



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ÁREA DE BIOFISICOQUÍMICA

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN
PARA EL SISTEMA S-(CARBOXIMETIL)-CARICAÍNA-CISTATINA.

T E S I S

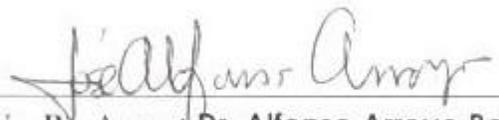
Q U E P R E S E N T A

I.B.Q.I. FRANCISCO REYES ESPINOSA

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (QUÍMICA).

Asesor: DR. JOSÉ ALFONSO ARROYO REYNA


Vo. Bó. Asesor: Dr. Alfonso Arroyo Reyna.

MEXICO, D.F.

Trimestre 09-I



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Fecha : 08/04/2009

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRO EN CIENCIAS (QUIMICA) del alumno FRANCISCO REYES ESPINOSA, matrícula 206380701, quien cumplió con los 141 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veintidós de abril del 2009 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE DISOCIACION PARA EL SISTEMA S-(CARBOXIMETIL) - CARICAINA-CISTATINA.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 60 créditos y el programa consta de 183 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBAR

JURADO

Presidente

Secretario

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA

DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA

Vocal

DR. ENRIQUE GARCIA HERNANDEZ

UNIDAD IZTAPALAPA

Coordinación de Sistemas Escolares

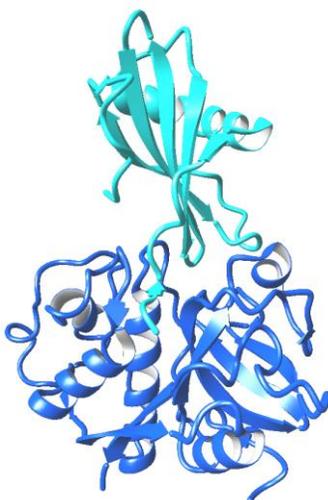
Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, DF, CP 09340 Apdo. Postal 555-320-9000

Tels. 5804-4880 y 5804-4883 Fax: 5804-4876

Este trabajo se realizó en el Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. José Alfonso Arroyo Reyna.

El examen de grado se efectuó el 22 de abril de 2009 a las 11:00 am.

Edificio de Posgrado de la UAM-I, salón 001.



El jurado estuvo formado por los siguientes sinodales:

Dr. Andrés Hernández Arana	Presidente
Dr. Rafael A. Zubillaga Luna	Secretario
Dr. Enrique García Hernández	Vocal

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de CONACYT, a través de la beca de Maestría con el número 2653, con el número de registro (CVU/Becario): 204984/203393.

Esta tesis la dedico con mucho amor y cariño...

A mis padres... Marcela y Ángel, a quienes agradezco de corazón sus consejos, su confianza, su amor que siempre me han brindado y por enseñarme que la perseverancia, la voluntad y la fe, son el móvil para lograr con éxito las metas trazadas.

A mis hermanas(os)... Celina, Enrique, Ricardo y María Teresa, a quienes agradezco su constante apoyo, su comprensión y amor fraternal que me han brindado.

A mis amigas(os)... Olga Delia Zamudio, Norma Gómez, Jorge Vivas, Ricardo Cruz, Karla Sanpedro, María Marina Villeda por su amistad incondicional, por el tiempo compartido en los buenos y malos momentos, por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría y optimismo, sobre todo por creer en mí.

En todo momento los llevo en el corazón.

I.B.Q.I. Francisco Reyes Espinosa

Quiero expresar mi gratitud...

A mi Asesor y Director de Tesis... Dr. José Alfonso Arroyo Reyna, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y respeto, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A los sinodales... Dr. Andrés Hernández Arana, Dr. Rafael A. Zubillaga Luna, Dr. Enrique García Hernández, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante la revisión de este trabajo.

A la Dra. Jaqueline Padilla Zúñiga y al Q. Juan Carlos Martínez Hernández por su generoso apoyo en la determinación de pureza de las muestras.

A mis compañeras(os) y amigas(as) del área de Biofísicoquímica por su calidez y compañerismo al compartir inquietudes, anécdotas, y por hacer amena la estancia en el laboratorio.

A mis amigas... María del Rocío, Blanca y Esther, por su continuo y afectuoso aliento, su amistad incondicional que me han brindado.

I.B.Q.I. Francisco Reyes Espinosa

RESUMEN:

La investigación y estudio acerca de proteasas y sus inhibidores es efectuada con el firme propósito de conocer más aplicaciones potenciales en medicina, agricultura y biotecnología, para ello se han efectuado y se continúan realizando estudios *in vivo* e *in vitro* de la formación de complejos enzima proteolítica-inhibidor.

La contribución de este trabajo fue conocer la constante de disociación en el equilibrio (K_d) para la interacción entre la S-(carboximetil)-caricaína y la cistatina de pollo, la K_d fue medida mediante el método de titulación fluorimétrica a pH 7.4 y 25°C. La K_d calculada tiene un valor de $(1.87 \pm 0.2) \mu\text{M}$, lo cual indica una constante de afinidad ($K_a = K_d^{-1}$) moderada con un valor de $5.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

ÍNDICE	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. OBJETIVOS	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. PURIFICACIÓN DE S-(CARBOXIMETIL)-CARICAÍNA.	16
2. PURIFICACIÓN DE CISTATINA A PARTIR DE CLARA DE HUEVO.	18
2.1 PURIFICACIÓN DE S-(CARBOXIMETIL)-PAPAÍNA Y OBTENCIÓN DE SOLUCIÓN ACOPLANTE.	19
2.2 PREPARACIÓN DE SEFAROSA 4B.	20
2.3 ACOPLAMIENTO DEL LIGANDO.	21
2.4 PREPARACIÓN DE CLARA DE HUEVO.	23
2.5 ACOPLAMIENTO DE CISTATINA.	26
2.6 DESACOPLOMIENTO DE CISTATINA.	28
3. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN DEL SISTEMA: S-(CARBOXIMETIL)-CARICAÍNA-CISTATINA.	30
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSIÓN	44
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	49
IV. BIBLIOGRAFÍA	50

V. APÉNDICE I

A) FLUORESCENCIA	53
B) ESPECTROS DE EMISIÓN Y EXITACIÓN	54
C) INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA	54
D) GRÁFICO DE CALIBRACIÓN DE FLUORESCENCIA	56

APÉNDICE II

A) DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE UNA CONSTANTE DE ASOCIACIÓN PROTEÍNA LIGANDO: PROTEASA-INHIBIDOR.	59
---	----

APÉNDICE III

A) TABLA A.III-1	65
B) ESPECTRO DE ABSORCIÓN EN EL UV (ULTRAVIOLETA) DE UNA PROTEÍNA.	66

I. INTRODUCCIÓN.

Las proteínas son polímeros lineales de α -aminoácidos con amplia variabilidad estructural y funciones biológicas muy diversas. Un α - aminoácidos consta de un átomo de carbono central, llamado carbono α , unido a un grupo amino, un grupo ácido carboxílico, una cadena lateral específica (R) y un hidrógeno (Figura I.1). Estos centros tetraédricos con la excepción de la glicina, son quirales: en las proteínas naturales solo existe el isómero L. Todas las proteínas naturales se construyen a partir del mismo conjunto de 20 aminoácidos [1].

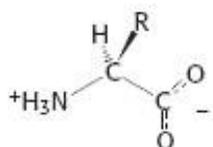


Figura I.1 Estructura general de un α -aminoácido.

La estructura de las proteínas se puede describir en cuatro niveles, que se denominan estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. La estructura primaria viene determinada por la secuencia de α -aminoácidos en la cadena proteica, es decir, el número de aminoácidos presentes y el orden en que están enlazados. Las posibilidades de estructuración a nivel primario son prácticamente ilimitadas y puede adoptar múltiples conformaciones en el espacio. La conformación espacial de una proteína se analiza en términos de estructura secundaria y terciaria. La estructura secundaria se refiere a la conformación adoptada por regiones locales de la cadena polipeptídica. Con o sin estructura secundaria, la proteína presenta un plegamiento tridimensional que adopta una forma determinada en el espacio, que constituye la estructura terciaria. La estructura terciaria de una proteína es única y siempre la misma en igualdad de condiciones, esta configuración tridimensional es la responsable directa de sus propiedades biológicas, ya que es la disposición espacial de los distintos grupos funcionales la que determina su interacción con los diversos ligandos. La estructura cuaternaria se refiere a la asociación de varias cadenas polipeptídicas (iguales o distintas) para formar una unidad funcional [1].

La gran heterogeneidad estructural de las proteínas les permite cumplir múltiples funciones en el ser vivo como son: medio de transporte de sustancias insolubles, enzimática (catalizan reacciones), hormonal (la mayoría de las hormonas son proteínas, excepto las hormonas sexuales), receptores (están en membrana de las células), estructural, nutricional, actúan como antígenos, amortiguadora de pH, contráctil, hemostasia (regulan la coagulación sanguínea) y genética.

Las enzimas son catalizadores de los sistemas biológicos, sus características más sobresalientes son su poder catalítico y especificidad. Las enzimas son altamente específicas, tanto en la reacción que catalizan como en la selección de sustancias reactantes, denominadas sustratos. La catálisis tiene lugar en un centro específico de la enzima llamado centro activo, casi todas las enzimas conocidas son proteínas [1].

La mayor parte de las enzimas se denominan a partir del nombre de los sustratos y las reacciones que catalizan con el sufijo “asa”. En 1964 la IUB (International Union of Biochemistry) estableció una Comisión de Enzimas, la cual estableció una nomenclatura para la clasificación de enzimas de acuerdo a las reacciones que catalizan las enzimas (Tabla I.1) y estas a su vez se subdividieron para poder identificar con precisión las enzimas mediante un código de cuatro dígitos precedido por las letras EC (de Enzyme Commission) [1,2].

Tabla I.1 Las seis clases principales de enzimas.

Clase	Tipo de reacción
1. Oxidoreductasas	Oxidación-reducción de los grupos CH-OH, CH-CH, C=O, CH-NH ₂ y CH-NH.
2. Transferasas	Transferencia de grupos de un solo carbono, residuos aldehídicos o cetónicos, y grupos acilo, alquilo, glucosilo o que contienen fósforo o azufre.
3. Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis de enlaces de tipo éster, éter, péptido, glucosilo, anhídrido de ácido, C-C, C-halógeno o P-N.
4. Liasas	Adición o separación de grupos para formar dobles enlaces. Incluyen las enzimas que actúan sobre los enlaces C-C, C-O, C-N, C-S y C-halógeno.
5. Isomerasas	Interconversión de isómeros ópticos, geométricos o de posición.
6. Ligasas	Unión de dos sustratos a expensas de ATP o compuesto semejante. Incluyen las enzimas que actúan sobre los enlaces C-C, C-O, C-N, C-S.

Datos tomados de Murray *et al.* [2].

Las proteasas (enzimas que catalizan la hidrólisis de un enlace peptídico o proteólisis) son de gran importancia en varias funciones celulares, tienen papeles clave en muchos procesos fisiológicos esenciales. Con los avances de la Biología Molecular, se han hecho extraordinarios progresos en comprender la estructura y función molecular, mecanismo catalítico y evolución de proteasas. Esto ha permitido que las proteasas puedan ser clasificadas en familias, teniendo estructuras y mecanismos catalíticos similares entre los miembros de cada familia [3,4].

Generalmente las proteínas estructurales o proteínas constitutivamente requeridas son de larga vida, mientras que las proteínas regulatorias con frecuencia se degradan rápidamente. Por lo tanto, su degradación debe ser regulada y medida con precisión, ya que una degradación no regulada podría ser peligrosa para la célula. Principalmente, el balance entre la tasa de síntesis y consumo de proteínas celulares determinan el destino de células *in vivo* [3].

Las enzimas constituyen un especializado y diverso grupo de proteínas que tienen varias funciones en procesos fisiológicos. Las enzimas proteolíticas están involucradas en procesos digestivos, activación de proenzimas, liberación de péptidos fisiológicamente activos y procesos de inflamación entre otros. Las proteasas se agrupan en cuatro categorías de acuerdo al aminoácido esencial en su sitio activo, pH óptimo en el rango de actividad, la similitud en secuencia de aminoácidos y el mecanismo de inhibición [5], en la Tabla I.2 se muestra la clasificación.

Tabla I.2 Clasificación de proteasas.

Proteasas.	Residuo de aminoácido en el sitio activo.	Rango de pH optimo.
Serinproteasas.	Ser; His	7 – 9
Cisteinproteasas.	Cys	4 – 7
Aspartilproteasas.	Asp, Try	Menor a 5
Metaloproteasas.	Ion metálico	7 – 9

Datos tomados de Oliveira *et al.* [5].

La gran familia de enzimas hidrolíticas, las peptidasas (también llamadas proteasas, EC 3.4) pueden ser categorizadas de acuerdo a la zona en la cual se lleva a cabo el rompimiento de la cadena polipeptídica, como endopeptidasas (o bien proteinasas, EC 3.4.21-99) y exopeptidasas (EC 3.4.11-19). Las proteasas pueden ser clasificadas de acuerdo al grupo reactivo en el sitio activo, el cual se encuentra involucrada la catálisis (Tabla I.2); serinproteasas (EC 3.4.21), cisteinproteasas (EC 3.4.22), aspartilendopeptidasas (EC 3.4.23), metaloendopeptidasas (EC 3.4.24), las enzimas que aún no se conoce completamente su mecanismo de reacción son clasificadas en el subgrupo (EC 3.4.99) [6].

Las cisteinproteasas se encuentran extensamente distribuidas entre organismos vivos, participan en una gran variedad de funciones celulares, la más reciente clasificación de esta familia comprende proteasas de plantas, varias catepsinas de mamíferos y calpainas, así como varias proteasas de parásitos [3].

La actividad de las cisteinproteasas es controlada mediante proteínas inhibitoras como cistatinas y α_2 -macroglobulinas. Sus funciones inhibitoras protegen al organismo celular de proteólisis destructiva de cisteinproteasas endógenas involucradas en sus procesos metabólicos, y de cisteinproteasas exógenas de origen bacterial y viral [7].

La familia de la papaína (peptidasas C1), la más grande de las cisteinproteasas, comprende enzimas de bacterias, plantas, invertebrados y vertebrados. La familia de la papaína incluye endopeptidasas, aminopeptidasas, una dipeptidil peptidasa y peptidasas que presentan características de endopeptidasa y exopeptidasa [4,8].

Las cisteinproteasas que son endopeptidasas presentan actividad catalítica debido a la nucleofilicidad de cisteína en su sitio activo. Un par iónico es formado, entre el residuo de cisteína de su sitio activo y una histidina ubicada sobre la pared opuesta de la hendidura del sitio activo [9]. Tomando como modelo la molécula de papaína, en la Figura I.2 se aprecia que el sitio activo es localizado en la interfase entre dos dominios.

Se ha identificado claramente que los residuos de cisteína y histidina, localizados en el sitio activo de las cisteinproteasas, participan en la hidrólisis de enlaces peptídicos, actuando como nucleófilo el residuo de cisteína y participando el residuo de histidina como ácido / base [10].

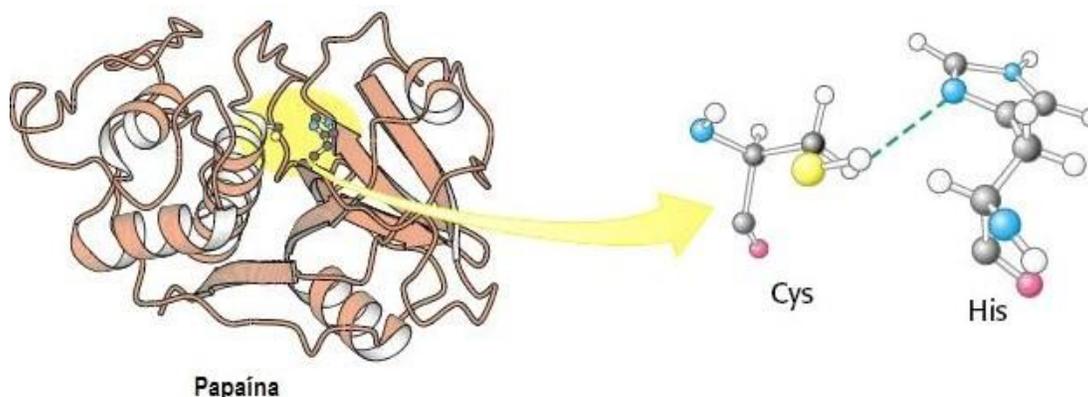


Figura I.2 Cisteinproteasas [1]. Del lado derecho de la molécula de papaína se muestra los residuos de cisteína (Cys) e histidina (His) que participan en la catálisis.

La actividad proteolítica de todas las cisteinproteasas proviene de los residuos de cisteína (Cys) e histidina (His) en el centro activo de la enzima. En el caso de cisteinproteasas de la familia de la papaína, el centro catalítico es complementado con un residuo de asparagina (Asn) que garantiza una orientación óptima del anillo de imidazol de la His para las sucesivas etapas de la hidrólisis. La etapa crucial del proceso catalítico (Figura I.3) involucra la formación de un par iónico reactivo tiolato/imidazolio ($\text{Cys-S}^-/\text{His-Im}^+$), el cual resulta de la transferencia de un protón entre Cys-25 y Hist-159 (numeración de residuos de papaína) [11].

En principio, los ataques del anión tiolato al carbonilo facilita el rompimiento del enlace peptídico y el doble enlace entre el carbono y oxígeno se convierte en enlace sencillo (Figura I.3-A). El oxígeno asume una carga neta negativa que permite el primer estado de transición tetraédrico. El oxianión se estabiliza enlazando hidrógenos del grupo NH de glutamina (Gln) de la cadena lateral (Gln-19) y Cys-25 de la cadena principal, de lo cual probablemente resulta la formación de la cavidad del oxianión (Figura I.3-B). En seguida la rotación de la cadena lateral de His-159, permite la transferencia de protones desde el catión imidazolio al nitrógeno del enlace péptido que comienza a ser hidrolizado y ocurre el rompimiento. El sustrato recién formado es enlazado a la His-159, mientras la parte carboxílica del sustrato es enlazado Cys-25 vía enlace tioéster, formando una acil-enzima (Figura I.3-C). El siguiente paso de la reacción involucra la disociación de la parte amínica del sustrato y su sustitución por una molécula de agua. El nitrógeno del imidazol contribuye a la polarización de la molécula de agua que a su vez ataca el carbono del grupo carbonilo de la acil-enzima (Figura I.3-D). Esta es seguida de la formación de un intermediario tetraédrico (Figura I.3-E). En la etapa final, la deacilación tioéster permite reconstruir el grupo carboxilo en el sustrato hidrolizado que es concertado con la liberación de una enzima activa (Figura I.3-F) [6, 11].

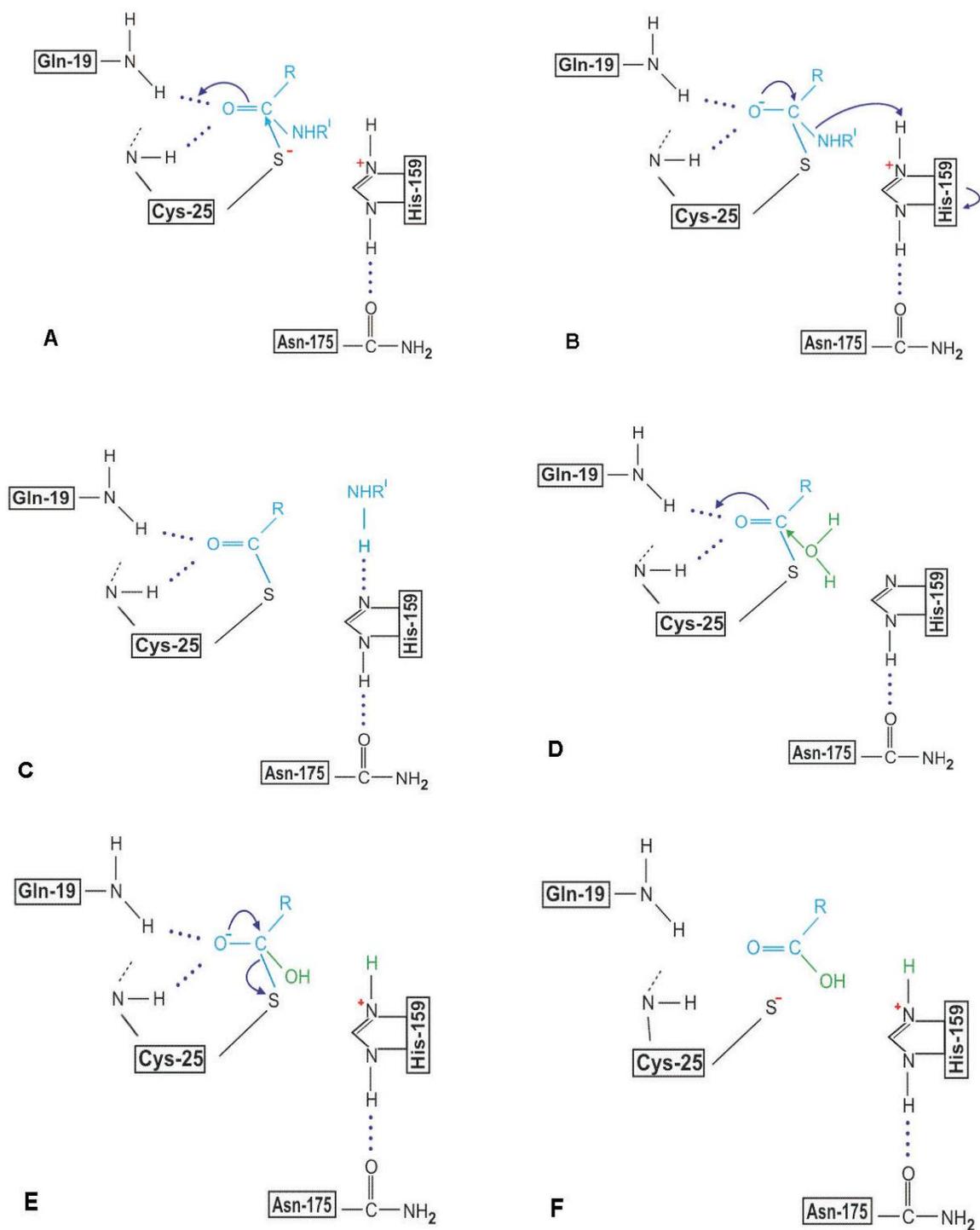


Figura I.3 Mecanismo catalítico de cisteinproteasas, ejemplificado por papaína [11].

A partir del látex de *Carica papaya* se han aislado cuatro cisteinproteasas que pertenecen a la familia de peptidasas C1 también conocido como el clan de papaína. En la Tabla I.3, se presenta su punto isoeléctrico (pI) y su porcentaje de similitud de estructura primaria con respecto a papaína.

Tabla I.3 Proteasas presentes en látex de *Carica papaya*.

Proteasas	pI ²	Porcentaje de Similitud ²
Papaína (EC 3.4.22.2).	8.8	
Quimopapaína (EC 3.4.22.6).	10.4	59.4
Caricaina ¹ (EC 3.4.22.30).	11.4	69.8
Proteasa de papaya IV (EC 3.4.22.25).	10.6	67.9

¹ Anteriormente conocida como proteasa A ó proteasa de papaya Ω . ² Sumner *et al.* [12].

Las proteasas de papaya se sintetizan como proenzimas, su forma activa contiene de 206 a 218 aminoácidos, se encuentra precedida de una prosequencia de 106 a 118 residuos, las cuatro secuencias exhiben un alto grado de similitud. Con la excepción de la proglucil endopeptidasa, las proregiones de proteinasas de papaya permiten mantener el plegamiento y actúan como un inhibidor intrínseco [13].

Un considerable número de cisteinproteasas son sintetizados como precursores inactivos, su activación requiere del rompimiento proteolítico de la proregión N-terminal que también funciona como inhibidor de la enzima madura. La mayoría de las proregiones de la forma madura de las cisteinproteasas comparten un plegamiento similar que consta de dos partes. La proregión N-terminal es constituida de dos estructuras α hélice y una estructura de hebra β extendida, interactuando con la superficie localizada en la proregión de unión del bucle, de la enzima madura. La región de C-terminal enlaza entre los dos dominios de la enzima, siendo fijado por una estructura corta de α hélice, al sitio S' (Nomenclatura de Schechter y Berger [14], Figura I.4). Esta estructura cubre el sitio de enlace del sustrato, con lo cual impide acceder al centro catalítico de la enzima [11].

La papaína presenta una zona de enlace extensa, en la cual existen numerosas interacciones entre la enzima y el sustrato. El acoplamiento adecuado del sustrato sobre el sitio activo permite que ocurra el proceso de hidrólisis. Schechter y Berger [14] propusieron que el sitio activo de la papaína contiene siete subsitios, cada uno capaz de aceptar un residuo de aminoácido del sustrato peptídico. Los subsitios son localizados sobre ambas regiones del sitio catalítico de la enzima (Figura I.4); cuatro en la proregión N-terminal y tres en la proregión C-terminal. La papaína fácilmente rompe el enlace peptídico formado entre los residuos de Arg y Lys (P1). El subsitio S2 de la papaína es una cavidad hidrofóbica constituida por los residuos de aminoácidos Trp-69, Tyr-67, Phe-207, Pro-68, Ala-160, Val-133, Val-157 y específicamente interactúa con zonas hidrofóbicas de la cadena peptídica como Phe [6,8].

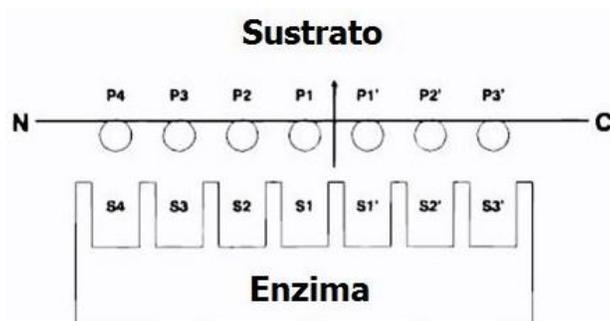


Figura I.4 Nomenclatura de Schechter y Berger [14]. Los residuos de aminoácidos del sustrato sobre la proregión N-terminal de la zona de rompimiento de los enlaces peptídicos son numerados como P1, P2, P3, ...; los residuos sobre la proregión C-terminal son numerados como P1', P2', P3', ...; los subsitios sobre la enzima son numerados S3, S2, S1, S1', S2', S3', ... (Figura I.4) los cuales se complementan con los residuos de sustrato [8].

La investigación y estudio acerca de proteasas y sus inhibidores es efectuada con el firme propósito de conocer más aplicaciones potenciales en medicina, agricultura y biotecnología, para ello se han efectuado y se continúan realizando estudios *in vivo* e *in vitro* de la formación de complejos enzima proteolítica–inhibidor.

Diversos estudios *in vivo* han demostrado que proteínas inhibidoras de cisteinproteasas endógenas regulan endopeptidasas cisteínicas lisosomales. Se encuentran reportados estudios de estos inhibidores en el tratamiento de cáncer y metástasis, pancreatitis, artritis, aterosclerosis, diabetes, gingivitis periodontal, infecciones, inflamación, trastornos en hígado, pulmón, lisosomal, miocardial, renal, muscular, enfermedad de Alzheimer y de Batten [15].

Los inhibidores de cisteinproteasas podrían ser empleados como fármacos apropiados para el tratamiento de tumores, enfermedades inflamatorias, procesos patológicos en los que se involucran el incremento de la degradación de huesos, cartílago o musculo, infecciones causadas por virus, bacterias y protozoos. En términos farmacológicos, un inhibidor de proteasas eficaz debe cumplir con las siguientes condiciones: la interacción entre la enzima e inhibidor debe ser irreversible, ó si es reversible, la constante de disociación del complejo enzima–inhibidor debe ser <0.1 nM con el propósito de mantener esta actividad por un periodo de tiempo grande. Las cisteinproteasas normalmente existen en la célula como enzimas lisosomales o citoplasmicas, con el propósito de pasar rápidamente a través de la membrana celular, el inhibidor de cisteinproteasa no debe presentar carga. Además, la reactividad del inhibidor tiene que ser lo suficientemente baja para ser inertes hacia grupos tioles catalíticamente irrelevantes o grupos SH esenciales de enzimas no hidrolíticas [6].

Las cistatinas, proteínas del tipo inhibidoras de cisteinproteasas se encuentran extensamente distribuidas en animales y plantas, de manera general se asume que estos inhibidores están involucrados en la regulación fisiológica y procesos patológicos [16]. Los miembros de la superfamilia de la cistatina han sido agrupados en familias, de acuerdo a su localización, tamaño y complejidad de su cadena polipeptídica, en la Figura I.5 se muestra un esquema de esta clasificación [5,17].

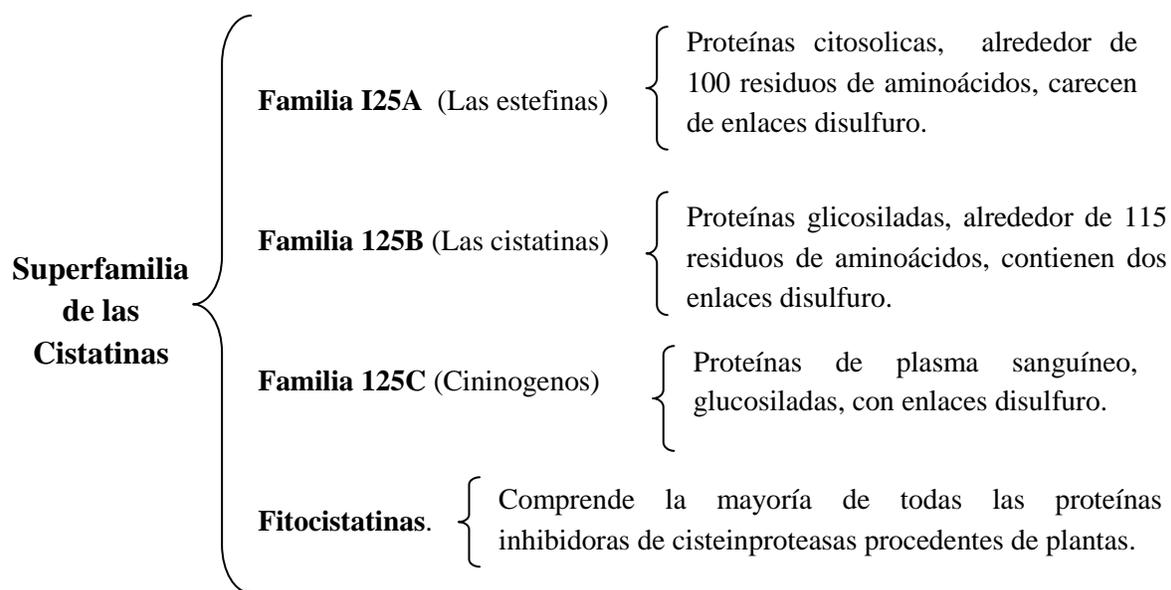


Figura I.5 Clasificación de cistatinas.

Las cistatinas son inhibidores de cisteinproteasas con estructura proteica, endógenas, termófilas (estables por arriba de 100 °C) y estables a pH extremos (pH de 2–12 para cistatinas y 5–2 para cininogenos). La inactivación de cisteinproteasas se realiza mediante inhibición competitiva, no covalente y reversible. Todas la proteínas inhibidoras de cisteinproteasas (CPIs) solo inhiben cisteinproteasas, incluso inhiben a la exopeptidasa catepsina C. Las excepciones son bromelaína y glicilendopeptidasa (proteasa de papaya IV) las cuales no son inhibidas por alguna de esta proteínas. La calpaína es solo inhibida por cininogenos. La clostripaína y la proteasa de virus de polio no pertenecen a la familia de la papaína y son inhibidas por las cistatinas [6].

El modelo de la formación del complejo papaína–cistatina, presentado en la Figura I.6, se basa en la estructura tridimensional de la cistatina de pollo y fue confirmado por el análisis de la estructura del complejo enzima–inhibidor de papaína y la estefina humana B recombinante mediante cristalografía de rayos X. En este modelo (Figura I.6) el segmento N-terminal del inhibidor el cual tiene el residuo Gly9 conservado en todas las cistatinas, interactúa con el sitio activo y los subsitios S1-S3 de la enzima, mientras dos bucles –los cuales contienen la secuencia conservada QVVAG (en cistatina de pollo: QLVSQ) y Pro-Trp– enlazan en los subsitios S1'-S2' (Nomenclatura de Schechter y Berger) [6,14].

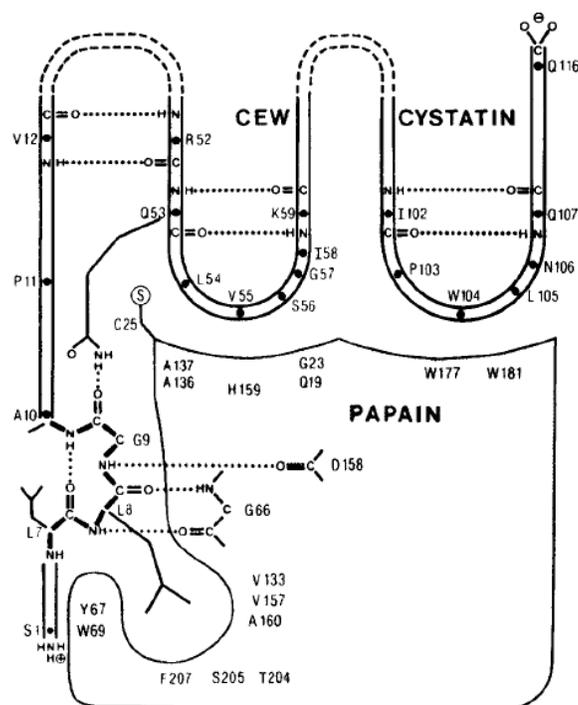


Figura I.6 Modelo de la interacción entre cistatina y papaína [6].

La clara de huevo de pollo (o albumen) contiene de 9.7 a 12 % de proteínas, puede ser considerada como un sistema construido de numerosas proteínas globulares en solución acuosa. Algunas de las proteínas que constituyen la clara de huevo poseen actividades biológicas, estas incluyen novedosas actividades antimicrobianas, anticancer, antihipertensivas, propiedades antiadhesivas, inmunomodulatoria, propiedades antioxidantes, inhibidores de proteasas, biodisponibilidad de nutrientes, y poseen lípidos funcionales. Por todo esto, es de gran importancia el estudio de los componentes del huevo en la salud humana, para la prevención y tratamiento de enfermedades [18].

La clara de huevo es una fuente rica de inhibidores de proteasas, los cuales se han estudiado e identificado; ovomucoide y ovoinhibidor son inhibidores multidominio tipo Kazal, cada dominio contiene un sitio reactivo a serinproteasas. La cistatina es un inhibidor de cisteinproteasas mientras que la ovastatina es un inhibidor que inhibe proteasas mediante los cuatro mecanismos [19].

La cistatina de pollo es un inhibidor de cisteinproteasas que se encuentra en clara de huevo y suero de pollo, también en pulmón, molleja, cerebro, corazón, oviducto y es expresado por células de musculo y en el desarrollo embrionario de pollo [20]. La cistatina aislada a partir de clara de huevo de pollo es una mezcla de las formas moleculares 1 y 2, con valores de punto isoelectrico (pI) de 6.5 y 5.6 respectivamente, la diferencia estructural entre estas formas isoelectricas es un residuo de fosfoserina (PSer) en la posición 80 de la forma 2 (Ser en forma1). La carga negativa adicional de PSer es responsable de bajar el pI de 6.5 (forma 1) a 5.6 (forma 2) [21].

Annastasi *et al.* [22] propusieron un método de purificación de cistatina de tres etapas: precipitación de ovomusina, cromatografía de afinidad empleando S-(carboximetil)-papaína (CM-papaína) inmovilizada sobre sefarosa y cromatoenfoque; más tarde Lindahal *et al.* [23] modificó esta ultima etapa empleando cromatografía sobre una columna de dietilaminoetil (DEAE) – sefacel. Trziszca *et al.* [16], reportó la purificación de cistatina, mediante la compilación de la precipitación de ovomucina, cromatografía de afinidad a través de papaína inmovilizada sobre sefarosa, filtración en gel sobre sefadex G-100, cromatografía DEAE y fase reversa. Otro método descrito por Turk *et al.* [24] incluye el ajuste del pH de la clara de huevo a un valor de pH de 12 y precalentamiento a 62 °C, aplicación la solución resultante sobre gel de fenil-sefarosa seguida por una columna de intercambio catiónico [20].

Existen diversos métodos espectroscópicos para el estudio de conformación macromolecular en disolución. Las proteínas absorben luz y emiten radiación en el rango UV del espectro electromagnético, la absorbancia es causada por los enlaces peptídicos, aminoácidos aromáticos y enlaces disulfuro. Esta propiedad permite realizar estudios de caracterización conformacional y cambios conformacionales mediante Fluorescencia y Dicroísmo Circular.

Las proteínas absorben cerca de 280 nm, el rango de fluorescencia máximo es de 320 a 350 nm, la emisión máxima de proteínas refleja la exposición promedio de sus residuos fluoróforos a la fase acuosa. La fluorescencia de proteínas proviene de los residuos de fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp). Los residuos de triptófano de las proteínas generalmente aportan alrededor del 90 % del total de fluorescencia procedente de proteínas, este fluoróforo natural es altamente sensible a la polaridad de su medio circundante. Frecuentemente, los cambios espectrales observados son consecuencia de varios fenómenos, como la unión de ligando, asociación proteína-proteína, y desnaturalización, entre otros [25].

A pesar de que solo los aminoácidos aromáticos expuestos (Phe, Tyr y Trp) son luminiscentes, existen otras dos posibilidades de análisis por luminiscencia que permiten el estudio fluorimétrico de aminoácidos y proteínas otra posibilidad consiste en marcar una proteína con un cromóforo fluorescente. Estos cromóforos pueden usarse para el análisis fluorimétrico de muchas proteínas. Otro tipo de compuestos biológicos que pueden estudiarse fluorimetricamente son las pirimidinas, las purinas y los ácidos nucleicos [26].

La fluorimetría es una técnica muy valiosa para el análisis cualitativo y cuantitativo de enzimas y para el estudio de cinéticas y mecanismos enzimáticos. La alta sensibilidad y selectividad de esta técnica ha permitido realizar numerosos estudios *in situ*, en tejidos sin requerir ninguna separación para efectuar el estudio [26].

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ✚ Determinar la constante de disociación en el equilibrio del sistema formado por la cistatina de clara de huevo de pollo (inhibidor de cisteinproteasa) y la S-(carboximetil)-caricaína (cisteinproteasa) a 25° C, pH 7.4.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✚ La purificación de cistatina a partir de clara de huevo (albumen), mediante precipitación selectiva de las proteínas que constituyen el albumen, seguida de una cromatografía de afinidad empleando S-(carboximetil)-papaína (CM-papaína) inmovilizada sobre sefarosa 4B.
- ✚ Determinar la constante de disociación para el complejo S-(carboximetil)-caricaína–cistatina a partir del método de titulación fluorimétrica a 25°C y pH 7.4.

III. MATERIALES Y METODOS

1. PURIFICACIÓN DE S-(CARBOXIMETIL)-CARICAÍNA.

La purificación de la S-(carboximetil)-caricaína (CM-caricaína) se realizó siguiendo el procedimiento reportado por Solís-Mendiola *et al.* [27]. La caricaína es la enzima más básica de las proteinasas estudiadas en el latex de *Carica papaya*, es detectada con facilidad mediante cromatografía de intercambio catiónico; al aplicar un gradiente de incremento en la fuerza iónica es eluido como el último componente (Figura 1.1). En la Figura 1.2 se esquematiza el procedimiento efectuado para la purificación de S-(carboximetil)-caricaína (CM-caricaína).

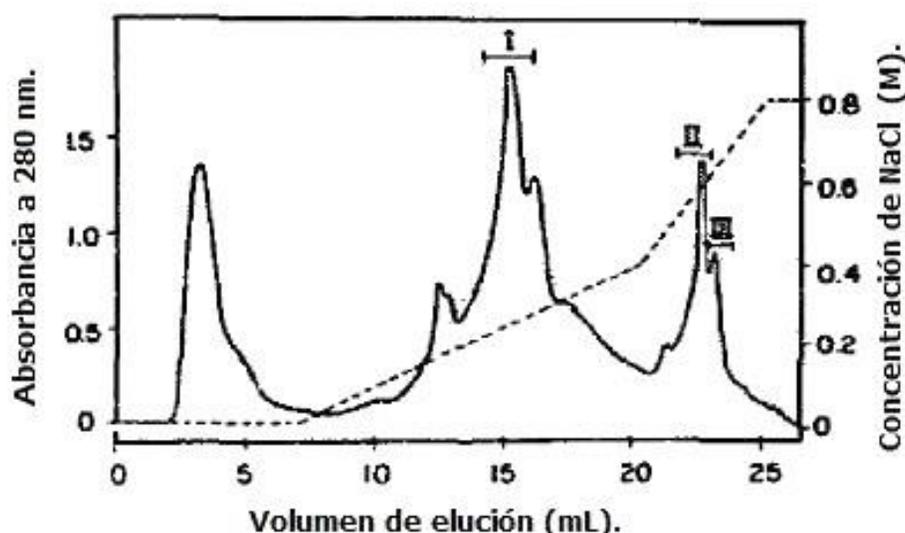


Figura 1.1 Cromatograma de quimopapaína parcialmente purificada [27].

Absorbancia _____, Concentración de NaCl _____

La carboximetilación de las proteasa contenidas en el extracto de quimopapaína se efectuó de la siguiente manera. Se pesaron 900 mg de extracto de quimopapaína que contiene caricaína (SIGMA C-9007, Lote:124F80751), y se disolvieron en 41 mL de amortiguador fosfatos 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 6.0, contenidos en un vaso de precipitados de 150 mL. Las proteínas fueron activada con cisteína 2 mM, para lo cual se disolvió 0.0129 g de cisteína en la solución de papaína, una vez disuelta se mantuvo en agitación por 10 min a temperatura ambiente. Una vez efectuada esta operación fue adicionado ácido iodoacético hasta una concentración final de 10 mM. La solución de ácido iodoacético fue preparada disolviendo 0.083 g de ácido iodoacético en 4 mL de agua desionizada contenidos en un vaso de precipitado de 10 mL, una vez disuelto se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por una hora. Una vez efectuada esta operación se mezcló con la solución de papaína, para obtener un volumen final de 45 mL.

La solución de quimopapaína carboximetilada fue dializada contra agua desionizada por 6 horas a 4 °C, empleando una membrana Spectra/Por (MWCO: 12–14000). Posteriormente la solución se filtró con un filtro 0.45 µm HV (Durapore). Una vez dializada y filtrada la solución, se procedió a purificar por cromatografía de líquidos en un equipo Varian 9012/9050, empleando una columna de intercambio catiónico PL-SCX (laboratorios Polymer) y un gradiente de elución en amortiguador de fosfato 0.05 M, pH 7.0 previamente reportado [27]. Los componentes de la solución fueron eluidos a través de la columna con un flujo de 0.5 mL/min, empleando un gradiente bifásico programado de cloruro de sodio: NaCl de 0 a 0.4 M (con una pendiente de 0.015 M/mL) y NaCl de 0.4 a 0.8 M (con una pendiente de 0.04 M/mL).

En el cromatograma se identificó la elución de carboximetil-quimopapaínas y carboximetil-caricainas. La fracción identificada como pico II (que corresponde a caricaina [27]) fue colectada y dializada contra agua desionizada por 6 horas a 4°C. Una vez dializada se recromatografio utilizando el mismo gradiente, esta fracción colectada se dializó (por 6 horas a 4°C) contra amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4.

Posteriormente esta solución fue concentrada mediante ultrafiltración, empleando una membrana amicon bioseparations (NMWL: 10000), a un volumen de 3 mL con una concentración de 1.038 mg/mL. La concentración de la solución fue calculada en base a su $A^{1\%}_{280, 1\text{ cm}} = 16.7$ [28] y realizando corrección por dispersión de luz (Apéndice III).

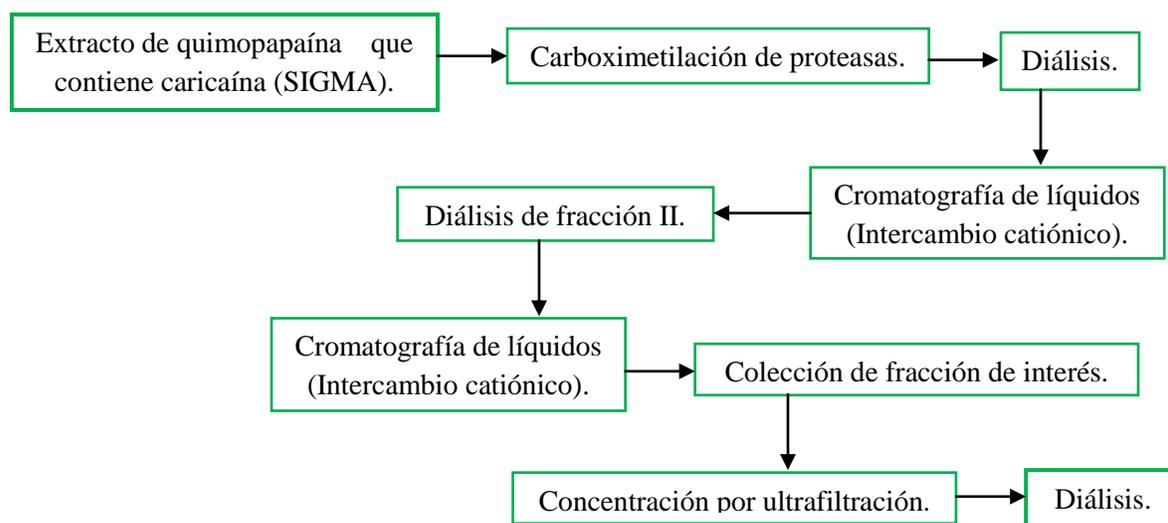


Figura 1.2 Purificación de CM-caricaína.

2. PURIFICACIÓN DE CISTATINA A PARTIR DE CLARA DE HUEVO.

Barret en 1981 [29] propuso el nombre "cistatina" a proteínas que inhiben cisteinproteasas, la cistatina de clara de huevo de pollo fue aislada por primera vez por Whitaker en 1968 [19]. Los métodos de purificación de cistatina propuestos por Anastasi *et al.* (1983) [22], Lindahl *et al.* (1988) [23], Trziszka *et al.* (2004) [16], emplean cromatografía de afinidad, efectuando un tratamiento previo de la clara de huevo.

El proceso de purificación de cistatina que se presenta en este trabajo consiste en dos etapas. La primera consiste en una precipitación de las proteínas de la clara de huevo en medio ácido, seguida de la precipitación de las proteínas que se encuentran en mayor cantidad, mediante el ajuste del pH a su respectivo punto isoelectrico. En la segunda se realiza una cromatografía de afinidad empleando el método en batch, inmovilizando carboximetil-papaína (CM-papaína) sobre gel de sefarosa 4B. En la Figura 2.1 se presenta un esquema que resume las etapas de purificación realizadas en este trabajo, comprende métodos de clarificación, enriquecimiento, cromatográficos y de control de pureza.

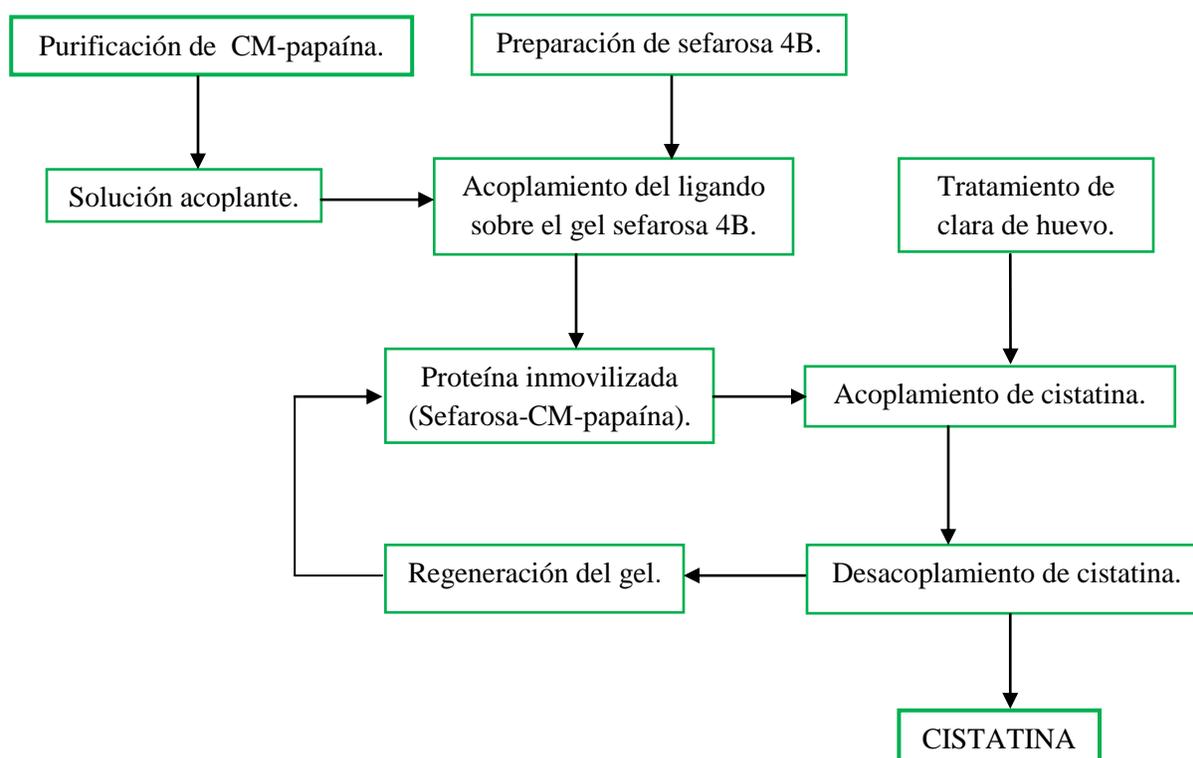


Figura 2.1 Etapas de purificación de cistatina a partir de clara de huevo.

2.1 PURIFICACIÓN DE S-(CARBOXIMETIL)-PAPAÍNA Y OBTENCIÓN DE SOLUCIÓN ACOPLANTE.

La carboximetilación de una proteasa permite la formación de derivados estables que permanecen intactos durante los estudios de la proteína. Las etapas del proceso para la obtención de la solución acoplante se presenta en la Figura 2.2.

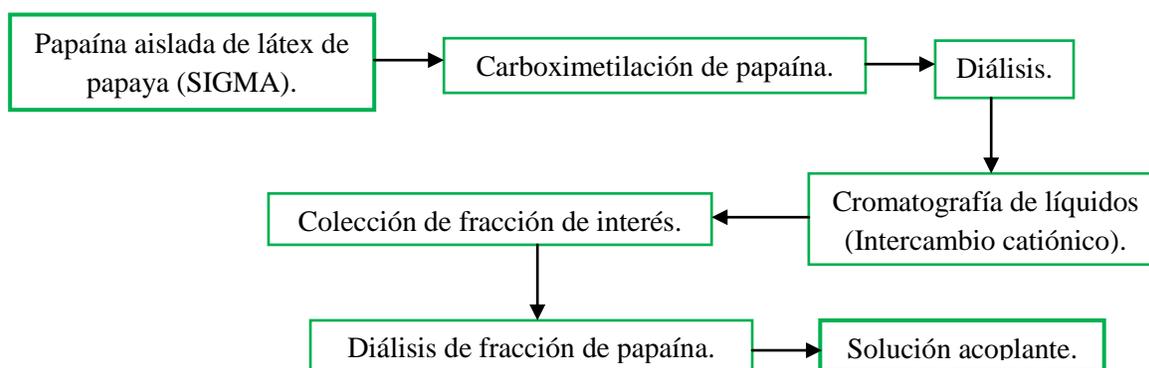


Figura 2.2 Purificación de S-(carboximetil)-papaína.

La carboximetilación de papaína se efectuó de la siguiente manera. Se pesaron 20 mg de papaína aislada de látex de papaya, dos veces cristalizada (SIGMA, Lote:106K7043), y se disolvieron en 82 mL de amortiguador fosfatos 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 6.0, contenidos en un vaso de precipitados de 150 mL. La proteína fue activada con cisteína 2 mM, para lo cual se disolvió 0.0258 g de cisteína en la solución de papaína, una vez disuelta se mantuvo en agitación por 10 min a temperatura ambiente. Una vez efectuada esta operación fue adicionado ácido iodoacético hasta una concentración final de 10 mM.

La solución de ácido iodoacético fue preparada disolviendo 0.186 g de ácido iodoacético en 18 mL de agua desionizada contenidos en un vaso de precipitado de 50 mL, una vez disuelto se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por una hora. Una vez efectuada esta operación se mezcló con la solución de papaína, para obtener un volumen final de 100 mL.

La solución de S-(carboximetil)-papaína descrita anteriormente, fue dializada contra agua desionizada por 6 horas a 4 °C, empleando una membrana Spectra/Por (MWCO: 12–14000).

La solución dializada fue filtrada (filtro HV Durapore, 0.45 µm), y se procedió a purificar por cromatografía de líquidos empleando una columna de intercambio catiónico PL-SCX (laboratorios Polymer), para ello se realizó 39 corridas en el equipo, obteniendo un volumen de 60 mL, el cual se dializó en agua desionizada por 6 horas a 4 °C. Posteriormente esta solución

fue concentrada mediante ultrafiltración, empleando una membrana amicon bioseparations (NMWL:10000), a un volumen de 4 mL con una concentración de 0.15 mg/mL. Esta cuantificación de proteína se realizó en base a su $A^{1\%}_{280, 1 \text{ cm}} = 25$ (Especificación: SIGMA).

Una vez concentrada la S-(carboximetil)-papaína (CM-papaína) se dializó en amortiguador NaHCO_3 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3, por 6 horas obteniendo un volumen de 4 mL con una concentración de 0.14 mg/mL. El cálculo se realizó en base a su $A^{1\%}_{280, 1 \text{ cm}} = 25$ (Especificación: SIGMA).

Esta es la solución acoplante que contiene la proteína que se inmovilizó sobre gel de sefarosa 4B, el procedimiento de acoplamiento sobre este gel, es mas eficiente en el rango de pH de 8–10 donde los grupos amino contenidos en el ligando predominan en su forma desprotonada.

2.2 PREPARACIÓN DE SEFAROSA 4B.

La sefarosa 4B activada con bromuro de cianogeno, se emplea en la inmovilización de ligandos que contienen aminas primarias (proteínas, péptidos y ácidos nucleicos), la Figura 2.3 esquematiza la activación del soporte. La unión covalente de la enzima de interés, se basa en la activación de los grupos químicos del soporte para que reaccionen con los nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la Lys, Cys, Tyr, His, en menor medida Met, Trp, Arg, Asp, Glu. El resto de los aminoácidos, debido a su carácter hidrofóbo, no se encuentran expuestos al exterior de la superficie proteica, y no intervienen en la unión covalente [30].

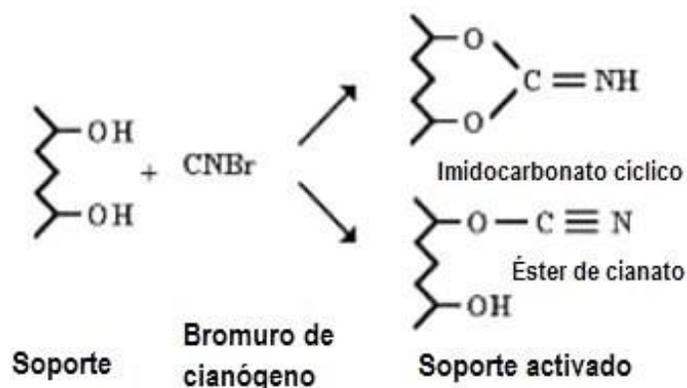


Figura 2.3 Activación del soporte.

Se obtuvieron 4 mL de solución acoplante con una concentración de 0.14 mg/mL (aproximadamente 6 mg de CM-papaína). La determinación de proteína ligada al gel por el método de Lowry muestra que hay 0.6 mg de papaína / g de gel [22]. Por lo tanto, se requiere 1.0 g de sefarosa 4B para inmovilizar la CM-papaína que fue purificada.

Los aditivos que contiene el gel preactivado se eliminan a pH bajos (pH 2–3), en estas condiciones se preserva la actividad de los grupos reactivos, los cuales a pH altos se hidrolizan.

Un gramo de sefarosa 4B-CNBr liofilizada (SIGMA-ALDRICH Lote: 124k1654), fue hidratado con 2.4 mL de HCl 1 mM (su volumen aproximado fue de 3.5 mL). Una vez hidratado el gel, fue lavado por filtración con 200 mL de HCl 1 mM, resuspendiendo el gel en 20 mL de HCl 1 mM y filtrando, el tiempo total de contacto del gel con la solución ácida no fue mayor a 15 min (Especificación: Pharmacia Biotech).

2.3 ACOPLAMIENTO DEL LIGANDO.

Una vez activado el soporte, se procedió a inmovilizar el ligando (CM-papaína), en la Figura 2.4, se muestra las formas en que se realiza el acoplamiento del ligando.

La afinidad (K_a) por la sustancia a purificar debe encontrarse dentro de los rangos 10^4 – 10^8 M^{-1} (es decir una K_d en el rango de 10^{-4} – 10^{-8} M). Si la K_a es menor de 10^4 se desorberá de la matriz en forma inespecífica, si es mayor de 10^8 será muy difícil desorberla.

El complejo CM-papaína–cistatina a un pH de 7.4 y 25 °C, presenta una constante de afinidad (K_a) de 2×10^9 M^{-1} (es decir una constante de disociación (K_d) de 5×10^{-10} M [31]), lo cual indica una alta afinidad. Sin embargo, en condiciones de pH= 11.3 el complejo es disociado con facilidad.

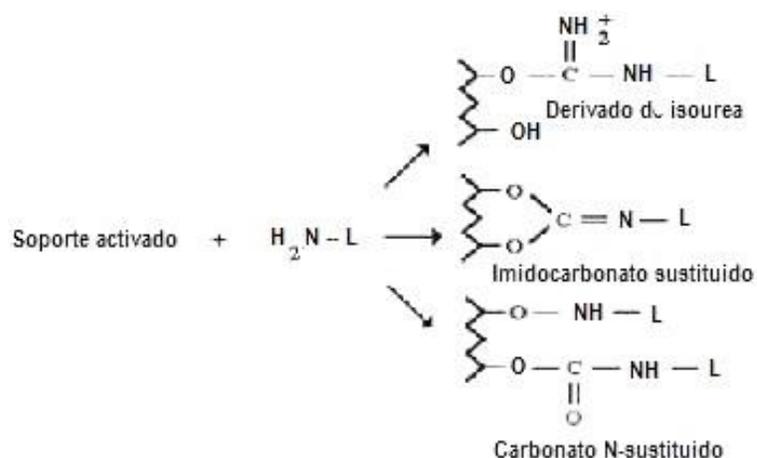


Figura 2.4 Inmovilización del ligando (L).

En la Figura 2.5 se muestra el esquema de inmovilización de CM-papaína sobre la sefarosa 4B. Se recomienda mezclar alrededor de 5 a 10 mg de proteína por gramo de gel y de 1 a 10 μmol por gramo de gel para ligandos de bajo peso molecular (Especificación: Pharmacia Biotech).

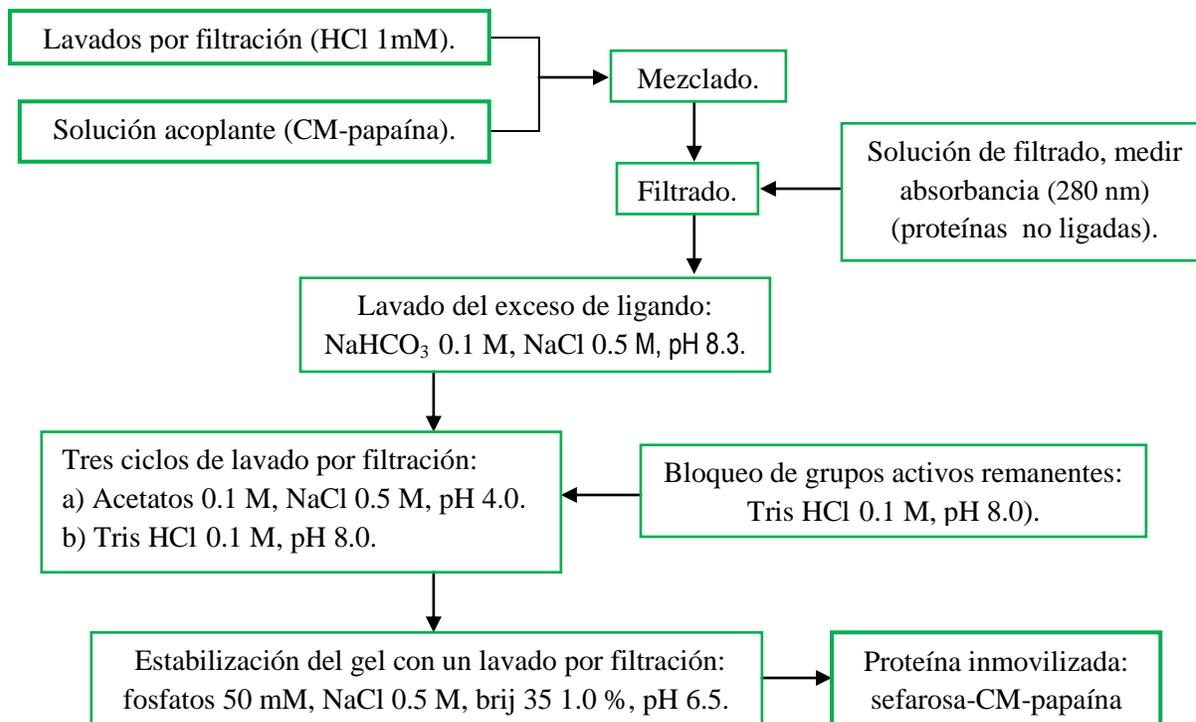


Figura 2.5 Inmovilización de CM-papaína.

En un matraz Erlenmeyer de 25 mL, se mezcló el gel con la solución acoplante que contiene el ligando, agitando el matraz mediante rotación por una hora a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo la mezcla fue filtrada. Para verificar que la proteína fue ligada se tomó lectura de absorbancia del filtrado a 280 nm y se comparó esta con la absorbancia de la solución acoplante, para ello se empleó $A_{280, 1 \text{ cm}}^{1\%} = 25$ (Especificación: SIGMA) correspondiente a papaína.

El ligando en exceso (no ligado de forma covalente) adherido en la superficie del gel fue eliminado, para ello el gel se resuspendió en 17 mL de amortiguador NaHCO_3 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3 y se filtró. Con la finalidad de bloquear los grupos activos remanentes, el gel fue resuspendido en 8 mL de tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, por 2 horas con ligera agitación por rotación, pasado este tiempo fue filtrado.

El producto (gel de sefarosa-CM-papaína) fue sometido a tres ciclos de lavado por filtración, alternado el pH de 8.0 a 4.0. Para cada ciclo se empleo un lavado con 8 mL de amortiguador acetatos 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 4.0, seguida por un lavado de amortiguador tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.0. Finalmente se equilibró el gel de sefarosa-CM-papaína, mediante un lavado por filtración con 8 mL de fosfato 50 mM, NaCl 0.5 M, brij 35 1.0 %, pH 6.5.

2.4 PREPARACIÓN DE CLARA DE HUEVO.

Los huevos de aves son una importante fuente de nutrientes, todos contienen proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y factores de crecimiento requeridos en el desarrollo embrionario, así como de numerosos factores de defensa que protegen al huevo contra infecciones bacteriales y virales. En la Tabla 2.1, se resume como esta constituido un huevo de pollo.

Tabla 2.1 Composición del huevo de pollo.

HUEVO DE POLLO			
COMPOSICIÓN	% (w/w)	CONTENIDO	% (w/w)
Cascaron	9.5	Agua	75
Clara ó Albumen	63	Proteínas	12
Yema	27.5	Lípidos	12
		Carbohidratos y Minerales	>1

Datos tomados de Kovacs-Nolan *et al.* [18].

La clara de huevo de pollo está constituida de proteínas (9.7–10.6 %), lípidos (0.03 %) y carbohidratos (0.4–0.9 %) [18]. Las proteínas contenidas en mayor cantidad en la clara de huevo son ovalbumina, ovotransferrina (conalbumina) y ovomucoide. En menor proporción ovomusina, lisozima, avidina, cistatina, ovoinhibidor y ovomacroglubulina (ovostatina) [18]. La solubilidad de estas proteínas es afectada principalmente por factores como son: la composición de aminoácidos, estructura de proteína (nativa o desnaturalizada) y factores del medio como son: pH, temperatura, presión, tipo y contenido de sales y concentración de proteínas. Las proteínas en su punto isoelectrico (pI) presentan una solubilidad mínima. Las interacciones proteína–proteína aumentan en su pI debido a que las fuerzas electrostáticas entre las proteínas y las moléculas de agua son mínimas. Esto es una condición favorable para la aproximación y agregación de moléculas de proteínas permitiendo su precipitación [32].

Las propiedades fisicoquímicas de proteínas presentes en mayor cantidad en la clara de huevo y de la cistatina, se resumen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Propiedades fisicoquímicas de proteínas presentes en la clara de huevo.

Proteína	Albumen ¹ (% peso seco)	pI ²	Peso molecular ² (Da)	T _d ² (°C)
Ovalbumina	54.0	4.5	44500	84.0
Conalbumina ó Ovostranferrina	12.0	6.0 y 6.6	60000 – 95000	61.0
Ovomucoide	11.0	3.9 – 4.3	26100 – 28300	77.0
Ovomucina	3.5	4.5 – 5.0	5500 – 8300	-----
Lisozima	3.4	10.7	14300–14600	75.0
Globulina G ₂	4.0	5.5	30000	92.5
Globulina G ₃	4.0	5.8	45000	-----
Cistatina	0.05 ³	5.5 ³ y 6.5 ³	13000 ³	≥115 ⁴

pI, punto Isoeléctrico; **T_d**, Temperatura de desnaturalización; ¹ Kovacs-Nolan *et al.* [18],
² Carraro [33], ³ Saxena and Tayyab [19], ⁴ Žerovnik *et al.* [34].

Ferreira *et al.* [32] evaluaron la influencia del pH y la concentración salina sobre la solubilidad y densidad de las proteínas de la clara de huevo para tres tipos de sales (NaCl, Na₂SO₄ y (NH₄)₂SO₄) a temperatura ambiente. La más baja solubilidad se da a condiciones de pH 3.0 y una concentración salina de NaCl de 0.05 M.

Con la finalidad de enriquecer la fuente de la proteína de interés, se efectuó el siguiente tratamiento de la clara de huevo (Figura 2.6).

La clara fue separada del huevo de pollo y se homogeneizó. Este proceso se efectuó colocando 63 mL de clara (dos claras) en un vaso de precipitado de 200 mL, la clara fue batida por 5 min, y sonicada por 10 min en baño de hielo y agitación constante. Una vez que se homogeneizó la clara de huevo, se efectuó la precipitación selectiva de las proteínas que constituyen el albumen, es decir, se procedió a insolubilizar las proteínas que se encuentran en la clara de huevo mediante el efecto causado por el pH y la concentración salina (NaCl).

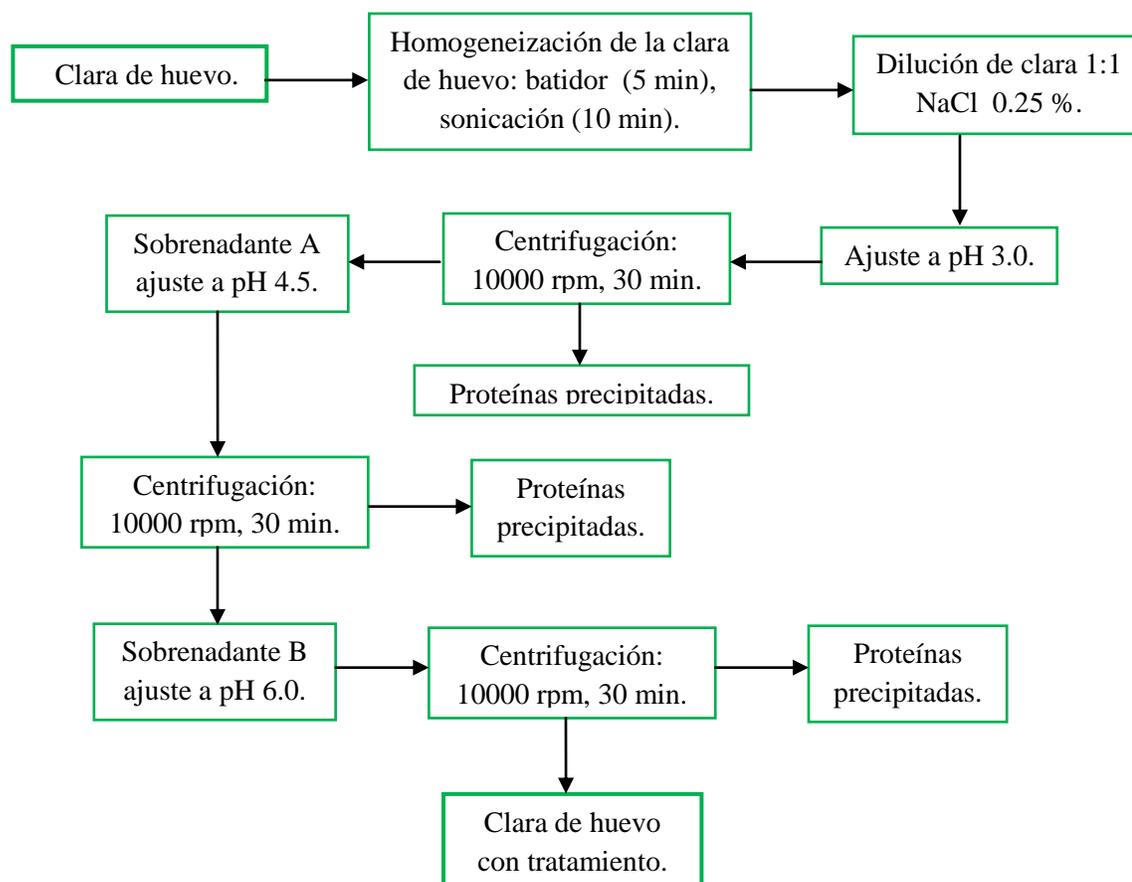


Figura 2.6 Tratamiento de clara de huevo.

La clara de huevo que se homogeneizó fue diluida con 63 mL de solución de NaCl 0.25 % (0.042 M), y se ajustó el pH a 3.0 con solución de HCl 2 M. Una vez ajustado el pH se mantuvo en agitación constante por 1 h a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo las proteínas precipitadas en este medio ácido fueron removidas, centrifugando a 10000 rpm por 30 min. Una vez efectuada esta operación, el sobrenadante fue separado por decantación, el precipitado fue desechado. Al sobrenadante colectado en esta etapa le nombre “sobrenadante A”.

El pH del sobrenadante A, se ajustó a pH de 4.5 con solución de NaOH 2 M, una vez ajustado el pH se mantuvo en agitación constante por 1 h a temperatura ambiente. En estas condiciones se insolubilizan las proteínas ovalbúmen y ovomusina, que constituye el 54 % y 3.5 % respectivamente de las proteínas presentes en la clara de huevo, el valor de pH de 4.5 corresponde al punto isoeléctrico de estas proteínas (Tabla 2.2). Las proteínas precipitadas en esta etapa fueron removidas, centrifugando a 10000 rpm por 30 min. El sobrenadante colectado en esta etapa lo nombre “sobrenadante B”.

El pH del sobrenadante B, se ajustó a pH de 6.0 con solución de NaOH 2 M, una vez ajustado el pH se mantuvo en agitación constante por 1 h a temperatura ambiente pasado este tiempo se mantuvo en agitación constante a 4 °C toda la noche. En esta etapa se insolubilizan la conalbumina y la Globulina G₃, debido a que el pH de 6.0 es muy próximo a su respectivo punto isoelectrico (Tabla 2.2). Las proteínas precipitadas en esta etapa fueron removidas, centrifugando a 10000 rpm por 30 min. El sobrenadante fue decantado y colectado (en la continuación del desarrollo del procedimiento de la purificación de cistatina, este sobrenadante lo nombre “clara con tratamiento”).

La concentración de cistatina en la clara de huevo es de 50 µg/mL (0.05 %) (Tabla 2.2), la concentración aproximada de cistatina en la solución de clara con tratamiento es la siguiente:

$$\left(\frac{50 \mu\text{g de cistatina}}{\text{ml de clara}}\right)\left(\frac{\text{ml de clara}}{2 \text{ ml de solución}}\right) = \frac{25 \mu\text{g de cistatina}}{\text{ml de solución}}$$

2.5 ACOPLAMIENTO DE CISTATINA.

La M_r de cistatina es 13.147 KDa [20], de S-(carboximetil)-papaína 23.485 KDa y S-(carboximetil)-caricaína 23.348 KDa (Apéndice III). La determinación de proteína ligada al gel por el método de Lowry muestra que hay 0.6 mg de papaína / g de gel [22].

La S-(carboximetil)-papaína (CM-papaína) que se espera sea ligada al gel es:

$$(1 \text{ g de gel}) \left(\frac{0.6 \text{ mg de CM-papaína}}{\text{g de gel}}\right) \left(\frac{1 \text{ mol de CM-papaína}}{23485 \text{ g de CM-papaína}}\right) =$$

25.6 nmol de CM – papaína

La estequiometria molar de interacción entre CM-papaína–cistatina es 1:1, la cantidad de cistatina que se espera sea acoplada es:

$$(25.6 \text{ nmol}) \left(13147 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) = 0.337 \text{ mg de cistatina.}$$

El volumen requerido de la solución de clara es:

$$\left(\frac{0.337 \text{ mg de cistatina}}{\left(\frac{25 \mu\text{g de cistatina}}{\text{ml de solución}}\right)}\right) = 13.48 \text{ mL de solución de clara con tratamiento.}$$

En la Figura 2.7, se presenta el esquema del procedimiento efectuado para acoplar la cistatina sobre el gel de sefarosa.

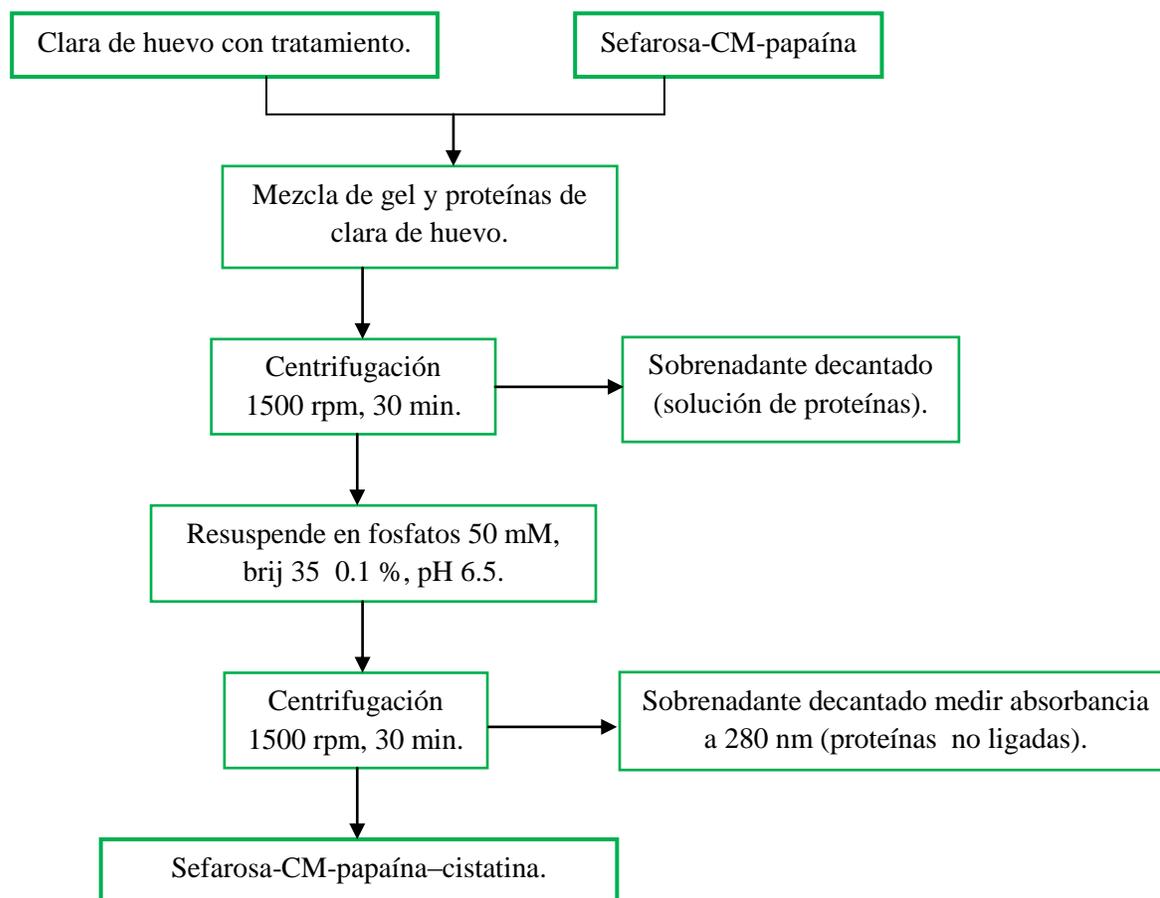


FIGURA 2.7 Acoplamiento de la cistatina.

En un matraz Erlenmeyer de 25 mL, se mezcló el gel y 15 mL de solución de clara de huevo previamente tratada, se agitó mediante rotación (la agitación con barra de vidrio o magnética podría romper el gel o interferir en el enlace de enzima inmovilizada) a temperatura ambiente por 2 h, y se dejó toda la noche. Una vez pasado este tiempo la mezcla fue centrifugada a 1500 rpm por 30 min. Estas condiciones de centrifugación permiten una completa sedimentación del gel sin afectar la estabilidad de la proteína inmovilizada y del acoplamiento. Posteriormente se decantó la solución, separando la solución que contiene las proteínas solubles del gel precipitado.

El gel se resuspendió en 8 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, brij 35 0.1 %, pH 6.5. El brij 35 al ser un agente surfactante no iónico (es decir, no produce iones en solución acuosa) se empleó para impedir los enlaces inespecíficos, con lo cual se eliminó las proteínas adheridas en la superficie del gel. El gel fue centrifugado a 1500 rpm por 30 min. Estas condiciones de centrifugación permiten una completa sedimentación del gel sin afectar la estabilidad de la proteína inmovilizada y del acoplamiento.

La resuspensión del gel en amortiguador que contiene brij 35 y la correspondiente separación del sobrenadante, se efectuó cinco veces más, repeticiones necesarias para que la lectura de absorbancia a 280 nm del sobrenadante colectado fué casi cero. Lo cual indica la presencia exclusiva de proteínas acopladas a la S-(carboximetil)-papaína (CM-papaína) inmovilizada, es decir de inhibidores de esta proteasa.

2.6 DESACOPLAMIENTO DE CISTATINA.

El desacoplamiento de la cistatina (Figura 2.8) se efectuó en medio alcalino (pH= 11.3), en estas condiciones el complejo que forma la cistatina con la CM-papaína inmovilizada, es disociado con facilidad. Con la finalidad de evitar la precipitación debida a la agregación de la proteína se empleo una concentración de glicerol de 10 %, en la preparación de los amortiguadores empleados en esta etapa.

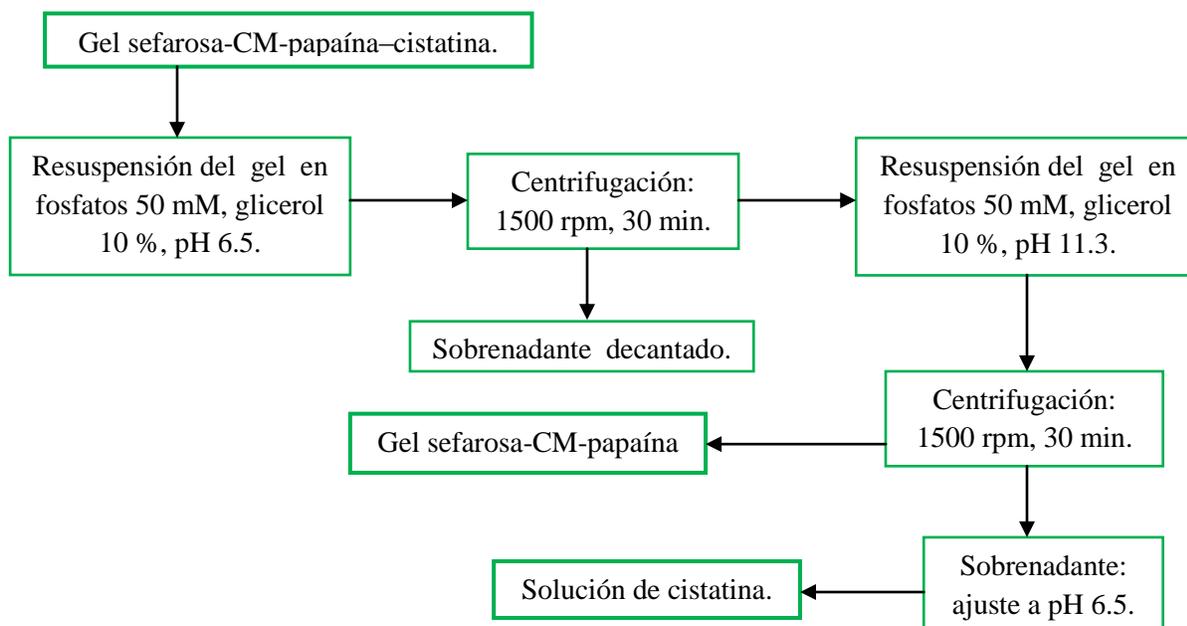


Figura 2.8 Desacoplamiento de cistatina.

Previo a efectuar el desacoplamiento, el gel (sefariosa-CM-papaína-cistatina) fue estabilizado, para ello se resuspendió en 8 mL amortiguador de fosfatos 50 mM, 10% de glicerol, pH 6.5, y se centrifugó a 1500 rpm, 20 min. Con la finalidad de efectuar el desacoplamiento de cistatina el gel se colocó en un matraz Erlenmeyer de 25 mL, y fue resuspendido en 8 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, glicerol 10 %, pH 11.3. Después de 5 min, el gel fue centrifugado 1500 rpm por 20 min.

El gel fue separado por decantación del sobrenadante, inmediatamente después de efectuar esta operación el pH del sobrenadante colectado fue ajustado a pH de 6.5 con amortiguador de formiato 2 M, pH 3.0.

Una vez efectuado el desacoplamiento, el gel (sefariosa-CM-papaína) fue regenerado para reutilizarse (Figura 2.9). Este gel se sometió a tres ciclos de lavado por filtración, alternado el pH de 8.0 a 4.0. Para cada ciclo se empleó un lavado con 8 mL de amortiguador acetatos 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 4.0, seguida por un lavado de amortiguador tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.0. Finalmente se equilibró el gel de sefariosa-CM-papaína, mediante un lavado por filtración con 8 mL de amortiguador fosfato 50 mM, NaCl 0.5 M, brij 35 1.0 %, pH 6.5.

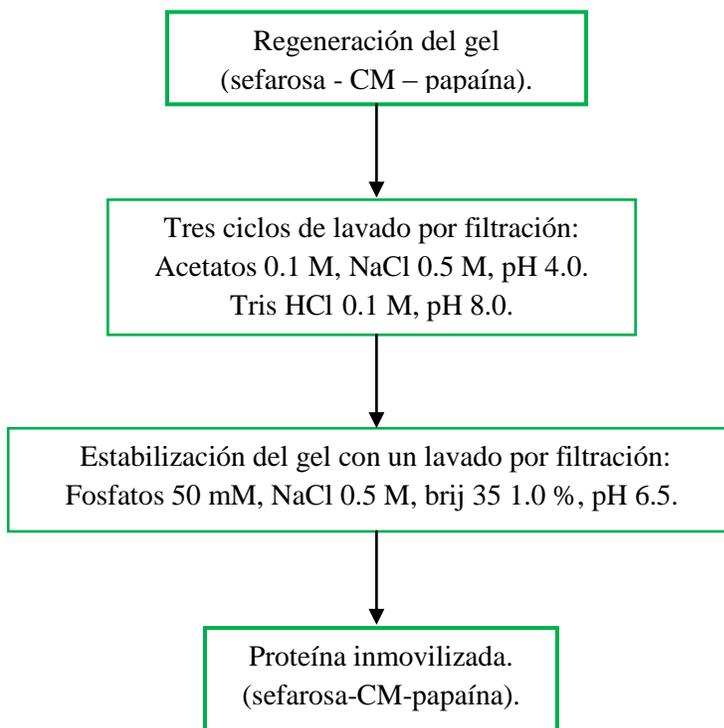


Figura 2.9 Regeneración del gel (sefariosa-CM-papaína).

3. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN DEL SISTEMA S-(CARBOXIMETIL)-CARICAÍNA –CISTATINA.

La constante de disociación en el equilibrio (k_d) para la interacción entre la S-(carboximetil)-caricaína y la cistatina, fue determinada mediante el método de titulación fluorimétrica, el cual se realizó titulando la enzima inactivada (S-(carboximetil)-caricaína) con un exceso de inhibidor (cistatina).

La S-(carboximetil)-caricaína (CM-caricaína) empleada en la titulación fluorimétrica, es la que fue purificada a partir de un extracto de quimopapaína comercial marca SIGMA (Lote:124F80751) que contiene caricaína (ver Sección 1) y se utilizó cistatina comercial marca SIGMA (Lote:10K41121).

La solución purificada y concentrada de CM-caricaína (Ver Sección 1), se cambió a amortiguador tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.14 M, EDTA 100 μ M, pH 7.4, mediante ultrafiltración, posteriormente se concentró a 33 μ M, obteniendo un volumen de 2.5 mL. La concentración de la solución fue calculada en base a su $A_{280, 1 \text{ cm}}^{1\%} = 16.7$ [28], realizando una corrección por dispersión de luz (Apéndice III).

La solución de cistatina se preparó disolviendo 0.6 mg de cistatina (SIGMA Lote:10K41121) en 0.9 mL de amortiguador tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.14 M, EDTA 100 μ M, pH 7.4. La concentración obtenida fue de 47 μ M. La concentración de cistatina fue calculada en base a su $A_{280, 1 \text{ cm}}^{1\%} = 8.7$ [19], realizando una corrección por dispersión de luz (Apéndice III).

Los cambios de intensidad de emisión de fluorescencia que acompañan la interacción de las proteínas en la titulación se monitorearon con la finalidad de determinar la afinidad de las proteínas, los valores registrados de intensidad de emisión de fluorescencia, fueron evaluados en la ecuación teórica 3.2 (la deducción de esta ecuación es presentada en el Apéndice II).

La deducción de la ecuación 3.2, se realizó partiendo de la expresión fundamental de la constante de equilibrio para una reacción bimolecular proteína-ligando (CM-caricaína y cistatina), con estequiometría equimolar (Ecuación 3.1).

Ecuación 3.1 Reacción en el equilibrio del sistema CM-caricaína–cistatina.



Donde: **P**, CM-caricaína (proteasa); **I**, cistatina (inhibidor de proteasa);

PI, complejo (CM-caricaína–cistatina).

La constante de disociación en el equilibrio (k_d) se expresa como: $k_d = \frac{1}{k_a} = \frac{[P][I]}{[PI]}$

Donde: $[P]$ es la concentración de CM-caricaína en el equilibrio, $[I]$ es la concentración de cistatina en el equilibrio y $[PI]$ es la concentración del complejo (CM-caricaína–cistatina) en el equilibrio, k_a es la constante de asociación en el equilibrio.

Para la derivación de la ecuación 3.2, se partió de dos consideraciones, la primera es que el cambio de la cantidad física medida (emisión de fluorescencia) es proporcional a la cantidad del complejo proteína–ligando formado y la segunda que todos los sitios de unión son equivalentes e independientes.

Ecuación 3.2 La deducción de esta expresión es presentada en el Apéndice II.

$$Y = \frac{F_{P_T} + F_{I_T} - F_m}{F_{P_T}} = \frac{\alpha}{2} \left(\left(1 + \left(\frac{k_d}{P_T} \right) + \left(\frac{I_T}{P_T} \right) \right) - \sqrt{\left(1 + \left(\frac{k_d}{P_T} \right) + \left(\frac{I_T}{P_T} \right) \right)^2 - 4 \left(\frac{I_T}{P_T} \right)} \right)$$

Donde: F_m es la fluorescencia de la mezcla en la celda de titulación, F_{P_T} es la fluorescencia de CM-caricaína total en la celda de titulación, F_{I_T} es la fluorescencia de cistatina total en la celda de titulación, k_d es la constante de disociación en el equilibrio (tiene unidades de μM), P_T es la concentración de CM-caricaína total (contenida en la celda de titulación), I_T es la concentración de cistatina total (contenida en la celda de titulación), α es una constante que indica el valor máximo de Y . En esta expresión la variable independiente es: $\frac{I_T}{P_T}$. Las variables obtenidas experimentalmente son: F_{P_T} , F_{I_T} y F_m . Los parámetros a estimar son k_d y α . En el Apéndice AII explico como se utilizó el modelo para estimar las constantes k_d y α , mediante un ajuste no lineal empleando la herramienta Microsoft Office Excel Solver, el cual utiliza el código de optimización no lineal.

La titulación fluorimétrica se realizó adicionando volúmenes sucesivos de 5 μL de cistatina 47 μM , a un volumen de 2 mL de CM-caricaína 1 μM , contenidos en una celda de 1 cm. Esta operación se realizó hasta obtener un exceso molar de 2.59 veces de cistatina sobre la CM-caricaína. Las concentraciones de proteína sola en la celda de titulación (es decir, sin ser mezcladas) I_T (concentración de CM-caricaína total) y P_T (concentración de cistatina total) requeridas en el modelo matemático expresado en la ecuación 3.2, se calcularon a partir de la

variación de las concentraciones de las proteínas contenidas en la celda de titulación (Tabla 3.1), considerando los cambios del volumen de la celda durante el proceso de titulación.

Tabla 3.1 Concentraciones de las proteínas contenidas en la celda de titulación.

No. ad.	Vol. Cel. (mL)	I_T / P_T (mol/mol)	P_T (μ M)	I_t (nmol)	I_T (μ M)
0	2	0.00	1.000	0	0.00
1	2.005	0.12	0.998	0.24	0.12
2	2.010	0.24	0.995	0.47	0.23
3	2.015	0.35	0.993	0.71	0.35
4	2.020	0.47	0.990	0.94	0.47
5	2.025	0.59	0.988	1.18	0.58
6	2.030	0.71	0.985	1.41	0.69
7	2.035	0.82	0.983	1.65	0.81
8	2.040	0.94	0.980	1.88	0.92
9	2.045	1.06	0.978	2.12	1.03
10	2.050	1.18	0.976	2.35	1.15
11	2.055	1.29	0.973	2.59	1.26
12	2.060	1.41	0.971	2.82	1.37
13	2.065	1.53	0.969	3.06	1.48
14	2.070	1.65	0.966	3.29	1.59
15	2.075	1.76	0.964	3.53	1.70
16	2.080	1.88	0.962	3.76	1.81
17	2.085	2.00	0.959	4.00	1.92
18	2.090	2.12	0.957	4.23	2.02
19	2.095	2.23	0.955	4.47	2.13
20	2.100	2.35	0.952	4.70	2.24
21	2.105	2.47	0.950	4.94	2.34
22	2.110	2.59	0.948	5.17	2.45

Donde: **No. ad.**, Número de adición; **Vol. Cel.**, variación del volumen en la celda de celda de titulación; I_T / P_T , relación entre cistatina y CM-caricaína contenida en la celda de titulación; P_T , concentración de CM-caricaína total contenida en la celda de titulación; I_t , cistatina contenida en la celda de titulación; I_T concentración de cistatina total contenida en la celda de titulación.

Las proteínas absorben luz y emiten radiación en el rango ultra violeta (UV) del espectro electromagnético. La absorbancia es causada por los grupos peptídicos, aminoácidos aromáticos y enlaces disulfuro. La emisión de fluorescencia se origina de los aminoácidos aromáticos. Los cambios espectrales de una molécula de proteína dependen del entorno molecular y de la movilidad de sus cromóforos. En la Tabla 3.2 se resume las regiones en las que los cromóforos de las proteínas absorben en el UV.

Tabla 3.2 Absorción en el UV de proteínas.

Longitud de onda (λ) (nm).	OBSERVACIÓN
< 230	Los enlaces peptídicos de una proteína absorben con gran intensidad.
[230, 300]	La absorción es determinada por los residuos de aminoácidos aromáticos (Tabla 3.3) presentes en la cadena polipeptídica.
250	Los enlaces disulfuro presentan un pico de absorbancia.
>310	Los residuos de aminoácidos aromáticos no absorben.

Datos obtenidos de Creighton [35].

Tabla 3.3 Propiedades de absorbancia y fluorescencia de los aminoácidos aromáticos.

Componente	Absorbancia		Fluorescencia	
	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm).	$\epsilon_{\text{máx.}}$ ($M^{-1}cm^{-1}$).	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm).	ϕ_f
Triptofano	280	5600	348	0.20
Tirosina	274	1400	303	0.14
Fenilalanina	257	200	282	0.04

Donde: $\lambda_{\text{máx.}}$, longitud de onda máxima; ϕ_f , rendimiento cuántico; ϵ , coeficiente de extinción. (Creighton [35]).

Los tres aminoácido presentados en la Tabla 3.3, contribuyen en la absorbancia de una proteína en diferente magnitud, la absorción molar de fenilalanina ($\lambda_{\text{máx}} = 257$ nm) es más pequeña en orden de magnitud comparada con la de triptófano y tirosina. Por lo tanto el espectro de absorción de una proteína esta determinado por los residuos de aminoácido tirosina y triptófano [35].

Los parámetros experimentales del ensayo se fijaron de acuerdo al procedimiento realizado por Lindahl *et al.* [23]. La mayor magnitud en la contribución de la absorbancia de una proteína la presenta los residuos de triptófano presentes en la estructura de la proteína, la absorción molar de triptófano es máxima a 280 nm. Por lo tanto la longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{Excitación}}$) se fijó a 280 nm.

Para fijar la longitud de onda de emisión ($\lambda_{\text{Emisión}}$) del ensayo, se procedió a realizar un barrido del espectro de emisión en el rango de 300 a 400 nm, de las proteínas libres (CM-caricaína y cistatina) y del complejo (CM-caricaína–cistatina). La longitud de onda a la cual presenta un máximo el espectro de la combinación ($F_{P_T} + F_{I_T} - F_m$) fue fijada como la longitud de onda de emisión ($\lambda_{\text{Emisión}}$) de la titulación fluorimétrica. Con el objetivo de obtener los espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas solas y del complejo, se prepararon las siguientes soluciones de proteína en amortiguador tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.14 M, EDTA 100 μM , pH 7.4: CM-caricaína 1 μM , cistatina 1.2 μM y para garantizar la formación del complejo se colocó un exceso molar de 1.2 veces de cistatina sobre la CM-caricaína. El espectro correspondiente a cada solución de proteína se obtuvo aplicando una excitación a 280 nm ($\lambda_{\text{Excitación}}$) a 2 mL de solución contenidos en una celda de 1 cm de paso óptico y fue medido de 300 a 400 nm, los estudios se realizaron a 25 °C y se empleó un Espectrofluórometro ISS modelo K2 (Urbana, USA).

Como un análisis alternativo previo a realizar la titulación fluorimétrica, se realizó una curva de calibración de fluorescencia para la cistatina y la CM-caricaína (Apéndice I). Este análisis indicó un comportamiento lineal de la respuesta de fluorescencia de las muestras en rango de concentraciones de operación del experimento.

El modelo matemático expresado en la ecuación 3.2 requiere de los valores experimentales de F_{P_T} (fluorescencia de CM-caricaína total, contenida en la celda de titulación), F_{I_T} (fluorescencia de cistatina total, contenida en la celda de titulación) y F_m (la fluorescencia de la mezcla, contenida en la celda de titulación). La medición de estas variables se realizó en dos celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, a una temperatura de 25 °C y efectuándose el mismo día de manera consecutiva.

Las variables experimentales F_{I_T} y F_m , se obtuvieron monitoreando la titulación fluorimétrica con solución de cistatina. Los valores de F_{P_T} fueron calculados realizando el ajuste correspondiente por efectos de dilución. Los valores de intensidad de emisión de fluorescencia de la CM-caricaína (F_{P_T}), se obtuvieron efectuando un ajuste por efecto de dilución del valor registrado al inicio de la titulación (un volumen de 2 mL de CM-caricaina 1 μM , contenidos en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico), el cual corresponde a la intensidad de emisión de fluorescencia de la CM-caricaína 1 μM . La concentración de CM-caricaína en el proceso de titulación, varía de 1 a 0.94 μM (Tabla 3.1).

Para los valores de intensidad de emisión de fluorescencia de la cistatina (F_{IT}) se hizo una curva de calibración en el rango de operación (Tabla 3.1), utilizando seis o siete puntos para cubrir una concentración de 0 a 2.45 μM . La curva se obtuvo registrando los valores de intensidad de emisión de fluorescencia de la titulación de un volumen de 2 mL de amortiguador tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.14 M, EDTA 100 μM , pH 7.4 (contenidos en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico), con volúmenes sucesivos de 5 μL de cistatina 47 μM , hasta obtener una concentración de cistatina 2.45 μM . Los valores de intensidad de emisión de fluorescencia de la mezcla (F_m), se obtuvieron registrando la intensidad de emisión de fluorescencia de la titulación fluorimétrica, la cual se realizó adicionando volúmenes sucesivos de 5 μL de cistatina 47 μM , a un volumen de 2 mL de CM-caricaína 1 μM (contenidos en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico) hasta obtener un exceso molar de 2.59 veces de cistatina sobre la CM-caricaína.

4. RESULTADOS

Respecto a la purificación de cistatina, se obtuvieron cuatro lotes de 8 mL aproximadamente, los cuales fueron mezclados. Esta solución de cistatina se encuentra en amortiguador de fosfatos 50 mM, glicerol 10 %. La concentración de glicerol y sales presentes fueron reducidas a menos del 0.1% de su valor original mediante ultrafiltración empleando agua desionizada. Posteriormente, la solución de cistatina se llevó a una concentración de 1.06 mg/mL, determinada mediante: $A^{1\%}_{280, 1\text{cm}} = 8.7$ [19], el volumen obtenido fue de aproximadamente 1 mL. Este cálculo se realizó considerando que la solución solo contiene cistatina.

Se analizó la pureza mediante SDS-PAGE (SDS – Polyacrilamide Gel Electroforesis), empleando un equipo de electroforesis BIO-RAD, la metodología efectuada se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor. El resultado muestra la presencia de dos proteínas (Figura no mostrada), las cuales presentan una masa molecular aproximada de 40 KDa y 14 KDa. Debido a que la preparación no es pura, no se usó para los experimentos de titulación.

Mediante la misma técnica de análisis SDS-PAGE, Anastasi *et al.* (1983) [22] reportaron un peso molecular aparente de 14.4 KDa para las dos formas moleculares de cistatina de clara de huevo de pollo. Trziszka *et al.* (2004) [16] reportaron la presencia de dos inhibidores de papaína con masa molecular de 40 KDa y 13 KDa que se encuentran en la clara de huevo, el inhibidor pequeño es cuatro veces más activo que el grande.

Los espectros de intensidad de emisión de fluorescencia en el rango de 300 a 400 nm de las proteínas solas (cistatina y CM-caricaína) y del complejo (CM-caricaína–cistatina), aplicando una excitación a 280 nm ($\lambda_{\text{Excitación}}$) a 25 °C, son presentados en la Figura 4.1. Estos espectros fueron corregidos restando la fluorescencia del amortiguador, esto se realizó con la finalidad de reducir los efectos del entorno y tener la seguridad de que la respuesta de intensidad de emisión de fluorescencia sea exclusivamente de las proteínas de interés.

El gráfico presentado en la Figura 4.1 fue normalizado respecto al valor de intensidad de emisión de fluorescencia de la CM-caricaína (2032848.8), el cual fue el valor máximo registrado. El experimento se realizó empleando un espectrofluorómetro ISS modelo K2. Las soluciones de proteínas solas (CM-caricaína 1 μM y cistatina 1.2 μM) y la del complejo (CM-caricaína–cistatina) fueron preparadas en amortiguador tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.14 M, EDTA 100 μM , pH 7.4.

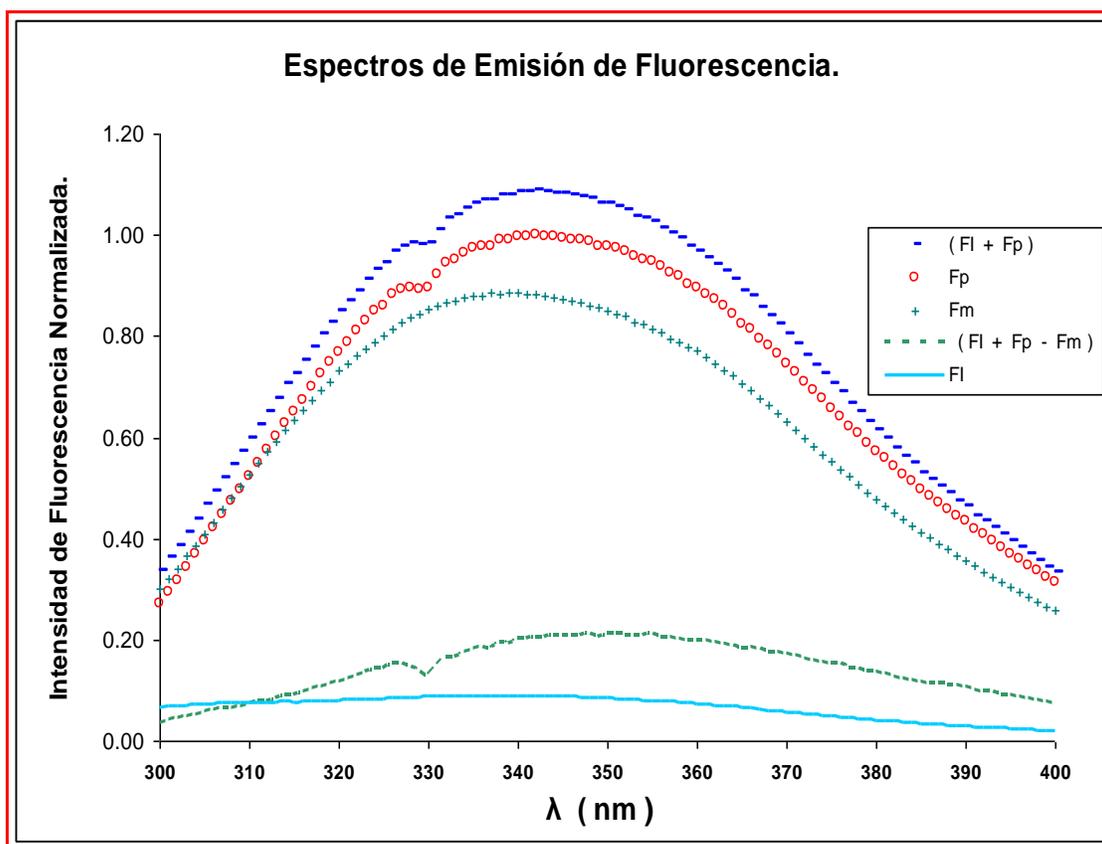


Figura 4.1. Espectro de emisión de fluorescencia corregido y normalizado; Donde: **Fp**, espectro de emisión de fluorescencia de CM-caricaína; **FI**, espectro de emisión de fluorescencia de cistatina; **Fm**, espectro de emisión de fluorescencia de la mezcla; **(FI + Fp)** es el espectro de la suma de FI y Fp; **(FI + Fp - Fm)** es el espectro de la combinación de Fp, FI y Fm.

En la Tabla 4.1, se presentan los valores máximos registrados en los espectros de emisión de fluorescencia de la Figura 4.1.

Tabla 4.1 Longitud de onda de máxima intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{Máxima}}$).

Espectros de emisión de las especies:	$\lambda_{\text{Máxima}}$ (nm).
Cistatina.	338
CM-caricaína.	342
mezcla (CM-caricaína–cistatina)	339
suma de los espectros F_P y F_I	342
combinación ($F_P+F_I-F_m$)	351

En los resultados reportados de la Tabla 4.1, se aprecia que existe un corrimiento en el valor de la $\lambda_{\text{Máxima}}$ registrada en el espectro de la mezcla (CM-caricaína–cistatina) hacia el UV cercano (es decir hacia longitudes de onda menores), con respecto a la $\lambda_{\text{Máxima}}$ registrada en el espectro correspondiente a CM-caricaína y diferente a la $\lambda_{\text{Máxima}}$ registrada en el espectro calculado a partir de la suma de los espectros correspondientes a cistatina y CM-caricaína. Por lo tanto, esta es la prueba experimental de la formación del complejo CM-caricaína–cistatina, resultado de los cambios espectrales que acompañan la interacción entre CM-caricaína y cistatina. Se encuentran reportados resultados similares en el estudio de los sistemas papaína–cistatina [23], quimopapaína A–cistatina, actinidina–cistatina y ficina–cistatina [36].

El espectro que resulta de la combinación de ($F_{P_I} + F_{I_I} - F_m$) presentó un máximo a 351 nm. Por lo tanto, la longitud de onda de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{Emisión}}$) que se fijó para efectuar la titulación fluorimétrica fue de 351 nm.

Una vez que se fijó la longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{Excitación}} = 280$ nm) y de emisión ($\lambda_{\text{Emisión}} = 351$ nm) de fluorescencia, se realizaron tres experimentos de titulación fluorimétrica, en cada ensayo se preparó una curva de calibración de cistatina con un rango de concentración de 0 a 2.45 μM . En las Figuras 4.2 a 4.7 se muestran los resultados de los experimentos.

Las curvas de calibración de cistatina (Figuras: 4.2, 4.4, 4.6) se efectuaron graficando la respuesta de intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de cistatina en el rango de 0 a 2.45 μM .

Las curvas que describen el comportamiento de la fluorescencia de la mezcla al efectuar la titulación (Figuras: 4.3, 4.5, 4.7) se obtuvieron graficando la respuesta de intensidad de fluorescencia con respecto a la relación entre cistatina total (inhibidor total) y CM-caricaína total (proteasa total) contenida en la celda de titulación (I_T / P_T).

Los gráficos presentados se realizaron normalizando la curva con respecto al valor registrado de máxima intensidad de fluorescencia en el mismo día que se efectuaron los experimentos. En la curva de calibración de cistatina correspondiente a cada experimento se presenta en línea continua el ajuste lineal efectuado por la herramienta de gráfica del programa Microsoft Office Excel. En la Tabla 4.2 presento los resultados del ajuste lineal realizado con el programa NCSS 6.0.

Los gráficos del primer experimento (Figura 4.2 y 4.3), fueron normalizados respecto al valor máximo de intensidad de emisión de fluorescencia registrado para la CM-caricaína (2218670.54).

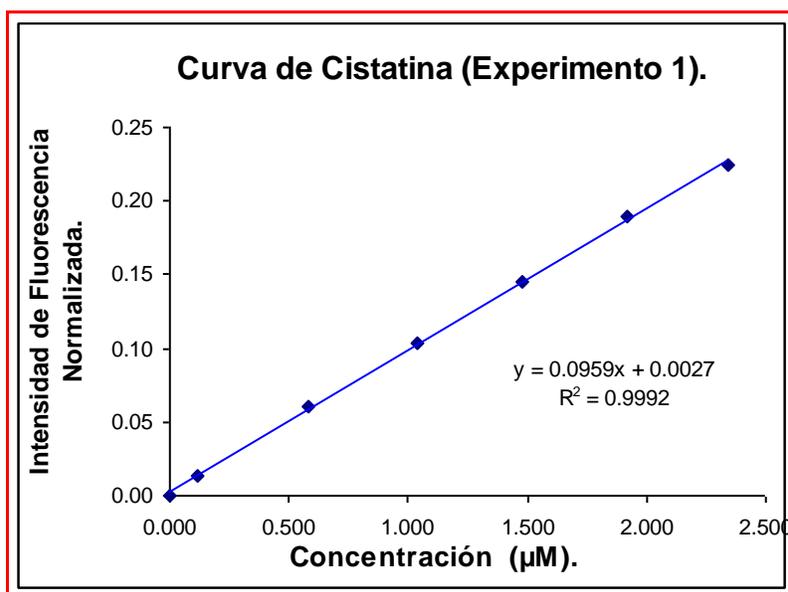


Figura 4.2 Curva de calibración de cistatina (Experimento 1).

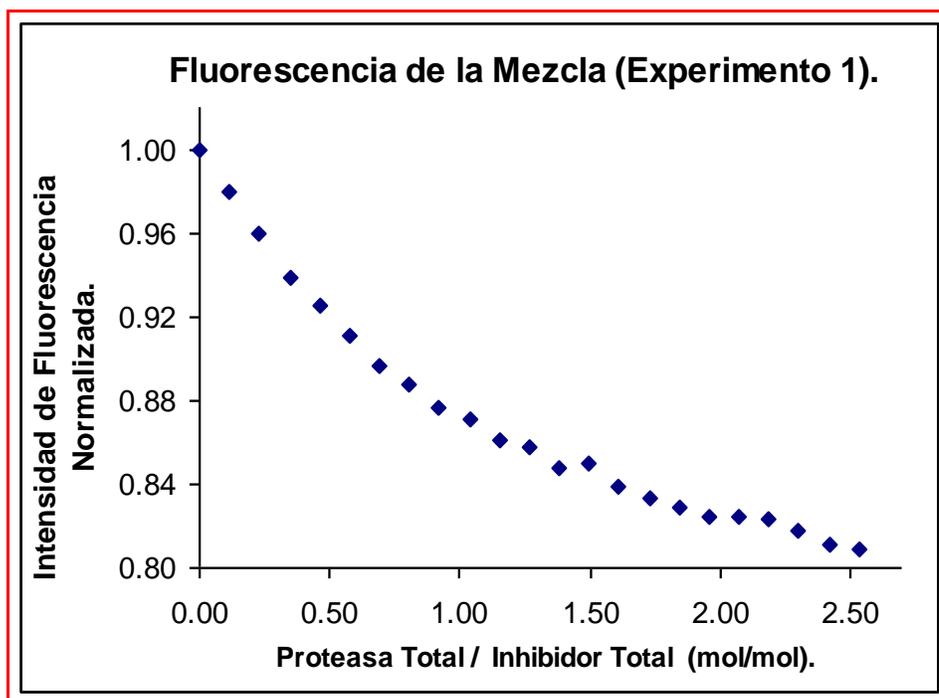


Figura 4.3 Curva de titulación fluorimétrica (Experimento 1).

Para los gráficos del segundo experimento (Figura 4.4 y 4.5), se normalizaron respecto al valor máximo de intensidad de emisión de fluorescencia registrado para la CM-caricaína (2228959.44).

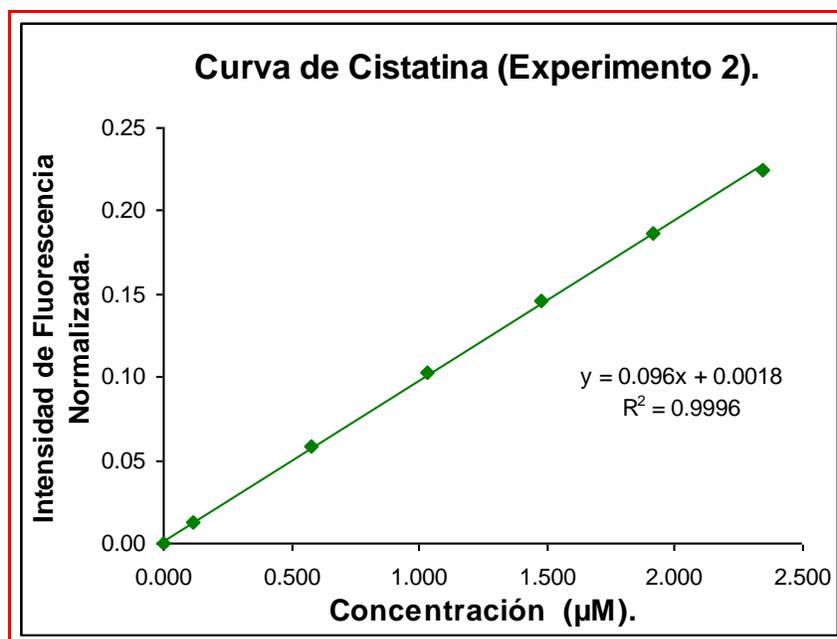


Figura 4.4 Curva de calibración de cistatina (Experimento 2).

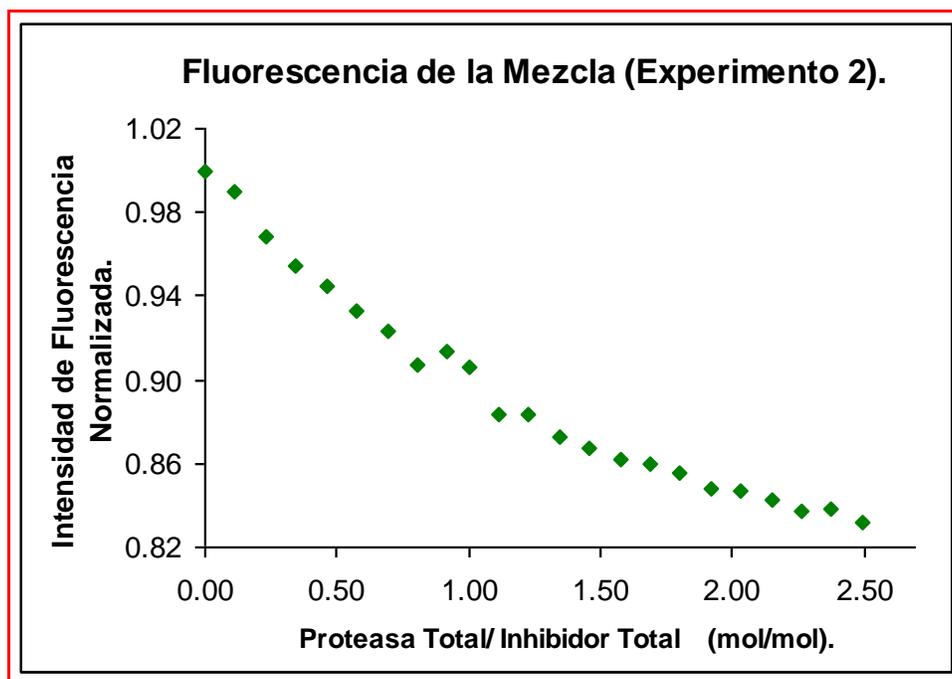


Figura 4.5 Curva de titulación fluorimétrica (Experimento 2).

Los gráficos del tercer experimento (Figura 4.6 y 4.7), fueron normalizados respecto al valor máximo de intensidad de emisión de fluorescencia registrado para la CM-caricaína (2164296.81).

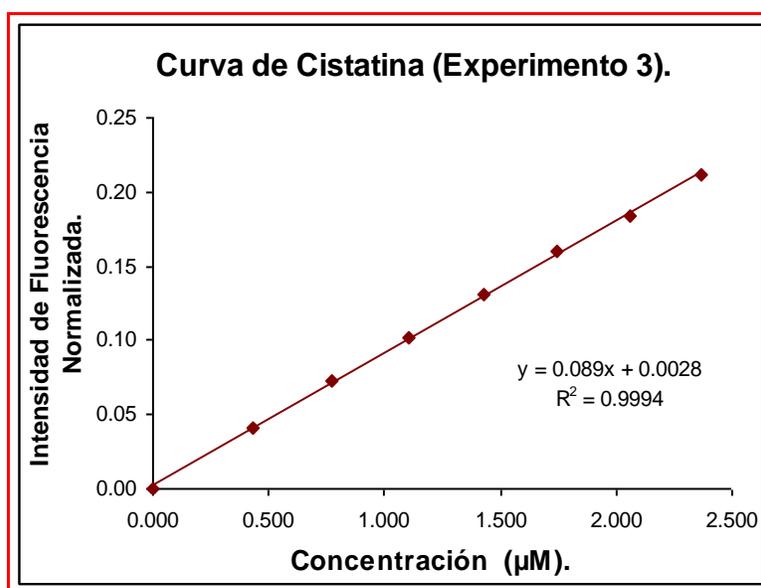


Figura 4.6 Curva de calibración de cistatina (Experimento 3).

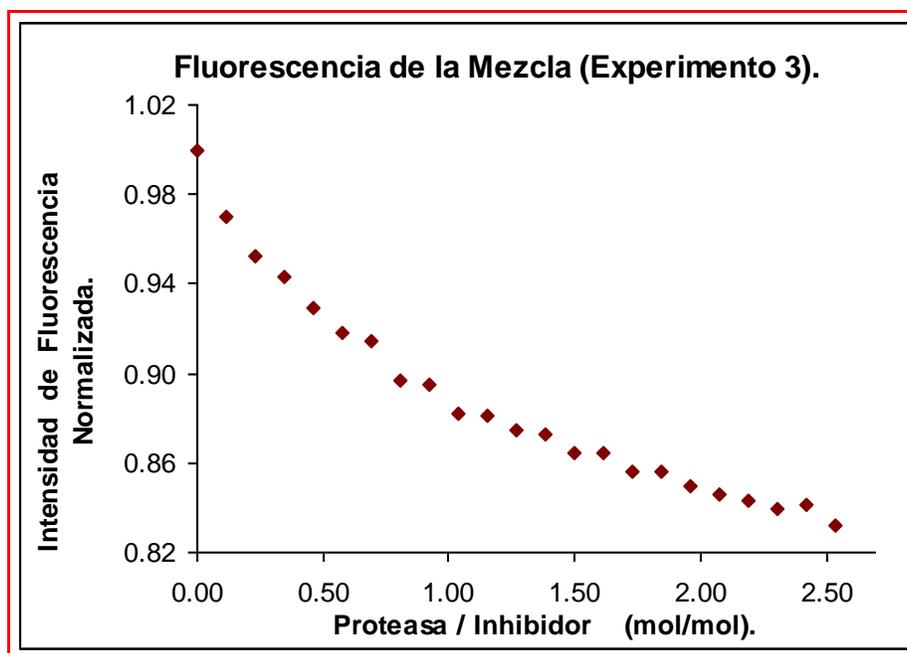


Figura 4.7 Curva de titulación fluorimétrica (Experimento 3).

Tabla 4.2 Resultados del ajuste lineal de las curvas de calibración de cistatina del programa NCSS 6.0.

Parámetro	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Intercepción	0.0027	0.0018	0.0028
Pendiente	0.0959	0.0960	0.0890
R^2	0.9992	0.9996	0.9993
Correlación	0.9996	0.9998	0.9997

Una vez obtenidos los valores experimentales de la intensidad de emisión de fluorescencia de la CM-caricaína total contenida en la celda de titulación (F_{P_T}), de la intensidad de emisión de fluorescencia de cistatina total contenida en la celda de titulación (F_{I_T}) y de la intensidad de emisión de fluorescencia de la mezcla en la celda de titulación (F_m). Se procedió a evaluar estos resultados en el modelo matemático expresado en la ecuación (3.2), obteniendo el gráfico de la función Y con respecto a la relación entre cistatina total y CM-caricaína total contenida en la celda de titulación (I_T / P_T).

En las Figuras 4.8, 4.9 y 4.10 se muestran las curvas correspondientes a cada experimento.

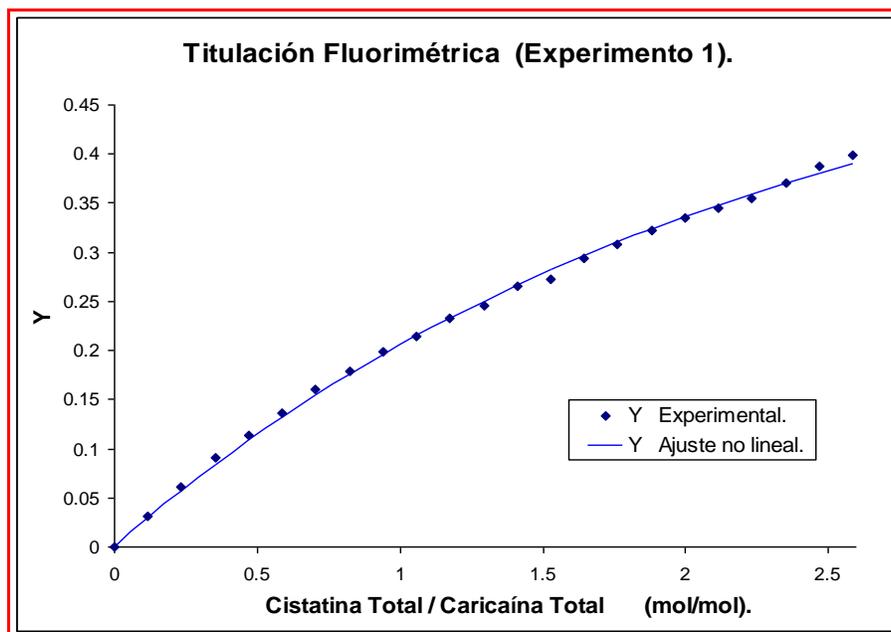


Figura 4.8 Gráfico de titulación fluorimétrica (Experimento 1).

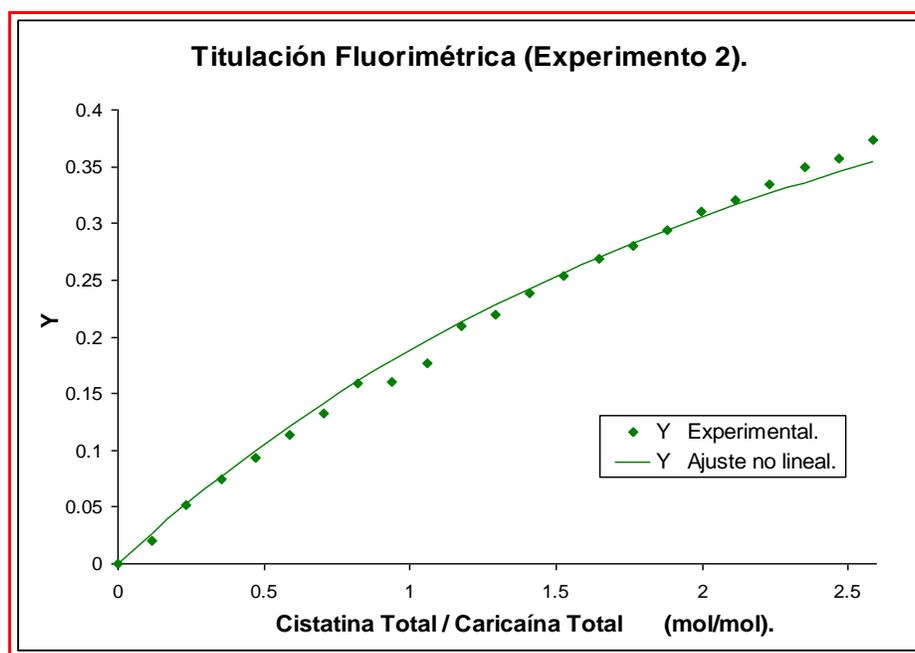


Figura 4.9 Gráfico de titulación fluorimétrica (Experimento 2).

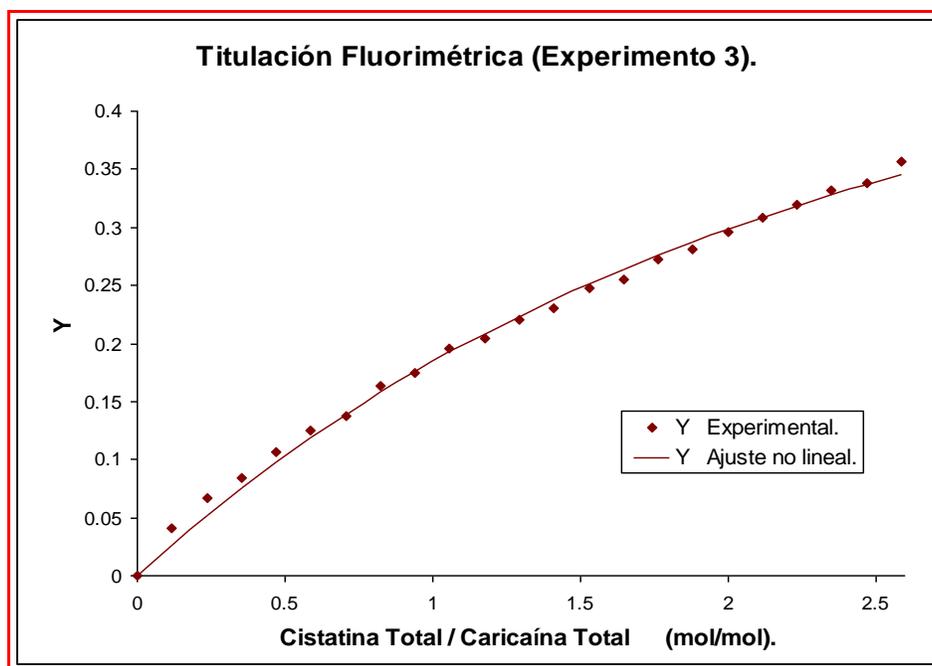


Figura 4.10 Gráfico de titulación fluorimétrica (Experimento 3).

Una vez evaluados los resultados experimentales se procedió a estimar los parámetros α y K_d , de la ecuación 3.2 (α es una constante que indica el valor máximo de Y , y K_d , es la constante de disociación en el equilibrio). Para lograr este objetivo se realizó un ajuste no lineal empleando la herramienta Microsoft Office Excel Solver.

En la Tabla 4.3, presento los resultados obtenidos del ajuste no lineal y en la Figura 4.8, 4.9 y 4.10, se muestra en línea continua el gráfico correspondiente a la regresión no lineal.

Tabla 4.3 Constantes de la Ecuación 3.2 calculadas, resultado del ajuste no lineal.

α	\pm error	K_d (μM)	\pm error
0.7587	0.0279	1.9524	0.1452
0.6773	0.0055	1.8686	0.0313
0.6459	0.0404	1.7879	0.2337
0.6939	0.0246	1.8696	0.1368

Dónde: α es la máxima intensidad de fluorescencia calculada al evaluar el modelo empleado en la titulación, K_d es la constante de disociación calculada.

La estadística descriptiva de los resultados experimentales es la siguiente (Tabla 4.4):

Tabla 4.4 Resultados.

Parámetro	k_d (μM)	α
Promedio	1.87	0.69
Error típico	0.047	0.033
Desviación estándar	0.082	0.06
Varianza de la muestra	0.006	0.003
Nivel de confianza (95 %)	0.204	0.14

Por lo tanto, la contante de disociación (k_d) calculada para el sistema CM-caricaína–cistatina es de $(1.87 \pm 0.2) \mu\text{M}$ con un nivel de confianza del 95 %.

5. DISCUSIÓN

La cistatina aislada a partir de clara de huevo es una mezcla de las formas no fosforilada y fosforilada. En condiciones alcalinas el grupo Pser que se encuentra presente en péptidos y proteínas, es hidrolizado mediante β -eliminación del grupo fosfato. En el huevo la forma 2 de la cistatina puede ser desfosforilada especialmente por la acción de fosfatasas alcalinas, el pH de la clara de huevo aumenta a 9.5 en el periodo de almacenaje [21].

El desacoplamiento de la cistatina del gel de sefrosa-CM-papaína fue realizado en medio alcalino (pH 11.3) con la finalidad de no alterar la estabilidad de la cistatina, inmediatamente se ajustó a pH 6.5 (pI de la Forma 1).

Una de las etapas del proceso de purificación de cistatina a partir de clara de huevo es la cromatografía de afinidad, es una técnica selectiva y específica. Como ya se confirmó la presencia de dos inhibidores de cisteinproteasas es interesante conocer su eficiencia, la cual se puede obtener de estudios ya publicados (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Eficiencia de cromatografía de afinidad.

Referencia	Proteína (mg)	Cistatina (mg)	% eficiencia
Barret [29].	80	34	42.5
Anastassi <i>et al.</i> [22].	83	38	45.3
Trziszka <i>et al.</i> [16].	40	15	37.5 ¹

¹ Este valor solo nos sirve de referencia el valor obtenido no es comparable.

Con el resultado que obtuve se confirma la presencia de dos cistatinas en la clara de huevo, una de ellas es la cistatina la cual se ha reportado en publicaciones anteriores y la otra de mayor tamaño molecular, reportada en un estudio del desarrollo embrionario de huevo de pollo la cual no se encuentra caracterizada. Es evidente que la impureza no reportada por Barret [29], Anastassi *et al.* [22] y publicaciones posteriores a estas, sea esta proteína inhibidora de cisteinproteasas de peso molecular de 40 kDa.

La siguiente etapa de purificación de cistatina puede ser efectuada por filtración en gel, la cual es una clase de cromatografía sólido-líquido que permite la separación de moléculas en base a su tamaño. Existen preparaciones comerciales que se emplean en esta técnica tales como sephadex, sefarsosa y biogel. Para continuar con la purificación de la mezcla de cistatinas obtenida se podría realizar empleando Bio-Gel P-60 o Bio-Gel P-100 (Bio-Rad Laboratories) los cuales tienen un límite de exclusión nominal de 3 a 60 kDa y 5 a 100 kDa respectivamente, ambos son empleados en la purificación de proteínas y polipéptidos. Sin embargo se obtuvo un volumen muy pequeño de la mezcla y al momento de realizar la concentración de las fracciones purificadas la pérdida de las proteínas sería casi total. Se requiere contar con mayor cantidad de mezcla de cistatina para continuar con la purificación.

La estructura cristalina de la cistatina de clara de huevo, se ha determinado mediante cristalografía de Rayos X; refinada a una resolución de 2.0 Å [37]. La molécula consiste principalmente de una estructura recta de alfa hélice de cinco giros, cinco estructuras cortas de hebras β plegadas antiparalelas y un segmento de α hélice. Los experimentos de simulación molecular de acoplamiento (docking) efectuados por Bode *et al.* [37] sugieren un modelo único para la inhibición de papaína con cistatina, el segmento N-terminal de la cistatina es dirigido hacia la hendidura donde se encuentra el sitio activo de la proteasa, pero una inapropiada conformación y la distancia impiden sea atacado por el sitio reactivo Cys25 (Figura 1.5).

El campo electrostático negativo del borde formado por la región Gln53-Lys59 de la estructura de la cistatina es determinado principalmente por grupos ionizables (grupos carbonilo expuestos al solvente) y de estructuras peptídicas en el que se encuentra inmerso. Las paredes de la hendidura del sitio activo (Cys25) de la papaína (localizado entre los subsitios S1 y S2), se encuentran formadas principalmente por los residuos 64 a 67 y 156 a 159, los cuales forman un campo electrostático positivo [37]. Por lo tanto, la interacción electrostática entre papaína y cistatina es favorecida.

La formación del complejo cisteinproteasa inhibidor también es formado con cisteinproteasas teniendo su grupo reactivo (Cys25) modificado de manera química. La inactivación de cisteinproteasas se puede efectuar fijando un grupo –metiltiol, –carbometil, –carboximetil, –N-etil-succinimidil, –N-n-butil-succinimidil, –N-(3-carboxipropil)succinimidil, entre otros. Permitiendo la formación de derivados estables que permanecen intactos durante los estudios de la proteína.

Las cistatinas al interactuar con cisteinproteasas pueden enlazar de dos maneras distintas el sitio activo: Con enzimas nativas, el acoplamiento del ligando se efectúa como si fuera sustrato, por medio de la inserción del amino terminal Gly9I-Ala10I en el sitio reactivo (Cys25) y en enzimas inactivadas, por la atracción de la región conservada QVVAG (QLVSG en cistatina de clara de huevo), este segmento entra en contacto con la superficie de los grupos del sitio activo [37].

La caricaína presenta un 69 % de sus 116 residuos de aminoácidos en común con papaína y 50 % con actinidina. El alineamiento de la secuencia muestra que el plegamiento en general de la caricaína es similar al de papaína con la excepción de un bucle adicional de cuatro residuos entre los residuos 167 y 168 de papaína. La actinidina tiene un bucle de la misma longitud en esta región. La diferencia más notoria entre estas enzimas es la carga de la molécula y su distribución [38].

La estructura cristalina de la caricaína fue determinada por Pickersgill *et al.* [39] (mediante cristalografía de Rayos X; refinada a una resolución de 2.6 Å) y muestra que la caricaína tiene una estructura similar a la papaína, pero con la inserción adicional de cuatro residuos de aminoácido (de manera similar a la actinidina) y con otras diferencias en la conformación de la cadena principal resultado de la sustitución de prolina. La primera sustitución de prolina es la Pro-102 (en papaína) por una Gly (en caricaína) y la adyacente Tyr-103 (en papaína) por una Pro, resultado de esto se presenta una diferencia significativa en la conformación de la estructura principal. La segunda región de sustitución se encuentra en el entorno de la Pro-197

(de caricaína) presentando una diferencia sustancial en la conformación. Sin embargo la sustitución de prolina no siempre presenta una diferencia en la conformación, por ejemplo, la sustitución de Pro (en caricaína) en residuo Tyr-69 (en papaína). El sitio activo de Cys-25, His-159 y el adyacente Asp-179 (175 en papaína) se encuentran en posiciones idénticas en caricaína y papaína. Además, Pickersgill *et al.* [39] resaltaron que la molécula de caricaína es menos flexible en comparación a la molécula de papaína a pesar de presentar un número de contactos cristalinos similar, lo cual puede estar relacionada con su mayor estabilidad en comparación a la papaína.

Rowan *et al.* [40] citan una constante de inhibición de caricaína por cistatina de pollo de 73 nM. En la Tabla 5.1 se presenta algunos valores de las constante de disociación (K_d) de la interacción de cistatina con cisteinproteasas carboximetiladas y nativas, el estudio de estos sistemas fueron efectuados en las mismas condiciones de ensayo por lo tanto son comparables con los resultados obtenidos.

Tabla 5.1. Constante de disociación (K_d) de sistemas cisteinproteasa–cistatina.

Enzima	Cisteinproteasa nativa K_d (M)	Cisteinproteasa carboximetilada K_d (M)
Ficina ^b	5×10^{-14}	$\leq 1 \times 10^{-9}$
Quimopapaína A ^b	9×10^{-13}	$\leq 1 \times 10^{-9}$
Papaína ^a	5×10^{-12}	5×10^{-10}
Actinidina ^b	5×10^{-9}	1.7×10^{-7}
Caricaína	7.3×10^{-8}	$(1.87 \pm 0.2)^{-6}$

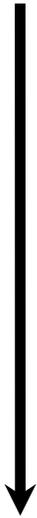
^a Björk and Ylinenjärvi [31]; ^b Björk and Ylinenjärvi [36].

La constante de disociación (K_d) calculada a través del desarrollo del trabajo que he presentado, tiene un valor de $(1.87 \pm 0.2) \mu\text{M}$, lo cual indica que la tiene una constante de afinidad (K_a) del inhibidor por la enzima de $5.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Comparando la constante de disociación (K_d) y la constante de afinidad (K_a) de los sistemas presentados en la Tabla 5.1, se obtiene el siguiente orden de magnitud de las constantes de la interacción de cisteinproteasas con cistatina de clara de huevo de pollo (Tabla 5.1).

Comparando el sistema S-(carboximetil)-caricaína–cistatina con respecto a los sistemas presentados en la Tabla 5.1, el sistema S-(carboximetil)-caricaína–cistatina presenta la constante de disociación (K_d) de mayor magnitud, es decir, la afinidad de la S-(carboximetil)-caricaína por cistatina es la más baja respecto a los sistemas comparados (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Comparando de K_d y K_a de los sistemas presentados en la Tabla 5.1

Orden creciente de K_d	Cisteinproteasa	Orden creciente de K_a
	Ficina Quimopapaína A Papaína S-(carboximetil)-papaína Actinidina Caricaína S-(carboximetil)-actinidina S-(carboximetil)-caricaína	

Los valores de la constante de disociación (K_d) de la interacción de cistatina con caricaína nativa ($K_d = 7.3 \times 10^{-8}$ M) y caricaína carboximetilada ($K_d = 1.87 \times 10^{-6}$ M) presentan una diferencia de dos órdenes de magnitud aproximadamente, lo cual describe el mismo comportamiento de los valores de la constante de disociación (K_d) registrado con otros sistemas en los que interacciona la cistatina con cisteinproteasas en su forma nativa y carboximetilada.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La contribución de este trabajo fue conocer la constante de disociación del sistema S-(carboximetil)-caricaína–cistatina, comparado el resultado obtenido con el reportado en otros sistemas ya estudiados, da la pauta a tratar de comprender porque a pesar de la alta similitud que presentan las proteínas homologas pertenecientes a la familia de la papaína (como lo es la caricaína, quimopapaína y la papaína) presentan diferente afinidad en la interacción con la cistatina de clara de huevo de pollo (inhibidor de cisteinproteasa), siendo el mismo mecanismo de interacción en todas las cisteinproteasas. Es evidente que al estar constituida por diferentes residuos de aminoácidos el entorno circundante del sitio activo (Cis25), es afectado por interacciones de diferente magnitud. Sin embargo, es interesante tratar de comprender a través de la obtención de parámetros experimentales y la comparación de las propiedades fisicoquímicas de la enzima en estudio, que factores están involucrados en la inhibición de cisteinproteasas por la cistatina de clara de huevo. Con la finalidad de complementar el trabajo que he presentado sería factible realizar el estudio mediante otras técnicas por ejemplo la titulación calorimétrica, dicroísmo circular e incluso mediante cinética enzimática y comparar los resultados con el obtenido por medio del desarrollo del trabajo que he presentado.

La importancia de investigar y estudiar este tipo de sistemas (cisteinproteasa–inhibidor) radica en conocer más aplicaciones potenciales en medicina, agricultura y biotecnología, para ello se han efectuado y se continúan realizando estudios *in vivo* e *in vitro* de la formación de complejos enzima proteolítica–inhibidor. El firme propósito de estudiar inhibidores de cisteinproteasas de origen natural y estructura proteica (como las cistatinas) es poder emplearlos en el tratamiento de enfermedades, es decir como farmacos.

V. REFERENCIAS

1. Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Stryer, Lubert. *Bioquímica*, 5 Edición, Editorial Reverte, **2004**, páginas: 41–73, 84, 85, 188–192, 237.
2. Murray, R. D. *Bioquímica de Harper*, 11ª Edición, Editorial El manual moderno S.A. de C.V. Mexico D.F. **1988**, página: 51.
3. Hahn-Jun Lee *et al.* Mammalian proteinase genes. Role of Proteases in the Pathophysiology of Neurodegenerative Diseases, edited by Lajtha and Banik. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. **2001**, 283–293.
4. Rawlings, N. and Barrett A. J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.*, **1993**, 290, 205–218.
5. Oliveira, Adeliara S. *et al.* Cysteine proteinases and cistatins, *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal*, **2003**, 46(1), 91–104.
6. Otto, Hans-Hartwing and Schirmeister, Tanja. Cysteine proteases and their Inhibitors. *Chemical Reviews*, **1997**, 7(1), 133-172.
7. Bobek, Libuse A. and Levine, Michael J. Cistatins-inhibitors of Cisteine Proteinases. *Critical Reviews in Oral biology and Medecine*, **1992**, 3(4), 307–332.
8. Duvey, Viskash K. *et al.* Papain-like proteases: applications of their inhibitors. *Africam Journal of Biotechnology*, **2007**, 6(9), 1077–1086.
9. Ikeuchi, Yoshihide *et al.* The enhancing of a cysteine protease activity at acidic pH by protein engineering, the role of glutamic 50 in the enzyme mechanism of caricaína. *FEBS Letters*, **1998**, 437, 91–96.
10. Katerelos, Nikolaos A. Cryatal structure of a caricaín D158E mutant in complex whit E64. *FEBS Letters*, **1996**, 392, 35–39.
11. Rzychon, Malgorzata; Chmiel, Dorota; Stec-Niemczyk, Justyna. *Acta Biochimica Polonica*, **2004**, 51(4), 861–873.
12. Sumner, Ian G. *et al.* Factors effecting the thermostability of cysteine proteinases from Carica papaya. *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 214, 129–134.
13. Moussaoui, A. *et al.* Revisiting the enzymes stored in the laticifiers of Carica papaya in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *CMLS (Cellular and Molecular Life Sciences)*, **2001**, 58, 556–570.
14. Schechter, I. and Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun.*, **1967**, 27: 157–152.
15. Kirschke, Heindrun; Barret, Alan J.; Rawlings Neil D. *Liysosomal Cysteine Proteases*. Published in The United States by Oxford University Press, Inc. New York. **1998**, pp. 54–57.

16. Trziszka, Tadeusz *et al.* Effect of hen's age on the level of cystatin in the chicken egg white. *International Journal of poultry Science*, **2004**, 3(7): 471 – 477.
17. Rawlings, N. D.; Tolle, D. P. and Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.*, **2004**, 378, 705–716.
18. Kovacs-Nolan, J. *et al.* Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. *J. Agric. Food chem.*, **2005**, 53, 8421–8431.
19. Saxena, I. and Tayyab, S. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, **1997**, 53,13–23.
20. Réhault, Sophie. INRA, HR 83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France. Antiproteases. *Bioactive Egg Compounds* (ed. By R.Huopalahti *et al.*) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2007**.
21. Laber, Bernd *et al.* The cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin is a phosphoprotein. *FEB07113*, **1989**, 248, 162–168.
22. Anastasi, A. *et al.* Cystatin, a protein inhibitor of cisteine proteinases. *Biochem. J.*, **1983**, 211, 129–138.
23. Lindahl, Peter *et al.* Interaction of the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin with papain. *Biochemistry*, **1988**, 27, 5074 – 5082.
24. Turk, Vito and Bode, Wolfram. The cystatins: protein inhibitors of cystein proteinases. *FEBS LETTERS*, **1991**, 285(2), 213–219.
25. Lakowicz, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York. Introduction to Fluorescence, **1983**, pp. 14.
26. Olsen, E.D., *Métodos ópticos de análisis*. Editorial Reverte S. A. España: Fluorimetría y Fosforimetría, Capítulo 8, **1990**, pp. 405–416, 431–433.
27. Solis-Mendiola *et al.* Circular dichroism of cysteine proteinases from papaya latex. Evidence of differences in the folding of their polipeptide chains. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1992**, 1118, 288–292.
28. Azarkan, M. *et al.* The papaya kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β -sheet glycoprotein. *Biochimica et biophysica Acta*, **2006**, 1764: 1063 – 1072.
29. Barret, A. J. Cystatin, the egg white inhibitor of cisteine proteinases. *Methods in Enzimology*, **1981**, 80, 771–778.
30. Arroyo, Miguel. *Inmovilized enzymes: Theory, methods of study and applications*. *Ars Pharmaceutica*, **1998**, 39(2), 23–39.
31. Björk, I. and Ylinenjärvi, K. Interaction of chicken cystatin with inactivated papains. *Biochem. J.*, **1989**, 260: 61–68.

32. Ferreira Machado, F. *et al.* Solubility and density of egg white proteins: Effect of pH and saline concentration. *LWT*, **2007**, 40, 1304–1307.
33. Carraro Alleoni, A. C. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz)*, **2006**, 63(3) Piracicaba May/june.
34. Žerovnik, Eva *et al.* Thermal Denaturation of Human Cystatin C and Two of its Variants; Comparison to chicken cystatin. *Biol. Chem.*, **1997**, 378, 1199–1203.
35. Creighton, T. E. Protein structure: a practical approach. Chapter 11, Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. Printed by Information Press Ltd, Oxford, England, **1989**, 251–276.
36. Björk, I. and Ylinenjärvi, K. Interaction between chicken cystatin and the cysteine proteinases actinidin, quimopain A, and ficine *Biochemistry*, **1990**, 29, 1770–1776.
37. Bode, Wolfram *et al.* The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *The EMBO Journal*, **1988**, 7(8), 2593–2599.
38. Pickersgill, Richard W. *et al.* Preliminary crystallographic data for protease omega. *Eur. J. Biochem.*, **1990**, 190, 443–444.
39. Pickersgill, Richard W. *et al.* Determination of the structure of papaya protease omega. *Acta Cryst.*, **1991**, B47, 766–771.
40. Rowan, Andrew D. *et al.* Inhibition of cysteine proteinases by a protein inhibitor from potato. *FEBS LETTERS*, **1990**, 269(2), 328–330.
41. Potter, Geoffrey W.H. Analysis of Biological Molecules: An introduction to principles, instrumentation and techniques. Chapman and Hall. Chapter 3, Spectroscopic techniques, **1995**, pp. 75–79. Printed in Great Britain by the Alden Press, Oxford.
42. Rendell, D., Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy. John Wiley and Sons. Quantitative Fluorimetry, chap. 3, **1987**, 88–104.
43. Krause, Jobst; Bühner, Manfred; Sund, Horst. Studies of Glutamate Dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, **1974**, 41, 593–602.
44. Nordenman, Birgitta and Björk, Ingerman. Binding of Low – Affinity and High – Affinity Heparin to Antitrombin. *Biochemistry*, **1978**, 17(16), 3339–3344.
45. Mathews, C. K.; Van Holde, K. E.; Ahern, K.G. *BIOQUÍMICA* 3ª Edición. Pearson Educación, S. A., Madrid, **2002**, pág. 143.
46. Rodney L. Levine and M. Marcia Federici. Quantitation of aromatic residues in proteins: Model compounds for second-derivative spectroscopy. *Biochemistry*, **1982**, 21, 2600–2606.

V. APÉNDICE I

A) FLUORESCENCIA

La luminescencia es la emisión de la luz, resultado de la interacción de algún tipo de energía con una partícula (un ión o molécula). La fotoluminiscencia es un tipo de luminescencia, su fuente de energía es la radiación. Una molécula que absorbe radiación pasa desde el estado electrónico y vibracional fundamental hasta un estado electrónico y vibracional excitado. Cuando esta molécula se encuentra en el nivel vibracional más alto del estado electrónico excitado pierde su exceso de energía restante de tres maneras:

- Sin emitir radiación perdiendo la energía electrónica mediante choques o interacciones.
- Emitiendo un fotón de luz ultravioleta o visible (**fluorescencia**).
- Pasando a un estado triplete metaestable y retornando después de un cierto tiempo al estado electrónico fundamental emitiendo un fotón de luz ultravioleta o visible (**fosforescencia**).

Una molécula en estado excitado tiene una vida de 10^{-7} a 10^{-8} s, el tiempo que tardan las sustancias fluorescentes en emitir radiación, es de 10^{-8} a 10^{-4} s. En el caso de fosforescencia, 10^{-4} a 20 s [26]. En la Figura AI.1, se representa un esquema de los niveles de energía que resume los cambios de energía implicados en el proceso de luminiscencia (absorción, fluorescencia y fosforescencia).

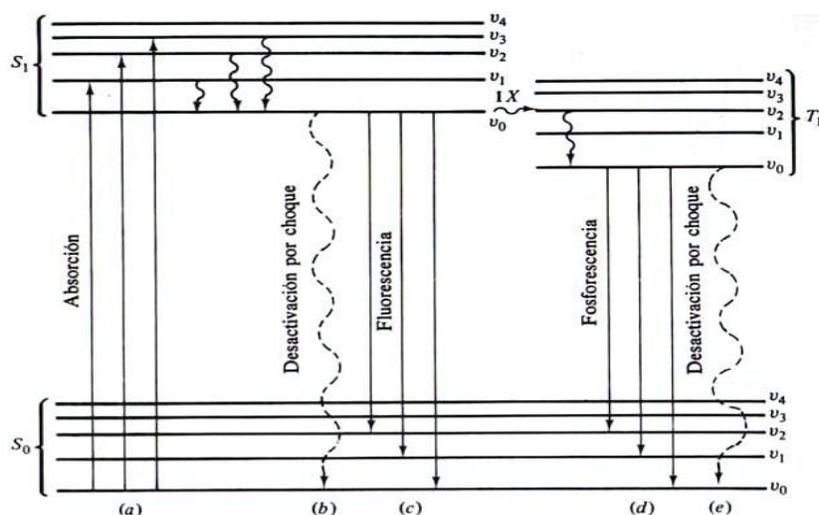


Figura AI.1 Proceso de Luminescencia [26]. Las flechas continuas representan fotones mientras que las discontinuas representan desactivación por choques, sin emisión de radiación. v_i = Niveles Vibracionales, S_0 = Estado Fundamental Singulete, S_1 = Primer Estado Excitado Singulete, T_1 = Primer Estado Excitado Triplete.

B) ESPECTROS DE EMISIÓN Y EXITACION

La fluorescencia es una técnica altamente sensitiva y selectiva. Mediante esta técnica se puede detectar pequeñas cantidades de radiación emitida y amplificarlas de manera confiable, no todos los compuestos florecen. Sin embargo estos pueden ser marcados con un grupo fluorescente y entonces ser analizados.

Para una mejor ejecución de la espectroscopia de fluorescencia se requiere conocer la longitud de onda que produce la mayor excitación ($\lambda_{\text{Excitación}}$), y la longitud de onda de emisión más intensa ($\lambda_{\text{Emisión}}$). Para encontrar la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{Máxima}}$), se requiere conocer primero la $\lambda_{\text{Excitación}}$, para ello se explora e identifica la longitud de onda de la radiación incidente que produce la mas intensa emisión total, una vez fija la $\lambda_{\text{Excitación}}$, se escanea a través de las longitudes de onda de emisión para encontrar su $\lambda_{\text{Máxima}}$ [41].

C) INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

Debe hacerse resaltar que las especies fluorescentes deben ser expuestas a la radiación que promoverá las transiciones electrónicas, antes que la fluorescencia pueda registrarse. La intensidad de fluorescencia (F_f) emitida a una longitud de onda (ecuación AI.1), depende de la intensidad de luz absorbida (I_A) y del rendimiento cuántico (ϕ_f).

$$F_f = \phi_f I_A \quad \text{AI.1}$$

La intensidad de luz absorbida se puede expresar como la intensidad de luz no transmitida:

$$I_A = (I_0 - I_t) \quad \text{AI.2}$$

Donde: I_0 , es la intensidad de la luz de incidente; I_t , es la intensidad de luz transmitida.

Sustituyendo la ecuación (AI.2) en (AI.1):

$$F_f = \phi_f (I_0 - I_t) \quad \text{ó bien:} \quad F_f = \phi_f I_0 \left(1 - \frac{I_t}{I_0}\right) \quad \text{AI.3}$$

Esta transmitancia (I_t/I_0), se relaciona con la concentración mediante la ley de Beer–Lambert:

$$A = \varepsilon c l = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) \quad \text{AI.4}$$

Donde: A , denota la absorbancia; coeficiente de absorción molar (coeficiente de extinción),

ε [=] $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$; concentración, c [=] M ; longitud de trayectoria óptica, l [=] cm .

Arreglando la ecuación (AI.4) se puede expresar como:

$$\ln\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = 2.303\epsilon cl; \quad \text{ó bien:} \quad \frac{I_t}{I_0} = e^{-2.303\epsilon cl} \quad \text{AI.5}$$

Sustituyendo la ecuación (AI.5), en (AI.3):

$$F_f = \phi_f I_0 (1 - e^{-2.303\epsilon cl}) \quad \text{AI.6}$$

La expresión contenida en paréntesis de la ecuación (AI.4) puede desarrollarse mediante la serie:

$$1 - e^{-2.303\epsilon cl} = 2.303\epsilon cl - \frac{(2.303\epsilon cl)^2}{2!} + \frac{(2.303\epsilon cl)^3}{3!} - \dots \quad \text{AI.7}$$

Para concentraciones bajas, siempre que el término $2.303\epsilon cl$ sea inferior a 0.05 [42], se puede tomar el término lineal y despreciar la contribución de los otros.

Sustituyendo (AI.7) en (AI.6):

$$F_f = 2.303\phi_f I_0 \epsilon cl \quad \text{AI.8}$$

Donde: F_f = Intensidad de fluorescencia. ϕ_f = Rendimiento cuántico.

I_0 = Intensidad de la luz incidente. ϵ = coeficiente de absorción molar.

l = longitud de la trayectoria óptica. c = Concentración.

Si se corrige la ecuación (AI.8) por el factor instrumental (Z), la intensidad de fluorescencia emitida a una longitud de onda (F_f) se puede expresar como:

$$F_f = 2.303Z\phi_f I_0 \epsilon cl \quad \text{AI.9}$$

Donde: Z es una constante de proporcionalidad que depende del instrumento (de la eficiencia del detector y de la geometría).

Definiendo: $k = 2.303ZI_0l$, y sustituyendo esta expresión tenemos:

$$F_f = 2.303ZI_0l\phi_f\epsilon c = k\phi_f\epsilon c \quad \text{AI.10}$$

D) GRÁFICO DE CALIBRACIÓN DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es el tipo de luminescencia más usado como técnica analítica. Una manera alternativa previo a un análisis fluorimétrico, para saber el comportamiento de las muestras, es obtener una curva de calibración, con la cual es posible identificar el rango en la cual la respuesta es lineal y la concentración a la cual es significativo el término cuadrático [26,42]. Sustituyendo la ecuación (AI.7) en (AI.6) y arreglando la ecuación resultante, se obtiene la ecuación (AI.11) que expresa la intensidad relativa de fluorescencia respecto a la variación de la concentración.

$$\frac{F_f}{Z\phi_f I_0} = 2.303\epsilon c l - \frac{(2.303\epsilon c l)^2}{2!} + \frac{(2.303\epsilon c l)^3}{3!} \quad \text{AI.11}$$

Evaluando los datos presentados de la Tabla AI.1 en la ecuación (AI.11) la cual describe la contribución de los términos lineal, cuadrático y cúbico, se obtienen los gráficos presentados en las figuras AI.I y AI.II en el rango de concentraciones de 0 a 5 μM , para caricaína y cistatina respectivamente.

El rango de operación en el que varía de la concentración de las proteínas debida al cambio de volumen en la titulación fluorimétrica de CM-caricaína con cistatina es presentada en la Tabla 3.1 y es la siguiente: para CM-caricaína de 1 a 0.94 μM , y para cistatina de 0 a 2.45 μM .

Tabla AI.1 Propiedades fisicoquímicas de caricaína y cistatina.

	$A^{1\%}_{280, 1\text{cm}}$	Mr	$\epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\epsilon (\text{dm}^3 \text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1})$
Caricaína	16.7	23348 ^a	38960 ^b	1.67
Cistatina	8.7 ^c	13147 ^d	11438	0.87

^a APÉNDICE III, ^b Réhault [20], ^c Saxena and Tayyab [19], ^d Azarkan et al [26].

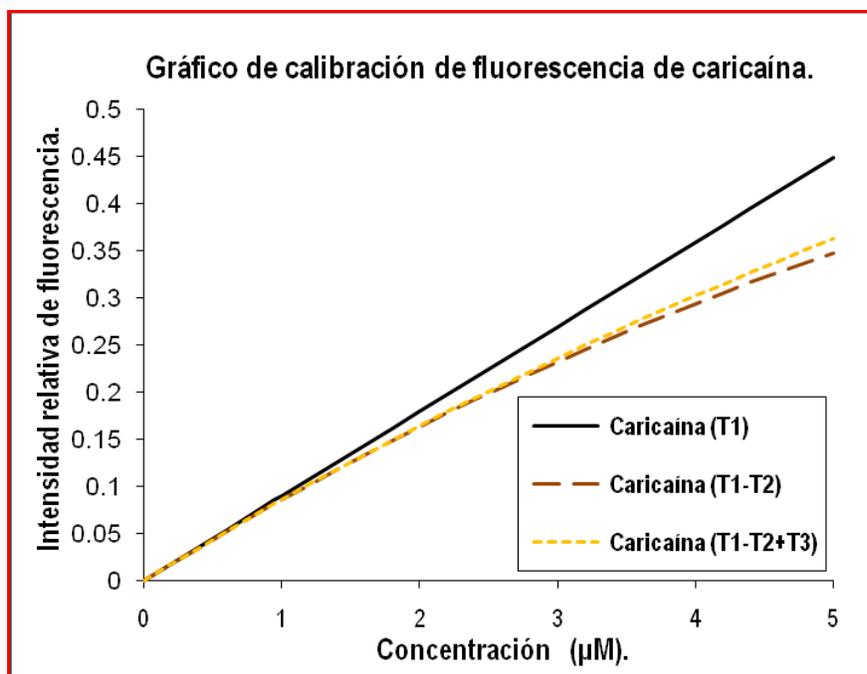


Figura AI.I Curva de calibración alternativa para el análisis fluorimétrico de caricaina.
 Donde: T1 = Termino lineal, T2 = Termino cuadrático, T3 = Termino cúbico.

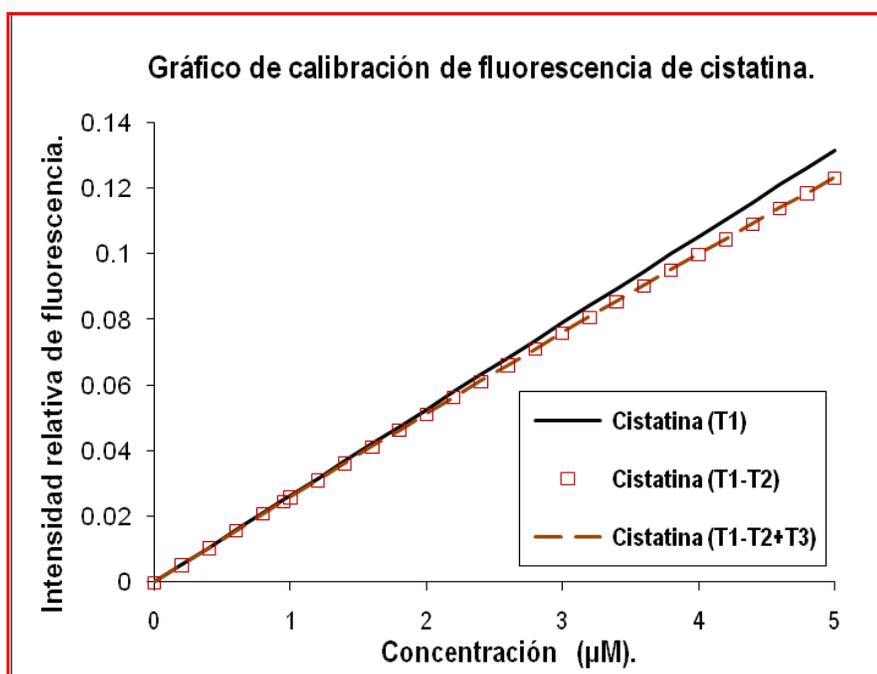


Figura AI.I Curva de calibración alternativa para el análisis fluorimétrico de cistatina.
 Donde: T1 = Termino lineal, T2 = Termino cuadrático, T3 = Termino cúbico.

En la Tabla AI.2 se presenta la contribución del termino cuadrático respecto al termino lineal y del termino cubico respecto al termino lineal, expresada en error relativo (*e.r.*).

Tabla AI.2 Contribución de términos cuadrático y cubico.

Proteína	Concentración (μM)	<i>e.r.</i> Termino cuadrático.	<i>e.r.</i> Termino cúbico.
CM-caricaína	[0.94, 1.00]	[0.045, 0.047]	[0.0013, 0.0014]
Cistatina	[0.00, 2.45]	[0.000, 0.033]	[0.0000, 0.0007]

$$\text{Donde: error relativo} = e.r. = \left(\frac{\text{es-debe ser}}{\text{debe ser}} \right).$$

La contribución del término cuadrático respecto a la curva de calibración lineal, no es significativo en el rango de operación para ambas proteínas, presentan un error relativo para CM-caricaína de [0.045, 0.047] y para cistatina de [0.000, 0.033]. Con este análisis previo al estudio de fluorescencia realizado en este trabajo, se esperaba un comportamiento de la respuesta de fluorescencia lineal de las proteínas libres presentes en la titulación fluorimétrica.

La intensidad de fluorescencia es sensible a las condiciones del ensayo tales como la concentración, la presencia de impurezas, el pH y la temperatura. Todas estas afectan la estabilidad del estado excitado y son importantes en la determinación del punto de equilibrio del sistema de estudio. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de las especies sólo en soluciones diluidas sobre una región sumamente limitada. Las impurezas pueden extinguir también la fluorescencia. La acidez y la temperatura óptimas para la estabilidad de las especies fluorescentes, deben encontrarse en forma experimental.

APÉNDICE II

A) DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE UNA CONSTANTE DE ASOCIACIÓN PROTEÍNA LIGANDO: PROTEASA–INHIBIDOR.

La ecuación para estudiar la reacción bimolecular entre cistaina y la S-(carboximetil)-caricaína (CM-caricaína), que se presenta a continuación, fue derivada de la expresión fundamental de la constante de equilibrio de la reacción proteína ligando, el planteamiento es retomado del trabajo presentado por Krause *et al.* [43]. La deducción de esta ecuación se basa en dos consideraciones: A) El cambio de la cantidad física medida (fluorescencia) es proporcional a la cantidad del complejo proteína–ligando formado, B) Todos los sitios de unión son equivalentes e independientes [44].

Reacción Bimolecular (CM-caricaína y cistatina).



Donde: **P**, CM-caricaína (proteasa); **I**, cistatina (inhibidor de proteasa); **PI**, complejo (CM-caricaína–cistatina).

La constante de asociación en el equilibrio (k_a) se define como:

$$k_a = \frac{[PI]}{[P][I]} \quad \text{AII.2}$$

La constante de disociación en el equilibrio (k_d) se expresa como:

$$k_d = \frac{1}{k_a} = \frac{[P][I]}{[PI]} \quad \text{AII.3}$$

Donde: **[P]** es la concentración de CM-caricaína en el equilibrio, **[I]** es la concentración de cistatina en el equilibrio y **[PI]** es la concentración del complejo (CM-caricaína–cistatina) en el equilibrio.

La intensidad de fluorescencia emitida a una longitud de onda (F_f), ver APÉNDICE I, se puede expresar como:

$$F_f = k\phi_f\epsilon c \quad \text{AII.4}$$

Donde: coeficiente de absorción molar (coeficiente de extinción), ϵ [=] $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$;
concentración, c [=] M ; constante $k = 2.303ZI_0l$ [=] cm .

Definiendo las siguientes fluorescencias (F_i), para las especies presentes en una celda de titulación:

$$F_{\text{mezcla}} = F_m \text{ Fluorescencia de la mezcla.}$$

$$F_{\text{CM-caricaína (libre)}} = F_p \text{ Fluorescencia de CM-caricaína libre.}$$

$$F_{\text{cistatina (libre)}} = F_i \text{ Fluorescencia de inhibidor libre.}$$

$$F_{\text{complejo}} = F_{pI} \text{ Fluorescencia del complejo (CM-caricaína-cistatina).}$$

$$F_{\text{CM-caricaína (en la mezcla)}} = F_{pT} \text{ Fluorescencia de CM-caricaína total en la mezcla.}$$

$$F_{\text{cistatina (en la mezcla)}} = F_{iT} \text{ Fluorescencia de cistatina total en la mezcla.}$$

La fluorescencia de la mezcla contenida en la celda de titulación se expresa de la siguiente manera:

$$F_m = F_p + F_i + F_{pI} \quad \text{AII.5}$$

Desarrollando la ecuación AII.5, con la connotación de la ecuación AII.4. Se puede expresar de la siguiente manera:

$$F_m = k\phi_p\epsilon_p[P] + k\phi_i\epsilon_i[I] + k\phi_{pI}\epsilon_{pI}[PI] \quad \text{AII.6}$$

Donde: ϕ_p , rendimiento cuántico de CM-caricaína; ϕ_i , rendimiento cuántico de la cistatina; ϕ_{pI} , rendimiento cuántico del complejo (CM-caricaína-cistatina); ϵ_p , absorptividad molar de CM-caricaína; ϵ_i , absorptividad molar de cistatina; ϵ_{pI} , absorptividad molar del complejo (CM-caricaína-cistatina); $[P]$, concentración de CM-caricaína en la mezcla (contenida en la celda de titulación); $[I]$, concentración de cistatina en la mezcla (contenida en la celda de titulación); $[PI]$, concentración del complejo (CM-caricaína-cistatina) en la mezcla (contenida en la celda de titulación).

Definiendo la cantidad total de CM-caricaína (P_T) y cistatina (I_T) en la mezcla contenida dentro de la celda de titulación como:

$$P_T = [P] + [PI] \quad \text{AII.7}$$

$$I_T = [I] + [PI] \quad \text{AII.8}$$

La fluorescencia de CM-caricaína en la mezcla (F_{P_T}) y la fluorescencia de cistatina en la mezcla (F_{I_T}), se puede expresar como:

$$F_{P_T} = F_P + F_{PI} \quad \text{AII.9}$$

$$F_{I_T} = F_I + F_{PI} \quad \text{AII.10}$$

Despejando $[P]$ y $[I]$ de ecuaciones (AII.7) y (AII.8) y sustituyendo estas en (AII.6):

$$F_m = F_{P_T} + F_{I_T} + [PI] (k\phi_{PI}\epsilon_{PI} - k\phi_P\epsilon_P - k\phi_I\epsilon_I) \quad \text{AII.11}$$

$$\text{Donde: } F_{P_T} = k\phi_P\epsilon_P P_T \quad \text{AII.12}$$

$$F_{I_T} = k\phi_I\epsilon_I I_T \quad \text{AII.13}$$

$$F_{PI} = [PI] (k\phi_{PI}\epsilon_{PI} - k\phi_P\epsilon_P - k\phi_I\epsilon_I) \quad \text{AII.14}$$

Arreglando la ecuación (AII.11), y dividiendo la ecuación resultante por la ecuación (AII.12):

$$Y = \frac{F_{P_T} + F_{I_T} - F_m}{F_{P_T}} = \frac{[PI]a}{P_T} \quad \text{AII.15}$$

$$\text{Donde: } a = \frac{k\phi_P\epsilon_P + k\phi_I\epsilon_I - k\phi_{PI}\epsilon_{PI}}{k\phi_P\epsilon_P} \quad \text{AII.16}$$

Arreglando la ecuación (AII.15):

$$[PI] = \frac{Y P_T}{a} \quad \text{AII.17}$$

De la ecuación (A.II.7) y (A.II.8), se obtiene:

$$[P] = P_T - [PI] \quad \text{AII.18}$$

$$[I] = I_T - [PI] \quad \text{AII.19}$$

Despejando $[I]$ de la ecuación (AII.3) y sustituyendo la ecuación (AII.8):

$$[I] = \frac{[PI]k_d}{[P]} = \frac{[PI]k_d}{P_T - [PI]} = \frac{k_d}{\frac{P_T}{[PI]} - 1} \quad \text{AII.20}$$

Arreglando la ecuación (AII.17) se obtiene:

$$\frac{a}{Y} = \frac{P_T}{[PI]} \quad \text{AII.21}$$

Sustituyendo la ecuación AII.21 en la ecuación AII.20:

$$[I] = \frac{k_d}{\frac{a}{Y} - 1} \quad \text{AII.22}$$

Sustituyendo las ecuaciones (AII.22) y (AII.17) en la ecuación (AII.8):

$$I_T = \frac{k_d}{\frac{a}{Y} - 1} + \frac{Y P_T}{a} \quad \text{AII.23}$$

Arreglando la ecuación (AII.23) como:

$$\frac{I_T}{P_T} = \frac{Y k_d}{(a - Y)P_T} + \frac{Y}{a} \quad \text{AII.24}$$

Definiendo: $x = \frac{I_T}{P_T}$, $w = \frac{k_d}{P_T}$; sustituyendo estas expresiones en la ecuación (AII.24):

$$x = \frac{wY}{(a - Y)} + \frac{Y}{a} \quad \text{AII.26}$$

Desarrollando el polinomio de la ecuación (AII.26):

$$Y^2 - a(1 + w + x)Y + a^2x = 0 \quad \text{AII.27}$$

La ecuación (AII.27), es un polinomio de segundo grado con coeficientes constantes, el cual se resuelve mediante la solución general:

$$Y = \frac{a}{2} \left((1 + w + x) \pm \sqrt{(1 + w + x)^2 - 4x} \right) \quad \text{AII.28}$$

Tomando la raíz negativa de la solución de la ecuación (AII.28):

$$Y = \frac{\alpha}{2} \left((1 + w + x) - \sqrt{(1 + w + x)^2 - 4x} \right) \quad \text{AII.29}$$

Sustituyendo: $x = \frac{I_T}{P_T}$, $w = \frac{k_d}{P_T}$, en la ecuación (AII.29):

$$Y = \frac{\alpha}{2} \left(\left(1 + \left(\frac{k_d}{P_T} \right) + \left(\frac{I_T}{P_T} \right) \right) - \sqrt{\left(1 + \left(\frac{k_d}{P_T} \right) + \left(\frac{I_T}{P_T} \right) \right)^2 - 4 \left(\frac{I_T}{P_T} \right)} \right) \quad \text{AII.30}$$

Donde: k_d es la constante de disociación en el equilibrio (tiene unidades de μM), P_T es la concentración de CM-caricaína total (contenida en la celda de titulación), I_T es la concentración de cistatina total (contenida en la celda de titulación), α es una constante que indica el valor máximo de Y .

De la ecuación (AII.15):

$$Y = \frac{F_{P_T} + F_{I_T} - F_m}{F_{P_T}} \quad \text{AII.31}$$

Donde: F_m es la fluorescencia de la mezcla en la celda de titulación, F_{P_T} es la fluorescencia de CM-caricaína total en la celda de titulación, F_{I_T} es la fluorescencia de cistatina total en la celda de titulación.

Igualando la ecuación (AII.30) y (AII.31) se obtiene el modelo matemático con el cual se estudió la reacción bimolecular entre S-(carboximetil)-caricaína (CM-cistatina) y cistatina.

$$Y = \frac{F_{P_T} + F_{I_T} - F_m}{F_{P_T}} = \frac{\alpha}{2} \left(\left(1 + \left(\frac{k_d}{P_T} \right) + \left(\frac{I_T}{P_T} \right) \right) - \sqrt{\left(1 + \left(\frac{k_d}{P_T} \right) + \left(\frac{I_T}{P_T} \right) \right)^2 - 4 \left(\frac{I_T}{P_T} \right)} \right) \quad \text{AII.32}$$

Para poder calcular la constante de disociación en el equilibrio (k_d), se construye un gráfico de Y vs. $\frac{I_T}{P_T}$ (donde Y , es expresado en la ecuación AII.31). Esta curva tiene como variables independientes la relación de la cistatina total (I_T) y la CM-caricaína total (P_T) contenida en la celda de titulación y como variable dependiente la función Y , la cual relaciona las variables: F_m (fluorescencia de la mezcla, contenida en la celda de titulación), F_{P_T} (fluorescencia de CM-caricaína total, contenida en la celda de titulación), F_{I_T} (fluorescencia de cistatina total, contenida en la celda de titulación).

Las variables F_m , F_{P_T} y F_{I_T} son valores experimentales obtenidos en la titulación fluorimétrica (la manera en que se obtuvieron estos valores es presentada en el Sección III de este trabajo).

Una vez obtenida la curva de Y vs. $\frac{I_T}{P_T}$, se procedió a realizar un ajuste no lineal empleando la ecuación (AII.31) y la herramienta Solver de Microsoft Office Excel. Para ello se minimizo la suma del cuadrado de la diferencia del valor experimental de la función Y y el obtenido através de la función expresada en (AII.30), la cual para fines de esta explicación le llamaré Y' y retomare la connotación de la ecuación (AII.29), es decir se minimizo la expresión: $\Sigma (Y - Y')^2$

La función Y' se calculo proponiendo un valor a los parámetros a estimar (es decir a las constantes α y k_d), I_T y P_T son valores obtenidos de la Tabla 3.1, estas concentraciones de proteína fueron calculados en base a la cantidad de proteína total (cistatina y CM-caricaína) que se encuentra contenida en la celda de titulación y tiene unidades de μM . Por lo tanto una vez que se calcula Y' , se procede a realizar el ajuste no lineal empleando la herramienta Solver de Microsoft Office Excel.

La herramienta Solver de Microsoft Office Excel utiliza el código de optimización no lineal (GRG2) que fue desarrollado por Leon Lasdon (Universidad de Texas en Austin) y Alan Waren (Universidad Cleveland State).

APÉNDICE III

A) **Tabla A.III-1** Cálculo de M_r de S-(carboximetil)-papaína y S-(carboximetil)-caricaína.

NOMBRE	Abreviatura	Mr del residuo (Da)	S-(carboximetil)-papaína (CM-papaína)		S-(carboximetil)-caricaína (CM-caricaína)	
			No. de residuos	(Da)	No. de residuos	(Da)
Alanina	A, Ala	71.08	14	995.12	14	995.12
Valina	V, Val	99.14	18	1784.52	20	1982.8
Leucina	L, Leu	113.17	11	1244.87	11	1244.87
Isoleucina	I, Ile	113.17	12	1358.04	10	1131.7
Prolina	P, Pro	97.12	10	971.2	13	1262.56
Fenilalanina	F, Phe	147.18	4	588.72	3	441.54
Triptófano	W, Trp	186.21	5	931.05	4	744.84
Metionina	M, Met	131.21	0	0	0	0
Glicina	G, Gly	57.06	28	1597.68	31	1768.86
Serina	S, Ser	87.08	13	1132.04	14	1219.12
Treonina	T, Thr	101.11	8	808.88	9	909.99
Cisteína	C, Cys	103.14	7	721.98	7	721.98
Tirosina	Y, Tyr	163.18	19	3100.42	12	1958.16
Asparagina	N, Asn	114.11	13	1483.43	10	1141.1
Glutamina	Q, Gln	128.14	13	1665.82	7	896.98
Aspartato	D, Asp	115.09	6	690.54	3	345.27
Glutamato	E, Glu	129.12	7	903.84	11	1420.32
Lisina	K, Lis	128.18	10	1281.8	22	2819.96
Arginina	R, Arg	156.2	12	1874.4	11	1718.2
Histidina	H, His	137.15	2	274.3	4	548.6
H ₂ O		18.02	1	18.02	1	18.02
Carboximetil-		58	1	58	1	58
M_r				23485		23348

Datos tomados de Sumner *et al.* [12], Mathews [45].

B) ESPECTRO DE ABSORCIÓN EN EL UV (ULTRAVIOLETA) DE UNA PROTEÍNA.

El espectro de absorción UV (ultravioleta) de una proteína es la suma de la absorción verdadera mas una contribución procedente de dispersión. El componente de dispersión puede ser muy grande, e incrementarse con el decremento de la longitud de onda (λ) (Figura AIII.1 y AIII.2).

El espectro corregido por efecto de dispersión de luz fue obtenido de acuerdo al método empleado por Rodney and Federici [46]. En la Tabla 3.2 presento en resumen a que se debe la absorción de las proteínas.

El espectro de absorbancia debida a la dispersión de luz (Figura AIII.1 y AIII.2) fue obtenida mediante una regresión lineal del grafico de $\log A_{exp}$ vs $\log \lambda$, de 320 a 350 nm (región en la cual la absorbancia se asume solo es debida a la dispersión de luz). La ecuación obtenida entonces permite calcular la absorbancia debida a la dispersión de luz a cualquier longitud de onda en el rango [250 nm, 350 nm].

La ecuación a la cual se efectuó el ajuste lineal es de la forma:

$$\log A_{exp} = a + b (\log \lambda)$$

Los parámetros (a y b) fueron calculados empleando la herramienta Solver de Microsoft Office Excel, los resultados son presentados en la Tabla AIII.2.

Tabla A.III-2

	a	b
CM-caricaína	3.2923	1.5874
Cistatina	3.7723	1.8656

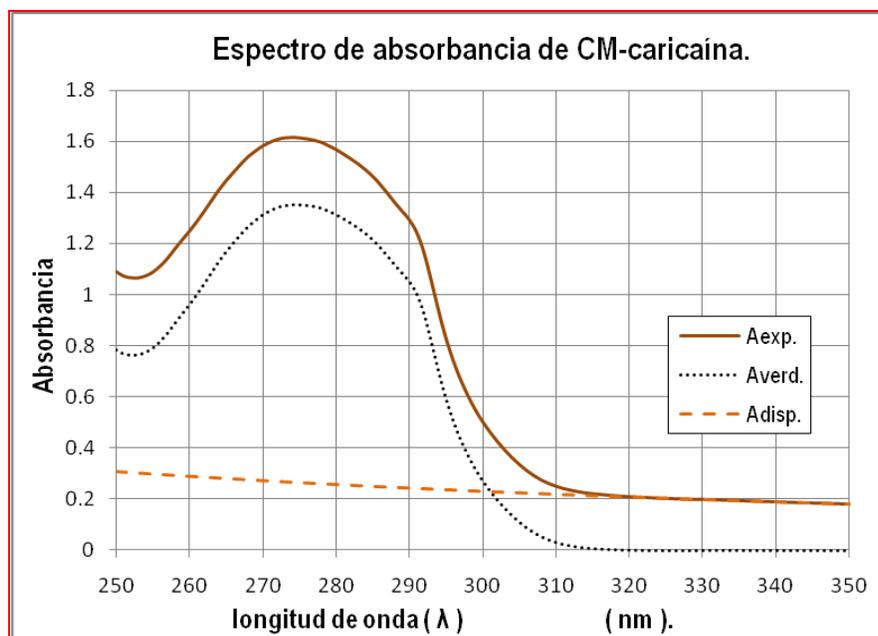


Figura AIII.1 Gráfico del espectro en el UV de la absorbancia de caricaína; **Aexp** es el espectro observado; **Averd** es el espectro corregido por dispersión de luz; **Adisp** es el espectro debido a la dispersión de luz.

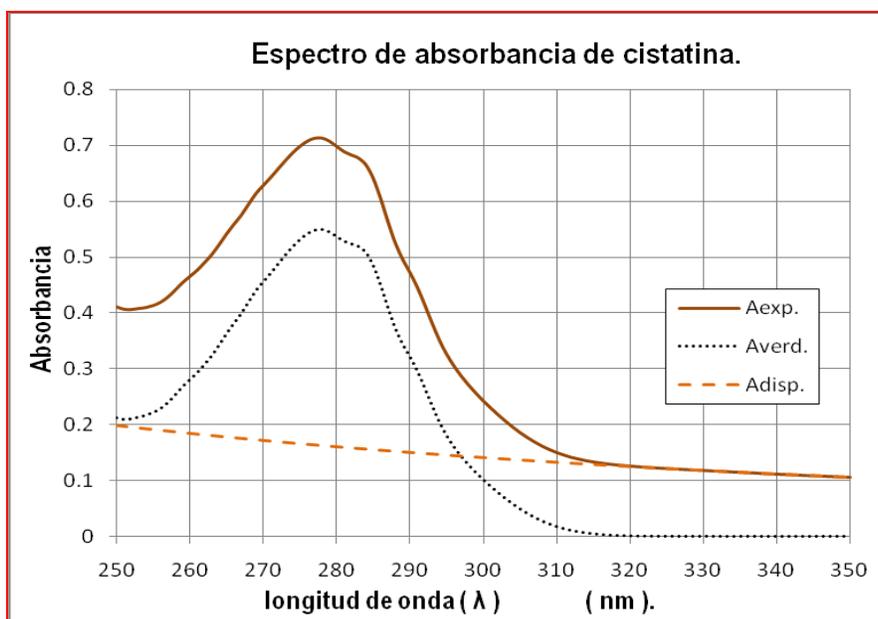


Figura AIII.2 Gráfico del espectro en el UV de la absorbancia de cistatina; **Aexp** es el espectro observado; **Averd** es el espectro corregido por dispersión de luz; **Adisp** es el espectro debido a la dispersión de luz.

Los resultados obtenidos de este trabajo fueron presentados en el Congreso Nacional: 45^a CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA. Celebrado en Cancún, Quintana Roo, México, Septiembre 2010.

El cartel presentado se tituló:

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN PARA EL SISTEMA S-(CARBOXIMETIL)-CARICAÍNA - CISTATINA A 25°C Y PH 7.4.

Bol. Soc. Quím. Méx. 2010, 4 (Número Especial) 145

BIOQUÍMICA

C/140 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN PARA EL SISTEMA MA S-(CARBOXIMETIL)-CARICAÍNA - CISTATINA a 25°C y pH 7.4.

F. Reyes Espinosa, J. A. Arroyo Reyna. Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana – Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina México D.F. Deleg. Iztapalapa C.P. 09340. frelibi@hotmail.com.

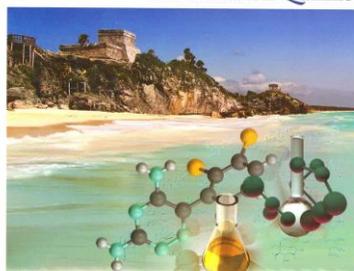
La constante de disociación en el equilibrio para la interacción entre la S-(carboximetil)-caricaína y la cistatina, fue medida mediante el método de titulación fluorimétrica, el cual se realizó titulando la enzima inactivada S-(carboximetil)-caricaína- con un exceso de inhibidor (cistatina de clara de huevo) a 25°C y pH 7.4. La constante de disociación (K_d) calculada a través del desarrollo del trabajo, tiene un valor de $(1.87 \pm 0.21) \mu\text{M}$, lo cual indica que la tiene una constante de afinidad (K_a) del inhibidor por la enzima de $5.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Es decir, la afinidad de la S-(carboximetil)-caricaína por cistatina es la más baja respecto a los sistemas comparados.



SEPTIEMBRE 2010

Bol. Soc. Quím. Méx. 2010, Vol. 4, Número Especial

45^o Congreso Mexicano de Química
29^o Congreso Nacional
de Educación Química



Riviera Maya, Quintana Roo, del 18 al 22 de septiembre de 2010
Programa y resúmenes de los trabajos

Bol. Soc. Quím. Méx. 2010, Vol. 4, Número Especial
ISSN 1870-1809
México, D.F.

www.bsqm.org.mx