aaq2129

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA

"Diseño de un procedimiento sencillo para la purificación de la F1– ATPasa de la mitocondria de *Ascaris suum*"

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química

Maritza De Los Ríos
Dra. Zadila Suárez

Caracas, julio de 2004

TESIS
ED2004
R56

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA

"Diseño de un procedimiento sencillo para la purificación de la F1– ATPasa de la mitocondria de *Ascaris suum*"

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química

Maritza De Los Ríos
Dra. Zadila Suárez

Caracas, julio de 2004

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de Grado titulado: Diseño de un procedimiento sencillo para la purificación de la F1– ATPasa de la mitocondria de ***Ascaris suum*** realizado por Maritza De Los Ríos para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas, a los 28 días del mes de julio de 2004.

Dra. Zadila Suárez

C.I: 2.981.141

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la dicha de existir y de disfrutar de tantas experiencias.

A la Profesora Zadila Suárez por todas las cosas que me enseñó, por la paciencia que me tuvo, por su confianza y sobre todo por haberme dado la oportunidad de trabajar junto con ella en esta maravillosa investigación.

A mis compañeras y eternas amigas del laboratorio Yajidy y Mildred, por su ayuda y apoyo incondicional.

A mis hermanas María Mercedes y María Carolina, por su apoyo y sus sabios consejos en los momentos que más necesitaba.

A mis compañeros de clase Victoria, Diego y Davis por su enorme paciencia para conmigo.

A todos mi eterno agradecimiento.

Dedico este trabajo a una persona que me enseñó que si una vez caía, mil veces me levantaba, que siempre creyó en mí, que mientras vivió nunca permitió que cayera y que fue y seguirá siendo un incentivo para mí...donde quiera que estés abuela te mando miles de bendiciones.

ÍNDICE GENERAL

Pág

Introducción ----------1

Capítulo I: El Problema

Planteamiento del Problema ---------- 2

Objetivo General ---------- 3

Objetivos Específicos ---------- 3

Justificación de la Investigación ---------- 4

Capítulo II: Marco Teórico Referencial

Antecedentes de la Investigación ---------- 5

Bases Teóricas Referenciales:

Ascaris Lumbricoides ---------- 5

Metabolismo del *Ascaris* ---------- 11

Mitocondria del músculo de *Ascaris* ---------- 11

F1.Fo-ATPasa ---------- 12

Sistema de Hipótesis ---------- 20

Sistema de Variables ---------- 21

Capítulo III: Marco Metodológico

Aislamiento de la fracción mitocondrial ---------- 22

Obtención de las partículas submitocondriales ---------- 22

Solubilización de la F1 con cloroformo ---------- 23

Ensayos enzimáticos ---------- 23

Determinación de la concentración de proteínas ---------- 25

Determinación del peso molecular de la proteína nativa y de las subunidades ---------- 25

Primer Procedimiento de Purificación ---------- 26

Segundo Procedimiento de Purificación ---------- 27

Tercer Procedimiento de Purificación ---------- 28

Capítulo IV: Resultados y Discusión de Resultados

1.-Purificación de la F1-ATPasa de *Ascaris*:

Primer Procedimiento de Purificación ---------- 30

Segundo Procedimiento de Purificación ---------- 33

Tercer Procedimiento de Purificación ---------- 37

2.-Caracterización de la F1-ATPasa de *Ascaris*:

2.1 Pureza, composición estequiométrica y peso molecular de las subunidades y de la enzima nativa ---------- 41

2.2 Efecto de algunos inhibidores de la actividad ATPasa sobre la actividad de la enzima de *Ascaris* ---------- 41

2.3 Estudios de Especificidad por Sustrato y de Afinidad por Iones Metálicos ---------- 42

2.4 Estudios Cinéticos con la F1-ATPasa de *Ascaris* ante concentraciones crecientes de ATP ---------- 43

2.5 Espectro de Luz Ultravioleta ---------- 44

3.-Estudios de degradación controlada de la F1 purificada con preparaciones de proteasas aisladas de la mitocondria del parásito ---------- 45

Discusión ---------- 50

Capítulo V: Conclusiones

Conclusiones ---------- 52

Referencias Bibliográficas ---------- 53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. ***Ascaris Lumbricoides*** ---------- 6
Figura 2. Obtención de las partículas F1 mitocondriales ---------- 13
Figura 3. Estructura del complejo F1.Fo, deducida de estudios bioquímicos y de cristalografía ---------- 15
Figura 4. Hipótesis de "cambio de enlace" como mecanismo por el cual el gradiente de protones es requerido para la síntesis de ATP ---------- 17
Figura 5. Electroforesis en SDS-PAGE al 12 % de fracciones obtenidas de la purificación de la F1-ATPasa (Primer Procedimiento de Purificación) ---------- 33
Figura 6. Electroforesis en SDS-PAGE al 12 % de fracciones obtenidas de la purificación de la F1-ATPasa (Segundo Procedimiento de Purificación) ------- 37
Figura 7. Electroforesis en SDS-PAGE al 15% de fracciones obtenidas de la purificación de F1 (Tercer Procedimiento de Purificación) ---------- 40
Figura 8. Espectro de luz visible ---------- 44
Figura 9. Electroforesis en SDS-PAGE al 12% de fracciones obtenidas de la purificación de F1 ---------- 47
Figura 10. Densitograma de una alícuota de la mezcla de incubación de la F1-ATPasa de Ascaris (Fr 15 de G-150) con el Pool I de DEAE (1:20) ---------- 48
Figura 11. Densitograma de una alícuota de la mezcla de incubación de la F1-ATPasa de Ascaris (Fr 15 de G-150) con el Pool II de DEAE (1:10) --------- 49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Purificación de la F1-ATPasa de *Ascaris* (Primer Procedimiento de Purificación) ---------- **30**

Tabla 2. Purificación de la F1-ATPasa de *Ascaris* (Segundo Procedimiento de Purificación) ---------- **33**

Tabla 3. Purificación de la F1-ATPasa de *Ascaris* (Tercer Procedimiento de Purificación) ---------- **38**

Tabla 4. Efecto de Inhibidores sobre la actividad ATPasa ---------- 41

Tabla 5. Ensayos de Inhibición producida por las Proteasas en la actividad ATPasa de la F1 ---------- 45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Patrón de Elución de Proteínas y Actividad ATPasa de la columna de Matrex-Red (1 x 10 cm) ---------- 31

Gráfico 2. Patrón de Elución de las Proteínas y de la Actividad ATPasa de la Columna de Sephadex G-150 (1 x 40 cm) ---------- 32

Gráfico 3. Patrón de Elución de Proteínas y Actividad ATPasa de la Cromatografía en Matrex-Red (1 x 13,5 cm) ---------- 34

Gráfico 4. Patrón de Elución de Proteínas y Actividad ATPasa de la Cromatografía en Sephadex G-150 (1 x 36 cm) ---------- 35

Gráfico 5. Patrón de Elución de Proteínas y Actividad ATPasa de la Cromatografía en AcA 22 (1 x 27 cm) ---------- 36

Gráfico 6. Patrón de Elución de Proteínas y Actividad ATPasa de la columna de Sephadex G-200 (1 x 36 cm) ---------- 38

Gráfico 7. Patrón de Elución de Proteínas y Actividad ATPasa de la Cromatografía en Matrex-Red (1 x 10 cm) ---------- 39

Grafico 8. Ensayos de Especificidad de Nucleótidos de Trifosfato ---------- 42

Gráfico 9. Ensayos de Especificidad por Cationes Divalentes ---------- 43

Gráfico 10. Determinación de parámetros cinéticos de la F1 purificada ---- 44

Gráfico 11. Ensayos de inhibición de la F1 con Proteasas ---------- 46

ABREVIATURAS

ADP: Adenosina 5' – Difosfato

ATP: Adenosina 5' – Trifosfato

ATPasa: Adenosina Trifosfatasa

BSA: Albúmina de Suero Bovino

DEAE – Celulosa: Dietilaminoetil Celulosa

CTP: Histidina 5' – Trifosfato

EDTA: Ácido Etileno – Diamino – Tetra – acético

GTP: Guanosina 5' – Trifosfato

ITP: Inosina 5' – Trifosfato

NAD^+: Nicotinamida – Adenin – Dinucleótido

NADH: Forma reducida del NAD^+

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SDS – PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

TCA: Ácido Tricloroacético

UTP: Uridina 5' – Trifosfato

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA

Diseño de un procedimiento sencillo para la purificación de la F1– ATPasa de la mitocondria de *Ascaris suum*

Autor: Maritza De Los Ríos

Tutor: Dra. Zadila Suárez

RESUMEN

Ascaris lumbricoides es un helminto parásito cuya forma adulta habita en el intestino delgado del hombre y del cerdo. En respuesta a la baja tensión de oxígeno de su hábitat, la mitocondria de *Ascaris* es capaz de sintetizar ATP bajo condiciones anaeróbicas, utilizando ácidos orgánicos insaturados como aceptores finales de electrones. Estudios bioquímicos y estructurales de microscopía electrónica han demostrado la presencia de una F1-ATPasa en la membrana mitocondrial interna del parásito.

En el presente trabajo se describen tres procedimientos de purificación que representan modificaciones a la metodología propuesta por Li y col. (1996), para la purificación de la F1.ATPasa mitocondrial de corazón de cerdo. Por lo tanto, se propuso diseñar un procedimiento más sencillo y corto para la purificación del dominio catalítico F1 de la Fo.F1-ATP sintetasa de la mitocondria anaeróbica de *Ascaris lumbricoides* var. *suum*.

La F1-ATPasa de la mitocondria anaeróbica de *Ascaris* fue parcialmente purificada con los procedimientos descritos. Los estudios cinéticos y de inhibición con cationes divalentes, nucleótidos de trifosfato, azida de sodio y aurovertina, permitieron caracterizar al complejo enzimático; y demostrar que la preparación purificada corresponde a una F1-ATPasa. Los estudios cinéticos indicaron que el sustrato para la actividad hidrolítica de la enzima es el complejo ATP-Mg^{++}, confirmando la naturaleza F1 del complejo enzimático. Añadiéndose a la caracterización bioquímica de dicho complejo enzimático, la inhibición por parte de proteasas mitocondriales aisladas del parásito.

Con una de las metodologías de purificación descritas, se obtuvo una F1-ATPasa 32,73 veces más pura, con un rendimiento del 20 %; este último resultado fue descrito por Parra (1992). Una actividad específica de 40,27 unidades /mg, siendo este valor menor al 73 umoles/min/mg obtenidos por Parra (1992).

INTRODUCCIÓN:

Las F1.Fo-ATPasas (o F-ATPasas) están presentes en la membrana plasmática de las bacterias y en la membrana interna de las mitocondrias o cloroplastos. Ellas catalizan principalmente la síntesis de ATP pero puede funcionar en la dirección opuesta hidrolizando el ATP. En células eucariotas la mayoría del ATP es sintetizado por la F1.Fo-ATP sintetasa mitocondrial. Este complejo enzimático está constituido por dos dominios, F1 y Fo; F1 es el dominio catalítico, que es soluble en agua y está compuesto de cinco subunidades diferentes (α, β, γ, δ y ϵ), conservando una estequiometría $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. El dominio F1 puede ser separado de la membrana en forma activa y es capaz de hidrolizar el ATP. Fo es el dominio que está embebido en la membrana, forma el canal para el paso de protones y tiene el sitio de unión para el inhibidor específico de F1.Fo-ATP sintetasa, la oligomicina, la misma al combinarse con el dominio Fo, bloquea la translocación de protones y la síntesis e hidrólisis de ATP.

Ascaris lumbricoides es un helminto parásito cuya forma adulta habita en el intestino delgado del hombre y del cerdo. En respuesta a la baja tensión de oxígeno de su habitat, la mitocondria de *Ascaris* es capaz de sintetizar ATP bajo condiciones anaeróbicas. Estudios bioquímicos y estructurales bajo el microscopio electrónico han demostrado la presencia de una F1-ATPasa en la membrana mitocondrial interna de este parásito.

El presente trabajo, propuso diseñar un procedimiento más sencillo para la purificación del dominio catalítico F1 de la F1.Fo-ATP sintetasa de la mitocondria anaeróbica de *Ascaris lumbricoides* variedad *suum*. Para la purificación del dominio F1 se emplearon modificaciones a la metodología propuesta por Li y col. (1996), para la purificación de la F1-ATPasa mitocondrial de corazón de cerdo.

CAPÍTULO I
EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La ascariasis es una enfermedad parasitaria que afecta a las poblaciones rurales tanto en Venezuela como en el resto del mundo, ella consiste en una infección gastrointestinal producida por el helminto *Ascaris lumbricoides*, que en los bovinos afecta su rendimiento.

La forma adulta del parásito, posee un metabolismo energético anaeróbico en respuesta a la baja tensión de oxígeno en el intestino delgado del hospedador. Estudios bioquímicos y de microscopía electrónica indican la presencia del dominio catalítico de la F1.Fo-ATP sintetasa en la mitocondria anaeróbica de *Ascaris*.

En el año 1992, Parra purificó con un 85% de pureza la F1-ATPasa de la mitocondria de *Ascaris lumbricoides* var. *suum* . Posteriormente, en el año 1996, Li y col. describieron un procedimiento más corto para la purificación de la F1-ATPasa de la mitocondria del corazón de cerdo, que consiste de la extracción con cloroformo de las partículas submitocondriales, fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía en Sephadex G-200. El procedimiento utilizado por Parra consume bastante tiempo. Por ello, en el presente trabajo se utilizó una modificación del procedimiento de purificación descrito por Li y col., para la purificación de la F1-ATPasa de la mitocondria de corazón de cerdo. La modificación consistió básicamente, en introducir un paso de cromatografía de afinidad en Matrex-Blue, con el fin de eliminar una proteína contaminante de 68 Kda (kilodalton) presente en la mitocondria de *Ascaris*, y de sustituir la cromatografía en Sephadex G-200 por Sephadex G-150. Con esta nueva metodología de purificación que consume menos tiempo, se esperaba obtener una enzima con mayor grado de pureza y rendimiento.

Durante el desarrollo experimental de la investigación, se pretendió dar respuesta a las siguientes interrogantes: ¿Cuáles son los razgos más importantes que

hay que tomar en cuenta para la caracterización bioquímica de la enzima F1-ATPasa?, ¿Son las subunidades α y β de la F1 susceptibles a degradación por proteasas aisladas de la mitocondria del parásito?, ¿Cuáles son las semejanzas o diferencias que se establecen entre el procedimiento descrito por Parra (1992) y el nuevo método en términos de grado de pureza, rendimiento y actividad específica de la enzima?.

Objetivo General

Diseñar un procedimiento para la purificación de la F1-ATPasa de la mitocondria de *Ascaris suum*, basándose en los protocolos de purificación de Li y col. (1996) y de Parra (1992), con la finalidad de mejorar y acortar el tiempo de purificación de dicha enzima para mejorar su rendimiento y caracterización.

Objetivos específicos

- Aislar y purificar la F1-ATPasa de la mitocondria del músculo de *Ascaris*.
- Caracterizar bioquímicamente el complejo enzimático purificado. Formará parte de esta caracterización:
    a) Determinación del peso molecular y de la composición de subunidades del complejo purificado.
    b) Determinación del efecto de inhibidores específicos de la F1-ATPasa sobre la actividad de la enzima purificada.
    c) Determinación de las constantes cinéticas Km y Vmax.
    d) Determinación de la susceptibilidad de la F1-ATPasa purificada de la mitocondria de *Ascaris* a sufrir inhibición y degradación por proteasas, aisladas de la mitocondria del parásito.
- Comparar la F1-ATPasa purificada por el nuevo método, con la enzima purificada mediante el procedimiento descrito por Parra (1992) tomando en cuenta los siguientes criterios:
    a) Grado de Pureza
    b) Rendimiento
    c) Actividad específica de la enzima

Justificación de la Investigación

Estudios previos realizados en el laboratorio de Bioquímica de Parásitos por Parra (1992), permitieron la purificación de la F1-ATPasa mitocondrial de *Ascaris*. El procedimiento con una duración de dos semanas, permitió obtener una enzima 85% pura con un rendimiento el 20% y una actividad específica de 73 *u*moles/min/mg.

Con la metodología propuesta, se pretendió acortar el procedimiento de purificación de la F1-ATPasa de la mitocondria de *Ascaris*, con el fin de avanzar en la caracterización bioquímica de la enzima. Formó parte de los estudios bioquímicos, determinar la susceptibilidad de la enzima purificada a ser degradada por proteasas presentes en la mitocondria del parásito.

El procedimiento a emplear, consistió de un paso inicial de solubilización del dominio F1 de la membrana con cloroformo, ya que se ha demostrado que este complejo solubilizado de las membranas es incapaz de sintetizar ATP, pero conserva la capacidad de hidrolizarlo, de allí que se le conoce como F1-ATPasa. La solubilización es seguida por precipitación con sulfato de amonio y cromatografías de exclusión molecular y de afinidad.

Estudios realizados por Suzuki y col. (1997) indicaron que la proteasa mitocondrial LON fue capaz de hidrolizar las subunidades α, β y γ de la F1-ATPasa *Saccharomyces cereviciae*; lo que justifica que en este trabajo se utilice una preparación purificada de la F1-ATPasa como sustrato para la proteasa LON y para otras proteasas presentes en la mitocondria del parásito *Ascaris suum*. La comparación de los resultados de esta investigación con los obtenidos con la enzima LON de levadura, permitió determinar si se conservan los sitios de degradación en ambas enzimas.

Finalmente, esta investigación representa un aporte valioso para la caracterización estructural y funcional de la F1-ATPasa de un organismo anaeróbico, parásito del hombre y del cerdo.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

Antecedentes de la Investigación

En 1992, la Licenciada Karlett Parra en el laboratorio de Bioquímica de Parásitos de la Universidad Simón Bolívar, purificó la F1-ATPasa mitocondrial del músculo de la lombriz parásito del cerdo *Ascaris suum*. Este procedimiento se inició con la extracción con cloroformo del dominio F1 de la membrana mitocondrial interna. La F1 solubilizada se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Celulosa, centrifugación de las fracciones activas de DEAE-Celulosa en un gradiente de glicerol, cromatografía de afinidad en Matrex-Blue y cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-150. Como resultado, obtuvo una enzima de 85 % de pureza, con una actividad específica de 73 *u*moles/min/mg y un rendimiento del 20 %.

Para 1996, Sheng-Guang Li y colaboradores en el Laboratorio Nacional de Biomacromoléculas en China, purificaron la F1-ATPasa mitocondrial del corazón de cerdo, siguiendo el procedimiento de extracción con cloroformo del dominio F1. La enzima solubilizada fue sometida a precipitación con sulfato de amonio al 52,5 % de saturación y a cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-200. Obtuvieron una enzima con una actividad específica de 90 – 130 unidades/ mg proteína.

Bases Teóricas Referenciales

Ascaris lumbricoides

Es el gusano cilíndrico no segmentado más grande, que parasita el intestino delgado de humanos y de cerdos (Figura 1). Es el nemátodo de mayor prevalencia en humanos y ocurre endémicamente en todas partes del mundo, excepto en regiones de clima frío y seco.

Figura 1. *Ascaris lumbricoides*

Su cuerpo, está revestido por una cutícula pluriestratificada a la que le siguen la epidermis y un estrato de fibras musculares. El aparato digestivo es completo, y entre éste y la pared del cuerpo se inserta una amplia cavidad llamada seudocele. El cuerpo no se presenta subdividido en regiones claramente diferenciadas, por lo cual se indica como porción anterior aquella donde se encuentra localizado el principal complejo nervioso, es decir, el llamado anillo nervioso. La porción posterior o caudal, es la situada en la extremidad opuesta.

En su cuerpo, la cutícula está formada por tres estratos, de los cuales el más externo, llamado córtex, contiene una sustancia afín a la queratina; al córtex le sigue el denominado estrato homogéneo, constituido por elementos fibrilares; el tercer estrato, consiste en fibras conjuntivas y limita con una delgada membrana llamada basal. La cutícula rodea todo el cuerpo como un forro y se repliega a la altura de las aberturas genital, anal y bucal, prosiguiendo en el interior, donde reviste los conductos que desembocan en estas aberturas. Precisamente por su estructura, en las especies parásitas del aparato digestivo del hombre y de los animales, la cutícula

representa una válida defensa contra la acción demoledora de los jugos gástricos. La epidermis que sigue a la cutícula, se hace más gruesa, sobresaliendo en la cavidad del seudocele. Por debajo de la epidermis se halla un estrato muscular; la célula muscular está formada por dos porciones, una fibrilar adosada a la epidermis y una citoplasmática que contiene el núcleo y sobresale en la cavidad del cuerpo. De la porción citoplasmática salen con frecuencia unas prolongaciones que se ponen en contacto con los cordones nerviosos ventral y dorsal. La musculatura, constituida por un único estrato de células, está divida en cuatro campos musculares, dos dorsales y dos ventrales, y por las cuerdas longitudinales (Municio, 1997).

El aparato digestivo empieza con la abertura bucal, situada a la altura de la extremidad anterior del cuerpo, y termina con la abertura anal; la abertura bucal está rodeada por seis labios abovedados coronados por protuberancias. En el exterior de este primer anillo labial de seis elementos sensoriales hay otro constituido por seis papilas o filamentos. Sigue una tercera serie de cuatro papilas o filamentos, exterior a los labios y llamada cefálica. La abertura bucal, comunica con el estoma, una cavidad no muy amplia. Al estoma sigue una cavidad alargada, llamada protostoma, que comunica a otra, en general más ancha que larga, el telostoma. A la cápsula bucal sigue el esófago o faringe. Una válvula faringeointestinal comunica la faringe con un largo tubo, el intestino; entre este y el recto existe también una válvula denominada precisamente válvula intestino – rectal. El recto es un corto tubo previsto de grandes glándulas unicelulares cuyo número varía según se trate de machos o de hembras. La abertura anal, es una fisura transversal situada en la parte ventral (Municio, 1997).

El sistema nervioso de este parásito está constituido por un anillo nervioso que rodea la faringe y al que están asociados algunos ganglios. Del anillo nervioso parten seis nervios, que se dirigen hacia la extremidad anterior del cuerpo, donde se ramifican los nervios de las papilas sensoriales del complejo labial que rodea la abertura bucal. Del anillo nervioso y de los ganglios asociados a éste parten luego hacia la extremidad posterior del cuerpo algunos nervios. Los órganos sensoriales están representados sobre todo por filamentos y papilas. Como ya se ha visto, a la

altura de la corona labial existen numerosos filamentos. Se tratan de formaciones cuticulares, cada una de las cuales contiene una fibra nerviosa que alcanza el nervio papilar; igualmente conectadas al nervio están las papilas, que a veces sustituyen a los filamentos (Municio, 1997).

Las hembras del parásito tienen dos gónadas, es decir, dos ovarios orientados uno hacia el extremo anterior y el otro hacia el extremo caudal. En la gónada, se pueden observar dos zonas, en cada una de ellas se hallan células germinales en diversos estadios de maduración. La primera zona, denominada germinativa, se caracteriza por la presencia de oogonios en división activa. La segunda zona, llamada de crecimiento, sigue a la primera y contiene, ovocitos en vitelogénesis. El ovario continúa en un oviducto y generalmente termina en un receptáculo seminal en el que se conservan los espermatozoides introducidos por el macho durante el acoplamiento. Un esfínter separa el oviducto del útero, este órgano esta subdividido en tres zonas, de las cuales el último tracto, representa un depósito en el que se almacena los huevos fecundados para luego ser puestos; el útero desemboca en una vagina comunicada con el exterior mediante un poro genital, la vulva. Una hembra de *Ascaris lumbricoides*, parásita del intestino humano, puede poner 200.000 huevos en una sola jornada y unos 60 millones durante su período de actividad sexual; el huevo, en general de contorno elíptico o esférico, es fecundado cuando, después de haber atravesado el oviducto, pasa a través de la vesícula seminal en la que se hallan los espermatozoides maduros introducidos por el macho en el curso del acoplamiento. Después de la penetración del espermatozoide se forma en torno al huevo una membrana de fecundación, con objeto de impedir la entrada de otros espermatozoides, dicha membrana, tiende a aumentar de grosor tras depositarse uno o más estratos de sustancias proteicas a la altura de su cara interna, de este modo se origina una verdadera cubierta. El nematodo que sale del huevo se encuentra en el primero de una serie de cuatro estadios larvales que se suceden a través de otras tantas mudas. La muda supone un proceso necesario para permitir que el animal crezca, y consiste en la eliminación de todas las estructuras rígidas cuticulares, que

son luego reconstituidas. Al final del desarrollo embrional, ciertos órganos, como la faringe y el aparato excretor, están constituidos por un número de células que seguirá siendo constante durante toda la vida del individuo. En el testículo del macho se distinguen una zona germinativa y una zona de crecimiento; la zona germinativa contiene protogonios y espermatogonios, mientras que en la zona de crecimiento presenta espermatocitos y espermátidos. Al testículo sigue un gonoducto diferenciable en un canal aferente, cuyo tracto terminal está representado por un canal eyaculador que desemboca en el recto, transformado así en una cloaca. Los machos están provistos de una o dos espículas de diversa estructura, que tienen la función de enchansar los labios de la vulva de la hembra durante el acoplamiento. Las espículas tienen su origen en dos aglomeraciones celulares, los esbozos de las espículas, que se desarrollan en la pared dorsal del recto (Municio, 1997).

La especie que parasita al hombre se conoce como *Ascaris lumbricoides,* mientras que en el cerdo el parásito se conoce como *Ascaris lumbricoides* variedad *suum* o *Ascaris suum.* Se ha observado que estas variedades son idénticas desde el punto de vista morfológico, pero no del fisiológico: las formas larvales provenientes de un huésped no se desarrollan en el otro y viceversa (Municio, 1997).

En el *Ascaris lumbricoides*, los sexos están separados y el dimorfismo sexual es notable: la hembra alcanza los 35 cm de longitud, mientras que el macho difícilmente supera los 25 cm y, además, se reconoce con extrema facilidad porque tiene la extremidad posterior del cuerpo delgada, arqueada y provista de dos espículas copuladoras. El parásito vive en el intestino delgado, donde la hembra expulsa los huevos fecundados y no fecundados. Los primeros son esféricos y provistos de una cubierta gruesa e irregular, mientras que los segundos presentan una forma ovoidal y carecen de la gruesa cubierta que caracteriza a las células sexuales fecundadas. Estas son expulsadas con las heces y pueden llegar a la tierra donde, en mejores condiciones de temperatura y humedad, en dos o tres semanas se desarrollan, dando lugar a una larva que permanece encerrada en la cubierta. Si los huevos que contienen los embriones son ingeridos por el hombre, una vez que han alcanzado el intestino

delgado se abren, liberando las larvas, que después de haber perforado la pared intestinal llegan a los capilares pulmonares a través del sistema circulatorio y a la parte derecha del corazón. En los capilares pulmonares las larvas crecen y posteriormente se trasladan a los alvéolos, alcanzan a los bronquios y la tráquea y son ingeridas y encauzadas hacia el intestino delgado, donde alcanzan la madurez sexual. Los daños producidos por el parásito pueden ser muy graves. En primer lugar, lesiones a nivel pulmonar, provocadas por las larvas en el curso de sus migraciones. Los daños producidos por los adultos son de diversa naturaleza: si los individuos son pocos pueden incluso pasar inadvertidos, pero si la infectación es masiva entonces tiene consecuencias graves, como, por ejemplo, una intensa irritación de la pared intestinal y sobre todo oclusiones intestinales debidas al hecho de que los nemátodos tienden a aglomerarse formando masas compactas. A veces los parásitos abandonan su sede típica y se trasladan, por ejemplo, al apéndice, a las vías biliares y al hígado. Un cierto número de personas reacciona a la presencia del ascárido con manifestaciones alérgicas ligadas a la producción, por parte del parásito, de determinadas sustancias. Este nematodo está difundido en todo el mundo y centenares de millones de personas están infectadas por él (Municio, 1997).

Las ascariasis es una infección parasitaria causada por *Ascaris lumbricoides* y constituye la infección helmíntica más común en humanos, infecta a una quinta parte de la población mundial y su más alta frecuencia ocurre en las poblaciones rurales de zonas tropicales. En los Estados Unidos de América un estudio de parasitosis porcina reveló una prevalencia de 60% de Ascaris en cerdos criados para comercio. Esto tiene implicaciones económicas para los productos de cerdo, ya que la ascariasis está asociada con una reducida eficiencia para convertir los alimentos, lo que conlleva a pérdidas económicas de 3.5 a 6. 0 $ por cerdo, esto sin incluirle costo promedio de 1.00$ por cerdo, para droga desparasitante (Parra, 1992). A esto hay que añadirle que sobre todo en los cerdos jóvenes la migración de las larvas provoca graves daños pulmonares, que a veces se resuelven en pulmonías con resultado mortal (Municio, 1997).

Metabolismo del *Ascaris*

En comparación con animales superiores, el Ascaris posee un número mayor de estrategias metabólicas para la formación de ATP. El metabolismo energético del Ascaris es similar, al menos en parte al metabolismo de otros parásitos y de invertebrados de vida libre y de aguas profundas.

Gracias a estudios anteriores realizados por Saz en 1981, se logró demostrar que el adulto de *Ascaris* sobrevive por más tiempo bajo condiciones anaeróbicas, ya que se encontró que en presencia de oxígeno el parásito forma y acumula peróxido de hidrógeno que es tóxico para el organismo.

El Ascaris es capaz de obtener energía por los dos principios de conservación de la misma. Mediante la fosforilación a nivel de sustrato, donde parte de la energía libre contenida en un sustrato degradable es inicialmente conservada como un intermediario rico en energía, a partir del cual es transferida al portador universal de energía, el ATP. Y en segundo lugar, mediante la fosforilación acoplada al transporte de electrones por medio de un gradiente electroquímico de protones, el cual constituye la fuerza electromotriz para la síntesis de ATP.

Mitocondria del músculo de *Ascaris*

Estudios a nivel ultraestructural han demostrado que la mitocondria del músculo de *Ascaris suum* contiene un pequeño número de crestas en forma tubular (Van den Bossche, 1974). Por otro lado, Chance y Parsons (1963) han observado la presencia de esferas de 80 Å en la superficie de la membrana mitocondrial interna del parásito. La similitud morfológica de estas esferas con la F1-ATPasa presente en la membrana interna de mamíferos hicieron sugerir que la mitocondria de Ascaris también contiene ATPasa (Parra, 1992).

Diversos estudios han evidenciado que el sistema de transporte de electrones en Ascaris utiliza ácidos orgánicos insaturados, tales como el fumarato y enoil-CoAs de cadena ramificada con grupos metilo en el carbono 2, como aceptores finales de electrones en lugar de oxígeno. Estos compuestos son productos parcialmente oxidados del metabolismo de carbohidratos (Kôhler, 1985; Komuniecki y col., 1985).

F1.Fo-ATPasa

Peter Mitchell en 1961, postuló que la síntesis de ATP por medio del complejo ATPasa depende de un gradiente electroquímico de protones. En esencia, la formación de un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial durante el transporte de electrones, es el evento primario en la conservación de la energía (Stryer, 1995).

Para estudiar el mecanismo de la fosforilación oxidativa son de gran utilidad las partículas submitocondriales que se obtienen mediante la fragmentación por ultrasonidos de la membrana interna mitocondrial.

Para extraer la F1-ATPasa mitocondrial, primero se separan las mitocondrias de otros organelos y restos celulares por medio de la centrifugación diferencial, las mismas son sonicadas para obtener las partículas submitocondriales que se caracterizan porque la F1 está orientada hacia el lado externo de la membrana. El componente F1 es extraído de las partículas submitocondriales a través del tratamiento con cloroformo (Figura 2).

Estudios de reconstitución (Futai y Kanazawa, 1983) demostraron que cuando la F1-ATPasa solubilizada se incorpora a membranas depletadas de ésta, el complejo F1.Fo restaura su actividad ATP sintetasa, con lo que se comprueba el papel catalítico de la F1-ATPasa.

La ATP sintasa aparece en forma de proyecciones esféricas que emergen de la superficie externa de estas vesículas invertidas (Figura 2). En mitocondrias intactas, estas proyecciones de 85 Å de diámetro aparecen en el lado de la matriz de la membrana interna mitocondrial. En 1960, Efraim Racker descubrió que esta especie de protuberancias o pomos podían desprenderse por agitación mecánica. Las partículas submitocondriales así tratadas pueden transferir electrones a través de su cadena de transporte electrónico, pero no son capaces de sintetizar ATP. Por el contrario, las esferas de 85 Å separadas pueden catalizar la hidrólisis del ATP (Stryer, 1995), de allí se le confiere el nombre de ATPasa.

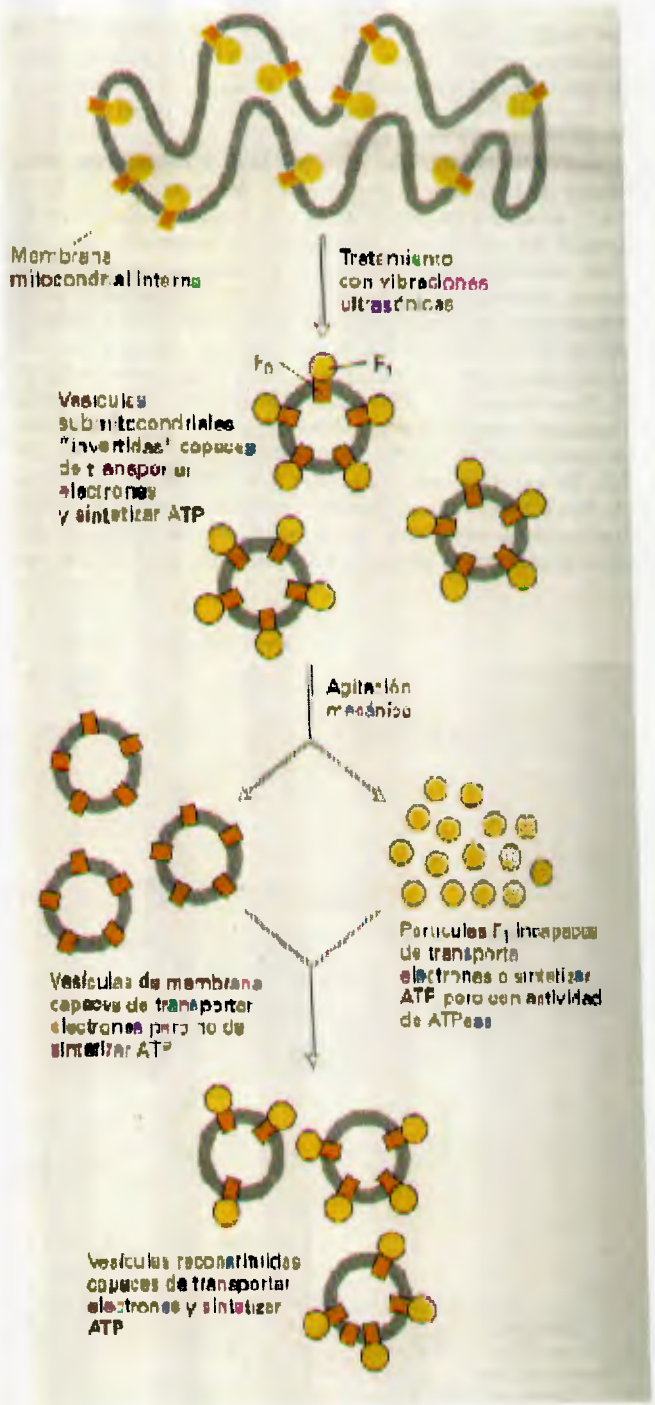


Figura 2. Obtención de las partículas F1 mitocondriales. Tomado de Biología Celular y Molecular (Lodish y col., 2002)

Racker descubrió que la adición de estas esferas con actividad ATPasa a partículas submitocondriales carentes de ellas, restauraba su capacidad para sintetizar ATP. A estas esferas se les denominó F1; el papel fisiológico del dominio F1 es catalizar la síntesis de ATP. La actividad ATPasa desarrollada por las partículas F1 solubilizadas (en ausencia de gradiente de protones) es el proceso inverso de su reacción fisiológica principal. La F1 está formada por cinco clases de cadenas polipeptídicas con estequiometría de α_3 β_3 γ δ ϵ: Este complejo tiene una masa molecular de 378 Kda. La ATP sintasa también recibe el nombre de F1.Fo-ATPasa (Stryer, 1995).

El componente F1 de la F1.Fo-ATPasa es identificado como esferas uniformemente distribuidas, de 90 Å de diámetro que sobresalen de la membrana y que están conectadas a esta por un estrecho cuello de aproximadamente 30 Å de diámetro y 40 Å de longitud (Amzel y Pedersen, 1983). El cuello que conecta el dominio F1 al dominio Fo está formado por varias proteínas diferentes. Una de la proteínas de Fo, confiere al complejo su sensibilidad a la oligomicina, un antibiótico que bloquea la síntesis de ATP al impedir el paso de protones. (Stryer, 1995).

Las funciones de la F1.Fo-ATP sintetasa (H^+-ATPasa) incluyen: servir de poro para el movimiento unidireccional de protones a través de la Fo en la membrana (translocación), la interacción directa de los protones con F1 (acoplamiento) y la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi (catálisis) (Parra, 1992).

La porción F1 es un complejo hidrosoluble de cinco polipéptidos bien definidos, con una composición α_3 β_3 γ δ ϵ. Las subunidades α y β se asocian en orden alternante para formar un hexámero, $\alpha\beta$ $\alpha\beta$ $\alpha\beta$ o $(\alpha\beta)_3$. Este hexámero descansa sobre la única subunidad γ larga, cuya parte inferior es una doble hélice que encaja dentro del anillo de la subunidad **c** de Fo. La subunidad ϵ está unida a γ y es probable que también haga contacto con las subunidades **c** de Fo. La subunidad δ del complejo F1 entra en contacto con la subunidad **b** del complejo Fo; en conjunto, estas subunidades forman un "estator" rígido que impide la rotación del hexámero $(\alpha\beta)_3$ mientras descansa sobre la subunidad γ (Figura 3).

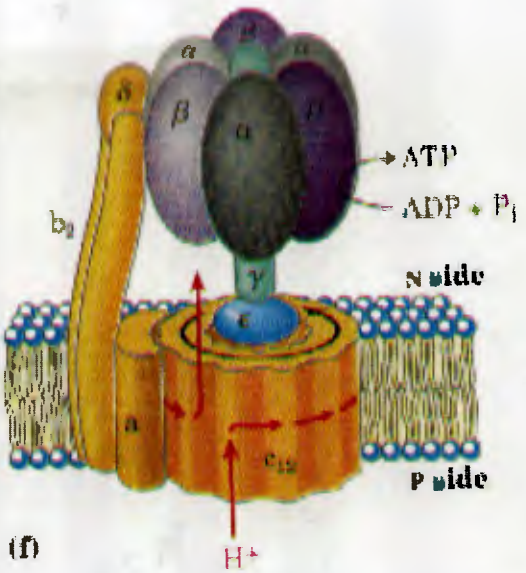


Figura 3. Estructura del complejo F1.Fo, deducida de estudios bioquímicos y de cristalografía. Las dos subunidades **b** de Fo están firmemente asociadas con las subunidades α y β de la F1, sujetada fijamente a la membrana. En Fo, un cilindro de subunidades **c** se encuentra embebido en la membrana y es atado al dominio F1 por las subunidades δ y ε. Un flujo de protones se produce del lado P de la membrana hacia el lado N por vía Fo. El cilindro y la columna rotan, y la subunidad β de la F1 sufre cambios conformacionales, al interactuar con la subunidad γ . Tomado de Lehninger Principles of Biochemistry (Nelson y col., 2000).

Fo está ubicado dentro de la membrana y conforma el canal transmembrana a través del cual fluyen los protones hacia F1. El componente Fo posee tres tipos de subunidades: **a b** y **c**; en las bacterias la composición de las subunidades es $\mathbf{a}_1\ \mathbf{b}_2\ \mathbf{c}_{9\text{-}12}$. Las subunidades **c** forman un anillo grueso como una rosquilla en el plano de la membrana. Se cree que cada subunidad **a** atraviesa la membrana ocho veces, cada subunidad **b**, una sola vez, y cada subunidad **c**, dos veces. En las mitocondrias, cada complejo Fo también contiene, según la especie, de dos a cinco péptidos adicionales de función desconocida. Cuando se incorpora Fo de manera experimental en liposomas, la permeabilidad de las vesículas a los H^+ se estimula mucho, lo cual indica que realmente forma un canal protónico. Cada copia de subunidad c contiene dos hélices α, que van de una superficie de la membrana a la otra (Lodish y col.,

2002). El canal protónico se ubica en la interfase entre las subunidades **a** y **c** (Figura 3).

Tres de las seis subunidades de la F1, contienen los sitios de enlace del ADP y del fósforo inorgánico. Para la formación del ATP, este mecanismo energético requiere de cambios repetitivos en la conformación proteica, dichos cambios se producen gracias a la rotación del tallo. De esta forma, la síntesis de ATP es capaz de producir más de 100 moléculas de ATP por segundo. Tres de los cuatro protones son necesarios para que pase a través de este maravilloso mecanismo para hacer cada molécula de ATP (Alberts y col., 2002).

Paul Boyer formuló una hipótesis acerca del mecanismo para la formación del ATP, aquí Boyer explica que el movimiento de protones a favor de un gradiente electroquímico a través de los canales formados por Fo, produce rotación y cambios conformacionales en F1 que alteran la afinidad de la proteína para ADP, Pi y ATP (Karp, 2001).

Según la hipótesis de Boyer de "cambio de enlace", cada pieza de la cabeza F1 contiene tres sitios catalíticos (uno por cada subunidad β) que varían progresivamente a través de tres diferentes conformaciones, según se refleja en su afinidad por nucleótidos (Figura 4). Estas tres conformaciones pueden describirse como la conformación "apretada" o T, en la cual los nucleótidos (ADP + Pi o ATP) están firmemente unidos; la conformación "laxa"o L, en la cual ADP y Pi están laxamente unidos; y la conformación "abierta" u O, la cual debido a su muy escasa afinidad por nucleótidos se considera que está vacía. Esta hipótesis expone que, el ADP y Pi se enlazan laxamente al sitio catalítico en la conformación L. A continuación los protones se enlazan a la enzima en los sitios alostéricos que enfrentan el espacio intramembranal donde la concentración de H^+ (protones) es alta. Una vez enlazados, su flujo a través de Fo produce cambios de conformación que aumentan la afinidad del sitio catalítico para ADP (Adeno sin difosfato) y Pi (fósforo inorgánico), provocando que estos reactantes se unan con mucho mayor firmeza a la enzima. A continuación los reactantes se condensan en forman espontánea para

formar ATP, que permanece fuertemente enlazado al sitio activo en la conformación T. En seguida, la enzima sufre un cambio de conformación que expone el sitio alostérico de enlace a protones al lado de la membrana correspondiente a la matriz, donde la concentración de H^+ es baja. La disociación de los protones de la enzima en la matriz cambia la conformación del sitio catalítico, disminuye su afinidad por el ATP enlazado y se libera el producto dentro de la matriz (Karp, 2001).

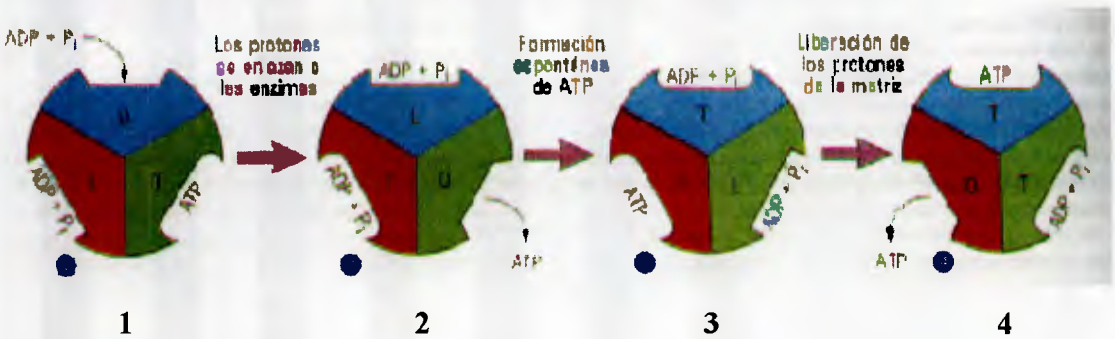


Figura 4. Hipótesis de "cambio de enlace" como mecanismo por el cual el gradiente de protones es requerido para la síntesis de ATP. Los pasos numerados se refieren a la secuencia de acontecimiento que ocurren en la subunidad de color rojo. Lo más importante es que el enlace de protones a la enzima en el lado citoplásmico de la membrana provoca un cambio de conformación (desde el paso 1 hasta el 2), que da como resultado el enlace firme de ADP y de Pi en el sitio catalítico de la enzima. A continuación, la formación de ATP ocurre de manera espontánea. La liberación subsecuente de protones al interior de la matriz causa un segundo cambio de conformación (pasos 3 a 4) que libera el ATP recién formado. Tomado de Biología Celular y Molecular (Karp, 2001).

Se cree que los cambios de conformación del sitio activo se acompañan de la rotación de la cabeza F1 en relación con su tallo, llevando los sitios catalíticos a posiciones sucesivas para interactuar con los protones que viene a través del canal Fo.

Las tres subunidades mayores del complejo enzimático F1.Fo-ATPasa, $\alpha\ \beta\ \gamma$ son semejantes en mitocondrias de bacterias y cloroplastos. Lo que sugiere que estas subunidades pueden ser estructuralmente similares y funcionalmente equivalentes en los complejos F1-ATPasa de las especies estudiadas (Parra, 1992).

Se observa que las subunidades β son más conservadas evolutivamente que las α, lo que refleja una mayor participación de β en el mecanismo de catálisis. Tanto α como β son esenciales para la actividad ATPasa. β posee el sitio de unión del péptido inhibidor endógeno de la actividad ATPasa en la F1 mitocondrial y el sitio de unión de fósforo inorgánico en todos los complejos F1 estudiados. Aunque las dos son capaces de enlazar ATP, α une ATP con una afinidad mucho mayor, aún en ausencia de cationes divalentes, mientras que β lo une menos fuerte y solo en presencia de cationes divalentes. Los sitios catalíticos del complejo parecen que se encuentran en la interfase α/β. La observación que alteraciones estructurales de β y la modificación covalente de la F1-ATPasa producen la pérdida completa de la actividad ATPasa de la F1, han permitido definir a β como la subunidad catalítica, sin descartar la participación de α en la catálisis. Para reconstruir la actividad ATPasa del complejo solo requieren de α, β y γ (Parra, 1992).

δ y ϵ se requieren para la reconstitución de un complejo F1.Fo-ATP sintetasa funcional pero no para la reconstitución de la actividad ATPasa. δ es indispensable para la conexión entre estos dos sectores y es responsable, al menos en parte, del acoplamiento de protones durante la fosforilación oxidativa. ϵ se comporta como inhibidor de la ATPasa en la F1 de E.coli y de cloroplasto; posiblemente haga lo mismo que el péptido inhibidor endógeno de la F1 mitocondrial (Parra, 1992).

Los pesos moleculares de las subunidades que forman este complejo enzimático son; 54 Kd la subunidad α, 51 Kd la subunidad β, 30,2 Kd la subunidad γ, 21 Kd la subunidad δ y 16 Kd la subunidad ϵ (Kagawa y col., 1980).

Pullman y Monroy en 1963, aislaron y caracterizaron un péptido que forma parte del dominio F1 y lo llamaron, péptido inhibidor de la actividad ATPasa, el cual inhibe su actividad hidrolítica cuando está unido a ella, pero no afecta su capacidad sintetasa del complejo F1.Fo-ATPasa.

Para 1988, Yamada y Huzel, aislaron y purificaron otro componente de naturaleza proteica el cual también inhibe la actividad ATPasa de la F1 mitocondrial, este componente es distinto al inhibidor de Pullman y Monroy; este se llamó

inhibidor enlazante de calcio y se ha demostrado que ambos inhibidores difieren en su estructura, en sus propiedades bioquímicas e inmunológicas y en su regulación.

El ADP resultó ser un fuerte inhibidor competitivo de la hidrólisis del ATP catalizada por la F1-ATPasa de *Ascaris*. Por esta razón se utilizó un sistema enzimático acoplado para medir la actividad ATPasa, donde el ADP se reconvierte en ATP por acoplamiento de la hidrólisis del ATP con la oxidación enzimática del NADH a través del sistema enzimático, Piruvato Quinasa (PK) – Lactato Deshidrogenasa (LDH) (Pullman y col., 1960).

La actividad enzimática de la ATPasa, igual que la F1 mitocondrial de los organismos aerobios, mostró absoluta dependencia de cationes divalentes, observándose máxima actividad cuando el magnesio estaba presente. La tendencia en organismos anaeróbicos es hacia una menor afinidad por ATP; el Km puede ser hasta tres veces mayor, mientras que la actividad específica puede llegar a ser un orden de magnitud superior en la enzima de los organismos aerobios (Parra, 1992). La función de la ATPasa de organismos anaerobios, que no presentan fosforilación acoplada a un transporte de electrones, es la hidrólisis del ATP.

Desde hace mucho tiempo se sabe que la mitocondria contiene sus sistemas de degradación de proteínas. Sin embargo, solo recientemente los genes para las proteasas mitocondriales han sido identificados permitiéndonos conocer el papel de la degradación de proteínas en la biogénesis mitocondrial (Rep y Grivell, 1996). En general la degradación de proteínas puede tener varias funciones: 1) protectora a través de la remoción de polipéptidos que son dañinos para la célula, 2) reguladora, controlando las concentraciones de enzimas o proteínas reguladoras y 3) metabólica, por la liberación de aminoácidos que son posteriormente usados para otros fines o propósitos.

Las subunidades de las enzimas que participan en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa son los blancos principales para la proteólisis. Estas enzimas constituyen el 50 % del contenido proteico de la membrana mitocondrial interna y están constituidas por una combinación de subunidades que son codificadas

por el genoma mitocondrial o nuclear. El recambio de subunidades es por tanto necesario para prevenir la acumulación de subunidades individuales y de sub-complejos en la membrana mitocondrial interna que pueden interferir con los procesos de ensamblaje o cambiar las propiedades de la membrana mitocondrial interna (Rep y Grivell, 1996).

Las proteasas mitocondriales pueden ser divididas en dos grupos: las proteasas que participan en el procesamiento de proteínas precursoras mediante la separación del péptido señal en la región amino-terminal (MPP: proteasa procesadora mitocondrial) y las proteasas degradativas (LON, una proteasa de la matriz dependiente de ATP) (Rep y Grivell, 1996).

En 1997, los estudios realizados por Suzuki y colaboradores., indican que la proteasa mitocondrial LON fue capaz de hidrolizar las subunidades α, β y γ de la F1-ATPasa en la *Saccharomyces cereviciae.*

Sistema de Hipótesis

Hipótesis de la Investigación:

- El nuevo método es más efectivo en términos del tiempo requerido para la purificación de la enzima F1-ATPasa que el utilizado por Parra (1992).
- El nuevo método es más efectivo en términos del rendimiento de la enzima F1-ATPasa purificada, que el utilizado por Parra (1992).
- El nuevo método es más efectivo en términos del grado de pureza de la enzima F1-ATPasa purificada, que el utilizado por Parra (1992).

Hipótesis Nula:

- El nuevo método no es más efectivo en términos del tiempo requerido para la purificación de la enzima F1-ATPasa que el utilizado por Parra (1992).
- El nuevo método no es más efectivo en términos del rendimiento de la enzima F1-ATPasa purificada, que el utilizado por Parra (1992).
- El nuevo método no es más efectivo en términos del grado de pureza de la enzima F1-ATPasa purificada, que el utilizado por Parra (1992).

Sistema de Variables

Variable Independiente: El nuevo método

Variable Dependiente: La purificación de la enzima tomando en cuenta los indicadores; rendimiento, grado de pureza y actividad específica.

Variables Intervinientes: temperatura, pH, buffers de elusión de las columnas y residuos de proteínas contaminantes en los distintos recipientes.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Aislamiento de la fracción mitocondrial

La fracción mitocondrial del músculo del *Ascaris* se aisló por disección en frío, según el procedimiento de Saz y Lecure (1969). Cada 5 gramos de músculo fresco, se cortaron hasta convertirlos en papilla, se resuspendieron en 35 ml de medio mitocondrial (sacarosa 0,24 M, EDTA 5mM, BSA al 0,15 %, pH 7,4) y se homogenizaron en frío. El pellet mitocondrial se obtuvo por centrifugación diferencial. El homogenato se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos a 4 °C en un rotor SS-34 de la Sorvall. El sobrenadante resultante, se filtró a través de lana de vidrio en frío, y se centrifugó a 8500 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante usando una trampa de vacío que utiliza agua. El pellet resultante, que se disolvió y homogenizó corresponde a la fracción mitocondrial, cada 2 de los pellet fueron lavados en 35 ml de medio mitocondrial. El homogenato se centrifugó nuevamente a 8500 rpm durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante con una trampa de agua y, los pellet que contienen las mitocondrias intactas fueron congelados a -20 °C.

Obtención de las partículas submitocondriales

El sedimento mitocondrial correspondiente a 10 g de músculo se descongeló y resuspendió en frío, en 2 ml de buffer Tris.HCL de 10mM, pH 7,6, sacarosa 250mM, NaCl 5mM. La suspensión mitocondrial se sonicó tres veces en frío a 30 watts durante 15 segundos con un intervalo de enfriamiento de 1 minuto, con esto se obtuvo las vesículas de la membrana interna invertidas con la F1-ATPasa en el lado externo de la vesícula. El sonicado se centrifugó a 12000 rpm durante 60 minutos a 4°C usando un rotor SS-34 de la centrífuga Sorvall con el fin de precipitar las partículas submitocondriales. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer Tris.HCl 10 mM, pH 7,6, sacarosa 150 mM, NaCl 25 mM.

Solubilización de la F1 con cloroformo

La F1-ATPasa se solubilizó de la membrana por extracción con cloroformo. Se agregó cloroformo a la suspensión de partículas submitocondriales en una relación (v:v) 1:2 a temperatura ambiente. Se separan la fase acuosa de la fase orgánica por centrifugación durante 5 minutos a baja velocidad (3400 rpm) en una centrifuga de mesa, encontrándose en la fase acuosa la F1 solubilizada. La fase acuosa se sometió a centrifugación, a 105.000 xg por 1 hora a 15 °C en una Ultracentrífuga Beckman L8-70 usando un rotor Ty- 65. Al sobrenadante de esta centrifugación (S_{105}) que contiene la F1 solubilizada, se le agregó glicerol al 10% (v/v) y se conservó en frío a 4 °C.

Ensayos enzimáticos

La actividad ATPasa se determinó por dos procedimientos distintos:

1) Cuantificando el fósforo inorgánico producido durante la siguiente reacción: ATP + H_20 -------ADP + Pi. El ensayo enzimático, con un volumen final de 1 ml contenía: Tris.HCl 1,5M, pH 7,6, MgCl 30 mM, TCA 50%, 30 mM ATP y la fracción enzimática. El volumen deseado se completó con agua destilada. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 15 minutos y la reacción se detuvo por adición de 0,1 ml de TCA al 50%. Para cada mezcla se realizó un control que permitió determinar el contenido de Pi endógeno dentro de la fracción enzimática, a través de la adición de TCA antes de la incubación.

Una vez finalizada la incubación, la mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Sorvall con un rotor SS-34, con el fin de precipitar proteínas.

El Pi presente en alícuotas del centrifugado se cuantificó, siguiendo el procedimiento descrito por Fiske y Subbarow (1925). Se realizó una curva de calibración para el Pi con una solución estándar de KH_2PO_4 1 mM en TCA 8%. Se prepararon estándares desde 0 hasta 0,2 ml que contenían distintas concentraciones de PO_4 completando hasta un volumen final de 0,2 ml de TCA 8%. A cada tubo que contenía 0,2 ml del estándar se le añadió 0,7 ml de Reactivo 1, también llamado

Reactivo Fiske (2 g de molibdato de amonio disueltos en 100 ml de H_2SO_4 2 N aforados hasta 350 ml con agua destilada) y 0,1 ml de Reactivo 2 (2 g de sulfato ferroso disueltos en H_2SO_4 1 N en un volumen final de 5 ml). Se midió la absorbancia a 830 nm después de 5 minutos utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A. La unidad de actividad ATPasa fue expresada en *u*moles de sustrato transformado por minuto.

Los ensayos de caracterización de la F1-ATPasa, de los cuales forman parte, especificidad de nucleótidos de trifosfato, inhibidores, afinidad por cationes divalentes y la cinética de la enzima fueron realizados utilizando el método de Fiske y Subbarow para medir actividad ATPasa.

2) Midiendo la producción de ADP mediante un ensayo enzimático acoplado, donde el ADP se reconvierte en ATP por acoplamiento de la hidrólisis del ATP con la oxidación enzimática del NADH a través del sistema enzimático, Piruvato Quinasa (PK) - Lactato Deshidrogenasa (LDH). Pullman y col., 1960.

En este ensayo enzimático el ATP, sustrato de la F1-ATPasa, fue regenerado por fosforilación del ADP durante la transformación del fosfoenolpiruvato (PEP) en Piruvato por la PK. La actividad de la enzima se siguió mediante la reducción del Piruvato formado con NADH + H^+ por la LDH, según la siguiente secuencia de reacciones:

$$ATP \xrightarrow{ATPasa} ADP + Pi$$

$$\underline{ADP} + PEP \xrightarrow{PK} PIRUVATO + \underline{ATP}$$

$$PIRUVATO + NADH + H^+ \xrightarrow{LDH} L\text{-}LACTATO + NAD^+$$

Además de eliminar la inhibición por producto, se mantuvo constante la concentración de ATP, con lo que favoreció la actividad ATPasa de la F1.

El medio de reacción con un volumen final de 1 ml, contenía: Tris.HCl 1,5 M pH 7,6, $MgCl_2$ 30 mM, PEP 20 mM, NADH 1mg / 0,5ml, 25 unidades de PK, 113,5 unidades de LDH, ATP 30 mM y la fracción enzimática, completando el volumen deseado con agua destilada.

La desaparición del NADH, a 340 nm fue seguida en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A, leyendo los cambios de absorbancia cada 15 segundos. Los *u*moles de NADH oxidados por minuto se determinaron usando el coeficiente de extinción molar del NADH $6,2 \times 10^3$, de la siguiente manera: (Cambio de D.O por minuto) / 6,2 = *u*mol Pi / min.

Para cada mezcla de reacción se corrió un control donde no se incluyó ATP, con el fin de determinar actividad NADH oxidasa presente en las muestras. La unidad de actividad ATPasa se expresó en *u*moles de sustrato transformado por minuto.

Este ensayo se utilizó para estudios de degradación de la F1 purificada con proteasas aisladas de la mitocondria del parásito.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976). Para la elaboración de la curva de calibración se utilizó una solución estándar de 0,2 mg / ml de BSA (Albúmina de Suero Bovino). Alícuotas de la solución estándar de 0 a 0,1 ml (0-0,02 mg) fueron llevadas a un volumen final de 0,1 ml con agua destilada antes de añadirles 2 ml de Reactivo de Bradford, el cual se preparó suspendiendo 100 mg de Coomasie Blue G-250 en 50 ml de etanol al 95 %, añadiendo 100 ml de ácido ortofosfórico al 85 % y aforando a 1 litro de agua destilada y filtrado. Seguidamente se procedió a leer la absorbancia a 595 nm.

Determinación del peso molecular de la proteína nativa y de las subunidades

El peso molecular de la proteína purificada se determinó por filtración en gel. De igual manera, se determinó el peso molecular de cada una de las subunidades de la F1-ATPasa por medio de la electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS, bajo condiciones disociantes. El gel se tiñó con Comasie Blue R y se le hizo densitometría, a partir de ella se calculó la movilidad relativa de las subunidades de la F1-ATPasa, y se construyo la curva de calibración.

Las proteínas componentes y los pesos moleculares del Standard de amplio rango fueron; miosina 200.000, β- galactocidasa 116.250, fosforilasa b 97.400,

albúmina de suero bovino 66.200, ovoalbumina 45.000, anhidrasa carbónica 31.000, inhibidor de tripsisna 21.500, lisosima 14.400 y apretinina 6.500.

Purificación de la F1

Para lograr este objetivo, se realizaron tres procedimientos de purificación, los cuales se describen a continuación:

Primer Procedimiento de Purificación:

La F1-ATPasa obtenida por solubilización con cloroformo fue sometida a los siguientes pasos de purificación:

1.- Cromatografía de Afinidad en Matrex-Red de Amicon

La enzima proveniente de 100 gramos de músculo fue sometida a cromatografía de afinidad en una columna de Matrex-Red de Amicon (1x 10 cm, volumen total = 7,85 ml), fue equilibrada con buffer Tris.HCl 20 mM pH 7,6, 10 % glicerol y ATP 1 mM a 4 °C. La enzima fue excluida de la columna con lavados consecutivos de buffer de equilibrio, siguiendo el patrón de elución de proteínas a 595 nm, y el resto de las proteínas presentes en la muestra fueron eluídas de la columna con una solución 1M NaCl en el buffer de equilibrio, a partir de la fracción 41. Se colectaron 58 fracciones de 1 ml cada una.

A las fracciones correspondientes al primer pico de proteínas (Bradford, 1976) se les midió actividad ATPasa por el método de Fiske y Subbarow (1925).

2.- Concentrado en una membrana PM 10X

Las fracciones aisladas de Matrex-Red que reportaron mayor actividad ATPasa fueron juntadas, el pool fue concentrado 10 veces en una membrana PM 10, con el objeto de eliminar proteínas cuyo peso molecular sean menores de 10.000 KDa.

Al concentrado se le midió actividad ATPasa por Fiske y Subbarow (1925) y se le determinó la concentración de proteínas presentes a través del método de Bradford (1976).

3.- Cromatografía de Exclusión Molecular en Sephadex G-150

El concentrado fue aplicado a una columna de Sephadex G-150 (1x 40 cm, volumen total = 31,4 ml) equilibrada con buffer Tris.HCl 20 mM pH 7,6, 10 % glicerol y ATP 1 mM. Se colectaron 40 fracciones de 1 ml cada una. A cada fracción se le siguió el patrón de elución de proteína por el método de Bradford leyendo la absorbancia a 595 nm y, se le midió la actividad ATPasa a las fracciones con mayores absorbancias.

Las fracciones con mayor actividad ATPasa fueron utilizadas para los estudios de caracterización de la enzima, determinación de los parámetros cinéticos; y la fracción más libre de proteínas contaminantes fue utilizada para los ensayos de degradación con proteasas aisladas de las mitocondrias.

Segundo Procedimiento de Purificación:

El sobrenadante de 105.000 xg, que contiene la F1 solubilizada fue sometido a los siguientes pasos de purificación:

1.- Cromatografía de Afinidad en Matrex-Red de Amicon

La enzima solubilizada a partir de 119,5 gramos de músculo, fue sometida a cromatografía de afinidad en una columna de Matrex-Red de Amicon (1x 13,5 cm, volumen total = 10,59 ml), equilibrada con buffer Tris.HCl 20 mM pH 7,6, 10 % glicerol, 1 mM $MgCl_2$ y ATP 1 mM a 4 °C. La enzima fue excluida de la columna y eluida con el buffer de equilibrio. El patrón de elución de proteínas se siguió utilizando el método de Bradford, y el resto de las proteínas presentes en la muestra fueron eluídas de la columna con una solución 1 M NaCl en el buffer de equilibrio, a partir de la fracción 33. Se colectaron 51 fracciones de 1 ml cada una.

A las fracciones correspondientes al primer pico de proteínas, se les midió actividad ATPasa por el método de Fiske y Subbarow (1925).

2.- Concentrado en una membrana Millipore PL 30

Las fracciones activas eluidas de Matrex-Red fueron juntadas y concentradas en una membrana Millipore PL 30 con el fin de eliminar proteínas contaminantes de pesos moleculares menores de 30.000 Kda.

Al concentrado se le midió actividad ATPasa por Fiske y Subbarow (1925) y se le determinó la concentración de proteínas presentes a través del método de Bradford.

3.- Cromatografía de Exclusión Molecular en Sephadex G-150

El concentrado fue cromatografiado en una columna de Sephadex G-150 (1x 36 cm, volumen total = 28,26 ml) equilibrada y eluida con buffer Tris.HCl 20 mM pH 7,6, 10 % glicerol, 1 mM $MgCl_2$ y ATP 1 mM. Se recogieron 20 fracciones de 1 ml cada una. A cada fracción se le siguió el patrón de elución de proteína por el método de Bradford y, se le midió la actividad ATPasa a las fracciones con mayores absorbancias.

4.- Concentración del Pool de Sephadex G-150

Las fracciones activas de Sephadex G-150 se juntaron y se concentraron a través de una membrana PM 30 de Amicon. A la muestra concentrada se le midió actividad ATPasa y se le determinó la concentración de proteínas, a través de los métodos anteriormente descritos.

5.- Cromatografía de Exclusión Molecular en AcA 22

El Pool de Sephadex G-150, se cromatografió en una columna de AcA 22 (1 x 27 cm, volumen total = 21,19 ml) equilibrada con un buffer Tris.HCl 20 mM pH 7,6, 10 % glicerol, 1 mM $MgCl_2$ y ATP 1 mM. Se colectaron 30 fracciones de 1 ml cada una. A cada fracción se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y, a las fracciones con proteína se les determinó la actividad ATPasa.

Tercer Procedimiento de Purificación:

Este procedimiento consistió en someter la F1-ATPasa solubilizada a los siguientes pasos de fraccionamiento:

1.- Precipitación con Sulfato de Amonio

A la preparación de F1 solubilizada se le añadió Sulfato de Amonio hasta alcanzar una saturación del 55%. El pellet obtenido después de la centrifugación contenía la F1.

2.- Cromatografía de Exclusión Molecular en Sephadex G-200

La preparación obtenida por precipitación con sulfato de amonio se colocó en una columna de Sephadex G-200 (1x 36 cm, volumen total = 28,23 ml) equilibrada con buffer Tris.HCl 50 mM, pH 7.6, 1mM EDTA, 1mM ATP y 10% glicerol. Se recogieron 60 fracciones de 1 ml cada una. El patrón de elución de las proteínas se siguió por el método de Bradford y, se le midió la actividad ATPasa a las fracciones con mayores absorbancias a 595 nm.

3.- Cromatografía de Afinidad en Matrex-Blue de Amicon

Se hizo el pool correspondiente a Sephadex G-200, y se sometió a cromatografía de afinidad en una columna de Matrex-Blue de Amicon (1x 10 cm, volumen total = 7,85 ml). La enzima se excluyó de la columna con lavados consecutivos en buffer de equilibrio Tris.HCl 50 mM, pH 7.6, 1mM EDTA, 1mM ATP y 10% glicerol, siguiendo el patrón de elución de proteínas a 595 nm (Bradford, 1976), y el resto de las proteínas presentes en la muestra fueron eluídas de la columna con lavados con buffer de equilibrio, al cual se le añadió previamente 1M de NaCl a partir de la fracción 30. Se colectaron 55 fracciones de 1 ml cada una. Las fracciones del primer pico de proteínas, se les midió actividad ATPasa por el método de Fiske y Subbarow, descrito anteriormente.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1.-Purificación de la F1-ATPasa de *Ascaris*

Primer Procedimiento de Purificación:

En este procedimiento la preparación de la enzima solubilizada obtenida mediante extracción con cloroformo presentó una actividad específica de 1,93 *u*moles/min/ mg proteína, con 27,20 mg de proteínas totales (Tabla 1).

Tabla 1. Purificación de la F1-ATPasa de *Ascaris*

Fracción	Proteína Total (mg)	Unidades Totales (*u*moles Pi/min)	Actividad Específica (*u*moles Pi/min/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (x)
S_{105}	27,20	52,39	1,93	100	1
Matrex-Red (Fr 13-27)	5,38	74,2	13,8	100	7,17
Concentrado PM 10	2,56	56,42	22,03	100	11,44
Sephadex G-150 (Fr 15-18)	1,17	9,66	8,25	18,4	4,38

Esta preparación fue cromatografiada en una columna de afinidad de Matrex-Red. El patrón de elución de proteínas y de la actividad ATPasa se muestra en el Gráfico 1; se observaron las mayores absorbancias a 595 nm en las fracciones desde la 13 hasta la 27, estas mismas fracciones presentaron actividad ATPasa. El pool de las fracciones activas presentó una actividad específica de 13,8 *u*moles/min/mg de proteína y 5,38 mg de proteínas totales con un rendimiento del 100% y una purificación de 7,17 veces. El segundo pico que se observó en el patrón de elución de Matrex-Red fue eluido con una solución 1 M NaCl en el buffer de equilibrio, y contiene el resto de las proteínas presentes en la muestra.

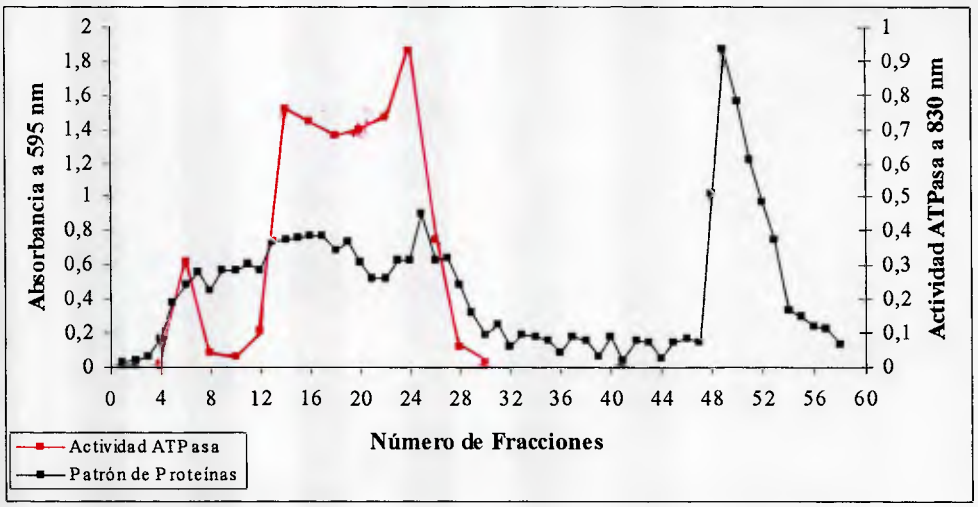


Gráfico 1. Patrón de Elución de Proteínas y Actividad ATPasa de la columna de Matrex-Red (1 x 10 cm).

El concentrado PM 10 de las fracciones activas aisladas de Matrex-Red, registró una actividad específica mayor a la del pool, 22,03 *u*moles/min/mg de proteína y 2,56 mg de proteínas totales, con un grado de pureza mayor a la del pool de 11,44 veces, manteniendo su rendimiento. Sin embargo, cuando el concentrado PM 10 se cromatografió en una columna de Sephadex G-150 (Gráfico 2), se observó una pérdida de la actividad de alrededor del 62 %. El pool de las fracciones activas mostró una actividad específica de 8,25 *u*moles/min/mg de proteína y contenía 1,17 mg de proteínas totales. Tanto de patrón de elución de las proteínas como el de actividad ATPasa son bastante parecidos, ya que los picos de ambas curvas se sobreponen.

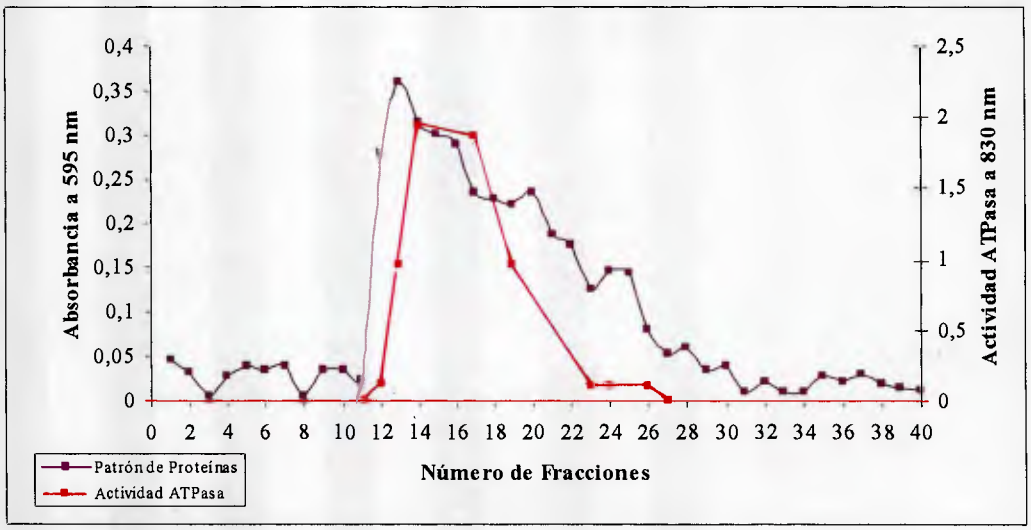


Gráfico 2. Patrón de Elusión de las proteínas Proteínas y de la Actividad ATPasa de la Columna de Sephadex G-150 (1 x 40 cm).

El análisis SDS-PAGE de la composición proteica de la preparación (Figura 5) nos indicó que las fracciones 14 y 17 con una alta actividad ATPasa además de contener las bandas componentes de la F1 (α, β y δ con pesos moleculares de 60, 58, 31, Kda) presentaron otras bandas contaminantes; de igual manera se encontró que la muestra eluída en Matrex-Red colocada en el bolsillo 4 tenía la banda contaminante de 68 Kda, indicando que la columna de Matrex-Red no eliminó completamente dicha banda.

En la Figura 5, se describieron los pesos moleculares de cada banda del estándar de amplio rango de BioRad. También se señalaron las bandas en las fracciones activas con masas relativas a las de las subunidades α y β de F1 (60 Kda y 58 Kda), confirmando que se trató de las subunidades α y β del dominio catalítico de *Ascaris* con pesos moleculares de 58 y 56 Kda respectivamente (Parra, 1992).

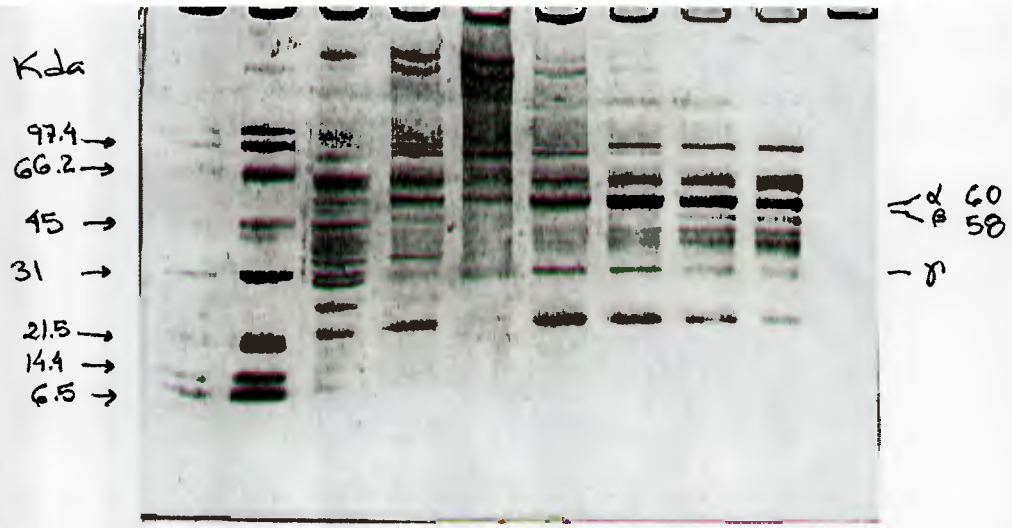


Figura 5. Electroforesis en SDS-PAGE al 12 % de las fracciones obtenidas de la purificación de la F1-ATPasa. El contenido de cada bolsillo fue: 1- Nada; 2- Standard de amplio rango; 3- S_{105} ; 4- Pool Matrex-Red; 5- G-150 Fr 13; 6- G-150 Fr 15; 7- G-150 Fr 16; 8- G-150 Fr 17; 9- G-150 Fr 18.

Segundo Procedimiento de Purificación:

La S_{105} que se obtuvo en este segundo procedimiento de purificación presentó una actividad específica de 1,94 *u*moles/min/ mg proteína, con 31,61 mg de proteínas totales (Tabla 2).

Tabla 2. Purificación de la F1-ATPasa de *Ascaris*

Fracción	Proteína Total (mg)	Unidades Totales (*u*moles Pi/min)	Actividad Específica (*u*moles Pi/min/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (x)
S_{105}	31,61	61,2	1,94	100	1
Matrex-Red (Fr 8-20)	3,84	19,35	5,04	31,62	2,61
Concentrado PL30	2,87	13,03	4,54	21,29	2,34
Sephadex G-150 (Fr 9-12)	1,21	6,34	5,26	10,36	2,71
ACA 22 (Fr 10-14)	0,44	3,08	6,94	5,03	3,58

Al igual que en la primera purificación, en este procedimiento la preparación de F1 solubilizada se sometió a cromatografía en una columna de Matrex-Red. Como

pudo observarse en el Gráfico 3, las fracciones 8 a la 20 debajo del primer pico de proteínas mostraron actividad ATPasa. El segundo pico de proteínas fue eluido con 1 M NaCl y contiene el resto de las proteínas que se quedaron en la columna y que formaban parte de la muestra aplicada. Las fracciones con actividad ATPasa fueron juntadas y presentaron una actividad específica de 5,04 *u*moles/min/ mg de proteínas y contenían 3,84 mg totales de proteínas. En este primer paso de purificación se perdió un 70 % de la actividad ATPasa, y se logró purificar la ATPasa unas 2,61 veces; a diferencia de la primera purificación en la que el rendimiento fue del 100% y se obtuvo una purificación de 7 veces.

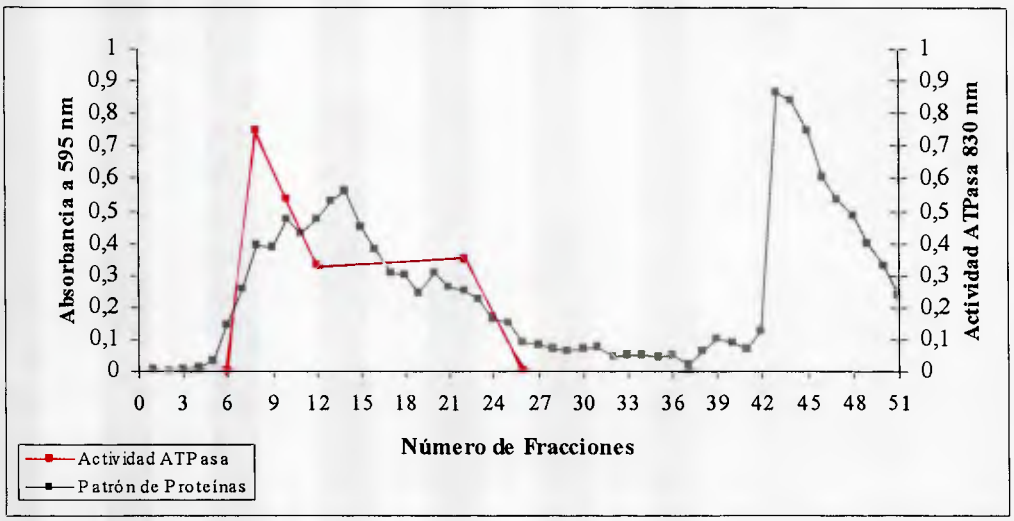


Gráfico 3. Patrón de Elusión de Proteínas y Actividad ATPasa durante Cromatografía en Matrex-Red (1 x 13,5 cm).

Las fracciones de Matrex-Red con actividad ATPasa fueron concentradas a través de una membrana PL 30 antes de ser sometidas a cromatografía en Sephadex G-150, con esta membrana se eliminaron proteínas contaminantes cuyo pesos moleculares eran menores de 30 000. El patrón de elución de las proteínas de la columna de Sephadex G-150 se muestra en el Gráfico 4. Las fracciones activas (9-12) fueron juntadas y mostraron una actividad específica de 5,26 *u*moles/min/mg con un rendimiento del 10,36 % y un grado de pureza de 2,71.

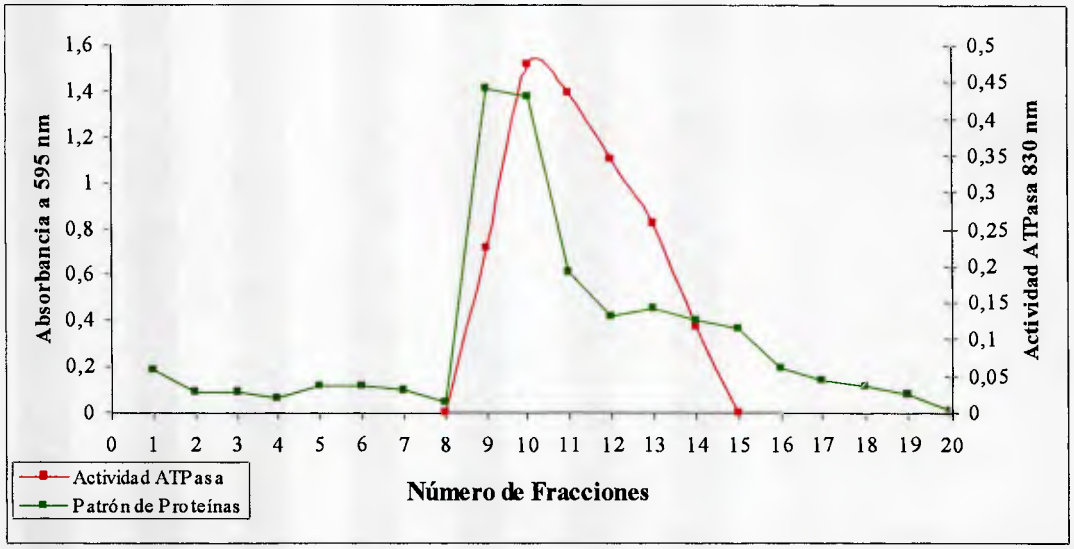


Gráfico 4. Patrón de Elusión de Proteínas y Actividad ATPasa de la Cromatografía en Sephadex G-150 (1 x 36 cm).

Las fracciones activas de G-150 fueron concentradas usando una membrana PL 30 y sometidas a cromatografía de exclusión molecular en una columna de AcA 22. El Gráfico 5 mostró que los picos correspondientes a las proteínas y a la actividad ATPasa coinciden casi perfectamente, lo que sugiere que hubo una muy buena purificación.

A pesar de que en esta cromatografía se incrementó la purificación de la enzima, el rendimiento fue bajo, se recuperaron 3,08 unidades de las 10 unidades que se aplicaron a la columna de Sephadex (Tabla 2).

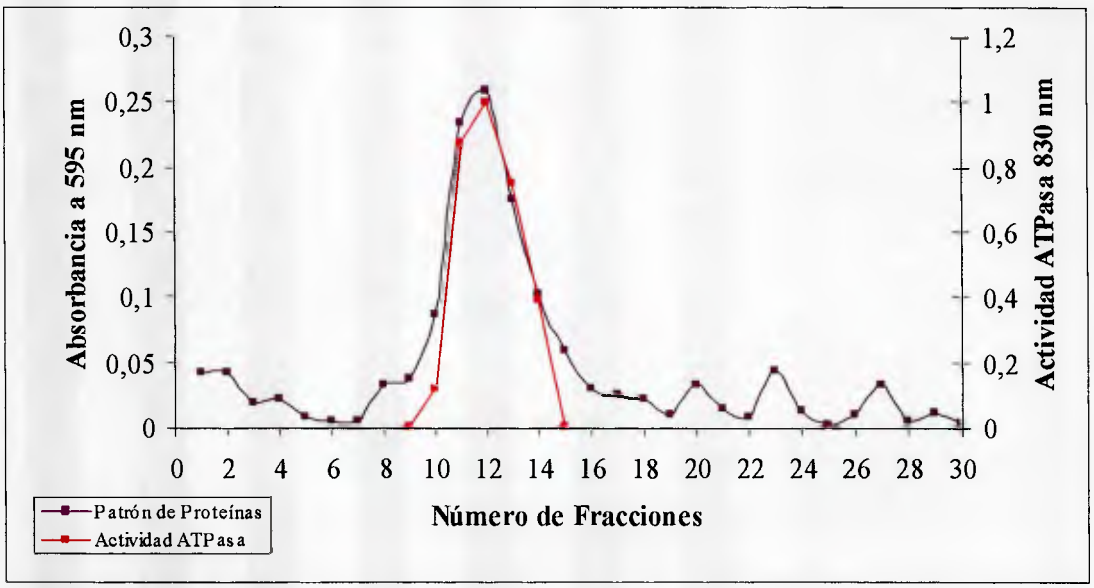
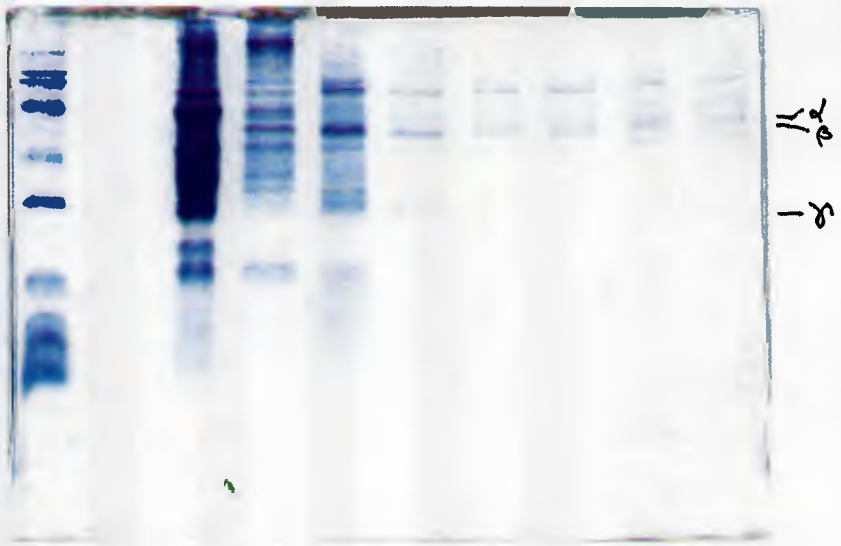


Gráfico 5. Patrón de Elusión de Proteínas y Actividad ATPasa de la Cromatografía en AcA 22 (1 x 27 cm).

El la Figura 6, se muestra el análisis electroforético de las proteínas presentes en las muestras aplicadas de las fracciones 11, 12, 13 y 14 de ACA 22, en las cuales se observaron unos bolsillos bastante libres de bandas que forman parte de proteínas contaminantes. Esto se corroboró con el aumento en el grado de pureza que presentó el pool de AcA 22 a diferencia de la muestra de pool de Sephadex G-150. Se pudieron observar claramente las bandas que constituyen las subunidades α β γ y δ; debido a la poca cantidad de muestra aplicada al bolsillo no se pudo comprobar la presencia de ε.



Bolsillos 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Figura 6. Electroforesis en SDS-PAGE al 12 % de fracciones obtenidas de la purificación de la F1-ATPasa. El contenido de cada bolsillo fue: 1- Standard de amplio rango; 2- Nada; 3- S_{105} ; 4- Pool Matrex-Red; 5- Pool Sephadex G-150; 6- Concentrado del Pool Sephadex G-150; 7- AcA 22 Fr 11; 8- AcA 22 Fr 12; 9- AcA 22 Fr 13; 10- AcA 22 Fr 14.

Tercer Procedimiento de Purificación:

La actividad específica que reportó la S_{105} obtenida en este tercer procedimiento de purificación, fue de 1, 23 *u*moles/min/ mg de proteína con 25,75 mg de proteínas totales (Tabla 3). Esta preparación se sometió a la precipitación con sulfato de amonio, en el pellet de 55% de saturación, aumento la actividad específica de 1,23 a 2,11 *u*moles/min/ mg de proteína con un total de 2,7 mg de proteínas, en este paso se logró purificar la enzima 1,71 veces pero el rendimiento fue bajo, sólo se recuperó el 18,04 % de la unidades presentes en S_{105}.

Tabla 3. Purificación de la F1-ATPasa de *Ascaris*

Fracción	Proteína Total (mg)	Unidades Totales (*u*moles Pi/min)	Actividad Específica (*u*moles Pi/min/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (x)
S_{105}	25,75	31,6	1,23	100	1
Sobrenadante de 55%	3,3	3,53	1,07	11,17	0,87
Pellet 55% $(NH_4)_2SO_4$	2,7	5,70	2,11	18,04	1,71
Sephadex G-200 (Fr 11-20)	1,61	1,83	7,95	5,79	6,46
Matrex Blue (Fr 8-12)	0,16	6,52	40,27	20,6	32,73

El Gráfico 6 representó el patrón de elución obtenido al cromatografiar el pellet de 55% de saturación en una columna de Sephadex G-200. Tanto la actividad como las proteínas estuvieron asociadas a las fracciones 11 a la 20. La actividad específica del pool de las fracciones activas fue de 7,95 *u*moles/min/mg. Lo que representó una purificación de 6,5 veces. Sin embargo, el rendimiento de este paso fue muy bajo (5,79 %).

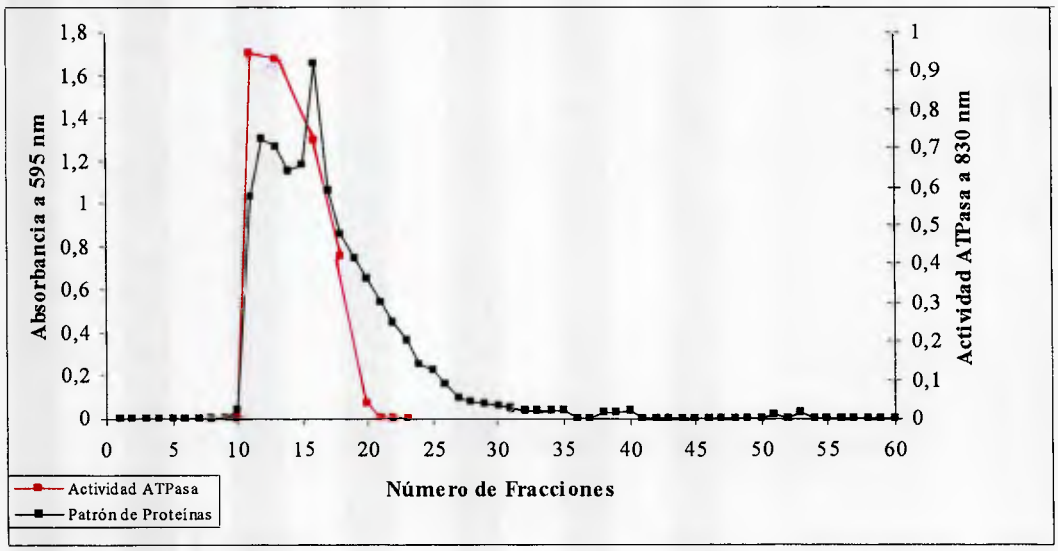


Gráfico 6. Patrón de Elución de Proteínas y Actividad ATPasa de la columna de Sephadex G-200 (1 x 36 cm).

Las fracciones activas de G-200 fueron cromatografiazas en una columna de Matrex-Blue (Gráfico 7). Las fracciones de la 8 a la 12 mostraron la mayor actividad ATPasa.

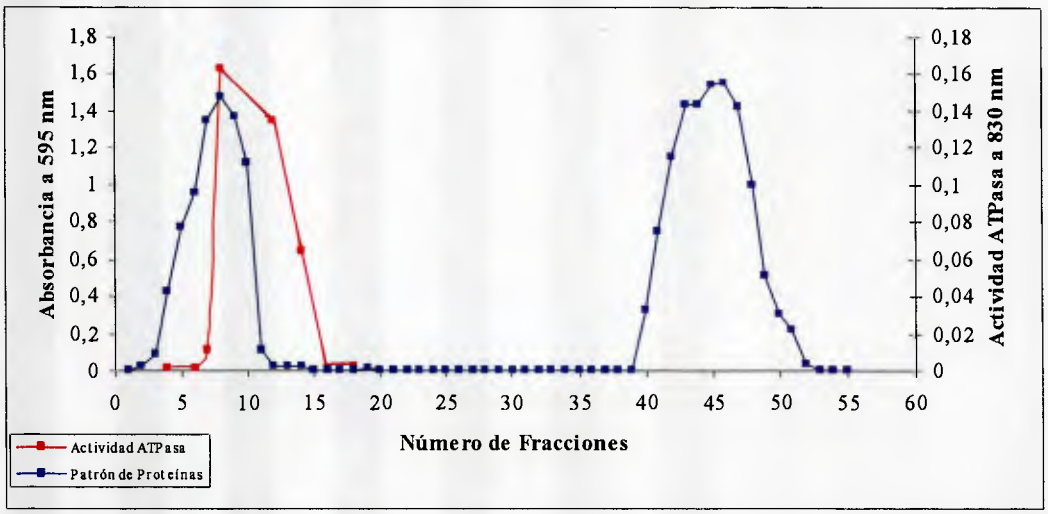


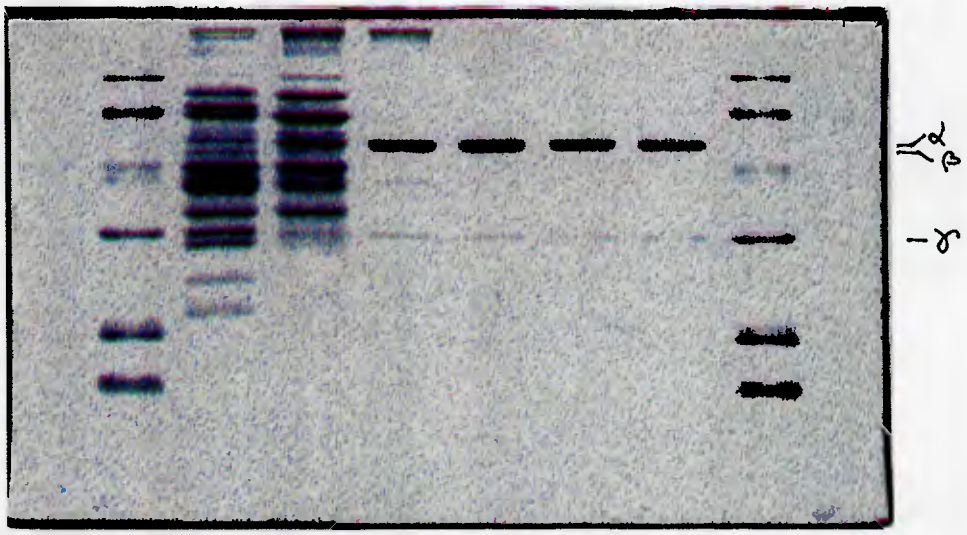
Gráfico 7. Patrón de Elución de Proteínas y Actividad ATPasa de la Cromatografía en Matrex-Red (1 x 10 cm).

En contraste con el paso anterior, la cromatografía en Matrex-Blue, permitió obtener una enzima con una actividad especifica 40,27 *u*moles/min/ mg de proteína, con rendimiento de 20,6 % y una purificación de 32,73 veces, valor que anteriormente no se había logrado registrar.

Estos valores indicaron que el rendimiento reportado para el pool de G-200 (Tabla 3) no era el correcto debido probablemente a error experimental o a la presencia del inhibidor endógeno de la F1 en las fracciones activas de G-200.

Las fracciones activas aisladas durante los distintos pasos de este procedimiento de purificación fueron sometidas a SDS-PAGE con el fin de determinar su composición peptídica y grado de pureza (Figura 7). Las fracciones 8, 9, 10 y 12 aisladas de Matrex-Blue con la más alta actividad ATPasa, mostraron bandas cuyos pesos moleculares e intensidad se corresponden con las bandas α β y γ de la F1-ATPasa. ε y δ que no se observaron debido a la baja cantidad de muestra

aplicada al gel, para observar estas bandas es necesario aplicar 20 *u*g de proteína por bolsillo.



Bolsillos 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figura 7. Electroforesis en SDS-PAGE al 15% de fracciones obtenidas de la purificación de F1. En los bolsillos: 1- Nada; 2- Standard de bajo peso molecular; 3- S_{105}; 4- Pellet de precipitación con sulfato de amonio al 55%; 5- Matrex-Blue Fr 8; 6- Matrex-Blue Fr 9; 7- Matrex-Blue Fr 10; 8- Matrex-Blue Fr 12; 9- Standard de bajo peso molecular.

Es importante hacer notar que la cromatografía en Matrex-Blue logró eliminar completamente la banda de 68 Kda. (ver bolsillos 4 y 5 de la Figura 7).

2.-Caracterización de la F1-ATPasa de *Ascaris*

2.1 Pureza, composición estequiométrica y peso molecular de las subunidades y de la enzima nativa

El peso molecular de las subunidades de la F1-ATPasa se obtuvo por SDS-PAGE bajo las condiciones descritas en el marco metodológico. En los geles se logró observar cuatro de las cinco subunidades que conforman al complejo enzimático, α, β, γ y δ; la subunidad ϵ no se distinguió debido a la baja cantidad de proteínas de la preparación aplicada en el gel. La subunidad α registró un peso molecular de 60 Kda, β 58 Kda, γ 31 Kda y δ 20 Kda (Figuras 1, 2 y 3).

2.2 Efecto de algunos inhibidores de la actividad ATPasa sobre la actividad de la enzima de *Ascaris*

Con el objeto de confirmar que la actividad ATPasa presente en preparaciones de la enzima, corresponde a una F1-ATPasa, se estudió el efecto de algunos inhibidores sobre la actividad de dicho complejo enzimático.

En la Tabla 4 se muestra el efecto de la Oligomicina, azida de sodio y Aurovertina sobre la actividad ATPasa de las fracciones activas eluidas de Sephadex G-150. Los resultados indicaron que la actividad ATPasa fue inhibida por azida de sodio un 76,3% y por Aurovertina un 64%.

Tabla 4. Efecto de Inhibidores sobre la actividad ATPasa

Inhibidor	**Concentración**	**Actividad**	
		***u*moles/min/ml**	**%**
Sin Inhibidor	--------	1.129	100
Oligomicina	2.5 *u*g/ml	1,065	94,1
Azida de Sodio	2 mM	0,267	23,7
Aurovertina	1 *u*M	0,407	36,09

También se pudo observar que la oligomicina no inhibió significativamente la actividad ATPasa de la preparación (5,9%), debido a que dicha preparación carece del dominio Fo donde esta localizada OSCP (proteína que le confiere sensibilidad a la oligomicina).

Se cree que el efecto inhibidor de la azida, se debe a que este anión incrementa la afinidad de la enzima por ADP y conduce a la formación de un complejo F1-ADP estable (Falson y col., 1987). Mientras que la Aurovertina interactúa directamente sobre la subunidad catalítica β del complejo, produciendo una inhibición significativa de la actividad ATPasa.

2.3 Estudios de Especificidad por Sustrato y de Afinidad por Iones Metálicos

Como parte de la caracterización de la F1-ATPasa parcialmente purificada de la mitocondria del músculo de *Ascaris*, se utilizó el pool de Sephadex G-150 en estudios de especificidad por sustrato y de afinidad por iones metálicos.

Se emplearon los siguientes nucleótidos de trifosfato como sustratos de la F1-ATPasa; ATP, GTP, ITP, UTP y CTP a una concentración 3 mM respectivamente, manteniendo la concentración de Magnesio constante a 3 mM. Los resultados (Gráfico 8) indicaron que el complejo enzimático presentó una mayor actividad ATPasa en presencia de ATP, y el orden decreciente con los demás nucleótidos fue: ITP > GTP > UTP > CTP.

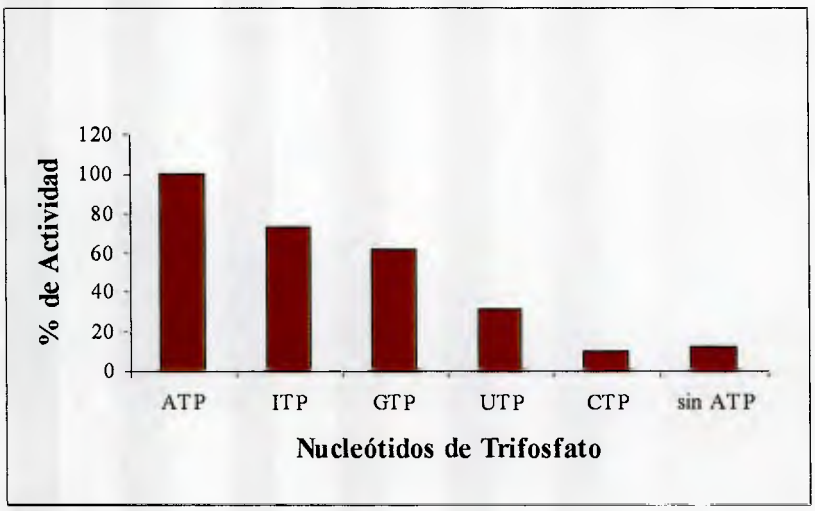


Grafico 8. Ensayos de Especificidad de Nucleótidos de Trifosfato

De igual forma, se realizaron los estudios de especificidad de la enzima por los siguientes cationes divalentes: Mg^{++}, Mn^{++}, Ca^{++} y Fe^{++} a concentraciones de 3 mM, manteniendo la concentración de ATP constante a 3 mM. Los resultados que se muestran en el Gráfico 9, indicaron que la mayor actividad ATPasa se obtuvo en presencia de Mg^{++}; la actividad en orden decreciente de la enzima parcialmente purificada frente a los demás cationes divalentes fue: $Mn^{++} > Ca^{++} > Fe^{++}$.

Con estos estudios se comprobó que el complejo enzimático parcialmente purificado funciona en óptimas condiciones en presencia de ATP y Mg^{++}, lo que indicó que la actividad ATPasa de dicho complejo, es de naturaleza F1.

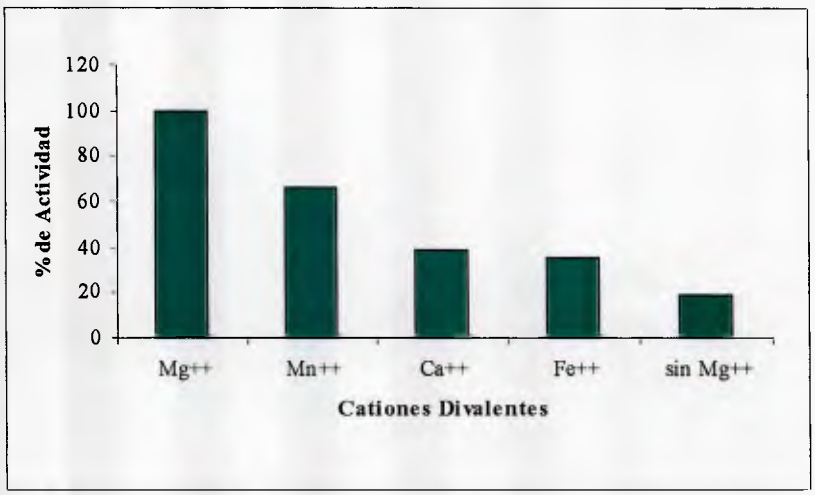


Gráfico 9. Ensayos de Especificidad por Cationes Divalentes

2.4 Estudios Cinéticos con la F1-ATPasa de *Ascaris* ante concentraciones crecientes de ATP

El Gráfico 10, representa los estudios de cinética enzimática con la F1 presente en las fracciones activas eluidas de Sephadex G-150. Se determinó que la velocidad inicial de la reacción a concentraciones crecientes de ATP y a una concentración fija de Mg^{++} (3 mM). El Gráfico 10 nos permitió determinar los valores de Vmax (92,3 *u*moles/min/mg) y de Km para ATP (0,31 mM).

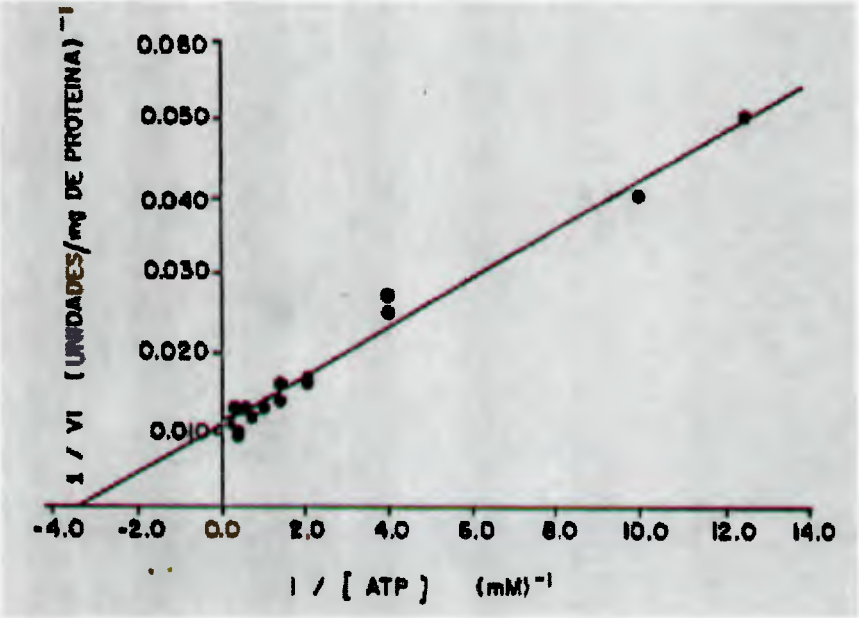


Gráfico 10. Determinación de parámetros cinéticos de la F1 purificada

2.5 Espectro de Luz Ultravioleta

La Figura 8 representa el espectro en la región ultravioleta del pool de fracciones activas aisladas de la columna de AcA 22. Con esta preparación se obtuvo un pico de absorbancia a 260 nm característico de la F1-ATPasa.

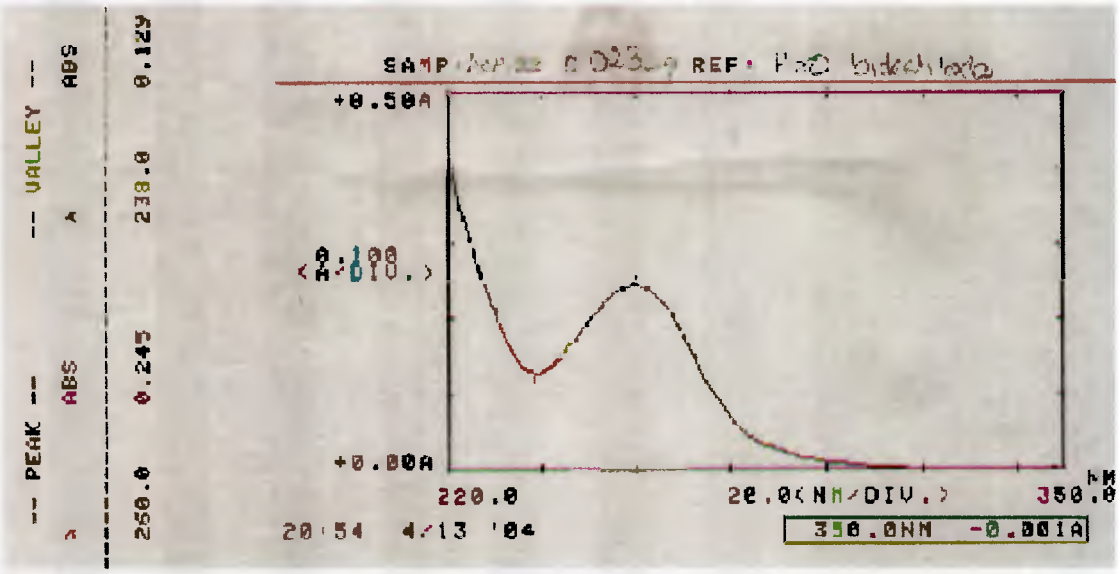


Figura 8. Espectro de luz visible

3.- Estudios de degradación controlada de la F1 purificada con preparaciones de proteasas aisladas de la mitocondria del parásito

Con el fin de comprobar si el dominio F1 parcialmente purificado es sustrato para las proteasas presentes en la mitocondria de *Ascaris suum*, se procedió a determinar el efecto de preparaciones de proteasas presentes en la matriz mitocondrial sobre la actividad y las subunidades componentes de la F1 de *Ascaris*. Los ensayos de inhibición de la F1-ATPasa con proteasas mitocondriales, se realizaron siguiendo el ensayo enzimático acoplado, descrito en la sección de marco metodológico. Inmediatamente antes de realizar el ensayo enzimático la muestra de F1 se incubó con la preparación de proteasa a 37°C por 60 minutos.

Se utilizaron tres preparaciones de proteasas que fueron previamente aisladas de la matriz mitocondrial por cromatografía en DEAE-Celulosa, las cuales se les llamó Pool I DEAE, Pool II DEAE y Fr 140 DEAE respectivamente.

Los ensayos mostrados en la Tabla 5 indicaron que el incremento de la concentración de proteasas en la mezcla de incubación, ocasionó un aumento en el porcentaje de inhibición de la actividad ATPasa de la enzima, es decir, mientras mayor fue la cantidad de proteasas añadidas a la preparación de F1, mayor fue la inhibición de su actividad ATPasa. Cuando de utilizó el pico II de DEAE como fuente de proteasa, se observó que la inhibición de la actividad ATPasa fue proporcional a la concentración de proteínas en la mezcla de incubación (Gráfico 11).

Tabla 5. Ensayos de Inhibición producida por las Proteasas en la actividad ATPasa de la F1

Muestras	F1: Proteasas	Actividad ATPasa (*u*moles/min/ml)	% Inhibición
F1 + Buffer $_{(control)}$		1,99	
F1 + Pool I $_{DEAE\ (experimental)}$	1:10	1,90	4,51
F1 + Buffer $_{(control)}$		1,99	
F1 + Pool I $_{DEAE\ (experimental)}$	1:20	1,51	24,46
F1 + Buffer $_{(control)}$		0,96	
F1 + Fr 140 $_{DEAE\ (experimental)}$	1:10	0,86	10,4
F1 + Buffer $_{(control)}$		3,50	
F1 + Pool II $_{DEAE\ (experimental)}$	1:5	3,21	8,41
F1 + Buffer $_{(control)}$		0,66	
F1 + Pool II $_{DEAE\ (experimental)}$	1:10	0,54	18,2
F1 + Buffer $_{(control)}$		0,74	
F1 + Pool II $_{DEAE\ (experimental)}$	1:20	0,45	39,46

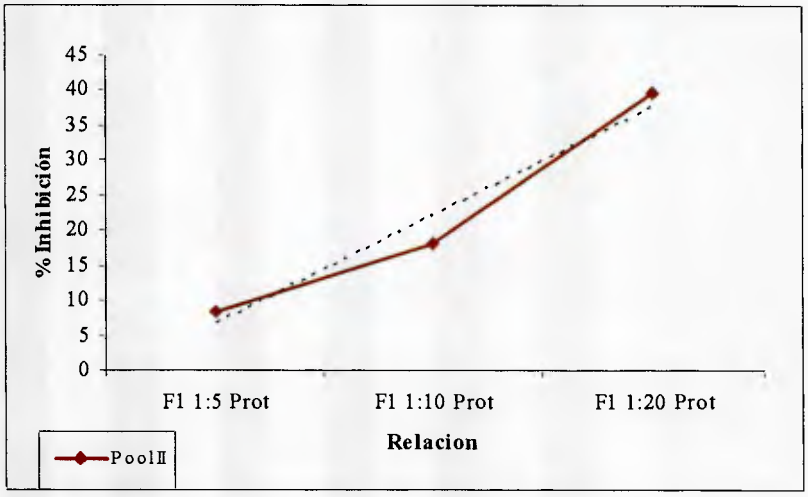
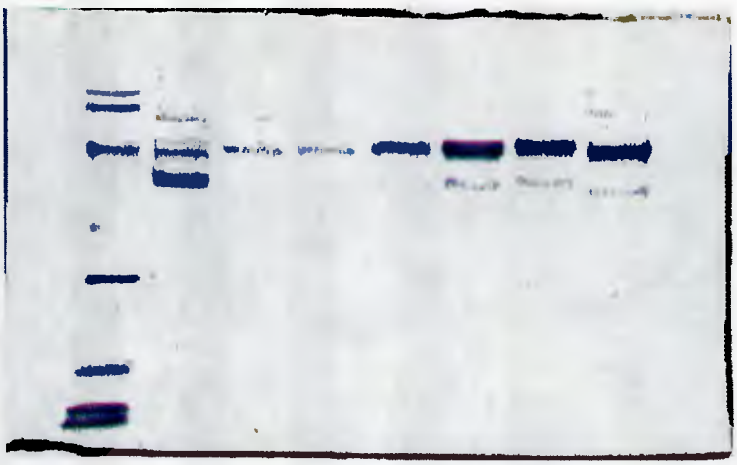


Gráfico 11. Ensayos de inhibición de la F1 con Proteasas

Para los estudios de degradación de las subunidades α y β del dominio F1, se incubó la enzima purificada con la preparación de proteasas a 37 °C durante 60 minutos, previo a ser sometida a SDS-PAGE en un gel al 12 % de acrilamida. En lo ensayos de incubación se usaron dos preparaciones de proteasas, Pool I DEAE y Pool II DEAE. Como fuente de F1 se utilizó la fracción 15 de Sephadex G-150, porque las bandas del duplete α / β se diferenciaron con bastante claridad en el gel de purificación. La Figura 9, representa el patrón electroforético de la F1 sola, de las dos preparaciones de proteasas empleadas y de alícuotas de la mezcla de incubación de la F1 con las proteasas. En el gel se observó una disminución considerable en la intensidad de las bandas que representan las subunidades α y β, lo que quiere decir que hubo degradación de dichas subunidades por parte de las proteasas. Las degradaciones más evidentes fueron observadas en los bolsillos 6, 7 y 8 que contenían respectivamente: 6 (G-150+ Pool I DEAE, en una relación de 1:10), 7 (G-150+ Pool I DEAE, en una relación de 1:20) y 8 (G-150+ Pool II DEAE, en una relación de 1:10).



Bolsillos 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figura 9. Patrón Electroforético en SDS-PAGE al 12% de las fracciones activas de Sephadex G-150 antes y después de su incubación con proteasas mitocondriales. En los bolsillos: 1- Nada; 2- Standard de amplio rango; 3- G-150 Fr 15; 4- Pool I DEAE; 5- Pool II DEAE; 6- Fr 15 + Pool I DEAE (1:10); 7- Fr 15 + Pool I DEAE (1:20); 8- Fr 15 + Pool II DEAE (1:10); 9- Fr 15 + Pool II DEAE (1:10) + EDTA.

Los densitogramas mostrados en las Figuras 10 y 11, demostraron la degradación de α y β por parte de las proteasas mitocondriales. También pudo observarse la degradación de la subunidad γ.

En el densitograma mostrado en la Figura 10, se observó que el tratamiento de la F1 + Pool I DEAE (1:20); produjo una disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a α y β de un 80 %.

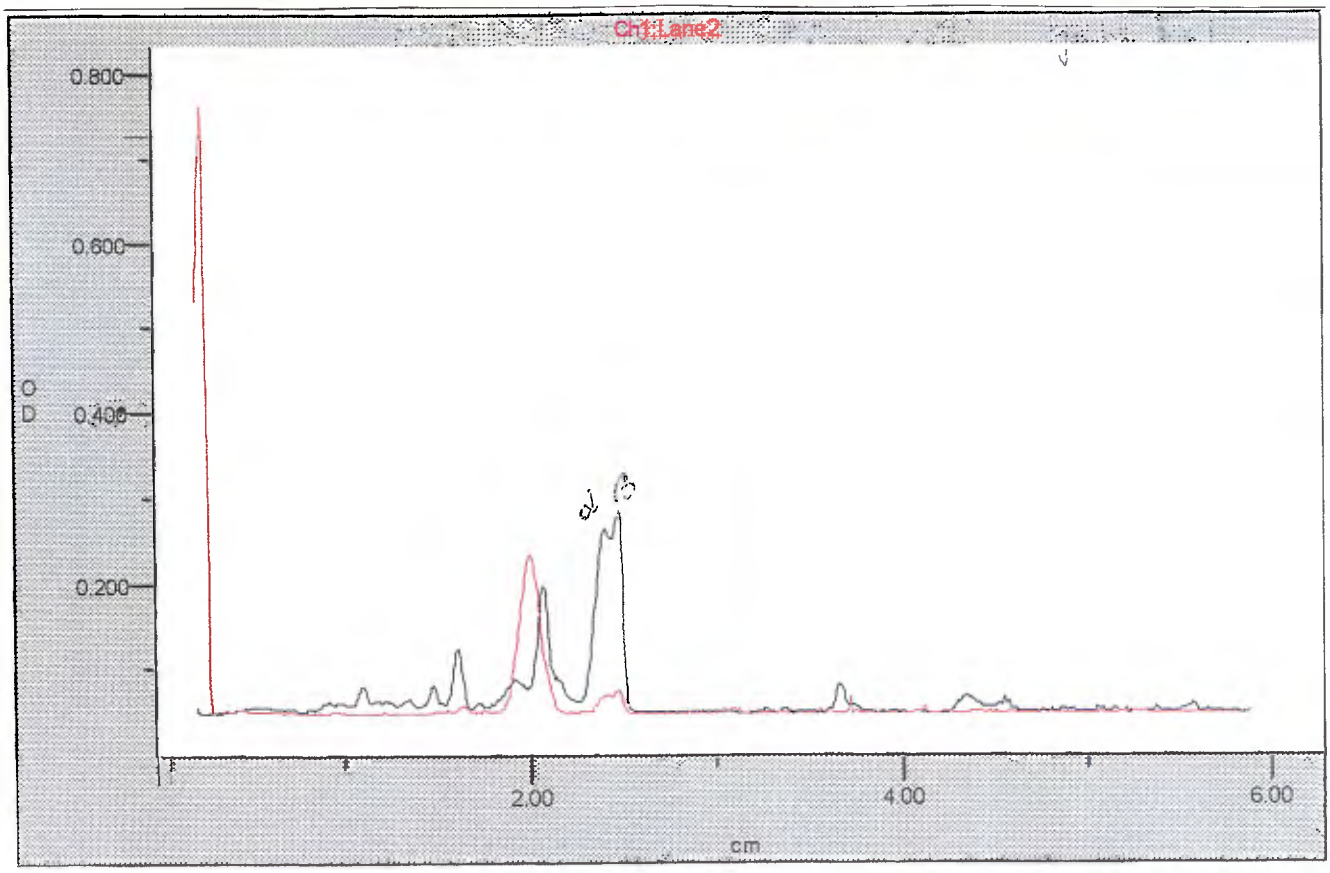


Figura 10. Densitograma de una alícuota de la mezcla de incubación de la F1-ATPasa de **Ascaris (Fr 15 de G-150) con el Pool I de DEAE (1:20). La línea azul representa el control (F1 no tratada) y la línea roja representa la F1 tratada con el Pool Ide DEAE (1:20).**

En el densitograma mostrado en la Figura 11, pudo observarse que la incubación de la F1-ATPasa de *Ascaris* con el Pool II DEAE (1:10) produjo la desaparición casi completa de la banda correspondiente a la subunidad α (95 %) y una disminución del 91 % de la banda correspondiente a β.

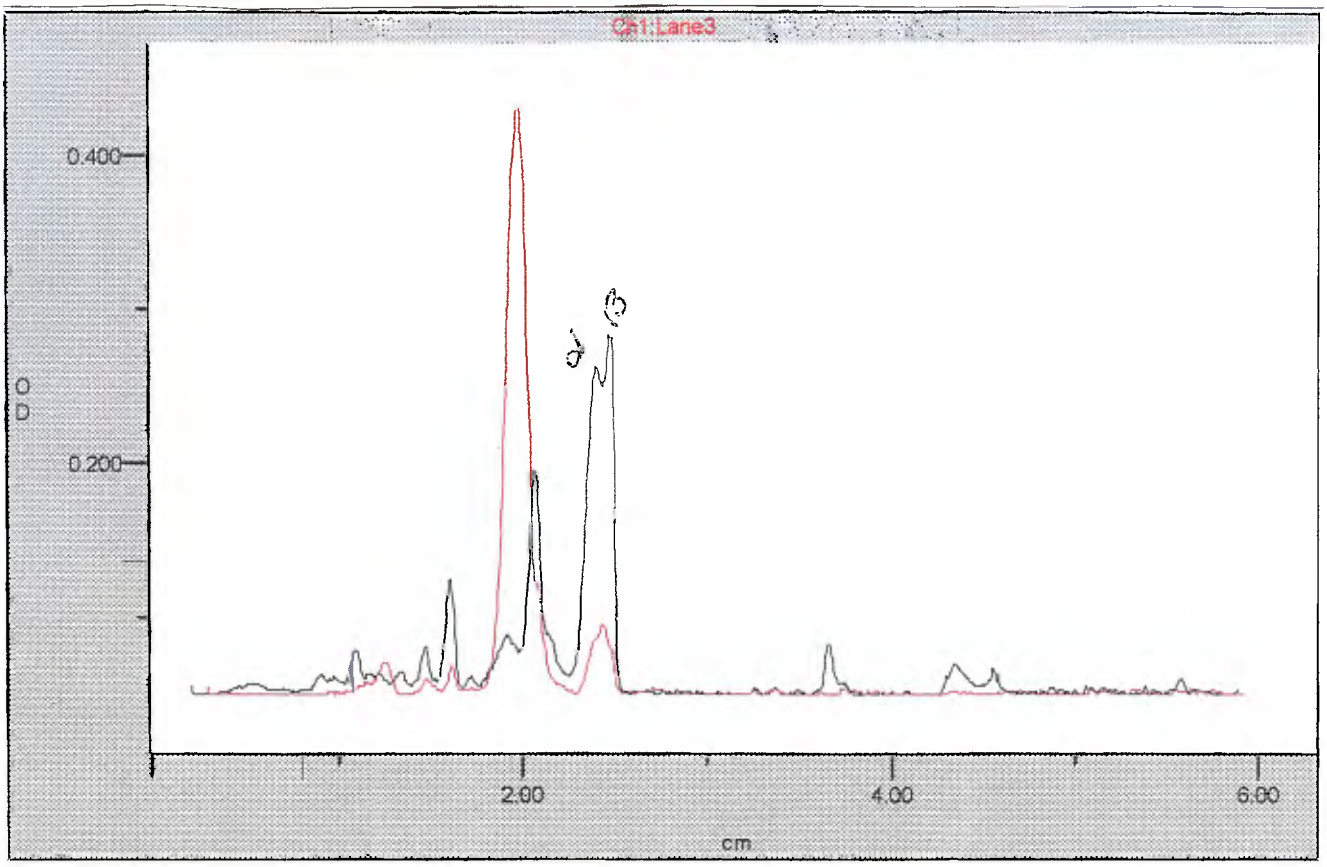


Figura 11. Densitograma de una alícuota de la mezcla de incubación de la F1-ATPasa de Ascaris (Fr 15 de G-150) con el Pool II de DEAE (1:10). La línea azul representa el control (F1 no tratada) y la línea roja representa la F1 tratada con el Pool II de DEAE (1:10).

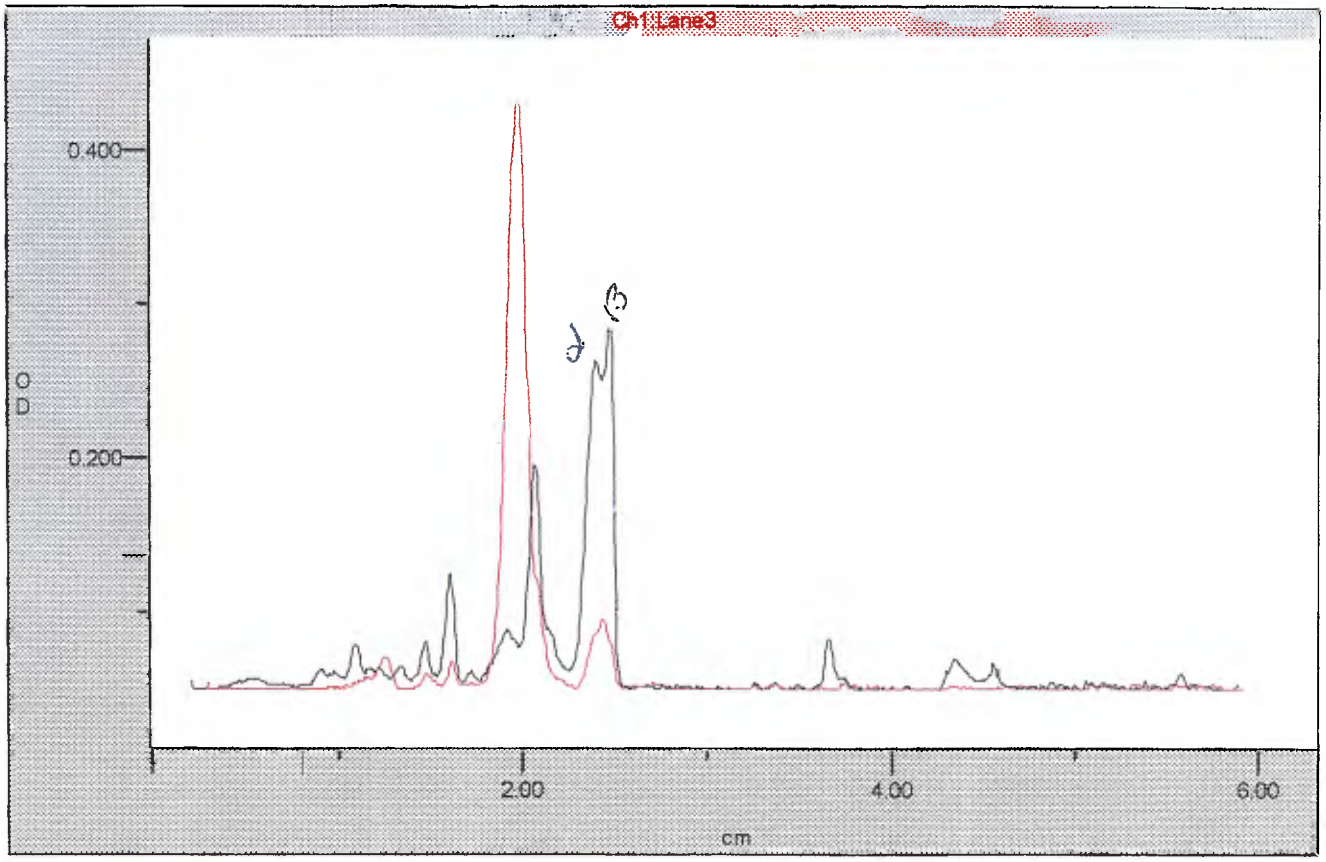


Figura 11. Densitograma de una alícuota de la mezcla de incubación de la F1-ATPasa de Ascaris (Fr 15 de G-150) con el Pool II de DEAE (1:10). La línea azul representa el control (F1 no tratada) y la línea roja representa la F1 tratada con el Pool II de DEAE (1:10).

Discusión

Con este trabajo se pretendió mediante 3 procedimientos de purificación, obtener la F1-ATPasa de la mitocondria del *Ascaris* mucho más pura, con un mayor rendimiento y en menor tiempo que la obtenida por Parra (1992), al utilizar cromatografías consecutivas en DEAE-Celulosa, Matrex-Blue y Sephadex G-150. El procedimiento de Parra (1992) permitió obtener una enzima con una actividad específica alta y un rendimiento del 20%, sin embargo, consumía un tiempo considerable.

Los tres procedimientos descritos en este trabajo permitieron acortar el tiempo de purificación significativamente a 4 días. Sin embargo, con los procedimientos 1 y 2 (Tablas 1 y 2) el rendimiento y la actividad específica de la misma fueron más bajos que los reportados por Parra. Por el contrario, el tercer procedimiento (Tabla 3), que consistió en someter la enzima solubilizada a precipitación con sulfato de amonio y a cromatografías en Sephadex G-200 y Matrex-Blue, además de ser más corto, nos permitió obtener una enzima con una actividad específica mayor y un rendimiento comparable al descrito por Parra (1992).

Una de las razones principales para tratar de acortar el tiempo de purificación es disponer en corto tiempo, de una enzima purificada para utilizarla en estudios de caracterización.

Los estudios de caracterización de la ATPasa purificada por los procedimientos descritos confirman la naturaleza F1 de la enzima debido a que la mayor actividad ATPasa se registró en presencia de ATP y Mg^{++} (Gráficos 8 y 9). La naturaleza F1 de la enzima purificada fue confirmada al observar una marcada inhibición con Aurovertina que se une directamente a la subunidad catalítica β.

Formó parte importante de la caracterización de la F1-ATPasa, los estudios de inhibición y degradación de la F1 por proteasas presentes en la matriz mitocondrial de *Ascaris suum*. Se demostró que dichas proteasas inhiben la actividad ATPasa, y que a medida que aumentaba la cantidad de proteasa en el ensayo, se obtenía una mayor inhibición (Tabla 5). También, se realizaron estudios de degradación con el fin de demostrar que la pérdida de actividad ATPasa estaba acompañada por degradación de

las subunidades de la F1. El uso de SDS-PAGE (Figura 9) y el análisis densitométrico de los geles (Figuras 10 y 11) permitieron demostrar una disminución significativa (80 – 95%) de la intensidad del duplete α / β. También se observó que la subunidad γ fue degradada.

En los análisis en SDS-PAGE de la enzima aislada con los procedimientos descritos, las 5 bandas que forman parte del dominio F1, no se pudieron observar completamente, debido a la poca cantidad de muestra aplicada en los bolsillos. Las subunidades δ y ϵ no se observaron, cuando la F1 purificada por el procedimiento 3 se sometió a SDS-PAGE (Figura 7). Para poder observar las bandas δ y ϵ es necesario aplicar al gel 10 a 20 *u*g de la proteína purificada (Parra, 1992).

El duplete α / β (Mr 60 000 y 58 000) y la subunidad γ (Mr 31 000) se observaron en los tres geles de purificación (Figuras 5, 6 y 7).

Las enzimas purificadas por los procedimientos 1 y 2 contenían otras bandas contaminantes además de las 3 bandas mencionadas.

Las subunidades α β y γ, se lograron diferenciar con bastante claridad cuando las enzimas purificadas por los procedimientos 2 y 3 fueron sometidas a SDS-PAGE. Estos resultados reflejan un alto grado de purificación de la enzima y confirman su naturaleza F1.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES

1.- La F1-ATPasa presente en las partículas submitocondriales del músculo de *Ascaris suum* se purificó parcialmente a través de una nueva metodología, en un tiempo de 4 días. El procedimiento de purificación utilizó fraccionamiento con sulfato de amonio, y cromatografías en Sephadex G-200 y Matrex-Blue. La enzima fue purificada 32,73 veces con un rendimiento del 21% y una actividad específica de 40,27 unidades/mg.

2.- Los estudios de especificidad realizados con la preparación parcialmente pura de la F1-ATPasa de *Ascaris*, indicaron que el sustrato para la actividad hidrolítica de la enzima es el complejo ATP-Mg^{++}.

3.- Los ensayos de inhibición realizados con la enzima purificada, demostraron que la actividad ATPasa de la F1-ATPasa obtenida en el laboratorio, sufre inhibición por Azida de Sodio y Aurovertina, inhibidores característicos de la F1, y no fue inhibida por oligomicina indicando que la preparación está libre de Fo.

4.- La actividad ATPasa del dominio F1 purificado fue inhibida por proteasas presentes en la matriz mitocondrial del músculo de *Ascaris*. El porcentaje de inhibición fue proporcional a la concentración de proteasas en la mezcla de incubación. Ademas, se demostró que la inhibición de la actividad ATPasa producida por las proteasas mitocondriales se debió a la degradación de las subunidades α y β de la F1.

5.- El tercer procedimiento al igual que la metodología descrita por Parra (1992) para la purificación de la F1-ATPasa de *Ascaris suum*, logró mantener un rendimiento del 20 %..Sin embargo, la actividad específica de la enzima purificada por el procedimiento diseñado fue menor que la reportada por Parra.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B.; Alexander Johnson; Julian Lewis; Martin Raff; Keith Roberts and PetercWalter. 2002. **Molecular Biology of The Cell**. Cuarta Edición. Garland Science. New York.
- Amzel, M., L; and Pedersen, P., L. 1983. Proton ATPases: Structure and mechanism. **Ann. Rev. Biochem. 52**. 801 – 824.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantitatives of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal.Biochem**. (72): 248 – 254.
- Chance, B., and Parsons, D., F. 1963. Cytochrome function in relation to inner membrane structure of mitochondria. **Science**. (142): 1176 – 1180.
- Fiske, C.; and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. **J.Biol.Chem. LXVI**. (2).
- Futai, M., and Kanazawa, H. 1983. Structure and function of proton translocatin Adenosine Triphosphatase (FoF1): Biochemical and molecular biological approaches. **Microbiological Reviews. 47**. 285 – 312.
- Kagawa, Y., Ohta, S., Yoshida, M. and Sone, N. 1980. Funcition of subunits of H^+- ATPase.**Ann. N. Y. Acad. Sci. 80**. 103 – 117.
- Karp, Gerald. 2001. **Biología Celular y Molecular**. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Kohler, P. 1985. The strategies of energy conservation in helminths. **Molecular and Biochemical Parasitology**. (17): 1 – 18.
- Komuniecki, Richard; Steven Fekete; and Julia Thissen-Parra. 1984. Purification and Characterization of the 2- Methyl Branched-chain Acyl-CoA Dehydrogenase, an Enzyme Involved in NADH-dependent Enoyl-CoA Reduction in Anaerobic Mitochondria of the Nematode, *Ascaris suum*. **J.Biol.Chem. 260** (8): 4770 – 4777.

- Li, Sheng-Guang; Lu-Lu Gui; Zhi-huan Lin; Zhu-Li Wan; Wen-Rui Chang; and Dong-Cai Liang. 1996. Purification and Crystal Growth of F1-ATPase from pig heart mitochondria. **Biochemistry and Molecular Biology International**. **40** (3): 479 – 486.
- Lodish, Harvey; Arnold Berk; S. Lawrence Zipursky; Paul Matsudaira; David Baltimore y James Darnell. 2002. **Biología Celular y Molecular.** Cuarta Edición. Editorial Medica panamericana. Madrid, (España).
- Municio, Angel Martín. 1997. **Ciencias de la Naturaleza**. Volumen 6. Editorial Planeta. Barcelona.
- Nelson, David L., and Michael M. Cox. 2000. **Lehninger Principles of Biochemistry.** Tercera Edición. Worth Publishers. New York. p: 681.
- Parra, Karlett. 1992. Estudios estructurales, enzimáticos y sobre el core de la Fi-ATPasa purificada para optar al título de Magíster en Ciencias Biológicas. USB. Julio de 1992.
- Pullman, M., and Monroy, G. 1963. A naturally occurring inhibitor of mitochondrial Adenosine Triphosphatase. **J. Biol. Chemistry. 240**. 4694 – 4702.
- Pullman, M., Penefsky, H., Catta, A., and Racker, E. 1960. Parcial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I, Purification and properties of soluble, Dinitrophenol – stimulated Adenosine Triphosphatase. **J. Biol. Chem. 235**. 3322 – 3329.
- Rep, M. and L.A. Grivell. 1996. The role of protein degradation in mitochondrial function and biogenesis. **Curr Genet**. (30): 367- 380.
- Saz, H. 1981. Energy metabolisms of parasitic Helminths: adaptations to parasitism. **Ann.Rev.Physiol**. (42):323 – 341.
- Saz, H. and Lascure. 1969. The Functions of phosphoenol piruvate carboxikinase and malic enzime in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris Lumbricoides*. **Comp.Biochem.Physiol**. **30** (1): 49 – 60.

- Stryer, Lubert. 1995. **Bioquímica**. TomoII. Editorial Reverté, S. A. Barcelona.
- Suzuki, Carolyn K.; Martijn Rep; Jan Maarten van Dijl; Kitaru Suda; Leslie A. Grivell and Gottfried Schatz. 1997. ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. **Reviews**. (22): 118 – 121.
- Van den Bossche, H. 1974. Adenosine Triphosphatase activity in *Ascaris* muscle mitochondria. **Comp. Biochem. Physiol. 49** (1 B): 71 -78.
- Yamada, E., and Huzel, N. 1988. The calcium – Binding – ATPase Inhibitor Protein from bovine heart mitochondria Purifications and properties. **J. Biol. Chem. 256**. 10203 – 10207.