hasta una turbidez de entre 0.5 y 0.7 a 600 nm. El cultivo se colocó en hielo 45 minutos, después se indujo con 0.2 mM IPTG y 2% de EtOH, se dejó crecer toda la noche a 23°C con agitación constante.

Las células se centrifugaron, se resuspendieron en un volumen de TRIS-HCl 20 mM pH 8, 0.15 M NaCl y se centrifugaron a 22000 g.

El pellet se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ , los pasos subsecuentes de purificación se llevaron a cabo a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## 8. Cromatografía de afinidad

Las células fueron resuspendidas en una proporción 1:0,05 del volumen original del cultivo en amortiguador de lisis el cual contienen 20 mM TRIS-HCl pH 8, 0.15 M NaCl, conteniendo además la mezcla de inhibidores de proteasas "Complete free EDTA 1x" (ROCHE).

A las células en suspensión se les adicionó 250  $\mu\text{l}$  de una solución de lisozima 20  $\text{mg mL}^{-1}$ , se dejó en hielo para ser sonicados (6 pulsos de 30 s c/u a 36 W, Sonicator 3000). Después del sonication se centrifugó a 13000 rpm por 35 minutos. El sobrenadante fue filtrado por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, se aplicó a una columna His-trap activada con una solución de sulfato de níquel (Amersham Biosciences) y equilibrada con un amortiguador TRIS-HCl 20 mM pH 8, NaCl 0.5 M, imidazol 20 mM usando una bomba peristáltica con un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . La columna fue lavada con este mismo amortiguador hasta que la absorción a 280 nm fue nula. Después se eluyó usando un gradiente lineal (15 volúmenes de columna, VC; con un flujo de  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ ) con amortiguador TRIS-HCl 20 mM pH 8, NaCl 0.5 M, imidazol 400 mM (fracción de 8 mL). La fracción que contenía la proteína se identificó mediante un gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio al 12% (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie.

Dicha fracción fue concentrada y dializada con un amortiguador TRIS-HCl 20 mM pH 8, NaCl 0.04 M, usando un sistema de ultrafiltración (Amicon Ultra 10 kDa de Millipore). La muestra se conservó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## **9. Corte de proteína de fusión con enterocinasa.**

La proteína de fusión se separó de rHev b 5 con la enzima enterocinasa siguiendo el protocolo de “Enterokinase Max” de Invitrogen. En general, por cada 8 mg de proteína de fusión se adicionaron 2 U de enterocinasa, (siguiendo el protocolo sugerido), se dejó a 4°C en agitación constante por 16 h. Los resultados del corte se visualizaron con la ayuda una SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie.

## **10. Espectrometría de masas.**

Para determinar la masa de la proteína pura se usó un espectrómetro de masas MALDI-TOF (MicroFlex de Brucker Esquire). A 100 µg de muestra se le añadieron 5 µL de ácido sinapínico en una mezcla de acetronitrilo/agua/TFA realizando dos diluciones.

## **11. Secuenciación proteica**

La muestra proveniente del corte con enterocinasa se separó mediante un gel SDS-PAGE al 15%, revelado con azul de Coomassie. A partir de la banda que mostraba la masa molecular correspondiente a Hev b 5 se llevó a cabo una hidrólisis con tripsina y los péptido obtenidos fueron separados por cromatografía de fase reversa. Finalmente, la identificación de los péptidos se hizo usando espectrometría de masa y la base de datos Mascot. Estos procedimientos se realizaron por el Dr. Guillermo Mendoza Hernández del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

## **12. Isoelectroenfoque**

Para determinar el punto isoeléctrico de la proteína de interés, liberada después del corte con enterocinasa, se utilizó un Phastgel IEF con límites de pH de 4-6.5 (GE Healthcare), en un equipo “Phast Systemn” (Amersham Biosciense) y siguiendo el protocolo descrito para el sistema (Amersham Biosciense).

### **13. Cromatografía de intercambio aniónico**

La muestra de proteína obtenida después del corte con enterocinasa previamente dializada contra una solución de TRIS-HCl 20 mM pH 8 y concentrada, se aplicó a una columna de intercambio aniónico (Mono Q, Amersham Biosciences) equilibrada con la misma solución amortiguadora. Se utilizó un sistema ÁKTA (FPLC, Amersham Biosciences) con un flujo de  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ .

La elución de la proteína se realizó con un gradiente de 0% al 100% en una solución TRIS-HCl 20 mM pH 8, NaCl 1 M, en 45 volúmenes columna (VC) todo esto a temperatura ambiente (TA). Se colectaron fracciones de 1 mL para su posterior análisis, ya que cabe mencionar que Hev b 5 no presenta aminoácidos aromáticos ni cisteínas, por lo que no fue posible medir su absorbancia a 280nm. Para detectar a la fracción que contenía a Hev b 5 se usaron geles de SDS-PAGE teñidos con una solución de azul de Coomassie además de que se corroboró su presencia al medir su absorbancia a 225 nm.

### **14. Dicroísmo circular**

Con el objetivo de determinar si Hev b 5 contenía elementos de estructura secundaria se obtuvieron espectros de dicroísmo circular en un espectropolarímetro (Jasco J-720) en un intervalo de longitud de onda de 195 a 260 nm a temperatura ambiente (25°C) en tres diferentes amortiguadores: TRIS-HCl 5 mM pH 8, fosfatos 10 mM pH 7,5, acetatos 10 mM pH 4,2. También se buscó detectar cambios conformacionales en distintos amortiguadores con diversas concentraciones de sales: TRIS-HCl 5 mM pH 8, NaCl 100 mM; TRIS-HCl 5 mM pH 8, NaCl 24 mM; TRIS-HCl 5 mM pH 8, NaCl 12 mM; TRIS-HCl 5 mM pH 8, NiSO<sub>4</sub> 5 μM; TRIS-HCl 1 mM pH 8, NiSO<sub>4</sub> 5 μM; TRIS-HCl 5 mM pH 8, ZnSO<sub>4</sub> 1 μM.

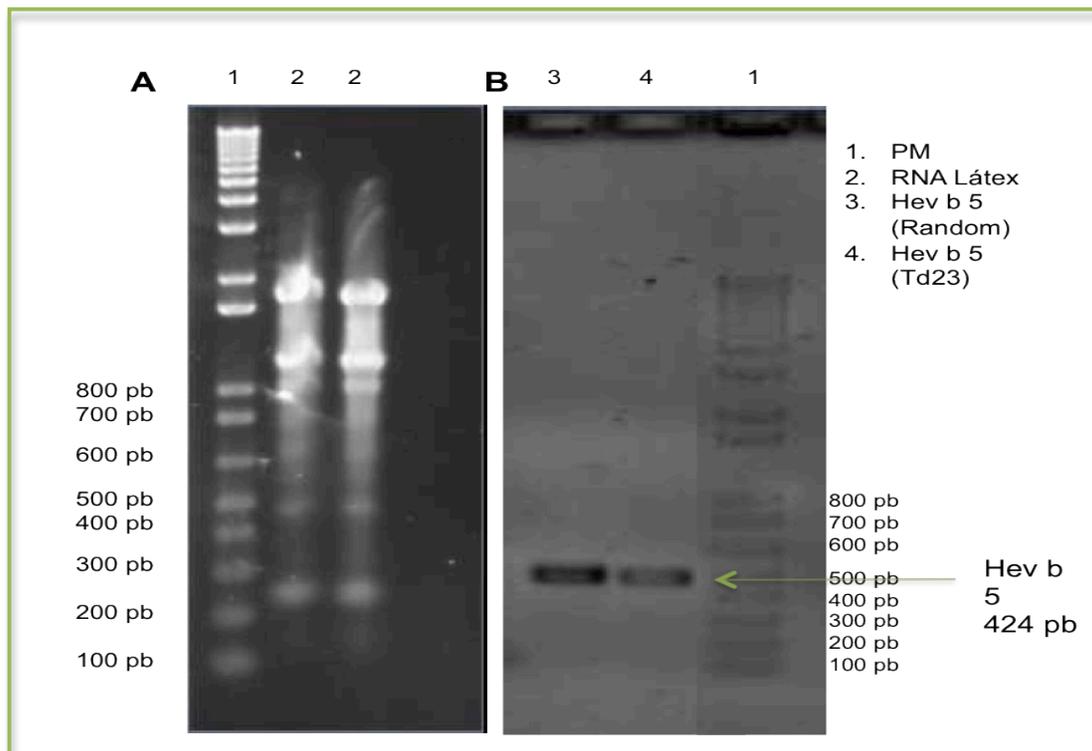
# CAPITULO 3

## RESULTADOS

### 1. Síntesis de cADN a partir del mRNA

La purificación de un ARN de alta calidad, como el que se muestra en la FIGURA 4, es muy importante para la obtención de ADN de cadena sencilla, ya que si existe degradación en éste, el cADN sintetizado no servirá como cadena molde.

Para evaluar la calidad del cADN sintetizado que se obtuvo se colocó 1  $\mu$ L de muestra en un gel de agarosa al 1% (FIGURA 4). Las bandas que se observan en los carriles 3 y 4 corresponden al gen amplificado de Hev b 5, ya que presenta el número de bases esperado (424 pb). Cabe mencionar que tanto el control negativo como positivo funcionaron adecuadamente.



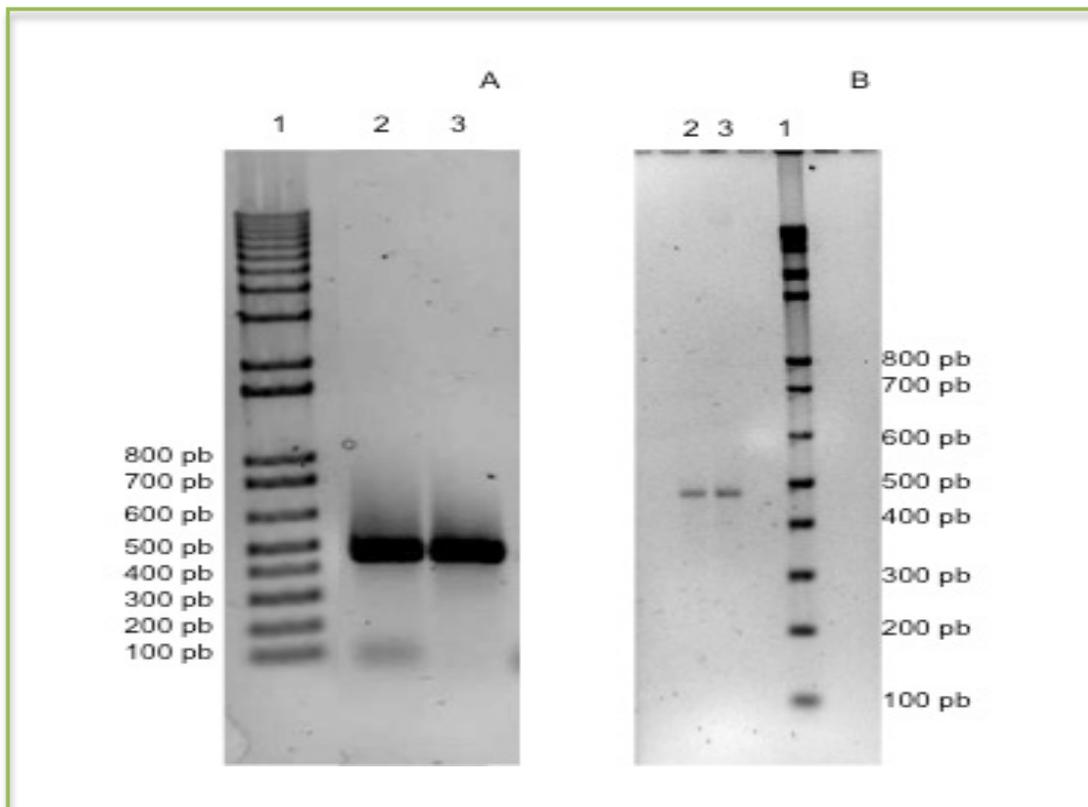
**FIGURA 4. Geles de agarosa de mRNA y amplificación del gen de Hev b 5.** Geles de agarosa al 1% . A) mRNA del látex de *Hevea brasiliensis*, B) Gen de Hev b 5 amplificado utilizando la transcriptasa reversa del virus de leucemia murino utilizando distintos primer (Random, Td23).

## 2. Clonación y purificación del cADN

A partir de la secuencia de nucleótidos reportada para la proteína Hev b 5 se diseñaron un par de oligonucleótidos con los cuales se logró amplificar al gen de interés a partir de cADN, utilizando una polimerasa de alta fidelidad.

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados considerando darle direccionalidad a la clonación del gen, es decir, que una vez amplificado este último se lograría insertar en un vector que incluía una proteína de fusión en el extremo amino terminal. *NcoI* en el extremo amino terminal y *HindIII* en el extremo carboxilo terminal del gen.

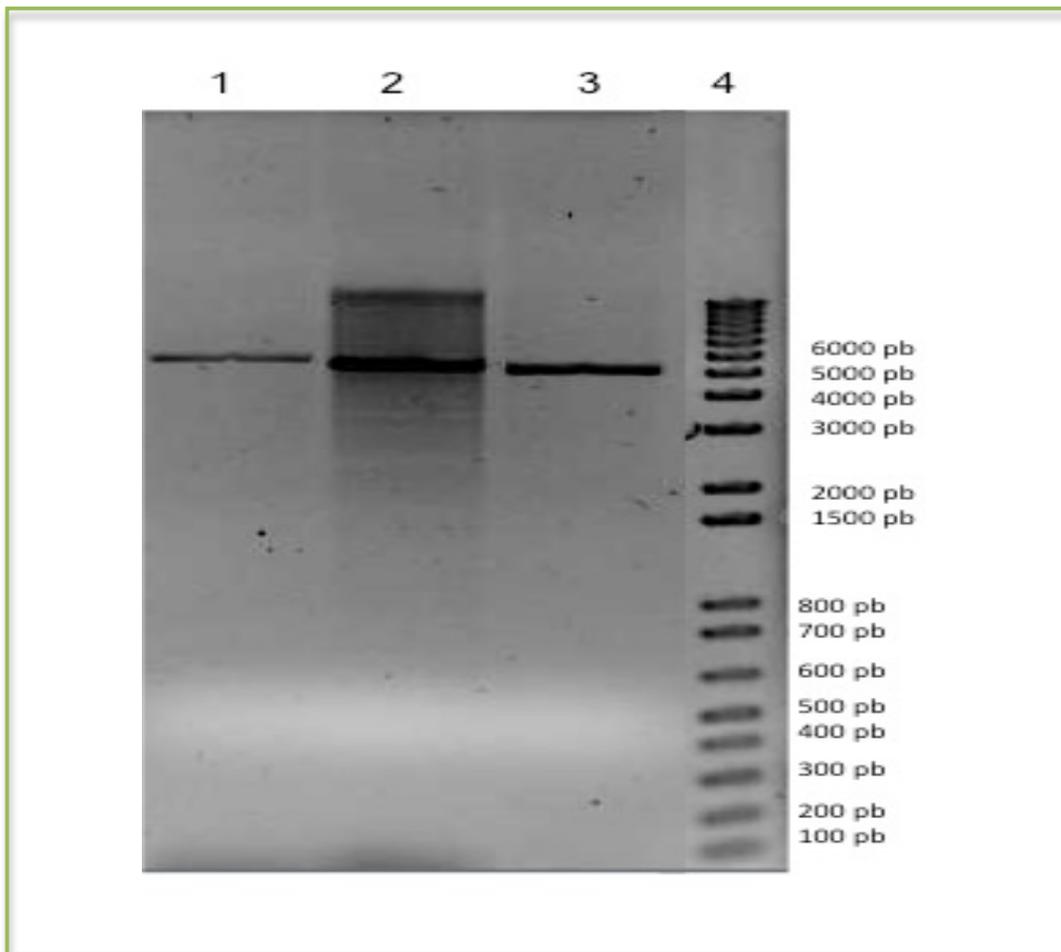
El producto de la amplificación fue purificado directamente del gel. (FIGURA 5) ya que presentaba rastros de degradación, entonces se deseaba eliminar posibles fuentes de contaminación para los pasos subsecuentes.



**FIGURA 5. Geles de agarosa de la amplificación del gen de Hev b 5.** A) Antes de purificar, B) Después de purificar. Carriles: 1) PM, 2) Hev b 5 (random), 3) Hev b 5 (Td23). La purificación se llevó a cabo con la intención de minimizar contaminantes del gen, pues tal como se observa en el gel A, existía gran cantidad de material de degradación

### 3. Vectores de expresión

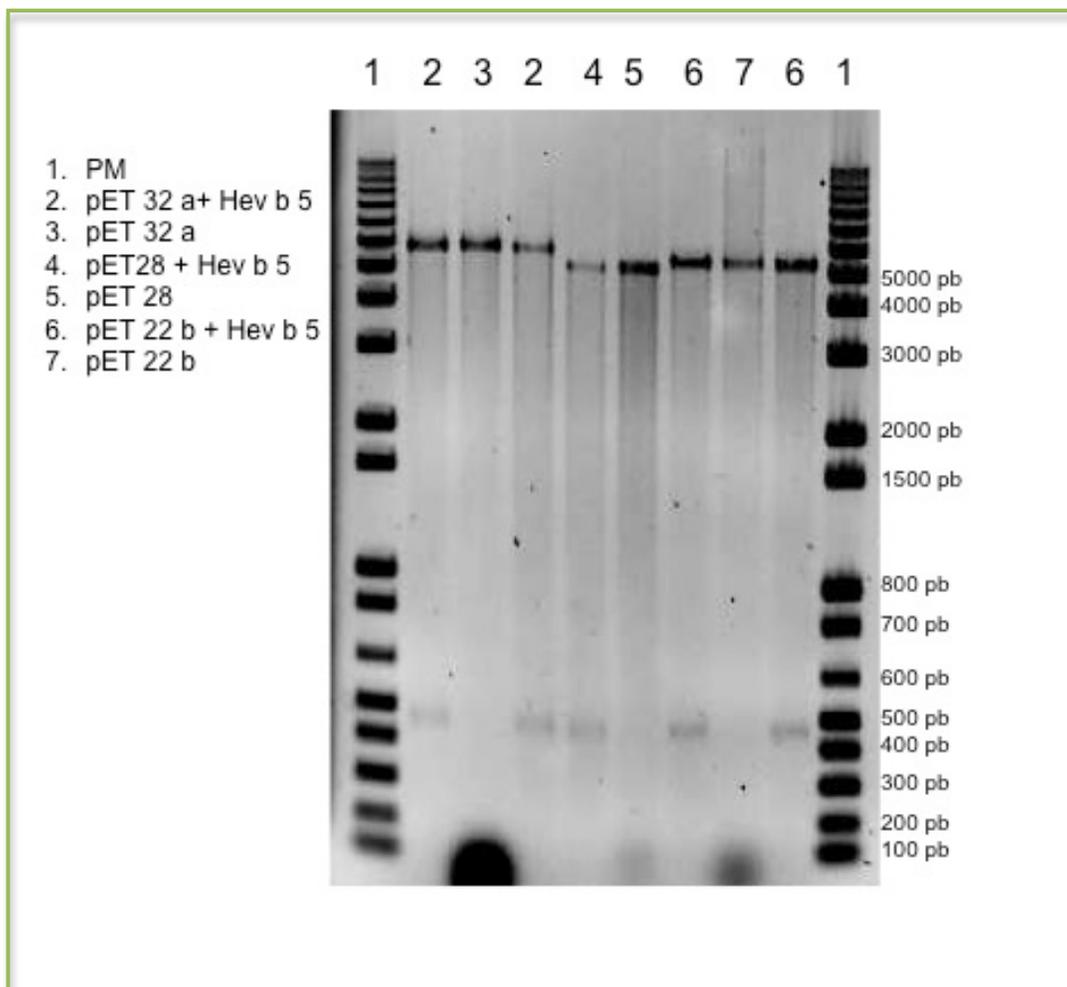
El producto de la amplificación ya purificado fue digerido con las enzimas *NcoI* y *HindIII*, lo mismo que los vectores pET 22b, pET 32a, pET 28 para ser ligados y transformados en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Después de la digestión los plásmidos linearizados se cargaron en un gel de agarosa al 1% para poder ser purificados. (FIGURA 6). La necesidad de purificar a los plásmidos se debió a que el vector pET28b presentaba contaminaciones debidas seguramente a una digestión incompleta y al igual que con el gen Hev b 5 se quería reducir los riesgos de contaminación.



**FIGURA 6. Gel de agarosa mostrando la digestión de los plásmidos.** pET 22b, 28 y 32a con las enzimas de restricción *NcoI* y *HindIII*. Carriles: 1) pET 32a, 2) pET28, 3) pET22b, 4) PM

#### 4. Análisis de los plásmidos purificados

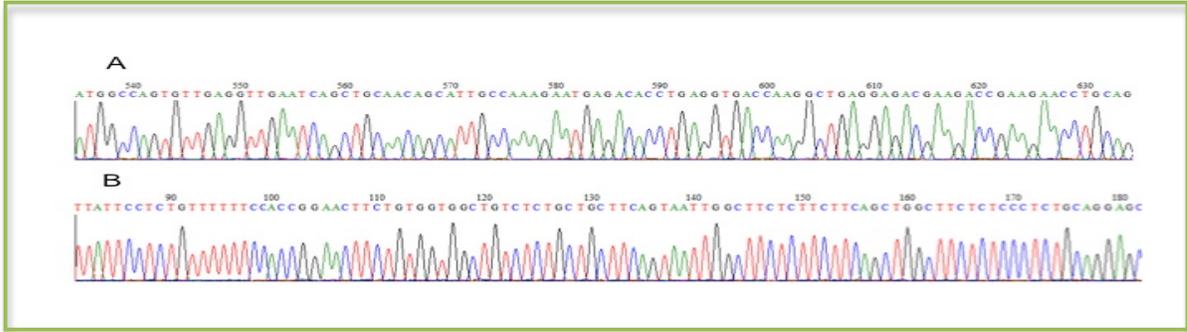
Cuando los plásmidos y el gen de interés fueron digeridos, ligados y purificados, tal como se describe en el capítulo II, se efectuó un análisis por enzimas de restricción de las posibles clonas (FIGURA 7). Esto permitió verificar la presencia del inserto en los vectores, ya que se esperaba una banda de aproximadamente 3900 pb para los plásmidos y una de 451 pb para el inserto.



**FIGURA 7. Análisis con enzimas de restricción.** De las clonas obtenidas de clonar el gen Hev b 5 en el plasmido correspondiente; Las enzimas usadas fueron *NcoI* y *HindIII*. Como se observa se comprobó la presencia del gen Hev b 5, pues se ve una disminución en el tamaño del vector con y sin inserto, además de que Hev b 5 se observa cuando aplica entre los marcadores de 400 y 500 pb.

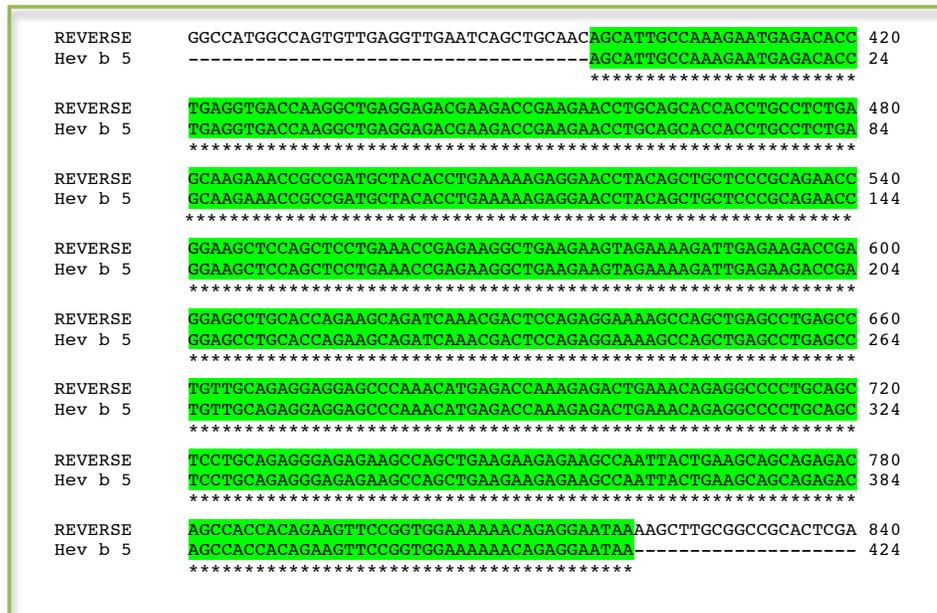
## 5. Secuenciación de plásmidos

En la FIGURA 8 se puede apreciar en los cromatogramas que la muestra enviada a secuenciar era de muy buena calidad pues los picos de fluorescencia se ven claramente definidos.



**FIGURA 8. Cromatogramas de secuenciación para el gen Hev b 5 en el vector pET 32a.** La secuencia completa fue comprobada con la ayuda del programa ClustalW2 y Oligo Calc:Oligonucleotide Properties Calculator A) T7 promotor, B) T7 terminador.

A continuación se muestra la comparación entre la secuencia de nucleótidos para Hev b 5 depositada en la base de datos “genbank” y la secuencia obtenida del gen insertado en los pETs 28, 22 b y 32 a, con lo que se demuestra que no existen artefactos de biología molecular, mutaciones, deleciones o inserciones en el material genético que se utilizó (FIGURA 9).



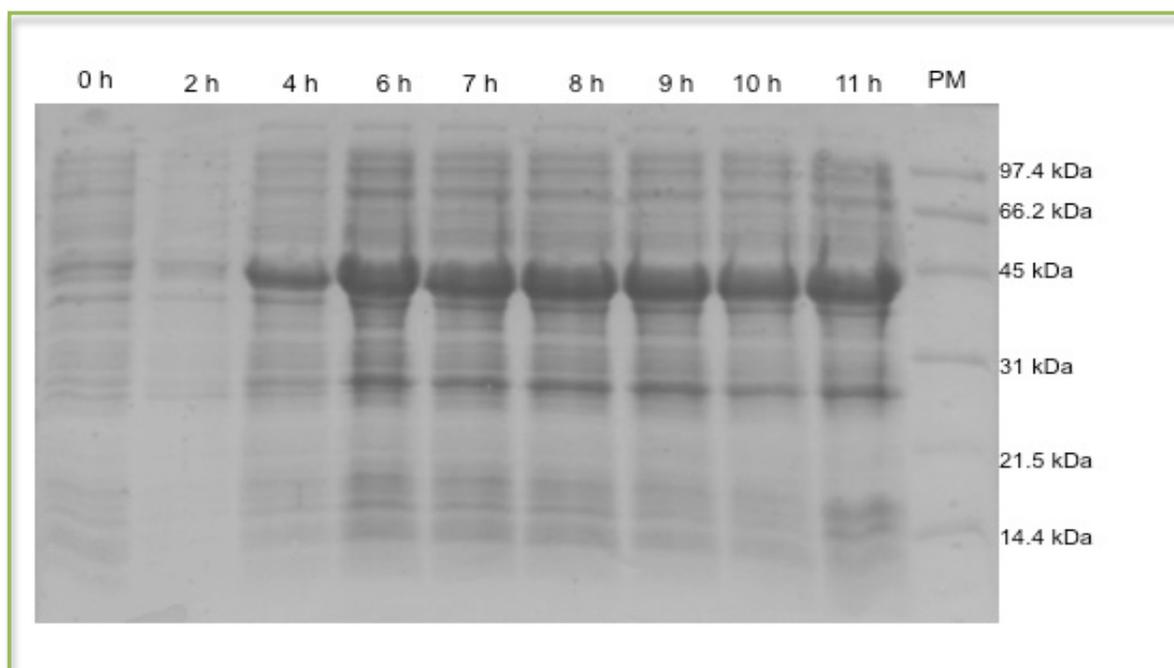
**FIGURA 9. Alineamiento entre la secuencia de rHev b 5 en pET 32a y la secuencia depositada en genbank.** Se comparo la secuencia obtenida del inserto en pET 32a, pET 28 b y pET22b.

## 6. Cinética de expresión

La cinética de expresión de la proteína rHev b 5 fue realizada utilizando la metodología descrita en el punto 7 del capítulo II. Es importante mencionar en este punto que utilizando la misma técnica descrita anteriormente se probó la expresión con los tres vectores trabajados hasta ese momento (pET 28, pET 22 b y pET 32 a). El resultado fue una pobre expresión para los dos primeros en comparación cualitativa con el pET 32 a, es por ello que para el resto del trabajo fueron descartadas las construcciones del pET 28 y pET 22 b.

Mediante una electroforesis desnaturante en un gel de acrilamida-bis acrilamida al 15% se observó la expresión de la proteína en forma cualitativa, ya que en cada carril (FIGURA 10) se cargaron 10  $\mu$ L del sobrenadante de una alícuota de 1 mL de cultivo.

Como se puede apreciar, el tiempo de inducción óptimo fue de 6 horas, pues a partir de ese momento la cantidad de proteína es constante reduciendo entonces el riesgo de tener metabolitos secundarios que pudieran ocasionar interferencias en el proceso de purificación.

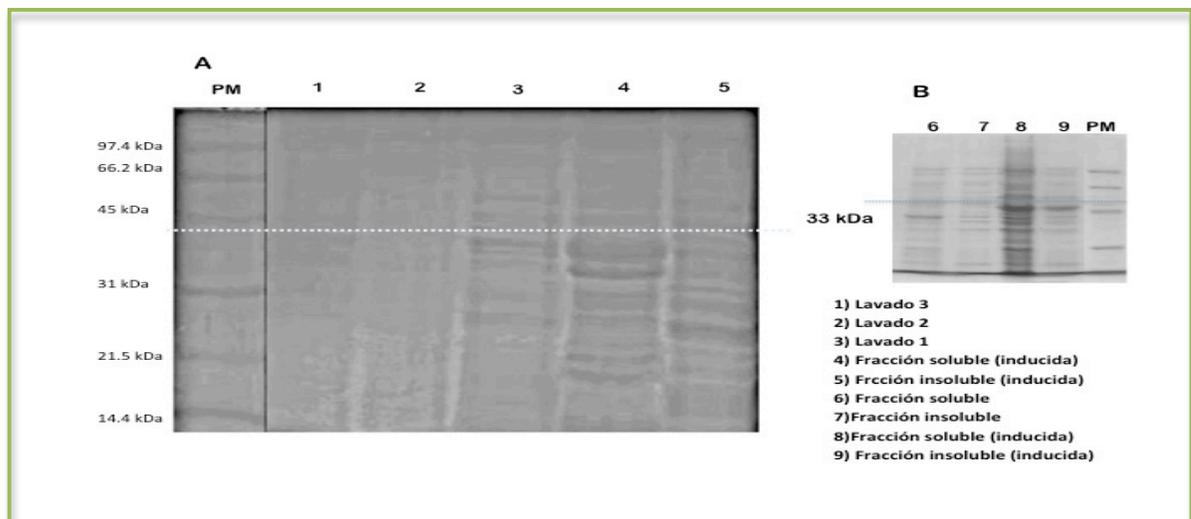


**FIGURA 10. SDS-PAGE al 15%. Cinética de expresión,** para el vector pET 32a en un sistema de sobreexpresión de *E. coli* rosetta gami. 0.5 mM IPTG a 37°C con agitación constante.

## 7. Sobreexpresión

La sobreexpresión de grandes volúmenes de proteína se efectuó de acuerdo a lo descrito en la metodología. Se esperaba que, al alargar el tiempo de la curva de crecimiento celular bacteriano la producción de la proteína inducible fuera más lento, lo que aumentaría el número de copias bien plegadas de la proteína. Además se esperaba que por este método toda la proteína sobreexpresada fuera soluble, lo cual se corroboró al hacer lavados sucesivos a la fracción insoluble del cultivo, tal como se observa en el gel A de la FIGURA 11.

Algo que vale la pena destacar es que la proteína de fusión tiene una masa de 33 kDa, pero al ser SDS-PAGE una técnica de migración relativa, en cuanto a las masas moleculares, la proteína migró siempre cercana al marcador de peso molecular de 45 kDa.

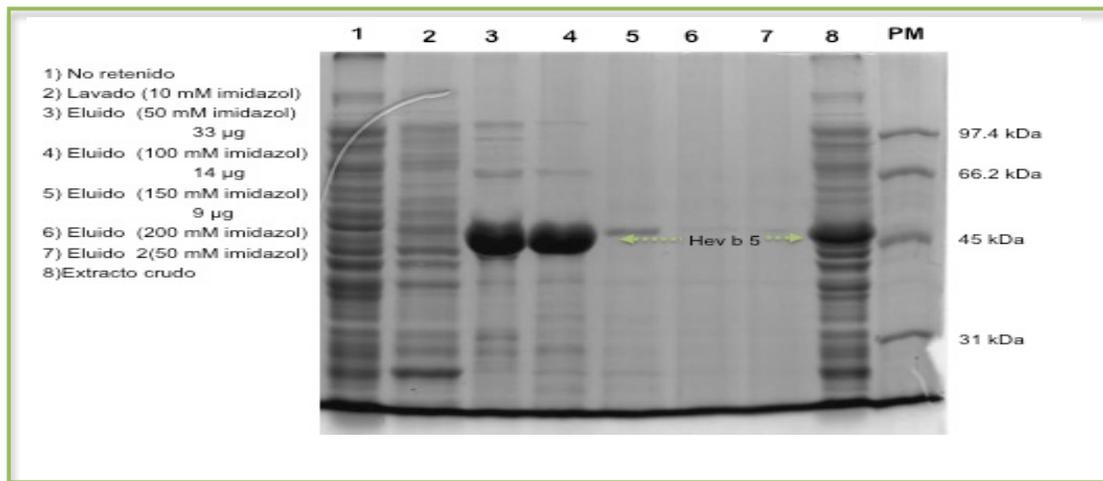


**FIGURA 11. SDS-PAGE al 15%. Sobre-expresión de Hev b 5** A) Lavados de la fracción insoluble, B) Inducción de Hev b 5/Trx. En el gel B parece que existe un porcentaje de rHev b 5-TRX que se encuentra en estado insoluble (carril 9), al hacer los lavados sucesivos en dicha fracción se observa que solo en el primero persisten remanentes de rHEv b 5-TRX (carril 3) y con lavados posteriores, toda la proteína es recupera en estado soluble.

## 8. Cromatografía de afinidad

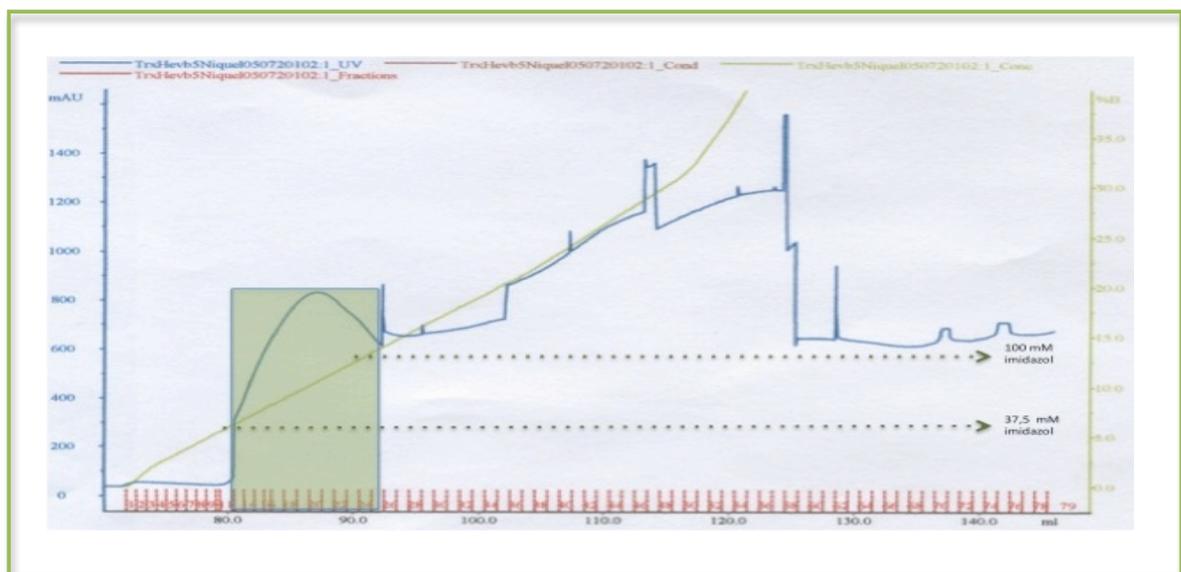
La FIGURA 12 muestra el primer gel de las fracciones obtenidas al realizar una elución fraccionada de la columna de Ni. Se observa que la concentración de imidazol donde eluía la mayor cantidad de proteína fue de 100 mM (Carril 4).

Con base en este primer experimento se determinaron las condiciones de trabajo que se mencionan en el apartado correspondiente del capítulo de metodología.



**FIGURA 12. SDS-PAGE al 12%. Columna de afinidad. Elución escalonada con imidazol.**

Se consideró que esta primera etapa de purificación se podía mejorar utilizando un gradiente lineal de imidazol para eluir a la proteína de fusión. En la FIGURA 13 se muestra el perfil de elución, donde la zona marcada con verde corresponde a la fracción que contenía a Hev b 5 como proteína de fusión. Al realizar los cálculos respectivos se obtuvo que la proteína se desprendía de la columna de afinidad entre el 37,5 y 100 mM de imidazol, lo que correspondía con los datos obtenidos mediante el fraccionamiento por pasos escalonados.

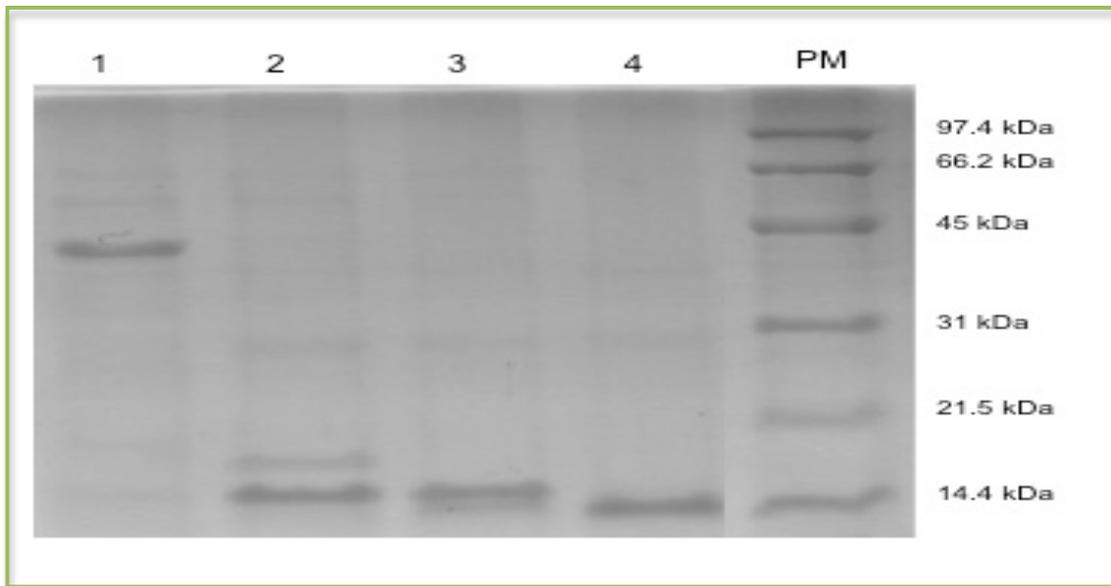


**FIGURA 13. Cromatografía de afinidad a níquel de la proteína de fusión.  $\lambda$  280 nm**

## 9. Corte de la proteína de fusión con enterocinasa

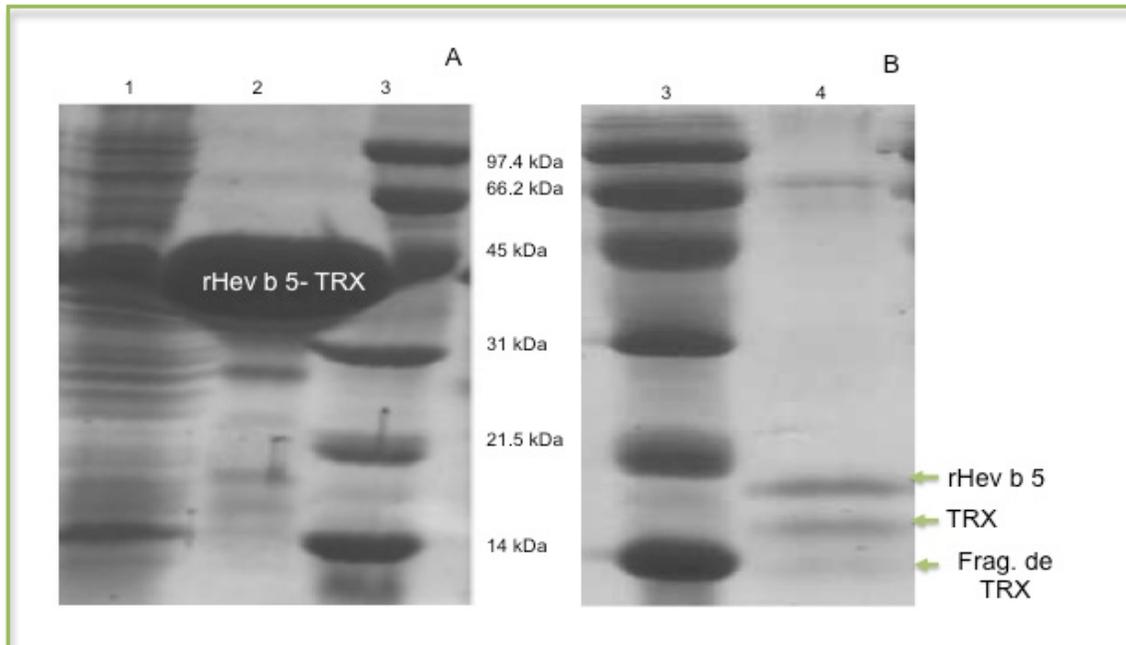
Las pruebas de corte se efectuaron después de la purificación en la columna de afinidad. El gel que se muestra en la FIGURA 14 es representativo de los resultados obtenidos con dichas pruebas, siendo notable que la eficiencia de corte fue del 100% para cualquier concentración.

Estos primeros resultados sugerían que al utilizar una alta concentración de enterocinasa, ésta cortaba inespecíficamente a la proteína. Esta idea surgió, no sólo por el número de bandas que se observaron en los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, sino también por los datos obtenidos por espectrometría de masas (MALDI-TOF) que arrojaba valores de 12 a 14 kDa, cuando los valores teóricos esperados eran de 16 y 17 kDa para rHEv b 5 y TRX, respectivamente.



**FIGURA 14. Pruebas de corte con enterocinasa.** SDS-PAGE al 15%, en cada carril hay 20  $\mu$ g de proteína TRX-rHev b 5. Carriles 1) Proteína de fusión sin digerir, 2) Hidrólisis con EK 0.01 U. 3) EK 0.1 U. 4) EK 1.0 U

En las FIGURA 15 A y B se muestran geles SDS-PAGE, en los que se observan la banda de expresión de la proteína de fusión (Carril 2) y las tres bandas después del corte con la enterocinasa (Carril 3) respectivamente y, cuyo origen, se explica en el siguiente apartado.

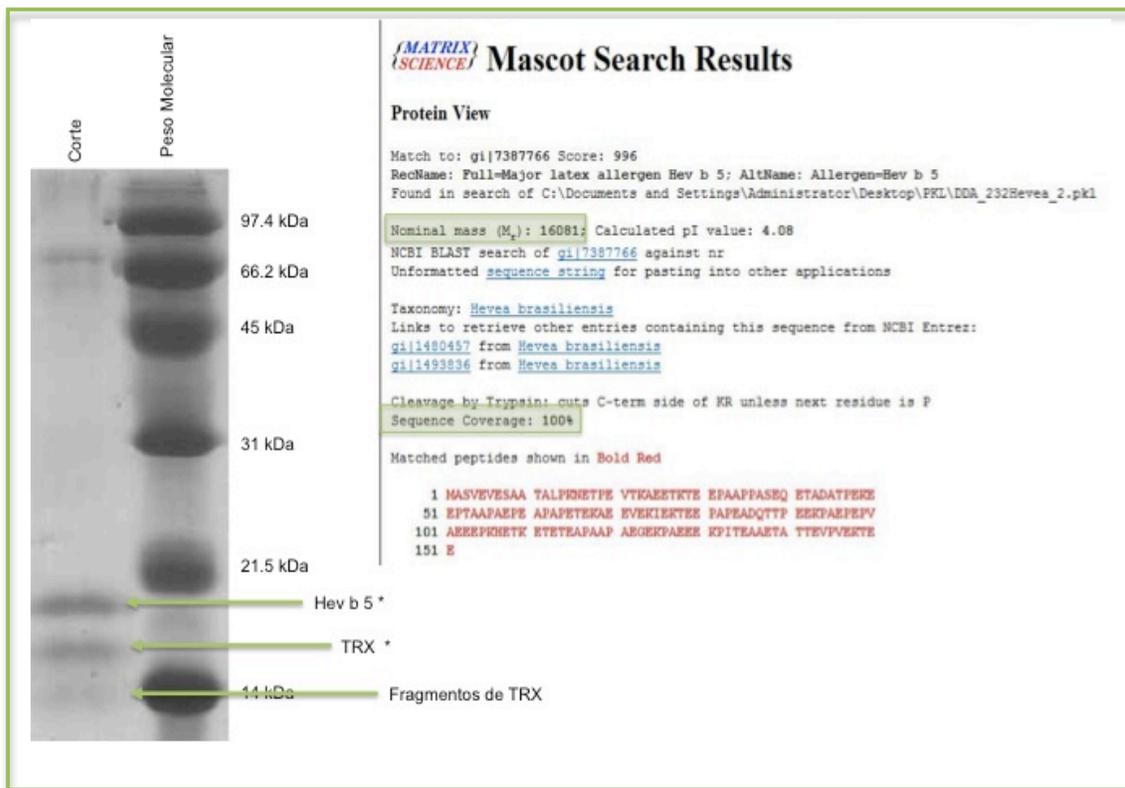


**FIGURA 15. Corte con enterocinasa de la proteína TRX- Hev b 5.** A) La sobreexpresión de la proteína de fusión antes del corte con enterocinasa. Carril 1, extracto crudo; carril 2, elución columna de Ni; carril 3, marcadores de PM; en B) la proteína después del corte con enterocinasa; carril 3, marcadores de PM y carril 4 corte de la proteína de fusión

## 10. Secuenciación proteica

Debido a que los datos arrojados por la espectrometría de masas indicaban que la masa de la muestra más abundante era de aproximadamente 12 kDa y las tres bandas generadas después de cortar con enterocinasa era persistentes, se decidió obtener la secuencia proteica, tanto de la proteína de fusión como de los productos de la digestión con enterocinasa a partir de los geles. Se obtuvo una masa de 32789 Da que correspondía exactamente con la masa de la proteína de fusión que se diseñó (Carril 2 gel A de la FIGURA 15). Además, se determinó la secuencia integra de rHEv b 5, con una masa molecular de 16,081 Da. En la FIGURA 16 se muestra el gel SDS-PAGE y el resultado de la secuenciación de la bandas usando la base de datos MASCOT.

Es interesante hacer notar que algunas de las bandas correspondían a fragmentos de TRX, lo que indica que fue la única proteína que se degradó en este proceso, mientras que Hev b 5 se mantuvo intacta.



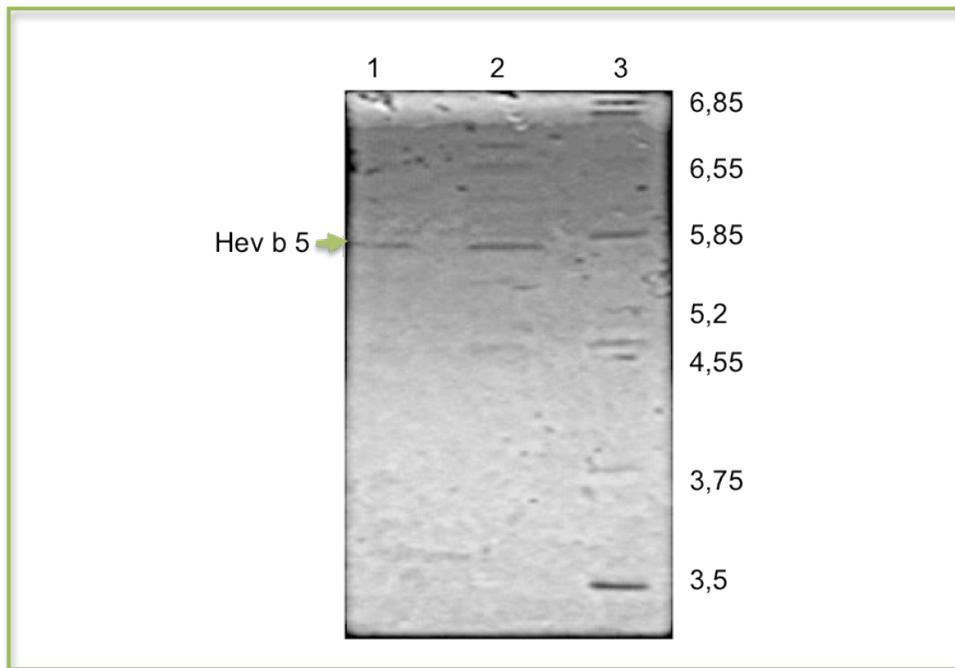
**FIGURA 16. Secuenciación proteica de la digestión de la proteína de fusión rHev b 5.** En A: gel SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie,; B: Resultado de la secuenciación para rHev b 5.

## 11. Isoelectroenfoque

Una vez que se confirmó que rHEv b 5 era un producto de la digestión con enterocinasa, y que no sufría cortes inespecíficos, se procedió a realizar el isoelectroenfoque para determinar su pI. Reportes previos indican un valor de pI de 3.5 experimental para rHev b 5, pero como proteína de fusión unida a la proteína de unión a maltosa; mientras que el pI teórico de la proteína es de 4.06, este PI se obtuvo utilizando el programa ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

Realizamos el IEF utilizando un gel con límites de pH de 4 a 6,5 el sistema PhastSystem, pues lo esperado era que tanto la tiorredoxina, sus péptidos y rHev b 5 tuvieran comportamiento ácido. En efecto TRX y sus fragmentos migraron alrededor de 5.0, mientras de rHev b 5 migró con un pI de 5.85, aproximadamente. Con este

dato, se planeó usar una columna de intercambio aniónico para separar Hev b 5 del resto de cadenas polipeptídicas.



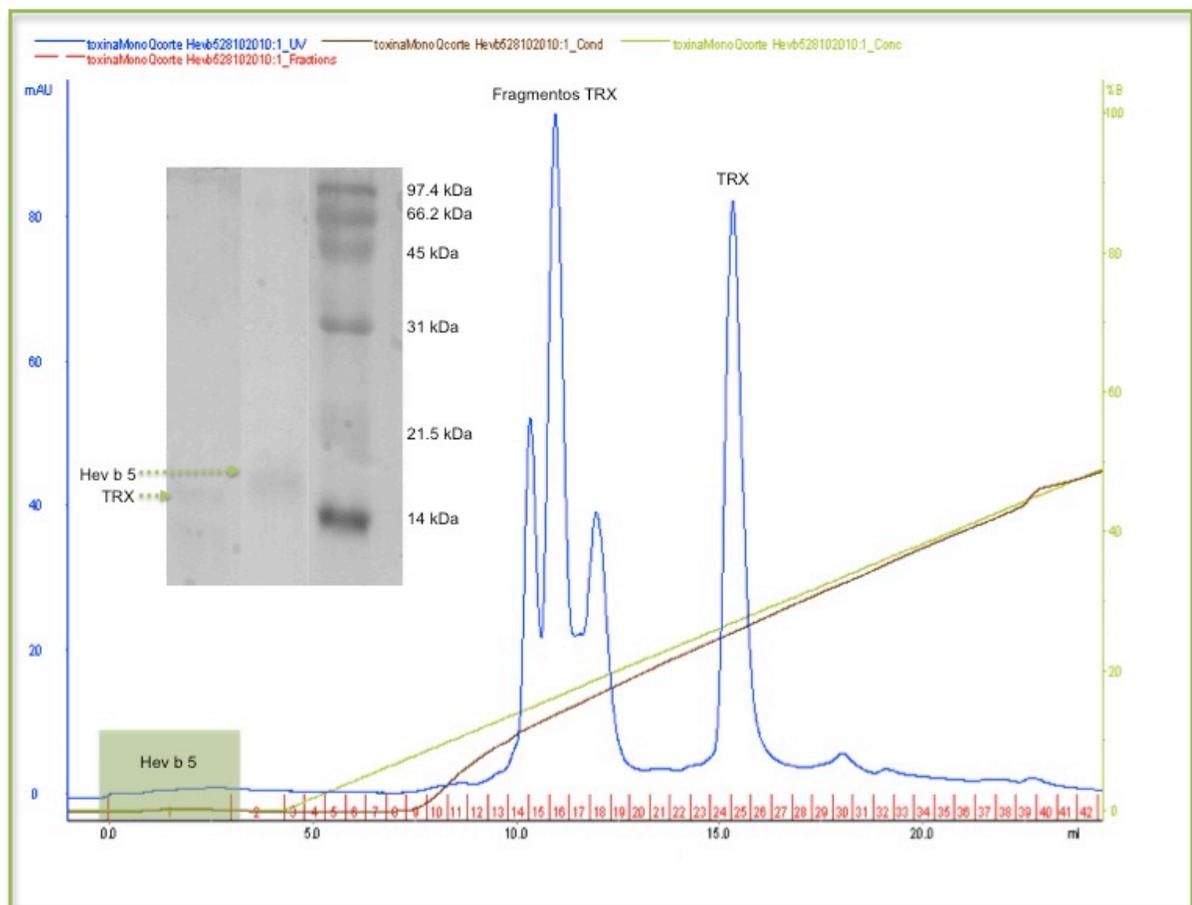
**FIGURA 17. Isoelectroenfoque.** 1) Digestión proteína de fusión rHev b 5 con 0.1 U enterocinasa, 2) Digestión proteína de fusión rHev b 5 con 0.1 U enterocinasa, 3) Marcador de pl. Teñido con Azul de Coomassie

## 12. Cromatografía de intercambio aniónico (Mono Q)

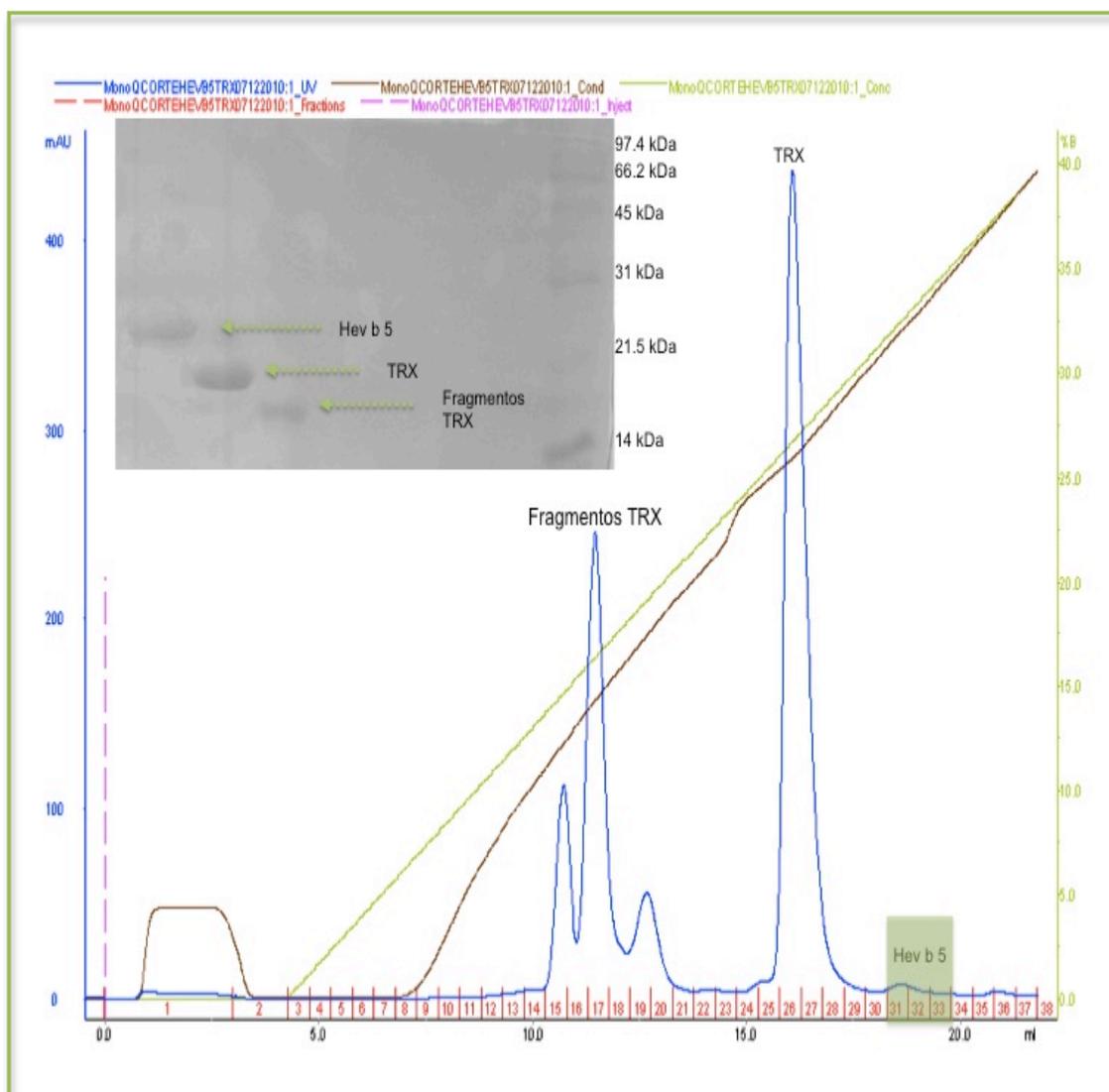
Para la cromatografía de intercambio aniónico se realizaron varias corridas, la primera fue aplicando 200  $\mu$ g de proteína. En este punto es de suma importancia recordar lo dicho en el apartado 13 del capítulo 2 referente a la ausencia de aminoácidos aromáticos y cisteínas en Hev b 5. Así pues, para poder cuantificarla lo que se realizó fue medir la absorbancia a 280 nm de la proteína de fusión e indirectamente cuantificar a Hev b 5, esto debido a que en ese momento no se contaba con los reactivos pertinentes para cuantificar siguiendo el método de Bradford.

Las corridas sucesivas de la muestra en la columna de intercambio aniónico fueron con 7 y 2 mg de proteína, respectivamente. El perfil obtenido es reproducible, con la peculiaridad de que dependiendo de la concentración de muestra inyectada,

rHev b 5 se retiene de distinta manera en la columna, cuando se cargan 200 µg no se retiene (FIGURA 18), mientras que con 2 mg rHev b 5 se retiene como si tuviera un pl muy ácido (FIGURA 19), cuando se inyectan 500 µg el tiempo de retención es intermedio, es decir sale a la mitad de la corrida, lo cual representa un gran reto pues localizarla se vuelve una tarea complicada, ya que como se ha mencionado con anterioridad la única forma de visualizarla es utilizando azul de Comassie. Este comportamiento se puede atribuir a la gran cantidad de ácidos glutámicos y aspárticos que Hev b 5 tiene en su estructura primaria (30.5% del total de aminoácidos que la componen) que pueden ocasionar que la fuerza ionica se modifique y la proteína se retenga mas o menos a la columna, dependiendo de su concentración (barras verdes en Figuras 18 y 19).



**FIGURA 18. Perfil de intercambio aniónico de 200 µg de proteína rHev b 5.** En la figura se muestra un gel SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Comassie, donde se muestran las bandas correspondientes a las proteínas de interés (Hev b 5 y TRX como control). Así mismo podemos observar que Hev b 5 eluye como si fuera una proteína muy básica, pues no es retenida en la columna anionica.

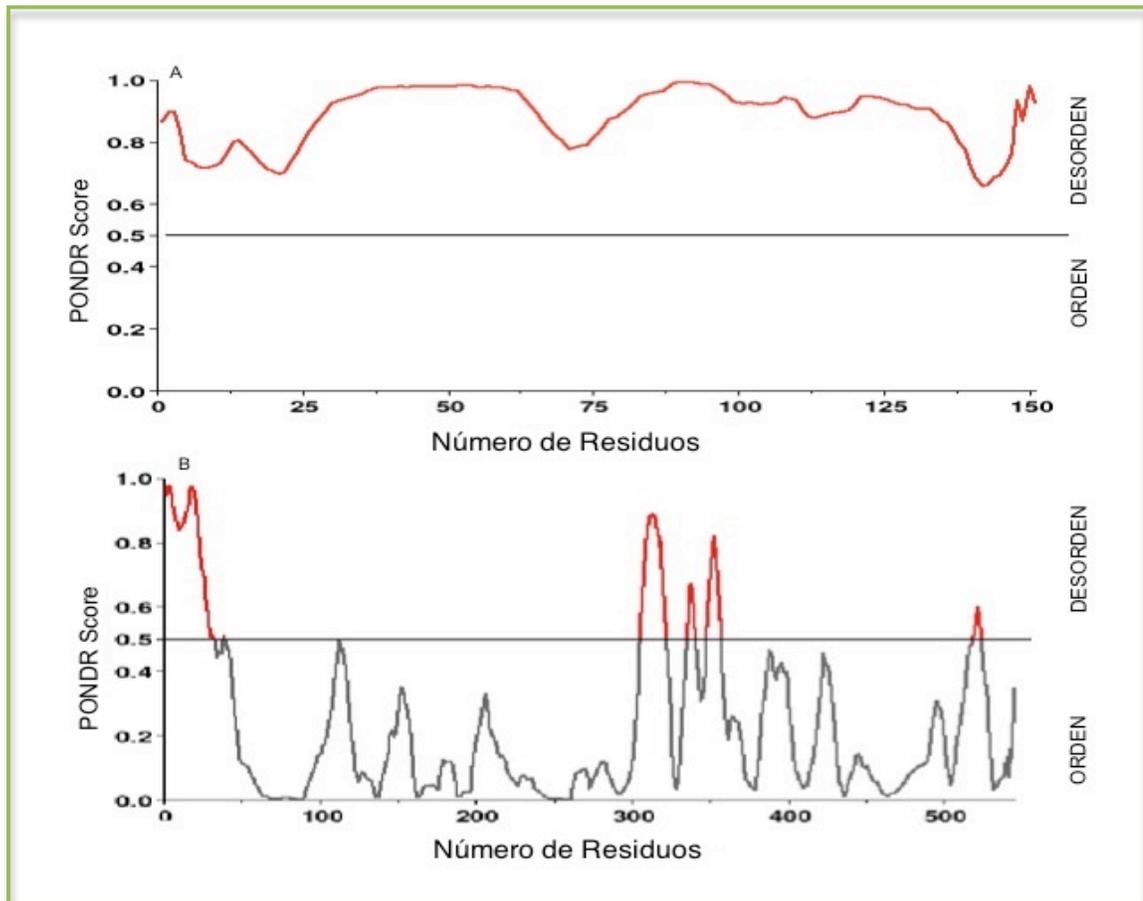


**FIGURA 19. Perfil de intercambio aniónico de 2 mg de proteína rHev b 5.** En la figura se muestra un gel SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie, donde se muestran las bandas correspondientes a las proteínas de interés (Hev b 5 y TRX como control). Así mismo podemos observar que Hev b 5 eluye como si fuera una proteína muy ácida, pues no es retenida en la columna anionica.

### 13. Caracterización estructural

Los experimentos preliminares de dicroísmo circular sugieren que rHev b 5 está desestructurada, tal como se observa en las FIGURAS 25, 26 y 27. Esto confirma las predicciones hechas, que se muestran a continuación.

Al realizar un análisis de Hev b 5 usando el algoritmo PONDR (<http://www.pondr.com>), el cual utilizando una red neural predice la probabilidad de que una proteína esté desplegada, encontramos los resultados que se presentan en la FIGURA 20. En A se muestra la predicción para Hev b 5, mientras que en B mostramos la predicción para una proteína estructurada como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Este mismo análisis se hizo utilizando tres algoritmos más DISpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>), DisProt (<http://www.ist.temple.edu/disprot/Predictors.html>), y DisEMBL (<http://dis.embl.de>), obteniendo el mismo resultado, esto es predicciones de desestructuración de toda la proteína.

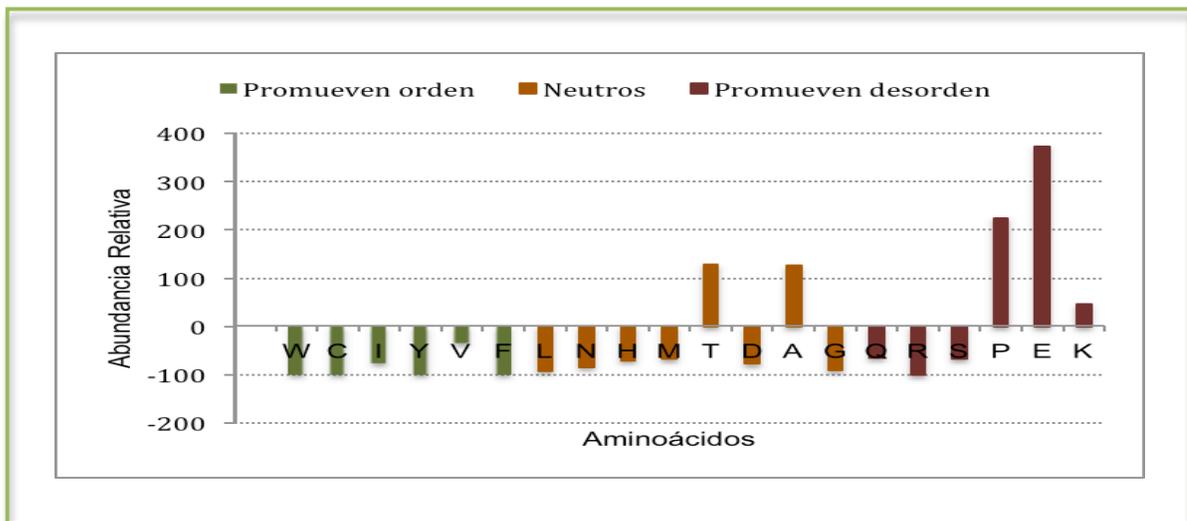


**FIGURA 20. Predicción de desorden estructural.** En A predicción de Hev b 5, en B predicción de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa utilizando el programa PONDR.

Se realizó otro análisis de la secuencia primaria de la proteína, la cual considera el contenido relativo de aminoácidos con una base de datos dnde previamente se han excluido a las proteínas de membrana y aquellas proteínas que presentan plegamiento “coil-coil”.

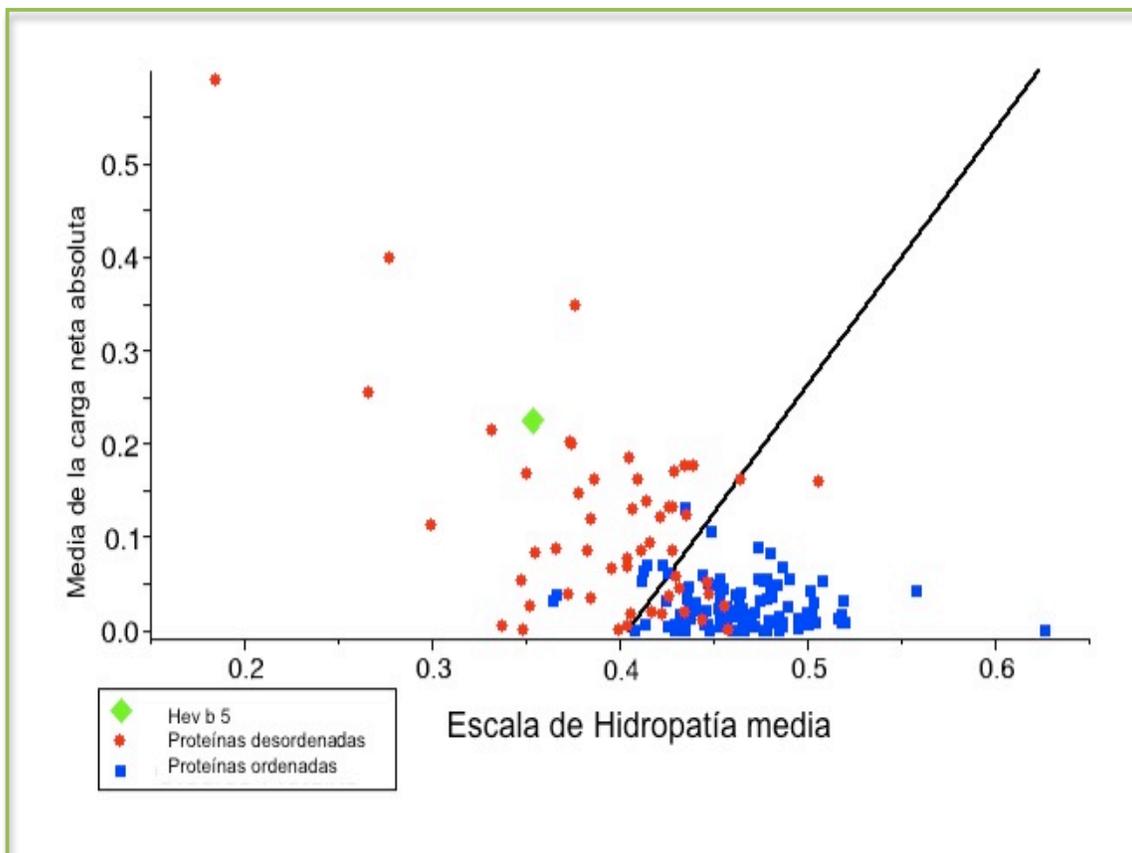
Con base en el conocimiento que existe sobre cuales son los aminoácidos que promueven plegamiento (en verde) y cuales no (en rojo), la FIGURA 21 sugiere que como se puede observar en la TABLA 4, al tener Hev b 5 un alto contenido de Glu y Pro y nulo de los aminoácidos marcados en verde sea una proteína del tipo desordenada. La abundancia relativa de los aa se calcula utilizando la ECUACIÓN 1 considerando la frecuencia de los aminoácidos de Hev b 5 y la frecuencia (%) de aminoácidos de la base de datos SCOP de la cual se han excluido las proteínas de membrana y las de estructura “coil-coil”.

$$\text{ECUACIÓN 1} \quad \%Abundancia \text{ Relativa} = \left( \frac{\%aa,proteína}{\%aa,SCOP} \right) \cdot 100$$



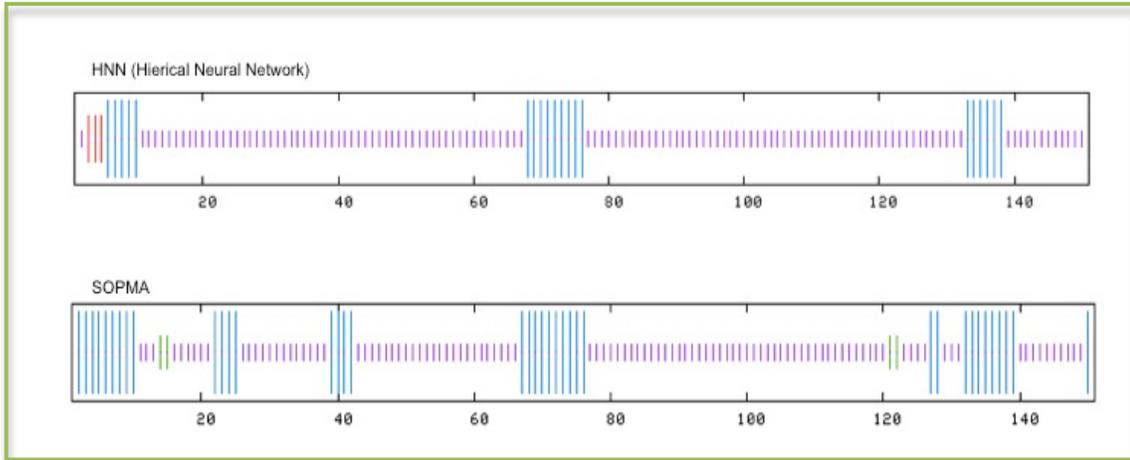
**FIGURA 21. Análisis de la estructura primaria de la proteína Hev b 5.** Utilizando la base de datos SCOP excluyendo la información de proteínas de membrana y la de aquellas que tienen estructura “coil-coil”.

Sin embargo, el uso de un subconjunto de aminoácidos no es el único parámetro que sirve para caracterizar a las proteínas intrínsecamente desordenadas, ya que la combinación de una baja hidrofobicidad media y de una alta carga neta son también un indicio de la ausencia de estructura en las proteínas (ver FIGURA 22).



**FIGURA 22. Clasificación carga-hidropatía.** La escala de hidropatía media es el resultado de la suma de normalización de la hidrofobicidad de los residuos individuales divididos por el número total de aminoácidos presentes en la proteína utilizando el programa ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/pscale/Hphob.Black.html>). En la gráfica se muestra un grupo conocido de proteínas con diferente carga neta e hidrofobicidad cuya estructura es conocida, la línea oblicua que separa ambas regiones se conoce como valor H, siendo esta la región divisoria entre las proteínas estructuradas y aquellas que no lo son. Hev b 5 está orientada en la zona perteneciente a las proteínas altamente desestructuradas.

También se realizaron predicciones de estructura secundaria las cuales se presentan en la FIGURA 23. Utilizando dos programas: Hierarchical Neural Network ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_nn.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html)) y SOPMA ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)), donde se predicen regiones de hélices alfa en los extremos de la proteína y en la región central de la proteína (mostradas en azul) y regiones “coil” (mostradas en morado).

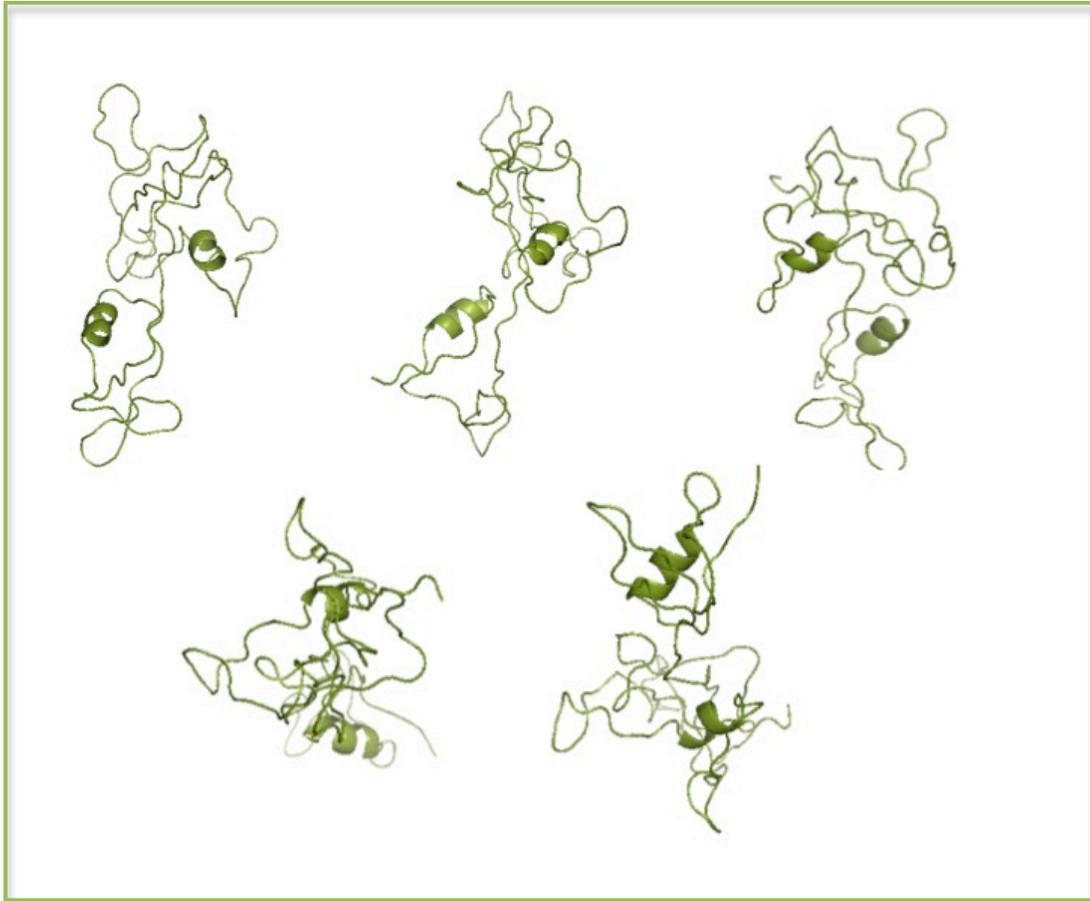


**FIGURA 23. Predicción de estructura secundaria para Hev b 5.** Utilizando los programas HNN y SOPMA, las regiones moradas indican desestructuración, las regiones azules indican estructura tipo hélice alfa, las región roja en el caso de la predicción HNN significa cadena extendida, mientras que las regiones verde en SOPMA indican una predicción de giros beta, pero al ser de tan solo 2 aminoácido cada una esta predcción resulta poco probables.

**TABLA 4. Composición de aminoácidos de Hev b 5**

Hev b 5			
Composición	Aminoácido	Cantidad	Porcentaje
	Ala (A)	28	18.5%
	Asn (N)	1	0.7%
	Asp (D)	2	1.3%
	Gln (Q)	2	1.3%
	Glu (E)	46	30.5%
	Gly (G)	1	0.7%
	His (H)	1	0.7%
	Ile (I)	2	1.3%
	Leu (L)	1	0.7%
	Lys (K)	13	8.6%
	Met (M)	1	0.7%
	Pro (P)	23	15.2%
	Ser (S)	3	2%
	Thr (T)	20	13.2%
	Val (V)	7	4.6%

En la FIGURA 24 se muestra el modelo estructural obtenido mediante una predicción estructural para Hev b 5, que coinciden perfectamente con todos los análisis realizados previamente, las vistas presentadas tiene angulos de giro de 120°.



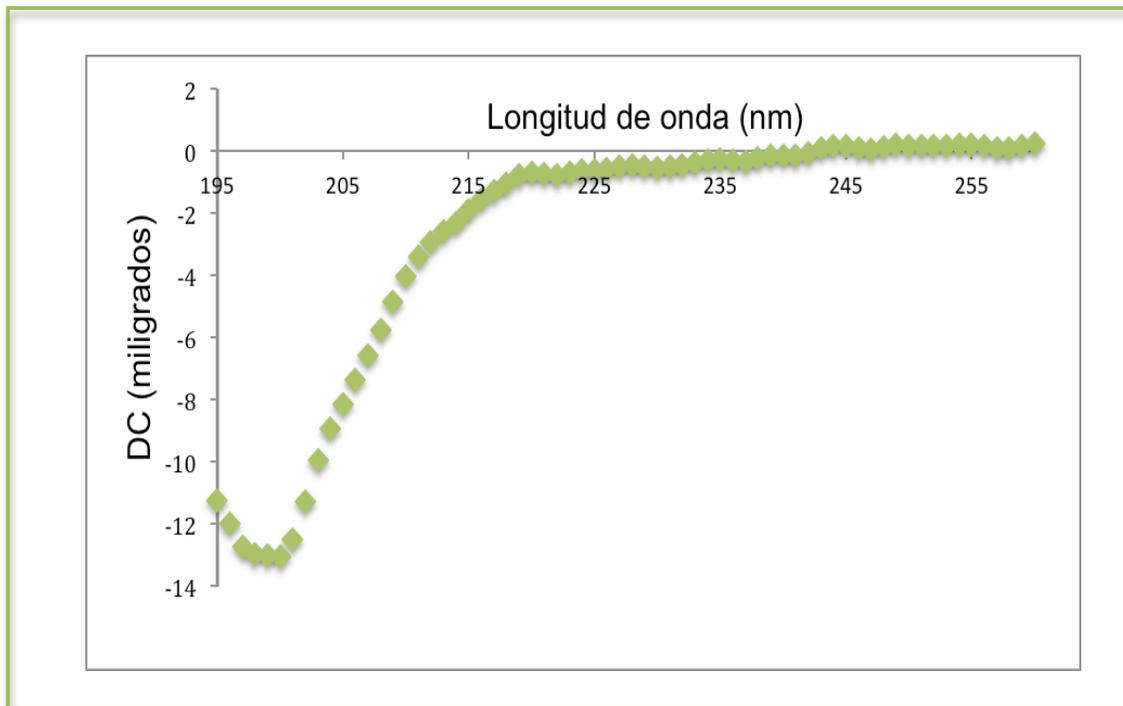
**FIGURA 24. Modelo de estructura terciaria para Hev b 5.** Elaborado en rosetta ; Colaboración de Dr. Rogelio Rodríguez de la Facultad de Química, UNAM.

El programa utilizado para realizar la predicción estructural fue Rosetta, el cual utiliza un algoritmo *ab initio* que trata de encontrar los plegamientos con la energía mas baja posible. La estrategia que utiliza Rosetta para encontrar estas formas de más baja energía es: 1) comenzar con la estructura primaria, 2) mover una parte de la cadena, 3) calcular la energía de la nueva forma, 4) aceptar o rechazar la nueva forma, 5) continuar hasta que cada parte de la cadena haya sido movida varias veces. Solo se encontraron dos pequeñas regiones de  $\alpha$ -hélice, lo que coincide con las predicciones de estructura secundaria presentadas en la FIGURA 23.

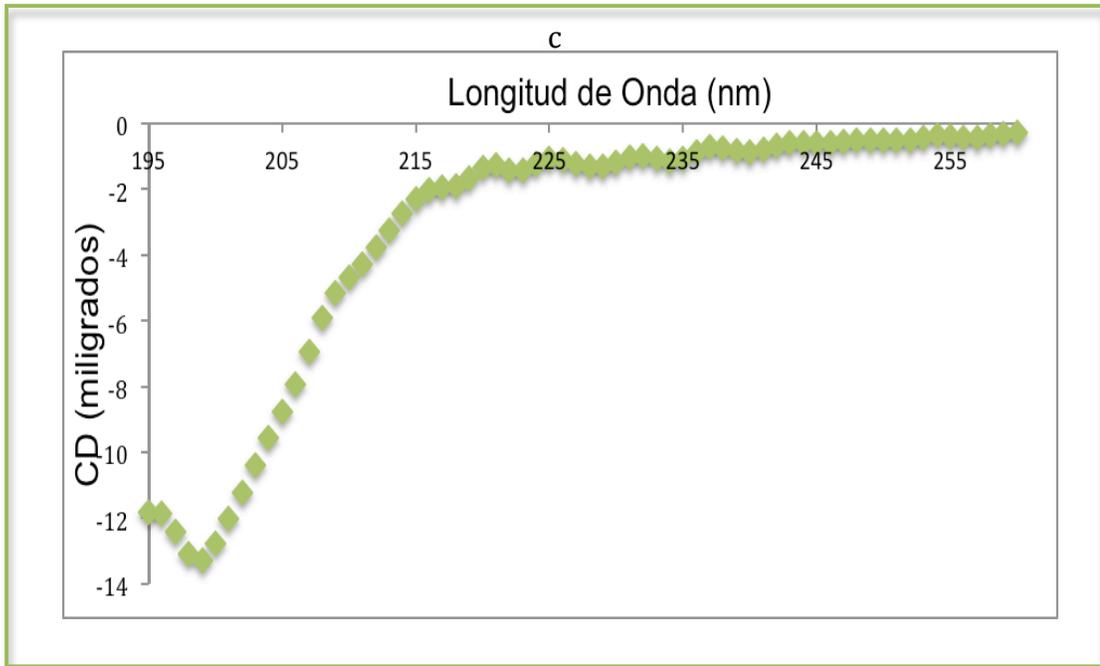
## 14. Dicroísmo circular

Con el objetivo de determinar si Hev b 5 presentaba estructura secundaria, se procedió a obtener los espectros de DC. Además se siguieron los cambios conformacionales provocados por cambios en el pH o bien por la presencia de iones metálicos que se pudieran coordinar a los residuos de ácido glutámico, aspártico o bien histidinas presentes en la proteína recombinante. Los datos se presentan como miligrados en función de la longitud de onda.

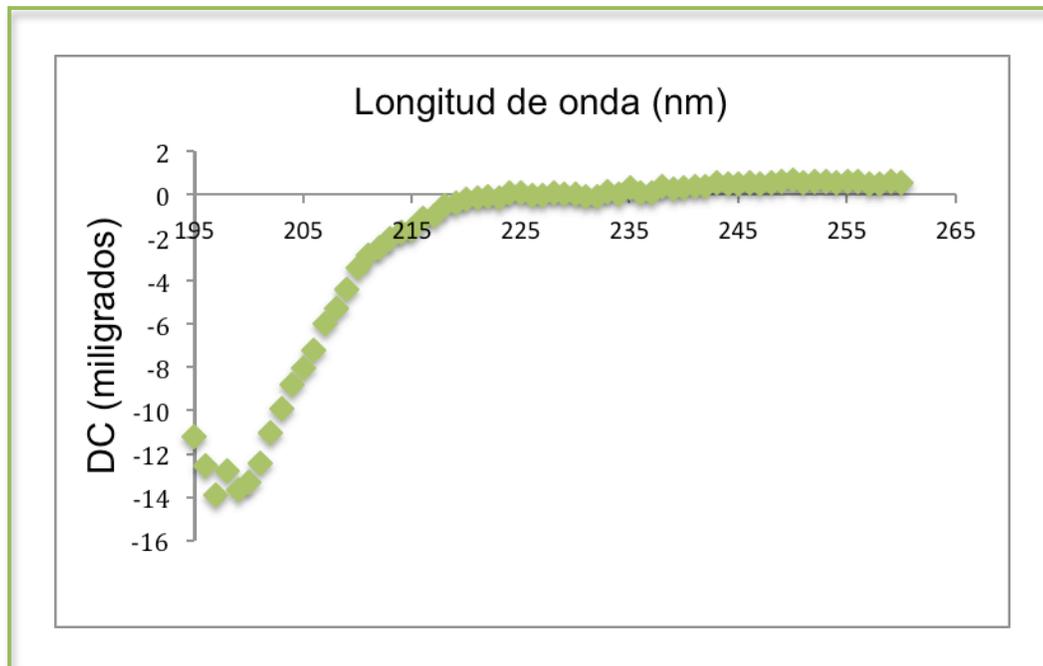
En la FIGURA 25, 26 y 27 se presentan los espectros obtenidos utilizando distintos amortiguadores una vez que se han eliminado la línea base (solo el amortiguador en cuestión, y eliminado el ruido de fondo). En los tres caso se utilizó la misma cantidad de proteína (100  $\mu\text{g}$ ) y el mínimo que se observa alrededor de 200 es de -20, es consistente en los tres caso y claramente muestra una proteína desestructurada



**FIGURA 25. Espectro de dicroísmo circular de rHEV b 5 en TRIS-HCl 5 mM pH 8.** Se muestra el espectro una vez que se ha restado la señal del amortiguador.



**FIGURA 26. Espectro de dicroísmo circular de rHEV b 5 en fosfatos 10 mM pH 7,5. Se muestra el espectro una vez que se ha restado la señal del amortiguador.**



**FIGURA 27. Espectro de dicroísmo circular de rHEV b 5 en acetatos 10 mM pH 4,2. Se muestra el espectro una vez que se ha restado la señal del amortiguador.**

Es importante mencionar que se intentó obtener espectros de DC con la proteína en presencia de distintos iones metálicos como el  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , en distintas concentraciones pero los datos son pre-eliminados debido a que las intensidades de señal eran tan altas en cierto punto del espectro que la señal se saturaba, al ser estos resultados preliminares, es necesario repetirlos para poder obtener resultados concluyentes de que la proteína recombinante pueda presentar elementos de estructura secundaria o bien estados de oligomerización a través de la coordinación de los iones metálicos con los residuos de Glu, Asp e His.

Por último, en este apartado vale la pena señalar que estos experimentos se repitieron; sin embargo, al ser tan difícil la cuantificación de rHev b 5 la cantidad de proteína utilizada para la obtención de los espectros fue insuficiente.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Hev b 5 es una proteína ácida cuya abundancia relativa en el látex de *Hevea brasiliensis* es baja; no obstante, en nuestro grupo de trabajo la hemos encontrado intacta en guantes de cirujano comerciales elaborados a partir de hule natural (datos no publicados). La masa molecular de esta proteína alergénica es de 16 kDa, que es muy similar al de otras proteínas alergénicas presentes en el látex de *H. brasiliensis* como son Hev b 1 (14.6 kDa) o el extremo C-terminal de la proheveína (Hev b 6) (14 kDa). Lo anterior dificulta la purificación de la proteína natural a partir de látex del árbol de hule *H. brasiliensis*, aunado a su carencia de aminoácidos aromáticos y cisteínas, que impide su cuantificación usando absorbancia a 280 nm.

Existen algunos reportes acerca de la purificación de Hev b 5 en su estado nativo; sin embargo, la metodología con la que logran obtener esta proteína supuestamente homogénea no es clara. Akasawa y colaboradores (Akasawa, 1996) purifican una proteína con un pI de 3.5, la cual dicen que no se puede observar en un gel SDS-PAGE con una tinción de azul de Coomassie, sólo mediante una tinción de plata y/o quimioluminiscencia usando un anticuerpo marcado con peroxidasa. También mencionan que la migración relativa de esta proteína en el gel corresponde a una masa molecular entre 21.5 kDa y 30 kDa, lo cual es muy superior a lo esperado para Hev b 5 de tan solo 16 kDa, la rHev b 5 obtenida en este trabajo se logro detectar, en un gel PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie, con una masa cercana a los 16 kDa, por lo que probablemente la proteína de Akasawa no es Hev b 5.

Por otro lado, en ese mismo trabajo se describe que el proceso de secuenciación incluye una digestión muy agresiva; utilizando una solución altamente alcalina con 4M de urea, calentando la mezcla 15 minutos a 60°C para digerir posteriormente con tripsina y endoproteínasa Asp-N, enzimas que también pueden cortar proteínas contaminantes presentes en la fracción que ellos reportan como pura, pero de la cual no presentan pruebas. No obstante, los péptidos coinciden en un porcentaje importante con la secuencia de Hev b 5 deducida del cADN. Cuando

obtienen la secuencia de la proteína purificada, encuentran una proteína muy similar a Hev b 5 el el fruto de kiwi, la cual tiene una masa molecular de aproximadamente 19 kDa.

Las regiones con mayor identidad se encuentran en los extremos amino y carboxilo de ambas proteínas

La escasez de Hev b 5 en el hule natural y la pobre información que se tiene sobre ella hacen necesario recurrir a las herramientas que la biología molecular ofrece para clonar genes y poder producir a gran escala proteínas recombinantes. En el caso muy particular de los alérgenos de látex, la posibilidad de estandarizar la producción a gran escala permitirá mejorar los métodos de diagnóstico, tanto para identificar a las personas que presentan hipersensibilidad al hule natural, como aquellos para detectar la presencia de estas proteínas en los productos manufacturados con este material.

En nuestro caso, la clonación y amplificación del gen de Hev b 5 fueron exitosos, pues se obtuvo un producto de 451 pb que concuerda con lo reportado por Slater en 1996. Cuando se analizó la secuencia del gen clonado e insertado en distintos vectores de sobreexpresión se encontró la secuencia depositada en Genbank (U42640.1) por Slater y colaboradores. Esto descartó la posibilidad de tener artefactos de biología molecular que pudieran afectar o dar características distintas a la proteína que se buscaba expresar.

El gen se insertó en tres vectores distintos con el fin de aumentar las posibilidades de éxito al realizar las pruebas de expresión. Eventualmente la mejor opción para sobreexpresar a la proteína fue la que consistió en insertarla en el plásmido pET 32a que tenía la característica de expresar a Hev b 5 fusionada la tioredoxina. Esta última es una proteína ampliamente usada como chaperona del plegamiento que favorece el correcto ensamblaje de proteínas con alto contenido de cisteínas, recordemos que la tioredoxina facilita la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína. Pese a conocer que Hev b 5 no contiene Cys, se optó por utilizarla para favorecer el posible plegamiento de la misma. Cabe mencionar que la intención de sobreexpresar a la proteína en un sistema EtOH/frío era el propiciar su correcto plegamiento, pues por previas experiencias se sabe que este tipo de condiciones propician que la expresión se lleve

acabo de una manera mas lenta, funciona para conseguir que la curva de crecimiento bacteriano se de con una velocidad mas baja, lo que implica que la proteína tiene mas tiempo antes de ser plegada una vez que va saliendo del ribosoma.

Una vez que se corroboró la expresión de la proteína y su solubilidad, se continuó con la estrategia experimental planteada. Uno de los primeros retos a los cuales hubo que enfrentarse fue una aparente inestabilidad de la proteína recombinante, que se manifestaba por pérdida importante de proteína a lo largo de la purificación, aparición de precipitados en las muestras proteicas en lapsos muy breves de tiempo, además de la presencia constante de fragmentos de aproximadamente 12 kDa al momento de determinar la masa molecular. Se probaron diferentes amortiguadores donde se mantenía a la proteína estable. El amortiguador TRIS-HCl 20 mM pH8, NaCl 500 mM resultó ser adecuado, se adicionó el NaCl debido a que Hev b 5 es una proteína rica en aminoácidos ácidos, principalmente glutámico, y con la sal se potencia la solubilidad de la proteína y se logra una mayor estabilidad de la misma. La solubilidad de las cadenas polipeptídicas es sensible a la concentración de sal y aunque en un principio no se conocía el porcentaje de aminoácidos cargados expuestos al disolvente en Hev b 5, el hecho de que el 30% de los residuos fueran ácido glutámico, nos daba un indicio del papel que la fuerza iónica podría jugar en la solubilidad de Hev b 5. Estos aminoácidos son altamente polares y están cargados negativamente a pH neutro, entonces para poder estabilizar todas esas cargas de la proteína fue necesario usar una alta concentración de sal y evitar así la precipitación de Hev b 5.

Con el fin de optimizar la purificación de rHev b 5, durante la cromatografía de afinidad se probó un amortiguador de fosfatos 20 mM; pH 7.5, tal como recomienda el fabricante de las columnas His-Trap. Cuando se utilizaba el amortiguador TRIS-HCl, por cada litro de cultivo bacteriano se obtenían alrededor de 7 mg de proteína de fusión, mientras que al cambiar a fosfatos, por cada litro de cultivo se lograban obtener 11 mg de proteína (rHev b 5 en este sistema de expresión siempre fue soluble, la cantidad de proteína que se quedaba en cuerpos de inclusión era practicamente nula).

Algo de suma importancia es que rHev b 5, tanto pura como en complejo de fusión, era muy inestable en el amortiguador de fosfatos, se precipitaba con mucha facilidad y al continuar con el proceso de purificación se perdían cantidades importantes de proteína (alrededor del 80%), por lo que finalmente se realizó el proceso de purificación en un amortiguador TRIS-HCl pH 8

Otro aspecto importante fue la forma de cuantificar a rHev b 5. Al no tener ningún aminoácido que absorbiera a 280 nm se intentó usar el ácido bicinconírico (BCA), usando albumina sérica bovina (BSA) como estándar. Este método permite cuantificar tanto los enlaces peptídicos como los aminoácidos aromáticos, siendo estos últimos los que más contribuyen a la reacción de coloración. Por lo tanto, la detección que hay de Hev b 5 con este reactivo es prácticamente nula, pues el color que se genera está dentro del error experimental. Un reactivo apropiado para cuantificar a esta proteína sería el de Bradford, el cual contiene azul de Commassie, con el cual se visualizó la presencia de Hev b 5 en geles SDS-PAGE.

La forma utilizada para estimar la concentración de rHev b 5 fue indirecta a través de la cuantificación de TRX, pues su coeficiente de extinción se determinó mediante el algoritmo Protparam (<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>). Entonces mientras rHev b 5 esté unida a TRX en una relación 1:1 se puede seguir y cuantificar.

La proteína de fusión, que fue eluída de la columna de níquel, se cortó con enterocinasa de acuerdo al diseño de la construcción. En una subsecuente aplicación a la columna de afinidad se eliminarían los contaminantes retenidos mientras que rHev b 5 no sería retenida. No obstante, se observó que no solo se retenía TRX, sino también Hev b 5. Una posible explicación es que Hev b 5 contiene 46 ácidos glutámicos, dos ácidos aspárticos y una histidina que podrían coordinar al níquel presente en columna de afinidad. Por lo tanto, fue necesario separar a las dos proteínas utilizando una columna de intercambio aniónico.

Una vez que rHev b 5 fue purificada se procedió a caracterizarla en cuanto a su contenido de estructura secundaria. Los resultados obtenidos mediante espectros de dicroísmo circular corroboran las predicciones de que la proteína se encuentra prácticamente desestructurada. Como se observa en las FIGURAS 25, 26 y 27, a pesar de que la proteína se encuentra en distintos amortiguadores el comportamiento

es el mismo, una clara señal de ausencia de elementos de estructura secundaria o bien de que la proteína se encuentra desordenada. Cuando se adicionaron iones metálicos divalentes, claramente se observó un cambio en la señal de DC con un mínimo aproximadamente a 225 nm.

Debido a que los experimentos no fueron concluyentes con por la saturación de la señal no podemos asegurar si los iones metálicos favorecen algún tipo de estructuración o lo que se observa es debido a una oligomerización, habría que intentar repetir los experimentos variando concentraciones de los iones adicionados, o modificando la hidrofobicidad.

Cabe aclarar que los estudios de DC son preliminares, ya que pese a intentar hacer repeticiones de los mismos, las intensidades de las señales no mejoraron, como se explicó en el apartado 14 del Capítulo 3. Esperamos que al cuantificar a rHev b 5 utilizando el método de Bradford, las intensidades de las señales mejoren y se pueda hacer un mejor análisis de ellos.

Es importante resaltar que en este trabajo es la primera vez que se hacen estudios de caracterización de rHev b 5 sola y no como proteína de fusión.

Además que desde hace ya varios años no hay trabajos referentes a Hev b 5 con el fin de estudiarla, sin embargo existen múltiples reportes de ella por su presencia en distintos materiales de látex y como parte de casos de estudio médico por alergia.

# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

## Conclusiones

- Se clonó, expresó y purificó a rHev b 5 a partir de mARN del látex utilizando un sistema de sobreexpresión bacteriano como proteína recombinante sola, y no como proteína de fusión, algo que antes no se había logrado.
- Se determinó la masa molecular y punto isoeléctrico de rHev b 5, siendo 16080 Da y 5.85, respectivamente, este último valor difiere sustancialmente con el pl teórico y el previamente reportado.
- Se determinó ausencia de estructura secundaria mediante técnicas de dicroísmo circular, lo cual corrobora las predicciones de estructura secundaria y terciaria presentadas en este trabajo, por lo tanto se concluye que es una proteína nativamente desestructurada.

## Perspectivas

Al ser rHev b 5 una proteína de masa molecular baja, es buena candidata para realizar estudios dirigidos a la determinación de estructura mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN). Sin embargo, es necesario enriquecerla con  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ .

3

Al saber que es una proteína intrínsecamente desestructurada sería importante encontrar el ligante con el cual interacciona en el látex de *H. brasiliensis* para poder determinar su estructura o al menos un estado transitorio de estructuración emulando las condiciones en las que Hev b 5 se encuentra en el látex, se podría utilizar técnicas de espectrometría de fluorescencia, DC y RMN.

Se podrían producir anticuerpos anti-rHev b 5 con técnicas de biología molecular como despliegue en fagos e intentar cristalizar estos complejos.

# BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS** A., Lichtman A., "Inmunología celular y molecular" 5ª ed. ELSEVIER, España, 2010.
- AKASAWA** A., Hsieh L, Martin B, Liu T, Lin Y., "A Novel acidic allergen, Hev b 5, in latex, purification, cloning and characterization" *J Biol Chem.* 1996 Oct 11;271(41):25389-93
- AUSILI** E, Tabacco F, Focarelli B, Nucera E, Patriarca G, Rendeli C, "Prevalence of latex allergy in spina bifida: genetic and environmental risk factors" *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2007 May-Jun;11(3):149-53.
- BUSS** Zs. Fröde TS, "Latex allergen sensitization and risk factor due to glove use by health care workers at public healths units in Florianopolis, Brazil" *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2007;17(1):27-33
- CENNELIER** M., "La alergia y la homeopatía" Editorial Paidotribo, España 1999
- COMTOIS** P., "The Experimental Research of Charles H. Blackley" *Aerobiol* 1995 (11):63-68.
- CREMER** R, Hoppe A, Korsch E, Kleine-Diepenbruck U, Bläker F, "Natural rubber latex allergy:prevalence and risk factors in patients with spina bifida compared with atopic children and controls" *Eur J Pediatr.* 1998 Jan;157(1):13-6.
- DE QUEIROZ** M, Combet S, Bérard J, Pouvau A, Genest H, Mouriguand P, Chassard D, "Latex allergy in children: modalities and prevention" *Paediatr Anaesth.* 2009 Apr;19(4):313-9.

- DUNKER** A.K., et al., Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model*, 2001. 19(1): p. 26-5
- FILON** FL, Cerchi R, "Epidemiology of latex allergy in healthcare workers" *Med Lav*. 2008 Mar-Apr;99(2):108-12
- HEMERY** ML, Verdier R, Dahan P, Sellier N, Demoly P, "Sensitization to powdered latex gloves: prevalence in hospital employees" *Presse Med*, 2005 Nov 5;34(19 Pt1):1363-9.
- ISHIZAKA** K., Ishizaka T., "Identification of gamma-E antibodies as a carrier of reaginic activity" *J. Immunol*. 1967 Dec;99(6):1187-98
- LANDWEHR**, L. P., and Boguniewicz, M. "Current perspectives on latex allergy" *J. Pediatr*. 1996;(128):305–312
- MAJED** M, Nejat F, Khashab ME, Gharagozloo M, Baghban M, Sajjadnia A. "Risk factors for latex sensitization in young children with myelomeningocele" *Neurosurg Pediatr*. 2009 Sep;4(3)a:285-8.
- MARTÍNEZ** C., "Clonación y expresión del alérgeno Hev b 11 (quitinasa de clase I) de *Hevea brasiliensis*" Tesiunam., Sep 2010
- MICHAEL** T, Niggemann B, Moers A, Seidel U, Wahn U, Scheffner D, "Risk factors for latex allergy in patients with spina bifida" *Clin Exp Allergy*. 1996 Aug;26(8):934-9.
- RAJAN** T, "The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation" *Treds Immunol* 2003 Jul;24(7):376-9
- REGUEIRO** J, López C, et. al., "Inmunología. Biología y patología del sistema inmune" 3ª ed. Ed. Medica Panamericana, España 2002.

- RING J**, "History of Anaphylaxis" *Allergy Clin Immunol Int: J World Allergy Org.* 2003 15(4):144-48
- SANCHEZ-PUIG N.**, D.B. Veprintsev, and A.R. Fersht, Human full-length Securin is a natively unfolded protein. *Protein Sci*, 2005. 14(6): p. 1410-8.
- SANDO T.**, Takaoka C., Muckai Y., et. al., "Cloning and Characterization of Mevalonate Pathway Genes in a Natural Rubber Producing Plant, *Hevea brasiliensis*" *Biosci. Biotechnol Biochem.* 2008; 72(8):2049-2060.
- SLATER J. E.** Latex allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994:139–149
- SOPENA R.**, Martí-Bonmatí L., Vilar J., "Algoritmos por diagnostico en la imagen" 2ed. Elsevier, España 2006.
- SUNEJA T**, Belsito DV, "Occupational dermatoses in health care workers evaluated for suspected allergic contact dermatitis" *Contact Dermatitis.* 2008 May;58(5):285-90.
- TARLO S. M.**, Wong, L., Roos, J., and Booth, N. "Occupational asthma caused by latex in a surgical glove manufacturing plant" *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990;85:626–631
- UVERSKY V.N.**, What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem*, 2002. 269(1): p. 2-°©-12
- WAGNER B.**, Buxk D., Hafner C., Sowka S., Niggemann B., Scheiner O., Breiteneder H., "Hev b7 is a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in children with spina bifida" *J Allergy Clin Immunol*, 2001 Oct; 108(4):621-7

- WAN** KS, Lue HS, "Latex allergy in health care workers in Taiwan: prevalence, clinical features" *Int Arch Occup Environ Health*. 2007 Apr;80(5):455-7.
- WRIGHT** P.E. and H.J. Dyson, Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol*, 1999. 293(2): p. 321-31
- YAGAMI** A, Suzuki K, Saito H, Matsunaga K, "Hev B 6.02 is the most important allergen in health care workers sensitized occupationally by natural rubber latex gloves" *Allergol Int*, 2009 Sep;58(3):347-55
- YEANG** HY, Cheong KF, Sunderasan E, Hamzah S, Chew NP, Hamid S, Hamilton RG, Cardoso MJ, "The 14.6 kd rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kd (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy" *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Sep;98(3):628-39
- YEANG** HY, Chow KS, Yusof F, Arif SA, Chew NP, Loke YH, "Appraisal of latex glove proteins in the induction of sensitivity to multiple latex allergens" *J. Investig. Clin. Immunol*. 2000;10:215-22.

### **Páginas Electrónicas**

1. La Nación, Santiago G., 24 de Noviembre del 2009.  
[http://www.lanacion.com.ar/nota.asp?nota\\_id=932211](http://www.lanacion.com.ar/nota.asp?nota_id=932211)
2. The Times, 24 de Noviembre del 2009  
<http://www.timesonline.co.uk/tol/comment/obituaries/article737804.ece>
3. Universidad Nacional del Nordeste, Gonzales A., 24 de Noviembre del 2009  
<http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema14/image/tema144.gif>
4. La Jornada, 24 de Noviembre del 2009  
[http://lajornada.unam.mx/.../052n1soc-3\\_mini.jpg](http://lajornada.unam.mx/.../052n1soc-3_mini.jpg)
5. SAGARPA, 17 Marzo del 2011  
[http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/Banco/Hule/hule\\_3\\_web.jpg](http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/Banco/Hule/hule_3_web.jpg)

6. INIFAP, 24 de Noviembre del 2009  
<http://intranet.inifap.gob.mx/infoteca/inifap/Forestal/Folleto1434.pdf>
7. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura en el Banco de México. Cultivo y beneficio del Hule. Boletín informativo No. 307, vol.XXX, Año XVIII, División de Comunicación Social del Banco de México, Ago 1998.
8. Goodyear, 24 de Noviembre del 2009.  
[http://www.goodyear.com/corporate/history/history\\_story.html](http://www.goodyear.com/corporate/history/history_story.html)
9. IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 24 de Noviembre del 2009.  
<http://www.allergen.org/Allergen.aspx>
10. Molecular Kinetics Inc., 13 de Diciembre del 2010.  
<http://www.pondr.co>
11. University of California, 10 de Diciembre del 2010.  
<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>
12. Indianapolis University Medicine School, 19 de Marzo del 2010.  
<http://www.ist.temple.edu/disprot/Predictors.html>
13. European Molecular Biology Laboratory., 19 de Marzo del 2010.  
<http://dis.embl.de>
14. Pole Bioinformatique Lyonnais, 19 de Marzo del 2009.  
[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_nn.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html)
15. Pole Bioinformatique Lyonnais, 19 de Marzo del 2009.  
[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)
16. ProtParam / Expasy, 23 de Enero del 2012.  
<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>
17. ProtScale / Expasy, 23 de Enero del 2012.  
<http://web.expasy.org/protscale/pscale/Hphob.Black.html>
18. Igea J.,  
[http://medtrad.org/panacea/IndiceGeneral/n25\\_entremeses-igea.pdf](http://medtrad.org/panacea/IndiceGeneral/n25_entremeses-igea.pdf)