

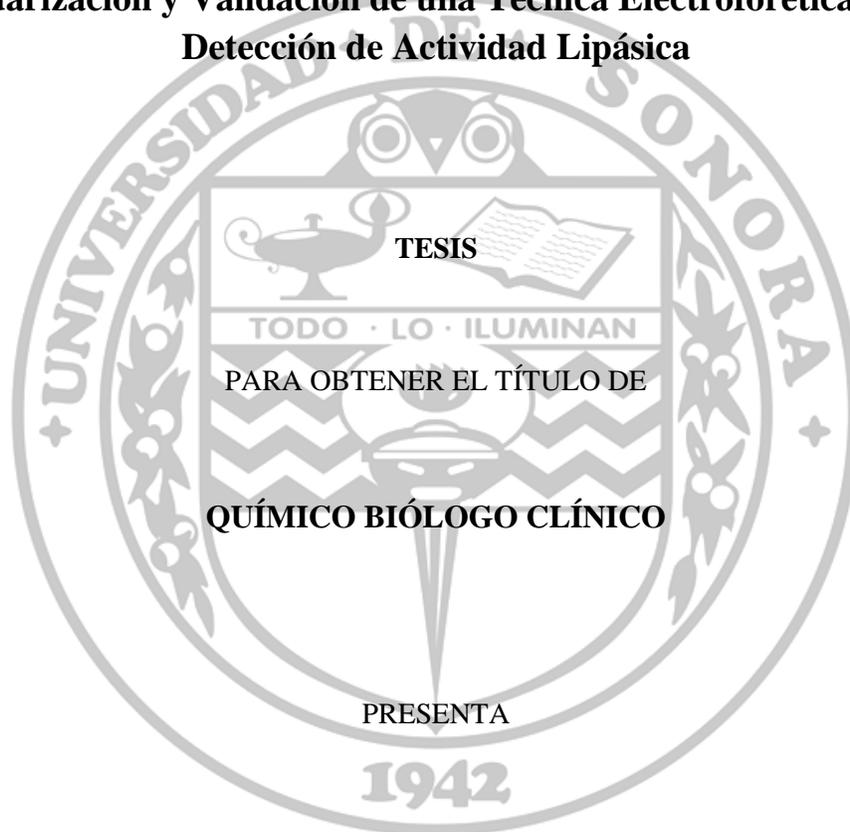
UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL NORTE

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Estandarización y Validación de una Técnica Electroforética para la Detección de Actividad Lipásica



JOVAN DANIEL ROMERO VALENZUELA

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL NORTE

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



Los miembros del jurado designado para revisar la **Tesis Profesional** de **Jovan Daniel Romero Valenzuela**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico Biólogo Clínico.

Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez
Director de Tesis

M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda
Secretario

M.C. Eligio Espinoza Ojeda
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de Sonora**, en especial a la Unidad Regional Norte, campus Caborca por brindarme los recursos necesarios para el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Al **Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez**, la mas sincera gratitud por su incondicional apoyo en la dirección del presente trabajo, por despertar en mi la expectación hacia la investigación.

A los asesores, **M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda** y **M.C. Eligio Espinoza Ojeda**, por sus diversos y útiles consejos para la elaboración de la presente Tesis.

A todos los maestros de la licenciatura por su atribución en mi formación académica y a todas las personas que directa o indirectamente me apoyaron en la realización del presente trabajo.

Gracias

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi amor a las tres personas que han sido fuente de motivación para mi vida en todos los ámbitos:

 Mi madre, *María Jesús Valenzuela Abril*

 Mi hermana, *Amairani Estibalis Rodríguez Valenzuela*

 Mi hija, *Danna Aylem Romero Carrasco*

A *Rosario Guadalupe Carrasco Gastelum*, gracias por tu paciencia y todo tu apoyo.

A *Ricardo Rodríguez López*, con toda gratitud por siempre brindarme su apoyo.

A mis abuelos, *Francisca Abril* y *Francisco Valenzuela*. A mis tíos; *Aleyda*, *Cesar* y *Francisco*. A mis primos, a todos les agradezco con todo mi corazón el estar siempre apoyándome, dándome sus sabios consejos.

A toda mi familia

Gracias por creer en mí

RESUMEN

Las lipasas son enzimas cuya denominación bioquímica es acil-éster-hidrolasas, con actividad catalítica específica para llevar a cabo reacciones de hidrólisis, esterificación e interesterificación. Las lipasas actualmente están siendo muy estudiadas ya que constituyen un importante grupo de biocatalizadores con amplio potencial biotecnológico y pueden ser de origen bacteriano, fúngico, vegetal y animal. La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es un método específico, sensible y eficaz, que es ampliamente utilizado para la caracterización de proteínas purificadas. En el presente trabajo se estableció un método de PAGE-Nativa para la separación de lipasas y detección de su actividad lipásica por medio de zimografía. Primeramente, se estandarizó la técnica de referencia para la separación de tres lipasas solubles comerciales A-12 de *Aspergillus niger*, AY-30 de *Candida rugosa* y F-AP15 de *Rhizopusoryzae*. Se encontró que estas enzimas no son totalmente puras y se requiere de un método específico para la identificación de la banda de lipasa. Cuando se utilizó como sustrato de revelado al butirato de 4-Metilumbeliferilo(4-MUFB) se logró visualizar las bandas con actividad lipásica al hacer incidir la luz UV a 254 nm. Utilizando un análisis por densitocolorimetría se estableció el rango dinámico lineal ($R^2 > 0.99$) para la cuantificación de la actividad lipásica. Además, se establecieron los límites de detección y cuantificación respectivos, así como el coeficiente de variación y precisión al momento de replicar los análisis. Los resultados de este trabajo demuestran que es factible utilizar el método de zimografía establecido para el análisis de muestras de investigación o diagnóstico clínico donde se requiera analizar la actividad lipásica.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iii
CONTENIDO.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
NOMENCLATURA.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
ANTECEDENTES.....	5
Generalidades de las Lipasas.....	7
Estructura y función.....	7
Propiedades químicas y especificidad.....	13
Principales Aplicaciones de las lipasas.....	16
Interés Clínico de las lipasas.....	19
Acné común.....	20
Gastritis crónica.....	21
Pancreatitis aguda.....	21

Obesidad.....	23
Métodos de Medición de Actividad Lipásica.....	25
Métodos físico-químicos.....	25
Métodos inmunológicos.....	32
Electroforesis.....	33
Fundamento de la electroforesis.....	34
Electroforesis en condiciones desnaturizante (SDS-PAGE).....	39
Electroforesis en condiciones no desnaturizante (PAGE-Nativa).....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
Materiales y sustancias químicas.....	49
Enzimas.....	49
Reactivos y soluciones utilizadas.....	50
Equipo.....	50
Estandarización de la técnica PAGE-Nativa.....	51
Inmovilización de sustratos.....	54
Validación de la técnica.....	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
Estandarización.....	61
Inmovilización.....	64
Validación.....	68

CONCLUSIONES.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	77
ANEXO A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE STOCK Y BÚFERS.	82
ANEXO B.ESPECIFICACIONES DEL SISTEMA.....	86
ANEXO C. PROCEDIMIENTO Y ENSAMBLE DEL EQUIPO.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Hidrólisis reversible de triacilgliceroles.....	8
2	Esquema de la conformación del plegamiento α/β	10
3	Imagen de la superficie molecular de la lipasa de <i>Candidarugosa</i> ...	12
4	Modelo del método de plato de Wilhelmy.....	27
5	Reacción de polimerización entre la acrilamida y bisacrilamida.....	40
6	Gel revelado con azul de Coomassie.....	62
7	Gel con derivados de p-nitrofenol.....	65
8	Gel copolimerizado conpoliacrilamida y acrilato de p-nitrofenilo..	66
9	Gel revelado con 4-MUFB y Azul de Coomassie.....	67
10	Gel revelado con 4-MUFB analizado con ImageJ.....	69
11	Gráfica de relación lineal del método zimográfico.....	70
12	Reproducibilidad de dos geles revelados con 4-MUFB.....	73
13	Gráfica de reproducibilidad del método zimográfico.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Linealidad del método zimográfico.....	71
2	Límite de detección y cuantificación del método zimográfico.....	72
3	Reproducibilidad del método zimográfico.....	75

NOMENCLATURA

μg	Microgramos.
μL	Micro litro.
G	Gramos.
H	Hora.
kDa	KiloDalton.
M	Mol.
Min	Minutos.
mL	Mililitros.
mM	Mili mol.
Mm	Milímetro.
mU	Micro unidades.
Nm	Nanómetros
V	Volts.
V	Volúmen.

ABREVIATURAS

2ME	2-mercaptoetanol.
4-MUFB	Butirato de 4-Metilumbeliferilo.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AGL	Ácidos grasos libres.
Asp	Aspártico.
D.E.	Desviación estándar.
DAG	Diacilgliceroles.
DTT	Ditiotreitol.
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
Glu	Glutámico.
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i> .
His	Histidina.
IEF	Enfoque isoeléctrico.
IMC	Índice de masa corporal.
ITP	Isotacoforesis.
LC	Límite de cuantificación.
LD	Límite de detección.
MAG	Monoacilgliceroles.
<i>P. acnés</i>	<i>Propionibacterium acnés</i> .

PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida.
PCR	Reacción de Cadena de Polimerasa.
pH	Potencial hidrogeno.
pI	Punto isoeléctrico.
pK	Constante de disociación.
r ²	Coefficiente de determinación.
Rf	Movilidad relativa.
SDS	Sodio dodecil sulfato.
Ser	Serina.
TAG	Triacilgliceroles.
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletildiamina.
UV	Ultravioleta.
ZE	Electroforesis de zona.

INTRODUCCIÓN

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas; EC 3.1.1.3) son enzimas que tienen la función biológica de llevar a cabo la hidrólisis de triacilglicérols. Es decir, las lipasas en nuestro organismo degradan las grasas de los alimentos para poder ser absorbidas. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se pueden encontrar en plantas, animales y microorganismos. Una de las características más distintiva de estas enzimas es que son solubles en agua y actúan sobre sustratos insolubles incrementando así la actividad catalítica, un fenómeno que se le ha denominado activación interfacial. La especificidad, estabilidad sobre solventes orgánicos, la elevada enantioselectividad junto con la activación interfacial son propiedades funcionales importantes que le dan un gran potencial biotecnológico a estas enzimas¹.

La electroforesis es una técnica relativamente simple, rápida y sumamente sensible que permite estudiar las propiedades de las enzimas. Este método separa las proteínas, basándose en sus cargas eléctricas, a través de una matriz bajo la influencia de un campo eléctrico. Esta matriz puede ser de agarosa utilizado principalmente para la separación de macromoléculas de mayor tamaño, como ácidos nucleicos, o puede ser gel de poliacrilamida utilizado para la separación de enzimas. Con electroforesis de gel de poliacrilamida se puede analizar el tamaño, la pureza, la cantidad y el punto isoeléctrico de polipéptidos y proteínas. Es por esto que esta técnica se ha convertido en un método frecuente en la química analítica, bioquímica y biología molecular. El número de métodos de separación electroforética ha aumentado desde el trabajo del pionero Tiselius (1937) a

quien se le ha considerado el padre de la electroforesis de proteína. El desarrolló el movimiento de frontera, método para separar proteínas del suero en solución, por el cual recibió el premio Nobel. Que a futuro llevó a la electroforesis de zona, técnica frecuentemente utilizada en la actualidad. Los primeros geles de poliacrilamida fueron usados por Raymond y Weintraub en 1959, estos geles eran químicamente inertes y mecánicamente estables. Mediante la copolimerización de monómeros de acrilamida con un reactivo, usualmente, metilbisacrilamida obteniendo un gel limpio y transparente evitando la electroendosmosis².

En el estudio de las lipasas, por sus propiedades, se requiere preservar su forma natural para así poder observar sus características activas. Zimograma se refiere a la identificación de enzimas en geles de poliacrilamida por medio de la localización visual, mediante su actividad específica sobre un sustrato cromogénico posterior a la separación electroforética, este método permite la separación de los componentes proteicos mediante carga y/o peso molecular de manera que es posible identificar una población heterogénea de enzimas en una gran variedad de muestras biológicas. En un principio esta técnica se utilizó para identificar zonas con actividad de esterasa, en un gel de almidón mediante la separación electroforética³.

La variedad de lipasas existentes con sus diversas y atractivas cualidades han hecho de este un grupo de enzimas ampliamente estudiadas desde su identificación ya más de un siglo. En nuestro organismo se producen de forma natural importantes lipasas, sobre todo la pancreática la cual está vinculada a la calidad y salud humana así como también las lipasas de origen bacteriano y fúngico. El presente estudio pretende establecer una técnica electroforética para el estudio específico y sensible de las lipasas a través de su actividad.

En la actualidad el estudio de las lipasas, ha tenido un gran auge sobre todo en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica dejando rezagado su estudio y aplicación en análisis clínicos. Por las ventajas de enantioselectividad que presentan estas enzimas se pueden utilizar para la resolución de compuestos quirales y creación de nuevos fármacos. Por la intervención en el cuadro clínico de enfermedades causadas por diferentes organismos lipolíticos su estudio resulta primordial para el control y tratamiento de interés inhibitorio. El análisis de la actividad lipásica en los trastornos pancreáticos, adquiere importancia en la detección de la lipasa para el diagnóstico de estos trastornos y por último un enfoque orientado al problema mundial de la obesidad puede darle aún más importancia al estudio de las lipasas ya que estas influyen directamente en la absorción de grasas en el organismo.

En el análisis de las lipasas, para observar sus particulares características, se debe realizar conservando la forma nativa de la enzima y así poder establecer la actividad y propiedades distintivas de estas enzimas. Hoy en día existen diversas técnicas que permiten hacer estos análisis, siendo los más destacados los métodos espectrofotométricos en los cuales se utilizan como sustratos específicos a ésteres de p-nitrofenol presentando una gran sensibilidad y también los métodos cromatográficos, que resultan de gran interés a la hora de estudiar las propiedades de enantioselectividad. La electroforesis, es una técnica de separación basada en la carga eléctrica y tamaño de las moléculas. En la presente investigación se muestra a la electroforesis en su variación de electroforesis nativa en gel de poliacrilamida y al respectivo revelado con sustratos específicos como una opción sensible en el estudio cualitativo y semicuantitativo de la lipasa detectando su actividad, preservando la forma nativa de la enzima.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estandarizar y validar una técnica electroforética para la detección de actividad lipásica.

Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones de corrida electroforética nativa para la separación de lipasas y su respectiva tinción de revelado.
2. Inmovilización de diferentes sustratos para detectar actividad lipásica *in situ*.
3. Validar la técnica zimográfica estandarizada para la detección de actividad lipásica.

ANTECEDENTES

Un informe publicado por el microbiólogo Eijkmann (1901)⁴ identificó por primera vez las lipasas a través de un experimento donde incubó cebo de ternera con diferentes bacterias, concluyó que las lipasas habían sido producidas y secretadas por las bacterias, y que las lipasas permanecían enzimáticamente activas en solventes orgánicos. Los siguientes años, diversos autores utilizaron triacilglicéridos simples como sustratos para medir actividad obteniendo la mayor hidrólisis con ácidos grasos de cadena corta, pero fue hasta 1936 cuando Weinstein y Wynne reportaron Tripropionina como un sustrato que otorgaba una hidrólisis más rápida. El efecto importante de temperatura de la mezcla de incubación con relación al punto de fusión del sustrato fue relatado por Balls (1938). Finalmente las características particulares de las lipasas fueron descritas por Schonheyder y Volqvartz (1945) y Sarda y Desnuelle (1958) fueron los primeros en estudiarlas a profundidad definiéndolas en términos cinéticos observando a la lipasa pancreática y su actividad especial ante sustratos en forma de emulsión. Desnuelle (1968) junto con Entressangles encontraron que la lipasa pancreática no solo es capaz de actuar sobre sustratos emulsificados, sino también sobre agregados del sustrato de menor tamaño^{4,5}.

Durante las investigaciones de Sarda y Desnuelle comprobaron por medio de un experimento utilizando triacetina y un triacilglicérido parcialmente soluble en agua que la lipasa pancreática, a diferencia de otras esterasas, era especialmente activa cuando el sustrato se encontraba en forma de emulsión, siendo su actividad escasa o nula sobre el

sustrato disuelto (forma monomérica). Este era un fenómeno ya antes observado y lo denominaron “activación interfacial” lo cual se consideró una característica distintiva de las verdaderas lipasas frente a las esterasas, las cuales actúan sobre ésteres disueltos. Desnuelle *et al.* (1960) propusieron que existía un cambio conformacional de la lipasa y que estaba asociado al fenómeno de la activación interfacial. Gracias a la alta resolución de rayos X Brady *et al.* (1990) mostraron la estructura cristalográfica de la lipasa de *Mucormiehei*, y a su vez Winkler (1990) expuso la lipasa pancreática humana. Por medio de esta estructura tridimensional descubrieron la presencia de un bucle anfifílico en la superficie, que cubre el centro activo de la enzima cuando ésta se encuentra en solución acuosa, impidiendo de esa forma el acceso. A este bucle se le denominó “tapa”. Por medio de estos estudios cristalográficos estos autores proponen que el bucle anfifílico sufre un reajuste como resultado del cual el centro activo se torna accesible. En base a esta observación Neves-Petersen (2001) estudiaron la distribución de aminoácidos polares, débilmente polares y apolares en la superficie de diversas lipasas en función del pH, observando que la región cercana al centro activo es más hidrófoba cuando las enzimas se encuentran en su forma abierta o forma accesible. Aunque, actualmente la activación interfacial no es concluyente para la diferenciación de las esterasas ya que se han encontrado datos bioquímicos y estructurales de lipasas que no presentan este fenómeno, como *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida antarctica* B. A esto Ferrato *et al.* (1997) concluyó que dado a que la hidrólisis de sustratos monoméricos por parte de las lipasas implica la accesibilidad del centro activo sin previa activación interfacial, este fenómeno se encuentra relacionado con los tiempos de vida respectivos de las formas abiertas y cerradas de las lipasas^{6,7}.

Generalidades de las Lipasas

De acuerdo con el Comité de Nomenclatura de Bioquímica (IUPAC-IUBMB) las lipasas se encuentran clasificadas como triacilglicerolacilhidrolasa, (EC 3.1.1.3.). Son un grupo de enzimas ampliamente distribuidos en la naturaleza cuya función es catalizar la hidrólisis reversible de los triacilglicéridos para originar diacilgliceroles, monoacilgliceroles, ácidos grasos y glicerol (Figura 1.). Las lipasas constituyen una clase especial de esterasas que actúan específicamente sobre ésteres insolubles en agua, en la interface lípido-acuosa. Bajo condiciones de humedad limitada las lipasas pueden catalizar la reacción reversible, también catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles en una amplia variedad de solventes orgánicos, incluyendo el dióxido de carbono. Las lipasas pueden hidrolizar la molécula detriacilglicerol aleatoriamente, o pueden expresar la especificidad posicional⁸.

Estructura y Función de las lipasas

Las estructuras de muchas lipasas han sido determinadas por la cristalografía de rayos X, como: lipasas fúngicas de *Rhizomucormiehei*, *Geotrichumcandidum*, *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa*, *Penicilliumcamembertii*, *Rhizopusdelemary* *Candidaantarctica*; lipasa pancreática y lipasas bacterianas como las de *Pseudomonasglumaey* *Chromobacteriumviscosu*. Las lipasas conocidas muestran un amplio rango de pesos moleculares, desde 19 kDa (Cutinasas) hasta 60kDa (*Candida*

rugosa). La mayoría de ellas a excepción de la lipasa pancreática, están formadas por un único dominio⁹.

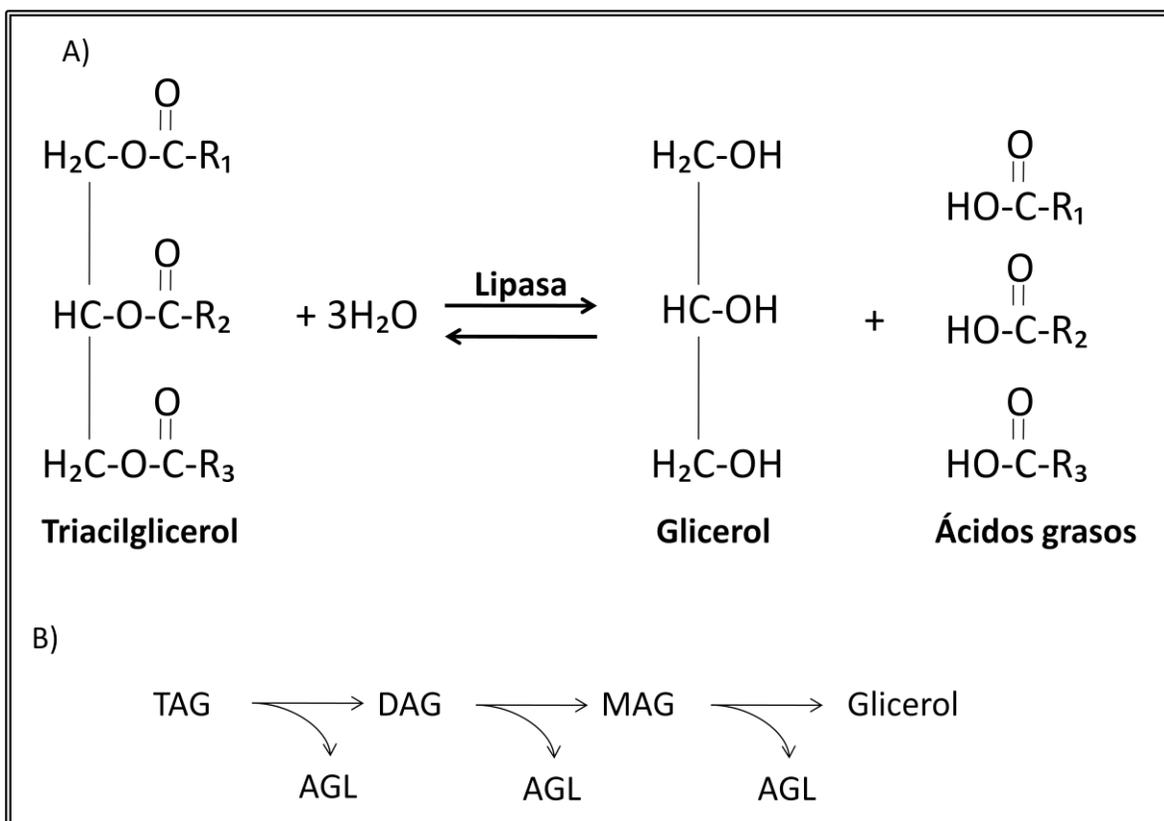


FIGURA 1. Hidrólisis reversible de triacilgliceroles. A) Un triacilglicerol se hidroliza a glicerol y ácidos grasos. En la reacción reversible, glicerol y ácidos grasos se combinan para formar triacilglicerol. B) Reacción de hidrólisis donde TAG son los triacilgliceroles, DAG son los diacilgliceroles, MAG los monoacilgliceroles y AGL son los ácidos grasos libres⁸.

Todas ellas presentan un plegamiento α/β hidrolasa que consiste en una lámina β central hidrofóbica constituida por diferentes cadenas β ($\beta 1$ - $\beta 8$, Figura 2) conectadas hasta por seis α hélices anfifílicas (A-F, Figura 2). Según la geometría del sitio de unión del ácido graso, las lipasas se subdividen en tres grandes grupos^{1º}.

Grupo I. El sitio de unión es similar a una grieta que se encuentra próxima a la superficie presentada en las lipasas de la familia de *Rhizomucor*.

Grupo II. Este sitio es similar a un embudo como los de la familia de las lipasas gástricas, familia *Pseudomonascepacia* y lipasa B de *Candida antártica*.

Grupo III. Sitio de unión similar a un túnel, se presenta en la familia *Candida rugosa*.

La maquinaria catalítica o centro activo está formada por una triada aminoacídica, la cual está constituida por serina, ácido aspártico (o glutámico) e histidina (Ser-Asp/Glu-His). Esta triada se encuentra presente prácticamente en la totalidad de las lipasas. La pérdida de actividad lipásica que se deriva de la unión del aminoácido serina a un agente inhibidor, revela que dicho aminoácido resulta crucial en la acción catalítica de la enzima (Brady et al., 1990)^{1º}.

El residuo nucleofílicoserina se encuentra localizado en el extremo C-terminal de la cadena β -5 en un pentapéptido altamente conservado, la cual forma una estructura característica β -giro- α denominado como codo nucleofílico. La hidrólisis del sustrato comienza con un ataque nucleofílico por parte del oxígeno de la serina sobre el átomo de

carbono carboxílico del enlace éster. Esto origina un intermediario tetraédrico estabilizado por el hidrógeno vinculado a los átomos de nitrógeno de los residuos de la cadena principal.

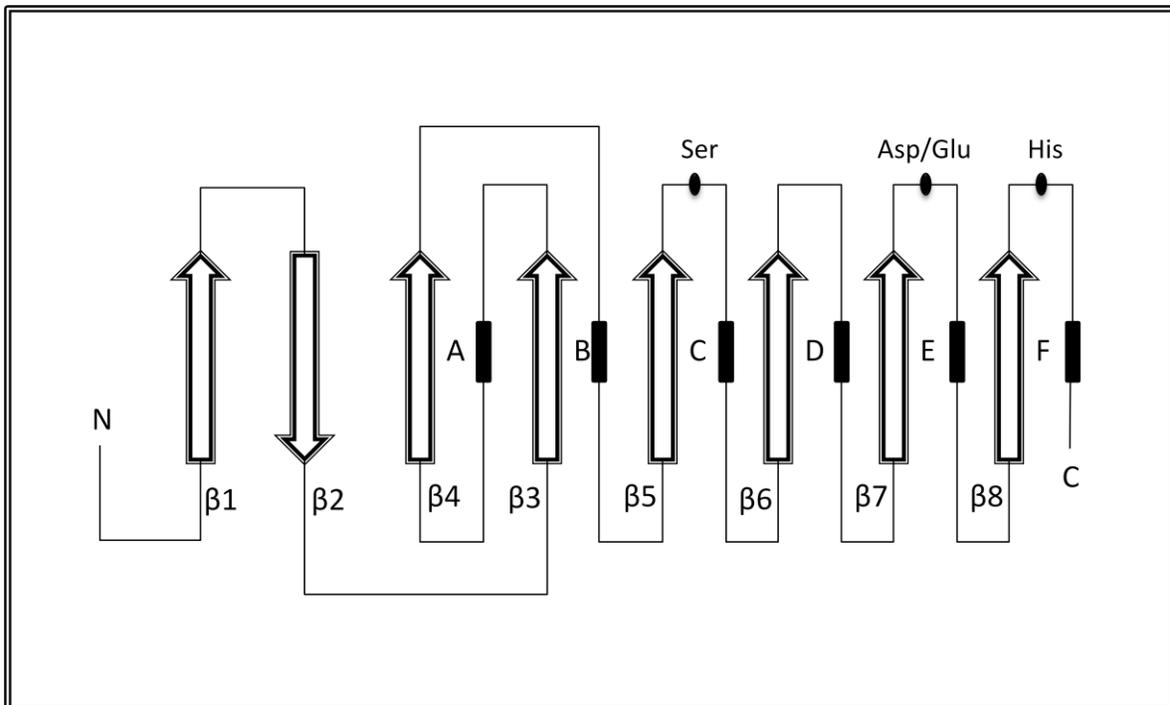


FIGURA 2. Esquema de la conformación del plegamiento α/β . Las cadenas β se designan por número y a las hélices α se les designa una letra. La triada catalítica está indicada por Ser: serina, His: histidina y Asp/Glu se refiere al ácido aspártico o glutámico. N y C son los extremos amino y carboxilo. (Schraget *al.* (1993))¹⁰.

De esta forma se libera un alcohol, dejando detrás un complejo acil-lipasa, el cual es finalmente hidrolizado con la liberación del ácido graso y la regeneración de la enzima¹¹.

Durante la conformación cerrada e inactiva de la lipasa, el centro activo y la zona contigua, involucrada en la unión con el sustrato, se encuentran cubiertas por la “tapa”. En presencia de una interface lípido/agua la tapa es capaz de desplazarse de su posición original, dejando expuesto al centro activo y permitiendo la interacción entre la enzima y el sustrato. Aunque este cambio conformacional es esencial no es suficiente para la expresión máxima de la actividad lipásica, de forma considerable también influye los componentes del sustrato.

La interacción de la tapa con el resto de la enzima cambia de forma hidrofóbica en la forma inactiva a hidrofílica en la conformación abierta. El reagrupamiento es también acompañado por isomerización cis-trans con incremento de energía, la cual es requerida para la transición entre las dos formas y juega un papel en la estabilización de la conformación activa en la interface lípido/agua¹².

En la figura 3 podemos observar la imagen de la lipasa de *Candida rugosa* en la cual se establecen sus conformaciones abierta y cerrada desde el mismo ángulo por encima del sitio activo. Durante la conformación abierta la superficie alrededor del sitio activo es mucho más hidrófoba que otras partes de la lipasa, mientras que en la conformación cerrada la superficie se hace mucho más hidrófila y la posición de la tapa cambia. La imagen se preparó con el programa gráfico GRASP (Nicholls *et al.*, 1991).

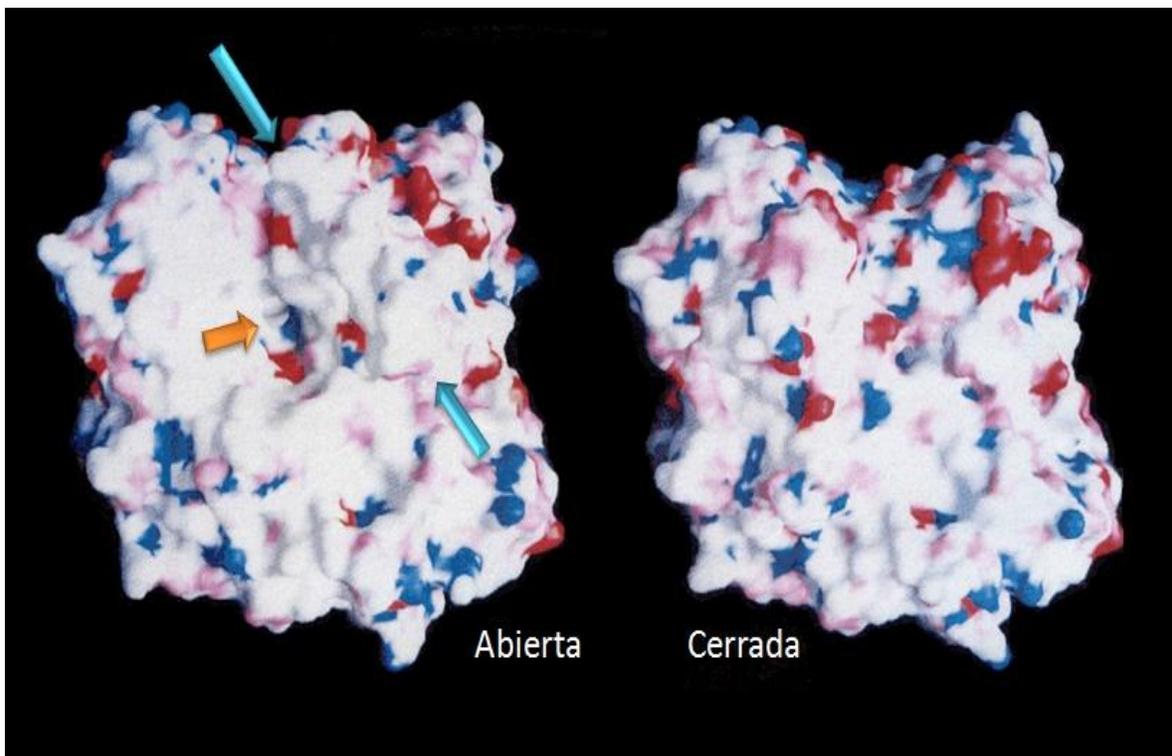


Figura 3. Imagen de la superficie molecular de la lipasa de *Candidarugosa* en sus dos estados conformacionales. De color azul, átomos de nitrógeno, de color rosa se presentan carboxilos y de rojo otros átomos de oxígeno. La superficie en la conformación abierta más coloreada blanca es la zona más hidrófoba. La flecha anaranjada indica la posición del sitio activo al fondo de una depresión grande. La tapa se encuentra marcada entre las dos flechas azules. (Schraget *al.* (1993).¹²

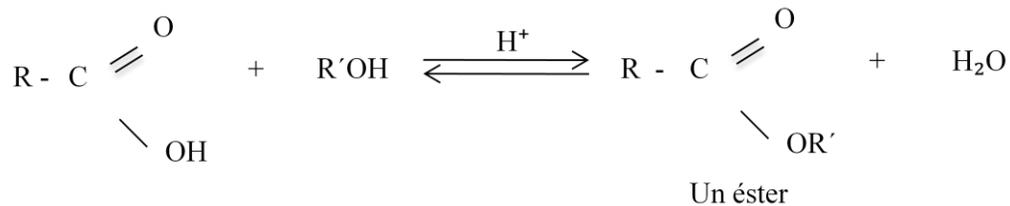
Propiedades químicas y especificidad

La reacción principal y característica de las lipasas corresponde a su función biológica de catalizar de forma natural la hidrólisis de ésteres, principalmente triacilgliceroles de cadena larga.

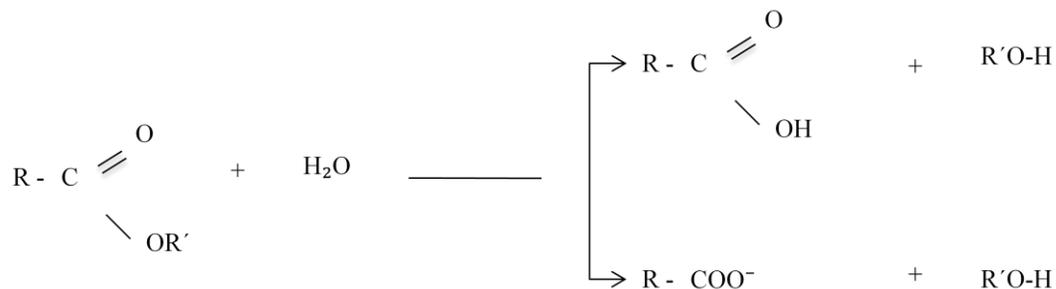
También pueden catalizar la reacción inversa, esterificación y transesterificación en medios microacuosos. El equilibrio entre la hidrólisis y la síntesis se determina por la actividad del agua en el medio de reacción.

La reacción de transesterificación según en el lugar de reacción que tenga entre un éster y un alcohol, un éster y un ácidocarboxílico o dos esterases la reacción puede clasificarse en alcoholólisis, acidólisis e interesterificación, respectivamente.

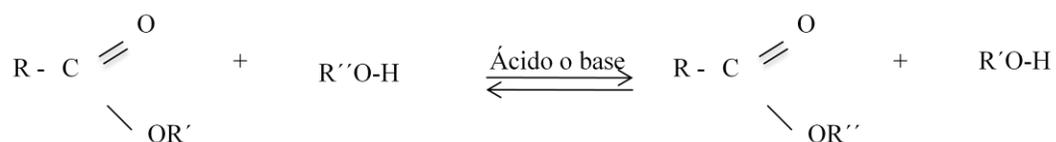
Esterificación: es la reacción entre un ácido carboxílico y un alcohol para dar un éster.



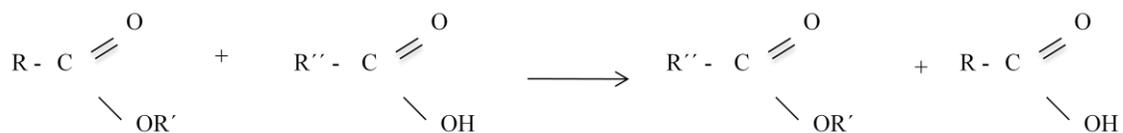
Hidrólisis: es la descomposición de un éster en su ácido y alcohol constituyente en presencia de agua.



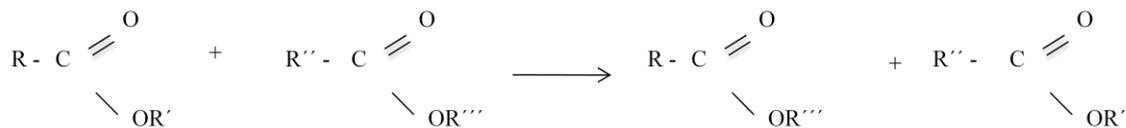
Alcoholólisis: es la reacción entre un éster y un alcohol produciéndose la sustitución de un grupo alquilo del éster por otro.



Acidólisis: es la reacción entre un éster y un ácido carboxílico que transcurre con el remplazo de un grupo acilo del éster por el del ácido libre.



Interesterificación: Es la reacción entre dos ésteres que intercambian su grupo acilo.



Especificidad

Ya algunos autores (Jaeger *et al.*, (2001), Eggert(2001), Liebetonet *al.* (1997)) han destacado las características que hacen tan atractivas a las lipasas sobre todo en la industria química como en la farmacéutica, agroquímica, etc. Una de estas características se refiere a la especificidad, regioespecificidad y estéreo-especificidad que presentan las lipasas al actuar sobre diferentes sustratos. Esta selectividad está determinada por las propiedades de la enzima a nivel molecular, la estructura del sustrato y los factores que afecten a la unión enzima-sustrato.

Según Miguel García de la Universidad de Granada (2005) definió tres tipos de especificidad:

1. Especificidad posicional o regioespecificidad: En este tipo de especificidad la lipasa tiene la capacidad de discriminar entre las posiciones externas (1y 3) e internas (2) del esqueleto de los triacilglicéridos. Y por lo tanto se puede hablar de lipasas específicas sn-1,3, como la que presenta la lipasa pancreática y las procedentes de *Rhizopusarrhizus*, *Aspergillus niger* y *Thermomyceslanuginosus*entre otras. O las específicas sn-2 que es menos usual y fue descrita para la lipasa de *Geotrichumcandidum*. Aunque también existen algunas lipasas no específicas como *Candida rugosa* y *Chromobacteriumviscosum*. Sin embargo esta capacidad parece responder a una preferencia por los ácidos grasos *cis*-9 insaturados independientemente de su posición.
2. Especificidad respecto del ácido graso o acil-especificidad: Las lipasas en general tienden a ser selectivas respecto a un ácido o específicamente a una clase de ácidos grasos con longitudes de cadenas y grados de insaturación definidos. Este tipo de especificidad está determinada por la adecuada acomodación de la cadena carbonada

del ácido graso en el centro activo de la enzima. Y la actividad lipásica depende también de la presencia de ramificaciones o insaturaciones y su posición. Algunas lipasas como la de *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus*, no presentan marcada especificidad por la longitud de la cadena de los ácidos grasos mientras que otras hidrolizan más rápidamente ácidos grasos de cadena corta como *Mucor miehei* lipasa pancreática, o de cadena media a larga como *Rhizopus delemar* y *Pseudomonas fluorescens*.

3. Estereoespecificidad: Este tipo de especificidad es de las más analizadas en la industria ya que es la capacidad de las lipasas de diferenciar entre moléculas de sustratos enantiómeras, cuando se habla de sustratos quirales, e incluso de diferenciar entre posiciones sn-1 y sn-3 en sustratos proquirales. Prácticamente la totalidad de las lipasas ensayadas sobre triacilglicéridos proquirales presentan esta propiedad en mayor o menor medida, a excepción de la lipasa pancreática porcina.

Principales aplicaciones de las lipasas

Las lipasas tienen características importantes que hacen de ellas una fuente atractiva para la industria química. La capacidad de estas enzimas para catalizar la reacción directa, la hidrólisis, así como la inversa, la síntesis, su alta especificidad, las estructuras cristalográficas de muchas lipasas ya han sido solucionadas facilitando así el diseño de estrategias racionales en la ingeniería, por lo general estas enzimas no requieren cofactores, son algunas de estas características.

Y aunque parecieran limitarse por sus costos elevados, son fácilmente obtenibles en cantidades grandes ya que pueden ser producidos por organismos microbianos, hongos y

bacterias, aparte de esto existen técnicas que minimizan costos, como lo son la modificación física que consiste en la inmovilización de las enzimas por adsorción física sobre soportes sólidos o por encapsulamiento en materiales insolubles para su posterior recuperación al tiempo que se incrementa su estabilidad. También existe la modificación química que es donde se forman enlaces covalentes entre las lipasas y un material insoluble es decir, una matriz polimérica o entre ellas mismas, con el mismo fin de inmovilizarlas. Y por último la ingeniería genética que permite expresar las propiedades de interés en un microorganismo cuyo cultivo a gran escala sea favorable, de esta misma técnica se pueden modificar secuencias peptídicas en puntos específicos de la lipasas y ser optimizadas para sus aplicaciones¹³.

Karl-Erich Jaeger (2001)¹⁴ y Thorsten Eggert (2001)¹⁴, K. Liebeton *et al.* (1997)¹⁵, son algunos de los autores que han publicado algunas de las aplicaciones de las lipasas, siendo un amplio campo de aplicación de estas enzimas por las características ya mencionadas haciéndolas el grupo más extenso usado en biocatálisis química orgánica, y esto es reflejado no solo en los más de 1000 artículos publicados al año si no también en el impresionante número de revisiones.

Nuevos materiales biopoliméricos. Los biopolímeros como los polifenoles, polisacáridos y poliésteres muestran un grado considerable de diversidad y complejidad. También estos compuestos reciben una atención creciente porque son biodegradables producidos de recursos naturales renovables. Las lipasas y estereasas son usadas como catalizadores para la síntesis polimérica con la ventaja principal de su alta selectividad en condiciones de reacción suave. Una estrategia combinatoria fue empleada para aislar nuevos poliésteres, estructuralmente complejos de monómeros con grupos multifuncionales reactivos fueron

polimerizados en alto rendimiento enzimático, usando lipasas disponibles comercialmente de diferentes fuentes.

Biodiesel. Una fuente alternativa de energía para el transporte público es el biodiesel, que ha sido producido químicamente usando el aceite de varias plantas (por ejemplo la semilla de colza). El combustible biodiesel proviene de recursos naturales renovables y de manera concomitante reduce la producción de óxido de azufre. La conversión de aceite vegetal al metil-ésteres u otros ésteres de alcohol de cadena corta puede ser catalizada en una sola reacción de transesterificación que usa lipasas en solventes orgánicos.

Síntesis de productos de química fina. La razón principal para usar lipasas en la biocatálisis es que los intermedios claves en la síntesis de terapéuticos, productos agroquímicos y saborizantes, son, por lo general complejos y/o compuestos quirales, difíciles de sintetizar con métodos químicos. Además solamente uno de los enantiómeros de medicamentos es farmacéuticamente funcional.

Algunos ejemplos de estos problemas que fueron solucionados con el uso de lipasas en fármacos son el de *Pseudomonas* (cepa, AK), que fue usada para sintetizar el intermedio quiral 2 en la síntesis total del potente agente antitumoral epitolona A. Mediante la lipasa de *Candida rugosa* se pudo catalizar la resolución enzimática de los compuestos antimicrobianos (S) y (R)-elvirol y sus derivados (S) - (+) y (R) - (-) curcufenol, (R) - (-) curcufenol 8, objetos expuestos actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio anguillarum*.

Se han utilizado las lipasas en la producción eficiente de productos agroquímicos como el enantiómero puro (S)-indanofan, un herbicida usado contra hierbas en arrozales y que solo este enantiómero muestra actividad herbicida.

Por otro lado mediante la síntesis de lipasas se ha logrado desarrollar fragancias para la producción de cosméticos, así como también obtener saborizantes de alimentos, el ejemplo más prominente es el relatado con (-)-mentol. En este caso el método requiere aislar enantioméricamente puro (-) ésteres mentolados, para esto se requiere llevar a cabo una transesterificación con (\pm)mentol utilizando *Burkholderiacepacia* lipasa. El producto final, metil metacrilato, es posteriormente polimerizado para ser usado como un perfume de liberación sostenido.

Mediante la hidrólisis se pueden obtener ácidos grasos y/o alcoholes, estos son productos de gran interés industrial, o también se puede usar para descomponer las grasas.

También durante el tratamiento de aguas residuales las lipasas se usan para la eliminación de la película de grasa que se genera en la superficie de los digestores aerobios e impide la transferencia de oxígeno, así como en la limpieza de tanques y conducciones. Por ejemplo de estas aplicaciones se han utilizado microorganismos productores de lipasas como *Yarrowialipolitic* para el tratamiento en el proceso de extracción de aceite de oliva que sirve para disminuir la demanda química de oxígeno en poco tiempo.

Estos son tan solo algunos ejemplos de la gran variedad de usos de lipasas en las diferentes áreas, que por sus características, van en aumento rápidamente. Aún falta identificar genes de interés con sus propiedades características que han de aumentar sus múltiples usos así como también aportaciones de nuevas técnicas de síntesis y condiciones de reacción.

Interés Clínico de las Lipasas

Dentro de las aplicaciones de las lipasas ya se hablaba de la importancia para resolver problemas de enantioselectividad y complejidad para la síntesis de terapéuticos. Así las lipasas son enzimas con características particulares para la formación de nuevos fármacos para el control de enfermedades contribuyendo así a la importancia clínica de las lipasas. Atraves de su potencial biotecnológico las lipasas son de gran interés en la industria sin embargo también existen lipasas que influyen en la virulencia de enfermedades principalmente de origen bacteriano y fúngico. También por su gran importancia biológica ya que son indispensables para la digestión de lípidos, las lipasas tienen importancia clínica en problemas de salud relacionados con la obesidad.

Acné común

El “acné común” es una enfermedad crónica inflamatoria que implica a los folículos polisebáceos, y causa la formación de erupciones inflamadas y/o no inflamadas. *Propionibacterium acnes* así como *Propionibacterium granulosum* son bacterias anaerobios representativos en la piel y estos son los organismos predominantes que crecen en la región sebácea. *P. acnes* produce una lipasa extracelular que se ha considerado un factor de virulencia de estas bacterias, los ácidos grasos libres son famosos por su capacidad de acelerar o suprimir el crecimiento de *P. acnes*¹⁶.

El glicerol que se genera de la hidrólisis de los triacilglicéridos del sebo sirven de fuente de carbono para *P. acnes*, los ácidos grasos libres producen una inflamación muy intensa y aumenta la hipercornificación de los conductos, debido a que aumenta la adhesión entre los queratinocitos y entre las células de *P. acnes* favoreciendo así la colonización.

Propionibacterium acnes biotipo BIII es el más frecuentemente aislado de casos severos y moderados de acné y este biotipo es el que más actividad lipásica presenta¹⁷.

Gastritis crónica

Helicobacter pylori es el agente causal de la gastritis crónica, la cual es el factor de riesgo más fuerte para la enfermedad de úlcera péptica y cáncer gástrico. El organismo es capaz de evadir el entorno áspero ácido en la mucosa gástrica. *H. pylori* posee numerosas proteínas de virulencia (cagA, vacA, e iceA) y enzimas (lipasas, catalasas, fosfolipasas y proteasas) con genotipos diversos y con estas respuestas inflamatoria intensas que influye en el resultado patógeno siendo dañina para el huésped¹⁸.

Las lipasas junto con las proteasas degradan el moco gástrico, conduciendo a la pérdida de la calidad protectora del moco. La proteasa de *H. pylori* conduce a la desintegración de la estructura polimérica de mucina, mientras que la lipasa y la fosfolipasa A2 causan la degradación del lípido de la mucosa, lo cual es perjudicial para la integridad del gel de la mucosa y las membranas de la células gástrica epitelial¹⁹.

Pancreatitis aguda

Pancreatitis aguda es la inflamación aguda del páncreas y puede ser edematosa o necrotizante, representa un reto diagnóstico en pacientes con dolor abdominal y en casos de complicaciones eleva la morbilidad y mortalidad. La fisiopatología incluye la activación y liberación de enzimas pancreáticas en el intersticio con autodigestión pancreática, enzimas como las proteasas, amilasa, lipasas y nucleasa y normalmente se almacenan en gránulos de zimógeno, ocasionando lesión tisular, respuesta inflamatoria local y compromiso variable de otros tejidos²⁰.

La causa etiológica más común en hombres es el alcoholismo y en mujeres por litiasis vesicular, también puede deberse a causas hereditarias, infecciones, traumatismos o medicamentos en menores casos²⁰.

En el diagnóstico de laboratorio se puede analizar el aumento de amilasa su elevación mayor de tres veces el valor superior normal hace sospechar pancreatitis. La amilasa se eleva en las 6 a 12 horas posteriores al inicio del dolor abdominal, tiene una vida media de 10 h, y persiste elevada por 3 a 5 días. Un dato importante es que la amilasa pancreática representa 35 a 50%, y la salival el resto, pues otras enfermedades pueden causar hiperamilasemia, tales como parotiditis, traumatismo, cirugía, radiación, acidosis, insuficiencia renal, embarazo ectópico roto, salpingitis, alcoholismo, cirrosis, colecistitis aguda, pseudoquiste, ascitis pancreática, obstrucción infarto intestinal, y la anorexia nerviosa²⁰.

Por otra parte la lipasa es más específica, se eleva más temprano y dura más días que la amilasa. Su sensibilidad es de 85 a 100%, aunque su elevación no se asocia con la gravedad del cuadro. Una relación lipasa-amilasa mayor de 2.0 sugiere pancreatitis aguda alcohólica (sensibilidad 91%, especificidad 76%). La elevación de lipasa mayor de 150

IU/L sugiere pancreatitis aguda biliar (sensibilidad 48%, especificidad 96%), así como la elevación de lipasa mayor de tres veces el límite superior normal sugiere pancreatitis aguda biliar con un valor predictivo positivo de 95%. Aunque también se sabe que 15 a 20% de pacientes con pancreatitis aguda tendrán lipasa en valores normales²⁰.

El diagnóstico de pancreatitis no se fundamenta solo en la elevación de las enzimas pancreáticas, sino que debe ir asociado a un cuadro clínico compatible. También puede acompañar de ultrasonido, tomografía y resonancia magnética, sin embargo son menos sensible que el diagnóstico por aumento de lipasa.²¹

Los valores normales de lipasa pancreática son de 10-150 IU/L y en personas adultas es de 18-180 IU/L. Las causas de aumento de lipasa pueden deberse a²¹:

- Trastornos pancreáticos
- Afección de vías biliares
- Rotura de aneurisma / disección de Aorta
- Nefrolitiasis
- Obstrucción intestinal
- Insuficiencia renal grave
- Quimioterapia
- Radioterapia
- Fármacos como betanecol, colinérgicos, indometacina, meperidina, morfina, metacolina

Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial que se puede prevenir, es un proceso que suele iniciarse en la infancia y la adolescencia, que se establece por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético. En su origen se involucran factores genéticos y ambientales, que determinan un trastorno metabólico que conduce a una excesiva acumulación de grasa corporal para el valor esperado según el sexo, talla y edad. La obesidad infantil ha sido definida considerando la relación entre el peso total y la talla estimada mediante el índice de masa corporal ($IMC = \text{peso en kg} / \text{estatura en m}^2$). El sobrepeso infantil se establece a partir del centil 75 en curvas de IMC y la obesidad infantil a partir de percentil 85.3.

El exceso de peso corporal es reconocido actualmente como uno de los retos más importantes de salud pública mundial, dada su magnitud, la rapidez de su incremento y el efecto negativo que ejerce sobre la salud de la población que la padece, debido a que aumenta significativamente el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). Según la secretaria de salud en México en la actualidad este país ocupa el segundo lugar de prevalencia mundial de obesidad, después de Estados Unidos de América y se le ha denominado ya como una epidemia.

La obesidad plantea un desafío terapéutico al clínico, intervenciones convencionales no farmacológicas basadas en la dieta y el ejercicio han limitado el éxito a largo plazo en la producción de la pérdida de peso sostenida. La obesidad induce múltiples anormalidades metabólicas que contribuyen a la patogénesis de la *diabetes mellitus* y enfermedades cardiovasculares y es asociado con la morbilidad aumentada y el riesgo de mortalidad. Por lo tanto existe una necesidad para usar instrumentos nuevos y eficaces terapéuticos.

Las lipasas al llevar a cabo la hidrólisis de triacilgliceroles permite la absorción de grasas en el organismo, un agente inhibidor de la actividad de la lipasa pancreática en el intestino delgado bloquearía el centro activo de la lipasa y así disminuiría de manera importante la digestión y la absorción posterior de los ácidos grasos libres y monoglicéridos, eficaz en un 30% de la grasa ingerida. Así una persona normal con una dieta media debería perder peso gradualmente y mantener esta pérdida²²⁻²³.

Métodos de Medición de Actividad Lipásica

La actividad de una enzima normalmente se mide determinando la velocidad de aparición de un producto o la desaparición de un sustrato, durante la reacción catalizada por la misma enzima. Estos son métodos fisicoquímicos, aunque hoy en día también existen métodos inmunológicos que sirven para medir la cantidad de lipasa presente por separado de su actividad. En la actualidad existen numerosos métodos para medir la actividad de las lipasas, Beissonet *al* (2000)²⁴. Los clasificaron así:

1. Volumetría.
2. Espectroscopia (fotometría, fluorimetría, infrarojo).
3. Cromatografía.
4. Radiactividad.
5. Tensometría interfacial.
6. Turbidimetría.
7. Conductimetría.

8. Inmunoquímica

9. Microscopia

Métodos fisicoquímicos

Se refiere a los métodos generalmente basados en la desaparición de un sustrato o aparición de un producto.

Métodos basados en desaparición del sustrato

1. Nefelometría y turbidimetría. Este método en medios sólidos es comparable a los que implican indicadores coloreados en platos de agar junto con ésteres carboxílicos como sustrato de lipasa. Consiste en determinar el diámetro de la difusión del área del producto. La presencia de lipólisis dará lugar a una zona clarificada sobre el plato de agar. Esto se observa si los ácidos grasos libres son al menos parcialmente solubles en agua. Este proceso es resultado de la disminución en el tamaño de la hidrólisis de las partículas emulsionadas que ocasionan una disminución de la luz difundida²⁵.

En medios líquidos el método consiste en supervisar la disminución con el tiempo de la absorbancia de los TAG en una emulsión. Esta técnica es sensible a artefactos, los numerosos artefactos en el suero de la sangre, por ejemplo puede interferir con el proceso. Sin embargo, los resultados no son valores de actividad absoluto y los datos cuantitativos no son confiables y por lo tanto se necesita hacer una curva de calibración usando una lipasa pura²⁵.

2. Método de plato de Wilhelmy. Es un método que detecta el consumo de sustrato, y consiste en esparcir la grasa a hidrolizar sobre una interface aire-agua formando una

monocapa lipídica. Mediante una barrera de teflón se aumenta o disminuye el área ocupada por dicha monocapa, de modo que la presión superficial puede ser controlada. Una solución de lipasa se inyecta en el seno de la fase acuosa, de forma que al ser hidrolizados los lípidos situados en la superficie la presión superficial disminuye y la barrera de teflón ha de moverse para mantenerla constante (Figura4). Registrando este movimiento en función del tiempo se puede seguir la cinética de la reacción.

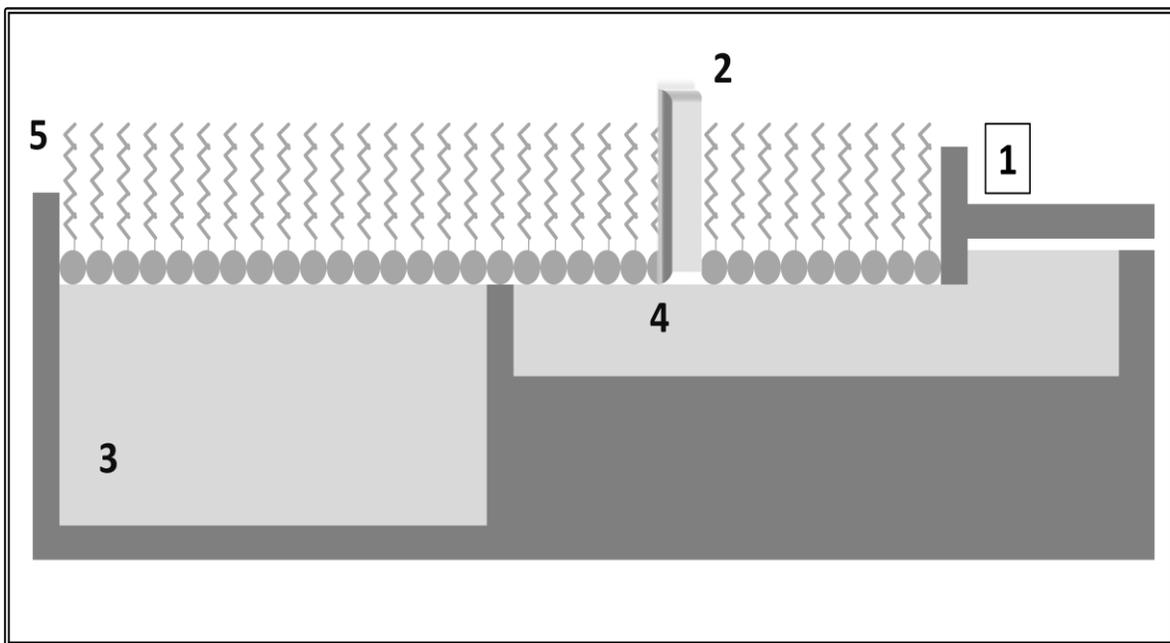


Figura 4. Modelo del método de plato de Wilhelmy (WilhelmyPlateMethod). 1. Barrera de teflón móvil para control de la presión superficial. 2. Lamina de platino conectada a una electromicrobalanza para medir la tensión superficial. 3. Compartimento de reacción enzimática. 4. Compartimento del depósito. 5. Monocapa lipídica²⁶.

Con esta técnica es posible medir y controlar algunos parámetros importantes interfaciales como la energía interfacial libre y el área molecular del sustrato, así como el exceso superficial de lipasas solubles en agua²⁶.

3. Microscopia de fuerza atómica. Para supervisar la cinética de la hidrólisis de la bicapa de fosfolípidos por la fosfolipasa A2, Nielsen *et al.* han realizado experimentos que usan la microscopia de fuerza atómica en un medio líquido. Después de estos estudios, la hidrólisis enzimática de la mezcla de la bicapa de acilgliceroles/fosfolípidos por *Humicola lanuginosa* lipasa, también fue investigada por microscopia de fuerza atómica. La bicapa del lípido fue hidrolizada por esta lipasa y como los productos se disuelven en el búfer, las regiones de la bicapa con defectos profundos fueron descubiertos por microscopia de fuerza atómica²⁷.

4. Espectroscopia infrarroja. Este método registra el espectro infrarrojo de la mezcla reaccionante en función del tiempo. Tanto los ésteres como los ácidos grasos libres pueden ser cuantificados en base a sus coeficientes de extinción molar, mediante la ley de Beer. Para poder medir la espectroscopia se necesita que el medio de reacción sea traslucido por lo tanto es necesario utilizar micelas inversas, donde las lipasas se encuentran encapsuladas²⁸.

Métodos basados en aparición del producto

En este método se encuentran las técnicas donde después del procedimiento se mide algún parámetro del producto obtenido después de la interacción con algún sustrato.

Liberación de protón como un ensayo indirecto

1. **Indicadores coloreados.** En medios sólidos cuando una solución de lipasas es colocada sobre un plato de agar que contiene un éster carboxílico como sustrato, es posible supervisar el pH de los ácidos grasos liberados observando el cambio de color del indicador incorporado junto con el sustrato en el agar. Existe una relación lineal entre el diámetro de las manchas formadas y el logaritmo de la concentración de la enzima.

En medios líquidos se refiere a un método cualitativo, aunque esta técnica proporciona un medio simple de descubrir la actividad lipásica en fracciones de columna de cromatografía en varias etapas de purificación, observando los cambios de colores de indicadores mezclados con los sustratos de ésteres²⁹.

2. **Volumetría.** El método de pH-stato es una técnica generalmente usada para los ensayos de referencia de lipasas. Esta técnica es conveniente para caracterizar la actividad de la lipasa y la especificidad, también sirve para ensayos del fenómeno de la activación interfacial. La actividad lipásica se mide sobre una emulsión mecánicamente revuelta de triglicéridos naturales o sintéticos, mediante la neutralización de ácidos grasos liberados en

la reacción hidrolítica con el tiempo añadiéndole NaOH titulado para mantener el pH constante³⁰.

3. Análisis de ácidos grasos libres liberados

Ensayos colorimétricos. Ya ha sido descrito un ensayo espectrofotométrico continuo basado en las propiedades metacromáticas del colorante catiónico, safranina. En este ensayo el cambio en la carga negativa neta en la interface lípido/agua durante la reacción lipolítica se observa por el cambio de absorbancia de safranina. La actividad lipásica puede ser medida de bajo de 50 mU por lo tanto resulta ser más sensible que el método de pH-stato³¹.

Rhodamina 6G también es utilizado para obtener ácidos grasos libres que es extraíble con hexano, en presencia de un ácido graso se desarrolla un color rosado y su absorbancia es leído en 513 nm. El inconveniente que muestra es la reproducibilidad, se tienen que hacer curvas de referencia con cada solución nueva de rhodamina 6G.

En esta técnica para determinar los ácidos grasos liberados se han descrito varios sustratos como los ésteres de p-nitrofenol con ácidos grasos de distintas longitudes, mostrando en este caso una absorbancia a 410 nm. También los triglicéridos naturales pueden ser usados como sustratos, formando luego sales cúpricas con los ácidos grasos liberados³².

Fluorescencia. Esta técnica se puede emplear cuando los ácidos grasos liberados presentan fluorescencia y para esto se usan triacilglicéridos o ésteres sintéticos. También se aprovecha la interacción de sustancias fluorescentes añadidas al medio de reacción con los ácidos grasos producidos, lo que posibilita el seguimiento de la cinética de la hidrólisis enzimática con una mayor variedad de triglicéridos³³.

Un ejemplo de este método es el basado en las interacciones entre rhodamina B y ácidos grasos liberados. La reacción ocurre en un gel que contiene una mezcla de rhodamina B triglicéridos y agarosa en pequeños pozos. Después de la adición de las lipasas, los ácidos grasos liberados se observa la intensidad de fluorescencia (excitación 485 nm, emisión 535 nm) cada 10 min. de 1 a 2 h.

Cromatografía. Existen varias técnicas cromatografías que pueden ser utilizadas para detectar lípidos, así como AGL de TAG, puede ser mediante cromatografía de capa fina, de gases o líquida. Para estas últimas técnicas el método requiere que los ácidos grasos antes sean transformados en sus ésteres de metilo. La cromatografía líquida permite, mediante el empleo de columnas selectivas sobre moléculas quirales, separar los productos y reactivos de una reacción de hidrólisis enantioselectiva, lo que hace posible caracterizar la enantioselectividad de la enzima³⁴.

Métodos enzimáticos. Se han descrito varias técnicas que por medio de una enzima revelan la actividad lipásica como la luz emitida por algunos productos de reacción de luciferasa de la bacteria marítima luminosa *Beneckeaharveyi* en presencia de ácidos grasos puede ser utilizada para descubrir niveles bajos de ácidos como el palmítico u oleico. Sin embargo tiene la desventaja que oleico, linoléico, palmitoléico y ácido linolénico inhiben a la luciferasa³⁵.

In Situ. Detección por microscopia de electrones. Ácidos grasos liberados en tejidos de animal por lipasas pueden ser detectados por microscopia de electrones. Esta técnica por ejemplo ha sido usada para detectar la lipasa lingual de rata y la lipasa presente en células pancreáticas de ratas y ratones³⁶.

Esta técnica también se ha utilizado para observar actividad de la lipasa en la epidermis externa. Tejidos fijados con aldehído fueron incubados con trioleína y luego expuestos para conducir las sales a formar jabones insolubles y finalmente procesados para la microscopia de electrones³⁷.

4. **Ensayos radiactivos.** Los métodos que implican el empleo de triacilglicéridos que contienen cadenas acilo marcadas son ensayos muy específicos y muy sensibles, sin embargo no pueden ser monitoreados continuamente y necesitan un paso cromatográfico que lleva mucho tiempo o un paso de fraccionamiento orgánico de solventes para aislar los ácidos grasos liberados³⁸.

Un método es el basado en marcaje con níquel ⁶³extrayendo AGL. Es sensible hasta 1 nmol de AGL detectados. Pero el método requiere que la fase de heptano que contiene los AGL tiene que ser evaporado antes de la adición del níquel marcado. Esto también requiere de material libre de grasa ácida³⁸.

Existen otros métodos por el cual se puede determinar la actividad lipásica como el análisis de alcoholes liberados durante la lipólisis. El análisis del glicerol no se lleva a cabo normalmente ya que estas moléculas por lo general no se presentan en los momentos iniciales de la reacción. Pero si es más frecuente el análisis de alcoholes modificados, donde se utilizan esterés como sustratos de origen sintético, y se detectan por colorimetría o fluorescencia. También se han utilizado tioésteres como sustrato.

Otra alternativa es la conductividad eléctrica, se observa que durante la reacción de hidrólisis aumenta la conductividad eléctrica, debido al desarrollo de cargas eléctricas llevadas por los AGL. Esta técnica tiene desventajas como que las medidas dependen

mucho de la temperatura, la sensibilidad es satisfactoria solo cuando se usa triacetin como sustrato aunque este no es conveniente para las lipasas³⁹.

Métodos inmunológicos

El examen ELISA forma un sistema sumamente sensible y específico para descubrir y cuantificar lipasas. Estos métodos inmunológicos pueden ser usados para descubrir tanto formas activas como inactivas. La detección inmunológica de lipasas requiere de la purificación de la enzima, natural o recombinante.

Varios ensayos inmunológicos se han desarrollado para determinar la concentración de la lipasa pancreática y utilizados para el diagnóstico clínico de la pancreatitis siendo sensibles y específicos. Inmunoensayos y equipos comerciales han sido desarrollados para cuantificar lipasa hepática en el suero humano.

Inmunotransferenciaelectroforética es el análisis que consiste en electroforesis de gel que se combina con un método inmunoquímico de detección. Esta técnica sirve para determinar la masa molecular de la lipasa así como la especificidad de anticuerpos para una cierta lipasa. Las proteínas son separadas de un gel de SDS-PAGEy transferidas a una membrana, lavadas e incubadas con anticuerpos en presencia de reactivos obstructores⁴¹.

Electroforesis

Dentro de los métodos cromatográficos se encuentran distribuidas las técnicas de separación llamadas electroforéticas, estas técnicas ofrecen una alta eficiencia de

separación y se requiere una cantidad relativamente limitada de equipo. La electroforesis es una técnica que principalmente se ocupa durante el estudio de un analito, más que de objetivo preparatorio, sin embargo hoy en día con la creciente tecnología en el estudio de ADN como su amplificación de fragmentos junto con la Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR), y el análisis de proteínas y péptidos por espectrofotometría de masas con cantidades analíticas, son separadas electroforéticamente y así pueden ser mejor analizadas.

Esta técnica de separación tiene un amplio campo de uso, principalmente en la investigación biológica y bioquímica, la química de proteína, la farmacobiología, la medicina forense, investigaciones clínicas, la ciencia veterinaria, el control de alimentos así como la biología molecular. Y va adquiriendo cada vez más importancia con la resolución de problemas de separación específicos.

Fundamento de la electroforesis

Bajo la influencia de un campo eléctrico las moléculas y partículas emigran en dirección del electrodo que tiene la carga eléctrica opuesta, durante este proceso por lo general las sustancias se encuentran en una solución acuosa. Debido a sus variaciones en cargas y masas las diferentes moléculas y partículas de una mezcla emigran en velocidades diferentes y así se separan en fracciones particulares.

La medida de velocidad de migración, llamada movilidad electroforética, es un parámetro significativo y característico de una molécula o partícula cargada y depende de los valores de pK de los grupos cargados y el tamaño de la partícula o molécula. Esto está

influenciado por el tipo, concentración y pH del búfer, por la temperatura y la fuerza de campo así como la naturaleza del material de apoyo.

La separación electroforética es realizada en soluciones libres como en tubo capilar y sistemas de flujo libres, o en medios estabilizadores como platos de capa fina, películas o geles.

La movilidad electroforética relativa de sustancias es especificada, se calcula en relación con la distancia de migración de una sustancia estándar, normalmente es un tinte como el azul de bromofenol, que ha sido utilizado como un estándar interno.

En la actualidad básicamente se emplean tres métodos diferentes de separación electroforética.

- a) Electroforesis, a veces llamada electroforesis de zona ZE
- b) Isotacoforesis o ITP
- c) Enfoque isoeléctrico o IEF

En la electroforesis de zona se usa un sistema homogéneo de búfer durante el tiempo entero de separación y el rango para asegurar un potencial de hidrogeno constante. Las distancias de migración durante un plazo limitado definido son una medida de movilidad electroforética de varias sustancias y puede ser utilizado para moléculas anfotéricas y no anfotéricas. Un problema que reduce la sensibilidad de detección y de resolución es que durante la difusión de separación puede conducir a zonas veladas.

A diferencia de la ZE, en la ITP la separación es realizada en un sistema discontinuo de búfer. La muestra ionizada emigra entre un electrolito principal con una alta movilidad y un electrolito de terminación con baja movilidad, pero todos ellos emigrando a la misma velocidad. Los diferentes componentes son separados según sus movilidades

electroforéticas. La sustancia con la movilidad más alta directamente sigue el ion principal y el de la movilidad más baja emigra directamente delante del electrolito de terminación. En el ITP hay una concentración que trabaja contra el efecto de la difusión.

En el enfoque isoeléctrico ocurre en un gradiente de pH y se usa solo para sustancias anfotéricas como péptidos y proteínas. Las moléculas se mueven hacia el ánodo cátodo hasta que ellos alcancen una posición en el gradiente de pH donde sus cargas netas son cero. Este potencial de hidrógeno es el “punto isoeléctrico” (pI) de la sustancia. Si la sustancia se difunde lejos, se generara una carga neta otra vez y el campo eléctrico aplicado hará que emigre atrás de su pI. Este efecto conduce al nombre de enfoque y por esto también se evita el problema de difusión.

Estas técnicas se aplican como en la separación de proteínas, péptidos, azúcares y ácidos nucleicos. Métodos electroforéticos son usados para la caracterización cualitativa de una sustancia o la mezcla de estas, para el control de pureza, determinación cuantitativa y objetivos preparatorios.

Muestra. Al momento de escoger el método electroforético apropiado es importante tener en cuenta la naturaleza de la muestra que va ser analizada. No debe haber ninguna partícula sólida o componentes grasos suspendidos en la solución porque pueden interferir con la separación bloqueando los poros de la matriz y por eso se centrifuga la solución de la muestra.

Las sustancias cargadas negativamente o positivamente son más fáciles de correr, como los ácidos nucleicos, tintes, fenoles y ácidos orgánicos o bases. Moléculas anfotéricas como aminoácidos, péptidos, proteínas y enzimas tienen cargas netas negativas o positivas dependiendo del pH del búfer.

Las proteínas y enzimas son a menudo sensibles a ciertos potenciales de hidrógeno o búfers, cambios conformacionales, desnaturalización, formación de complejos e interacciones intermoleculares son posibles. La concentración de las sustancias en la solución también desempeña un papel importante, en particular cuando la muestra alcanza un valor crítico durante la transición de la solución en la matriz del gel.

Búfer. La separación de muestras electroforéticamente es hecha en un búfer con un potencial de hidrógeno exacto y una fuerza iónica constante. La fuerza iónica debe ser tan baja como sea posible de modo que tanto la contribución de los iones de la muestra a la corriente total como su velocidad sea bastante alta.

Durante la electroforesis, los iones del búfer son llevados a través del gel de la misma forma que los iones de la muestra, los iones cargados negativamente hacia el ánodo, y los iones cargados positivamente hacia el cátodo. Esto debe ser llevado a cabo con muy poca energía de forma que no se genere mucho calor.

Mediante la segunda ley de electrolisis de M. Faraday es posible calcular la cantidad de iones que emigran en un experimento de electroforesis. La cantidad de electricidad es igual a la suma de cantidades de las sustancias, que son eliminadas de electrolitos diferentes. Tomando el número de Avogadro como constante y la carga elemental esto quiere decir: 1 mAh es igual a 36.4 mol.

En sistemas verticales o capilares el pH frecuentemente es puesto a muy alto o muy bajo valor, de manera que las moléculas estén negativa o positivamente cargadas y que así emigren en la misma dirección.

Electroendosmosis. El medio estabilizador como el gel y/o la superficie del equipo de separación como los cristales o tubos capilares pueden llevar grupos cargados como grupos

carboxílicos en el almidón y agarosa o grupos sulfónicos, óxido de silicio sobre superficies de cristales, estos grupos se ionizan en búfers básicos y neutrales y que en el campo eléctrico serán atraídos por el ánodo. Estos grupos se fijan en la matriz por lo tanto no emigran y causa una compensación por el contra flujo de H_3O^+ (ion hidronio) más iones hacia el ánodo, a este efecto contaminante se le denomina electroendosmosis. En geles este efecto es observado como un flujo de agua hacia el cátodo que lleva las sustancias solubilizadas a lo largo. Los resultados son zonas veladas y sequedad del gel⁴².

Tinción. Las proteínas que son separadas mediante electroforesis se pueden visualizar en el gel mediante diversos métodos de tinción: fluorescencia, plata y azul de Coomassie, son los más comunes siendo el ultimo el generalmente usado presentando una sensibilidad de hasta 50 ng de proteína. La tinción con Coomassie puede emplearse para la determinación de proteínas cuando estas son abundantes, pero no para la determinación de pureza de proteínas trazas. Esta tinción requiere un medio ácido para la generación de atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. La atracción iónica es a través de las fuerzas de Van Der Waals, que une a las proteínas y al colorante formando un complejo⁴³. A pesar de ser una técnica sensible una de las desventajas de utilizar la técnica de tinción con Coomassie es el tiempo de tinción. La técnica puede llevar de 12 a 24 horas según la muestra para teñir, más 35 minutos aproximadamente para desteñir. Si a este tiempo se le suma lo que dura el procedimiento de la técnica de electroforesis dentro de la polimerización y el tiempo de corrida, esta técnica se convierte en un método tardado.

A un mas a esta desventaja se encuentra la de especificidad. La tinción con Coomassie es general, lo cual significa que tiñe indiscriminadamente todo tipo de proteínas

y resulta en desventaja a la hora de identificar determinada enzima como la lipasa, a pesar del uso de marcadores de peso molecular.

Electroforesis en Condiciones Desnaturalizante (SDS-PAGE)

Durante los últimos 30 años, varios métodos electroforéticos en gel de poliacrilamida se han desarrollado para resolver distintos problemas. Sin embargo no se podría decir que alguno de estos métodos es universalmente aplicable, debido a la diversidad de moléculas y a los diferentes objetivos experimentales. Una electroforesis en gel de poliacrilamida dimensional resulta ser una técnica relativamente simple y económica. Entre las diferentes variantes de esta técnica, electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) discontinuo, descrita por Laemmli, es el sistema comúnmente usado, en el cual las proteínas son separadas por su tamaño. Este procedimiento desnatura las proteínas y por eso no puede ser usado para analizar proteínas nativas y proteínas cuya actividad biológica tiene que ser conservada para pruebas funcionales. Para tales casos es necesario utilizar un sistema no desnaturante.

Estructura y Mecanismo de Polimerización de Geles de Poliacrilamida

Los primeros geles de poliacrilamida en electroforesis fueron usados por Raymond y Weintraub (1959). Estos geles son químicamente inertes y mecánicamente estables. Poliacrilamida se forma por la copolimerización química de acrilamida monomérica y N,N'-metilen-bisacrilamida (Figura 5).

La reacción de copolimerización de la acrilamida y bisacrilamida es provocada por un producto químico o fotoquímico, sistemas llamados iniciadores. La polimerización química es iniciada por TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina) y persulfato de amonio

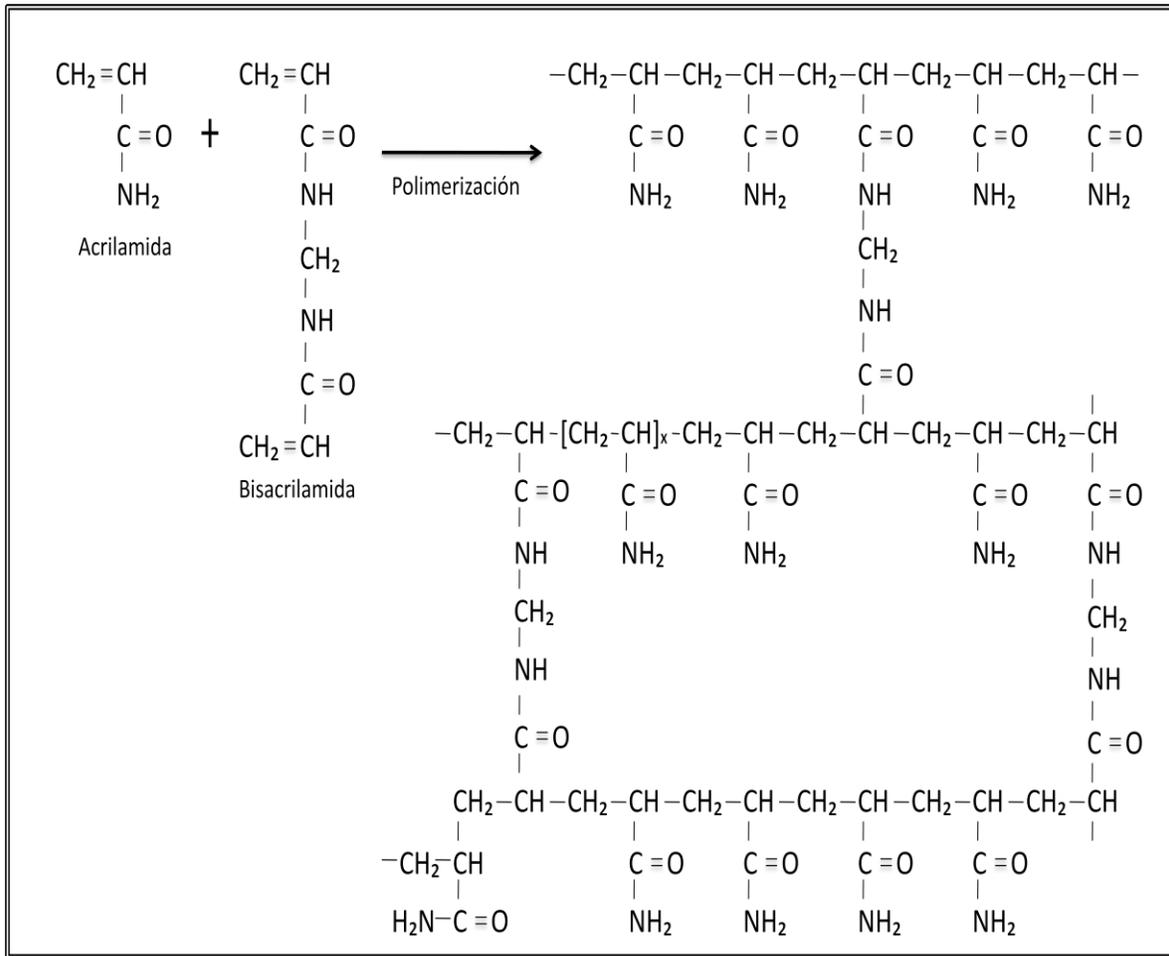


Figura 5. Reacción de polimerización entre la acrilamida y bisacrilamida⁴³.

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, mientras que la polimerización fotoquímica puede ser iniciada por riboflavin-5'-fosfato o azul de metileno.

Cuando el persulfato de amonio es disuelto en agua forma radicales libres que activan a la acrilamida, TEMED es añadido para servir como catalizador para acelerar la

reacción de polimerización debido a su capacidad de llevar electrones. Entonces el monómero de acrilamida activado puede reaccionar con el monómero inactivado para producir cadenas largas del polímero. Las cadenas de polímero alargadas son unidas al azar en cruz con la bisacrilamida para formar una red de cadenas de acrilamida.

La iniciación con riboflavina es menos común pero también puede ser usada para generar radicales libres y a veces se combina con el persulfato de amonio. En presencia de oxígeno y luz ultravioleta, la riboflavina sufre la fotodescomposición y la polimerización es iniciada por los radicales libres.

El tamaño del poro puede ser reproducible y exactamente controlada por la concentración (T) total de acrilamida y el grado de unión (C).

$$T = \frac{a + b}{v} 100$$

$$C = \frac{b}{a + b} 100$$

a es la masa de acrilamida en gramos.

b es la masa de bisacrilamida en gramos.

V es el volumen en mililitros.

Cuando C permanece constante y la T aumenta, el tamaño del poro disminuye. Cuando la T permanece constante y C aumenta, el tamaño del poro sigue una función parabólica. En los valores altos y bajos de C los poros son grandes.

Factores que afectan la polimerización

Durante el proceso existen factores que pueden afectar la polimerización, algunos factores pueden cambiar la velocidad de la polimerización, otros pueden cambiar las

propiedades del gel como tamaño del poro, elasticidad y homogeneidad. Es necesario comprender estos factores y como afectan para poder obtener geles reproducibles y con propiedades deseadas.

La velocidad de la polimerización de un gel puede ser observada por espectrofotometría, en una absorbancia de 260 nm para la reacción. Los factores que alteran la velocidad de polimerización son:

1. Tipo y concentración de iniciadores. En la polimerización química una concentración más alta del iniciador causa una polimerización más rápida y viceversa. Mientras que en la fotopolimerización requiere concentraciones definidas. La polimerización en gel es menos satisfactoria si se usan concentraciones más altas o inferiores a la requerida.

2. Pureza de los reactivos. Los contaminantes en la acrilamida, bisacrilamida, iniciadores, búfers y aditivos necesarios pueden inhibir o acelerar la polimerización. Un ejemplo de inhibidores de la reacción son los metales como el cobre. El tiempo de uso de los reactivos también afecta por ejemplo el persulfato de amonio que disuelto en agua pierde rápidamente su actividad.

3. pH. El efecto del pH está relacionado con la elección del iniciador. Caglio y Righetti definieron al sistema de persulfato como el más adecuado en la gama de pH 7-10⁴⁴.

4. Temperatura. A temperaturas más altas se favorece la polimerización mientras que temperaturas bajas reduce la velocidad de la reacción. La temperatura optima se encuentra entre 23-25°C. para obtener geles reproducibles estos deben ser polimerizados cada vez a la misma temperatura. Por lo general las soluciones se mantienen a 4°C por lo cual se deben dejar a que tomen la temperatura ambiente.

5.Intensidad de luz (para fotopolimerización).La polimerización es aproximadamente proporcional a la intensidad de la luz absorbida. Intensidad de luz demasiados altas evitaran la polimerización o será incorrecta.

6.Oxígeno.La presencia de oxígeno inhibe la polimerización de acrilamida ya que el oxígeno atrapa radicales libres.

7.Concentración de monómeros.Concentraciones altas de monómeros causa la polimerización más rápida.

El tamaño del poro también interviene en la correcta polimerización. Se ha sugerido que el tamaño del poro medio alcanza un mínimo cuando la cantidad de bisacrilamida representa aproximadamente el 5% de la acrilamida total. Cuando la concentración rebasa el valor para el tamaño del poro mínimo las cadenas del polímero se entrecruzan en bultos con espacios grandes⁴⁴.

Factores que afectan la homogeneidad del gel

Son algunos los factores que pueden afectar la homogeneidad del gel en la electroforesis:

1.Al no mezclar cuidadosamente el iniciador de la polimerización con las soluciones monoméricas causan remolinos en el gel. También al mezclar demasiado introduce un exceso de oxígeno inhibiendo la polimerización.

2.El grosor del gel también afecta la homogeneidad.Por encima de un grosor de 3 mm las inhomogeneidades de gel ocurren,inducidas por la gravedad. Al igual que si está por debajo de este grosor, se ve afectado el flujo del gel.

3. La polimerización inducida por el iniciador persulfato es muy sensible al oxígeno, al no ser sellada la mezcla en la cima correctamente durante la polimerización, la absorción de oxígeno causará un gel no homogéneo.

4. La velocidad de polimerización también afecta la uniformidad de los geles. La polimerización que es demasiado rápida (<10 minutos) o demasiado lenta (> 60 minutos) conduce a una polimerización no uniforme⁴⁴.

SDS y Mercaptoetanol

La electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para la determinación del peso molecular de las subunidades de proteínas. La estructura del detergente SDS empleado en esta variación de electroforesis (SDS-PAGE) es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$. El anión se une a las proteínas por absorción no específica (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos, con una relación SDS/proteína máximo de 1,4 g/g). El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). Las proteínas reaccionan con SDS a una relativamente alta concentración, pero se ha demostrado que 0,4 % de SDS es el nivel mínimo necesario para saturar los sitios de unión de la proteína, sin embargo, se emplea 1 % para lograr un margen de seguridad.

El Rf es una medida convencional de la movilidad de la proteína relativa al frente de migración y se define como la distancia desde el inicio del gel separador hasta el centro de cada banda dividida entre la distancia a la que ha migrado el ión líder. La concentración apropiada de SDS en el búfer superior, se determina incrementando la cantidad de SDS hasta que no exista variación en el Rf. Se ha demostrado que concentraciones en el rango de 0,02 a 0,025 % de SDS en el búfer superior es suficiente, sin embargo se utiliza 0,03% para obtener un margen de seguridad.

El complejo SDS-proteína tiene forma de varilla con un diámetro aproximado de 18 Å y una longitud proporcional al peso molecular de la cadena polipeptídica. El tratamiento concomitante con un agente reductor de puentes disulfuro, como el 2-mercaptoetanol (2ME) o el DTT desnatura las proteínas y las rompe en las subunidades que la componen. Por lo que el complejo SDS-proteína tiene generalmente mayor densidad de carga y menor tamaño que las proteínas nativas. Se ha determinado que con 5 min a 95-100 °C es suficiente para la formación de enlaces estables SDS-proteína a una concentración de 1 % de SDS, en presencia de EDTA y condiciones reductoras. El complejo SDS-proteína es estable durante 3 meses a 4 °C. El SDS migra más rápido que el complejo proteína-SDS en un gel restrictivo, por lo que el SDS no es necesario adicionarlo en los geles si este está presente en la muestra y en el búfer superior, lo que da la ventaja de asegurar las condiciones y la eficiencia de migración de los geles sin SDS. La migración de los derivados proteína – SDS hacia el ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular ($\log PM$). La relación carga/masa es aproximadamente igual para todas las proteínas de la muestra por lo que la talle de esta depende en el factor determinante de

la separación. El SDS-PAGE se emplea para estimar el peso molecular de las proteínas y se compara con un patrón.

Bajo iguales condiciones de pH y temperatura, el SDS y las proteínas se concentran en la misma zona, pero como la cantidad de SDS es muy grande comparada con la de proteínas y su concentración en el gel concentrador se puede regular, se forma una zona de concentración amplia caracterizada fundamentalmente por ser estable con el frente de corrida y que continuamente aumenta durante la electroforesis dependiendo de la cantidad de SDS introducido en el búfer⁴⁵.

Las condiciones pueden ajustarse dependiendo de cómo se necesite separar las proteínas (en estado completamente desnaturalizada, parcialmente desnaturalizada o nativa). Las asociaciones covalentes entre las unidades de proteínas pueden mantenerse omitiendo el β ME del búfer de muestras. En ausencia de este agente reductor los puentes disulfurointracatenarios e intercatenarios de la muestra de proteínas permanecen intactos; la movilidad electroforética del complejo SDS proteína se altera bajo estas condiciones de disociación y durante la electroforesis la movilidad de los oligómeros SDS proteínas es menor que con los componentes SDS polipéptidos completamente desnaturalizados. Las proteínas pueden mostrar una respuesta individual característica a la reducción, lo que se determina al comparar los geles corridos con β ME o sin este. Adicionalmente las proteínas no reducidas, pueden no estar del todo saturadas con SDS por lo que puede variar su relación peso/peso en su interacción con el detergente. Esto hace que las determinaciones de peso molecular con estas características no tengan la misma confiabilidad que el análisis hecho con polipéptidos del todo desnaturalizados. Es necesaria la existencia de patrones y proteínas conocidas de igual configuración para una comparación válida. EL SDS-PAGE

bajo condiciones reducidas y no reducidas es un método muy útil para el análisis de los puentes disulfuro que contienen las proteínas. Schuhmacher *Met al*(1996). en estudios con la lisozima de huevo durante la electroforesis demostraron que el 2ME y del DTT forman aductosdisulfuro con las proteínas. Jeannot M. A. y Zheng J. (1999) reportaron un método de preparación de la muestra en el que se elimina el SDS del gel⁴⁵⁻⁴⁷.

Electroforesis en Condiciones No Desnaturalizante (PAGE-Nativa)

Aunque SDS-PAGE es el sistema de electroforesis de gel comúnmente usado, este sistema no permite el análisis de proteínas manteniendo su estado natural y conservando sus propiedades de actividad biológica para poder hacer pruebas funcionales, en estos casos es necesario utilizar un sistema no desnaturalizante.

La PAGE Nativa es una técnica para separar proteínas biológicamente activas. En contraste con SDS-PAGE, la movilidad de proteínas depende tanto como del tamaño como de la carga. No hay ningún sistema de búfer que óptimamente separe todas las proteínas en un gel nativo. Parámetros claves para separar proteínas en un sistema de PAGE-Nativa son el pI de la proteína de interés y el pH del búfer de electroforesis.

pH y pI

El pH del búfer de electroforesis debe ser dentro de la gama de pH sobre el cual la proteína de interés es estable y conserva su actividad biológica. Además el pH del búfer debe impartir la carga suficiente a la proteína para que pueda moverse por el gel. El cambio

de pH afectara a la carga y tamaño de la proteína de interés y afectaran las velocidades de migración. Así un búfer con un pH mayor al pI de la proteína impartirá una carga negativa sobre la proteína y esta emigrara hacia el electrodo positivo (ánodo) y viceversa. Un pH igual al pI no causara ninguna carga neta a la proteína y no habrá emigración en un capo eléctrico.

Una remota desventaja que presenta SDS-PAGE es que diferentes proteínas con el mismo tamaño, improbablemente son resueltas con esta técnica. Una banda sola puede estar compuesta de múltiples componentes de idéntica masa molecular. Por medios de electroforesis en gel no desnaturizante basado en el tamaño y carga, el análisis de proteínas nativas según este procedimiento puede revelar la presencia de péptidos diferentes. Por ejemplo, por sus tamaños similares, es difícil de distinguir entre tres isoformascitoplasmáticas de kinasa creatina en SDS-PAGE. Sin embargo en geles en condiciones no desnaturizantes son fácilmente distinguibles ya que dos subunidades de kinasa de creatina tienen valores de pI diferentes, además que la estructura nativa se conserva y la actividad enzimática de kinasa puede ser medida después de la electroforesis, mientras que en SDS-PAGE no sería posible.

El pH muy alto o bajo puede desnaturizar las enzimas y así causar la pérdida de actividad, por eso es necesario escoger condiciones que proporcionen la resolución optima de la muestra particular para ser analizada. Las proteínas en general se diferencian extensamente en su carga, solubilidad y estabilidad en sus potencias de hidrogeno, su sensibilidad frente a la fuerza iónica y sus exigencias de cofactores. Por eso la electroforesis nativa es crítico escoger bien el búfer, a diferencia de SDS-PAGE⁴⁴.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Universidad de Sonora Unidad Regional Norte, campus Caborca. Se estandarizó y validó una técnica de zimografía para el análisis de actividad lipásica en PAGE-Nativa.

Materiales y Sustancias Químicas

A continuación se presentan las enzimas, reactivos y soluciones utilizadas durante la investigación así como también el equipo requerido. La descripción y preparación de las soluciones utilizadas y las especificaciones del sistema para la corrida electroforéticas se pueden encontrar en los anexos A y B, respectivamente.

Enzimas

Durante la zimografía se utilizaron tres lipasas comerciales de la marca Amano, Lipasa A-12 de *Aspergillus niger*, (LX03505), Lipasa AY-30 de *Candida rugosa*(LAYW12516), Lipasa F-AP15 de *Rhizopusoryzae*(LFX02504), y albumina de suero bovino (Sigma, A1933-1G) y un marcador de peso molecular de bajo rango (161-0305 Bio Rad), como control.

Reactivos y Soluciones Utilizadas

La técnica electroforética que se utilizó en la elaboración de este trabajo para llevar a cabo el análisis zimográfico fue PAGE-Nativa discontinuo (Ornstein-Davis, 1964). Para la formación del gel separador y concentrador se utilizó Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C), 1.5M Tris-HCl, pH 8.8, 0.5M Tris-HCl, pH 6.8, persulfato de amonio 10% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ y TEMED (N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina) (Fluka, 87689). Para la muestra se ocupó el búfer de muestra 2x. Durante la corrida se usó el búfer de corrida 10x, pH 8.3. La tinción fue realizada con azul de Coomassie y para la destinción se ocuparon la solución desteñidora I y II. Los sustratos en estudio fueron p-nitrofenol (Fluka, 1048) y los derivados, acetato de p-nitrofenol (Fluka, 46021), palmitato de p-nitrofenol (sigma, N2752), además se utilizó Cloruro de acrilóilo (549797-5G, Aldrich) y por ultimo butirato de 4-Metilumbeliferilo (Sigma 19362-5G), preparado con Dietilenglicol (32160, Fluka) y búfer fosfato 0.05 mol.

Las especificaciones de reactivos y preparación de estas soluciones se encuentran en el anexo A.

Equipo

El equipo utilizado para la electroforesis fue Mini-PROTEAN 3 cell® de la marca comercial Bio-Rad. Este equipo permite la manipulación de geles prefabricados comerciales o, en caso de este trabajo, geles elaborados durante el procedimiento. Es un sistema que incluye las herramientas necesarias para elaborar los geles y hacer la corrida electroforética.

Permite controlar uno o dos geles. Las especificaciones de este sistema se pueden encontrar en el anexo B.

Además del equipo electroforético se utilizó una agitadora eléctrica Orbital Shaker de la marca comercial United y una cámara con lámpara de luz UV de la marca comercial CAMAG sensible a 254nm y 366nm.

Estandarización de la Técnica PAGE-Nativa

PAGE-Nativa es la técnica mediante la cual se puede realizar una corrida electroforética manteniendo la enzima en su estado natural, tiene como fin establecer los parámetros con los que se realizara el estudio de la actividad lipásica. Aquí se estableció las concentraciones así como las condiciones para llevar a cabo la corrida sin desnaturalizar la lipasa y realizar una tinción general.

Formación de Geles

La formación de geles se divide en la preparación del gel separador primeramente y después el gel concentrador. El montaje del equipo para la preparación se puede observar en el anexo C.

El gel separador se preparó al 10% mezclando 1.66 mL de Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C), 1.25 mL de 1.5M Tris-HCl, pH 8.8, 2 mL de agua desionizada, 20µL de persulfato de amonio al 10 % y 3.3 µL de TEMED. Se agitó suavemente y se vertió hasta $\frac{3}{4}$ partes del casete para dejar polimerizar.

Una vez completada la polimerización se preparó el gel concentrador mezclando 325 μ L de Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C), 625 μ L de 1.5M Tris-HCl, pH 6.8, 1.52 mL de agua desionizada, 13 μ L de persulfato de amonio al 10 % y 2.5 μ L de TEMED. Se terminó de llenar el casete con esta mezcla y se le introdujo el peine para la formación de pozos para la muestra y se dejó polimerizar. Los geles que se prepararon son minigeles de 6 x 8x 0.75 mm.

Muestra

Las lipasas se prepararon diluyéndolas 1:2 en el búfer de muestra 2x. La muestra no se calentó para evitar desnaturalización. Una vez formados los geles se pasaron al soporte con electrodos y con la ayuda de la guía se cargó 20 μ L por pozo de la muestra en el gel.

Desarrollo electroforético

Una vez cargados los geles con la muestra se llevaron al tanque de desarrollo, donde se llenó con el búfer de corrida, una vez colocados los electrodos se inició la corrida a 80 V. Cuando la muestra se electrotransfirió al nivel del gel concentrador la corriente se incrementó a 100 V. Se dejó correr por 2.5 h hasta que se observó que el color del búfer de muestra salió completamente. La corriente se detuvo y se dejó reposar 10 minutos para permitir que el búfer de corrida emergiera de los geles, se desmontó el equipo y se extrajeron los geles para posteriormente ser teñidos.

Tinción

Para observar las bandas de la muestra y que la corrida se ha efectuado correctamente, que es lo que interesa, la técnica más utilizada es hacer una tinción con azul de Coomassie. El gel se colocó dentro de un recipiente de plástico y se cubrió con la solución de azul de Coomassie 0.05 % (P/v) y en agitación mecánica se dejó teñir por 12 h. Después de este tiempo se retiró el azul de Coomassie y se destiñó primeramente con la solución desteñidora I (Metanol-ácido acético-agua deionizada, 50:10:40 % v/v) por 20 min. Transcurrido este tiempo se retiró la solución I y se agregó la solución desteñidora II (Metanol-ácido acético-agua deionizada, 5:7:88 % v/v) permaneciendo nuevamente en agitación por 15 min. Por último se retira la solución desteñidora para analizar las bandas reveladas en los geles.

Determinación de pesos moleculares

Se determinó el peso molecular de las bandas más claras observadas en el gel obtenido de la corrida electroforética y revelado con azul de Coomassie. Primero se realizó una curva generada por el logaritmo de los pesos moleculares del estándar contra la movilidad relativa (R_f) y se obtuvo la ecuación general de la recta con la cual se determinaron los pesos moleculares de las bandas. La R_f se obtuvo con la ecuación:

$$R_f = \frac{\text{distancia migrada por la lipasa}}{\text{distancia migrada por el tinte}}$$

Inmovilización de Sustratos

El propósito de probar sustratos específicos de lipasas es obtener un método zimográfico donde se logre separar electroforéticamente los componentes de una muestra y poder establecer las bandas específicas correspondientes a las lipasas así como reducir el tiempo requerido para observar estas bandas. Esta identificación específica de las lipasas se puede lograr gracias a la reacción de hidrólisis ante ésteres que presentan las lipasas, esta reacción es la base en los estudios espectrofotométricos de actividad lipásica, método comúnmente utilizado en estudios de actividad lipásica.

Derivados de p-nitrofenol

Uno de los métodos más utilizados para determinar actividad lipásica es la espectrofotometría, donde los ésteres sintéticos como los derivados de p-nitrofenol han resultado eficientes. En este método se mide la absorbancia en medio de la reacción o tras la extracción de los productos, tiene la ventaja de ser un ensayo continuo y sencillo.

Basados en este método se llevó a cabo la zimografía aprovechando la actividad de las lipasas demostrada ante los derivados de p-nitrofenol. Se argumenta que la lipasa al romper el enlace éster de los nitrofenoles se podría obtener una muestra preteñida y específica para lipasas, quedando las bandas correspondientes en el gel.

El procedimiento para la elaboración de geles se realizó en las condiciones normales de la técnica, la muestra se preparó con las tres lipasas (A-12, AY-30, F-AP15) disueltas en

búfer 6.8 de pH agregando a la preparación los sustratos acetato de p-nitrofenol, palmitato de p-nitrofenol y como blanco p-nitrofenol, los tres con una concentración de 50mM en metanol. Las muestras se prepararon mezclando cada una de las lipasas disueltas con cada uno de los sustratos obteniendo 9 muestras, se cargaron 20uL de cada muestra para un total de 9 pozos. La corrida se realizó a 80 V inicialmente, después se aumentó a 100 V. la corrida duro 2.5 h. Se repitió el experimento en las mismas condiciones.

Cloruro de acrilóilo

Si a la matriz de poliacrilamida se le agregara un sustrato, como los derivados de p-nitrofenol, al cual la lipasa activa lo hidrolizara se obtendría una banda en el gel, con lo cual se lograría detectar y medir actividad lipásica. Los grupos funcionales de la acrilamida y bisacrilamida difícilmente reaccionan lo cual evita el poder agregarle el p-nitrofenol. El cloruro de acrilóilo no es en sí un sustrato específico para las lipasas, sin embargo, es un monómero con un grupo funcional fácilmente sustituible, al cual se le puede esterificar los derivados de p-nitrofenol y a su vez se puede copolimerizar junto con la poliacrilamida. La lipasa hidrolizara al sustrato dejando una banda en el gel en el lugar correspondiente a la carga y peso molecular.

Para llevar a cabo este experimento primero se requería obtener acrilato de p-nitrofenilo, se disolvieron 11.52g del acetato p-nitrofenol en 5mL de hidróxido de sodio 0.1M, se llevó a una atmosfera de nitrógeno y se le agregó 6.45mL de cloruro de acrilóilo.

En la elaboración del gel separador se le agregó a la solución la preparación de cloruro de acrilóilo con 2 mL de p-nitrofenol y aumentando el volumen de persulfato de amonio a

50µl. El gel concentrador se preparó en forma normal de acuerdo a la técnica descrita anteriormente. Las muestras fueron las tres lipasas (A-12, AY-30, F-AP15) disueltas en agua deionizada en concentraciones altas y en búfer 2x 1:2 con una concentración final de 500 µg de lipasa por pozo. Después se llevó a cabo el desarrollo bajo las condiciones normales, iniciando a 100V y después se aumentó a 120 V, con una duración 2.75 h.

Sustrato butirato de 4-Metilumbeliferilo(4-MUFB)

Un método para determinar actividad lipásica similar a la espectrofotometría es la fluorometría. Este método presenta una alta especificidad y sensibilidad, y se ha utilizado para la medición de actividad lipásica donde se ha reportado al 4-MUFB como un sustrato específico de lipasas. Este sustrato tiene una fórmula general de $C_{14}H_{14}O_4$, y presenta fluorescencia. Basados en esta observación se realizaron geles con lipasa nativa y se tiñó con 4-MUFB.

Se preparó una solución disolviendo 0.70g de MUFB en 11 mL de dietilenglicol y 4 mL de búfer fosfato 50mM.

Los geles se formaron preparados como se describe al principio. Se utilizó la lipasa A-12a diferentes concentraciones (125, 250, 375 y 500 µg) respectivamente. El desarrollo se inició a 80 V y se incrementó a 100 V con una duración de 2.5 h. Una vez terminada la corrida se retiró el gel transfiriéndolo a un recipiente de plástico donde se le agregó la solución de 4-MUFB, se agitó manualmente dentro de una cámara con luz UV a 254 nm por 30 min. Se capturaron imágenes digitales de las bandas reveladas utilizando una cámara

portátil a 12 MP (CyberShot, SONY). Posteriormente se procedió a teñir el gel con la solución de Coomassie como se describe anteriormente.

Validación de la Técnica

En base a los resultados obtenidos en la inmovilización de sustratos se realizó la validación de la técnica de zimografía estandarizada en PAGE-Nativa (Ornstein-Davis, 1964) y utilizando 4-MUFB como sustrato de revelado específico para la actividad lipásica, ya que es el sustrato que ofreció los mejores resultados. Para realizar la validación se analizaron las imágenes de los geles revelados con 4-MUFB y se realizó el análisis de estadística para obtener la linealidad, los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) y reproducibilidad del método.

Linealidad

Es la capacidad del método para obtener resultados de actividad lipásica directamente proporcionales a la concentración de la lipasa. Para llevar a cabo la medida de linealidad se realizó una corrida de zimografía en condiciones normales de PAGE-Nativa. La lipasa A-12 se disolvió en búfer 2x con una concentración de 11.2, 22.4, 44.8, 90, y 180 µg por pozo respectivamente. Concluida la electro-transferencia, el gel se reveló con la solución de 4-MUFB exponiendo las bandas fluorescentes correspondientes a la actividad lipásica. Las imágenes capturadas por la cámara fotográfica se analizaron con el programa ImageJ 1.45 m (NIH; Rasband, 2011), se obtuvo la diagrama electroforético de las bandas y

se obtuvieron el área bajo la curva utilizando la herramienta del mismo programa como lo describen Ferreira y Rasband, (2011). Utilizando Excel 2007 de Microsoft Office se graficaron los datos de las áreas de los picos contra la concentración realizando un análisis de regresión lineal para obtener los parámetros por la ecuación general de la recta de la forma⁴⁸⁻⁵⁰:

$$y = a + bx$$

Dónde:

y = representa al área de los picos

a = intercepción

b = pendiente

x = concentración de lipasa (μg)

Para comprobar la linealidad se determinó el coeficiente de correlación múltiple (r) y el coeficiente de determinación (r^2).

Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

El límite de detección es la cantidad o concentración mínima de lipasa que puede ser detectada con fiabilidad a través de su actividad con este método. El límite de cuantificación es la cantidad mínima de lipasa que se puede cuantificar confiablemente. Para determinar estos límites se realizó una corrida electroforética en condiciones normales de PAGE-nativo, se utilizó como muestra únicamente la lipasa A-12 en 5 diluciones con concentraciones de 11.2 μg a 180 μg de lipasa por pozo, una vez revelado el gel con 4-MUFB observando las bandas fluorescentes correspondientes a la actividad se analizaron con el

programa analítico ImageJ, por medio de este programa se analizó la imagen y las bandas, obteniendo la curva de concentración y su respectiva área. Los datos se analizaron en Excel 2007 de Microsoft Office, se obtuvo la ecuación de la regresión lineal de las diferentes concentraciones para obtener la concentración experimental y calcular ambos límites con las siguientes ecuaciones:

Límite de detección:

$$LD = \frac{3 \times D.E.}{b}$$

Dónde:

3 = factor

D.E. = desviación estándar

b = pendiente

Límite de cuantificación:

$$LC = \frac{10 \times D.E.}{b}$$

Dónde:

10 = factor

D.E. = desviación estándar

b = pendiente

Reproducibilidad

Es la precisión de los valores obtenidos bajo las mismas condiciones de operación con una muestra homogénea, en el mismo equipo y al mismo tiempo. Para realizar esta medida se prepararon 5 diluciones de la lipasa A-12 en búfer 2x, la concentración de la lipasa fue a 40, 80, 160, 320 y 640 µg por pozo. Se formaron dos geles preparados con la misma solución a iguales concentraciones (10%) se agregaron las 5 diluciones de la muestra por igual a ambos geles y el desarrollo electroforético se llevó a cabo en el mismo tanque con el mismo búfer de corrida a igual corriente eléctrica y por el mismo tiempo

(2.5h). Los geles se revelaron al mismo tiempo en igual concentración de solución de 4-MUFB (50 mg/mL). Se capturó imágenes de los geles y se analizaron con el programa ImageJ comparando los dos geles obteniendo el área bajo la curva de las concentraciones y se realizó la regresión lineal en Excel obteniendo la desviación estándar, coeficientes de variación y precisión del método por medio de las siguientes ecuaciones.

Desviación estándar:

$$D.E. = \frac{\sqrt{(y - \hat{y})^2}}{N - 2}$$

Coefficiente de variación:

$$C.V. = \frac{D.E.}{\hat{y}} 100$$

Precisión:

$$p = 100 - \hat{C.V.}$$

Dónde:

N = número de datos

y = valores obtenidos

\hat{y} = la media de los valores

$\hat{C.V.}$ = el promedio de los coeficientes de variación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización de la Técnica PAGE-Nativa

En la Figura 6 podemos observar un gel realizado con la técnica PAGE-Nativa, esta técnica se estandarizó estableciendo las condiciones más favorables para la separación de las lipasas sin alterar la estructura nativa de la enzima. En total se analizaron la lipasa A-12, AY-30 y F-AP15 y un marcador de peso molecular de bajo rango (carril 3). En las observaciones que se realizaron se encontró que las lipasas comerciales no son totalmente puras, la lipasa A-12 y F-AP15 presentaron una serie de bandas desconociendo la correspondiente a la lipasa nativa. La lipasa AY-30 presenta una banda mayormente definida que se presume sea la lipasa.

Con esta corrida electroforética se pudo determinar los pesos moleculares de las bandas más definidas. En el carril 1 donde se encuentra la lipasa A-12 se observaron 3 bandas claras, a, b y c, (Figura 6) y por medio de la ecuación general de la recta obtenida del estándar se calculó un peso molecular de 51.8 kDa, 32.3 kDa y 16.6 kDa, respectivamente. En el carril 2 correspondiente a la lipasa AY-30 se presentó una sola banda con un peso molecular de 51.8 kDa. En el carril 4, tres bandas sobresalieron a, b y c, con un peso molecular de 44.3 kDa, 29.8 kDa y 23.2 kDa respectivamente. La regresión lineal presentó un coeficiente de determinación (r^2) de 0.986.

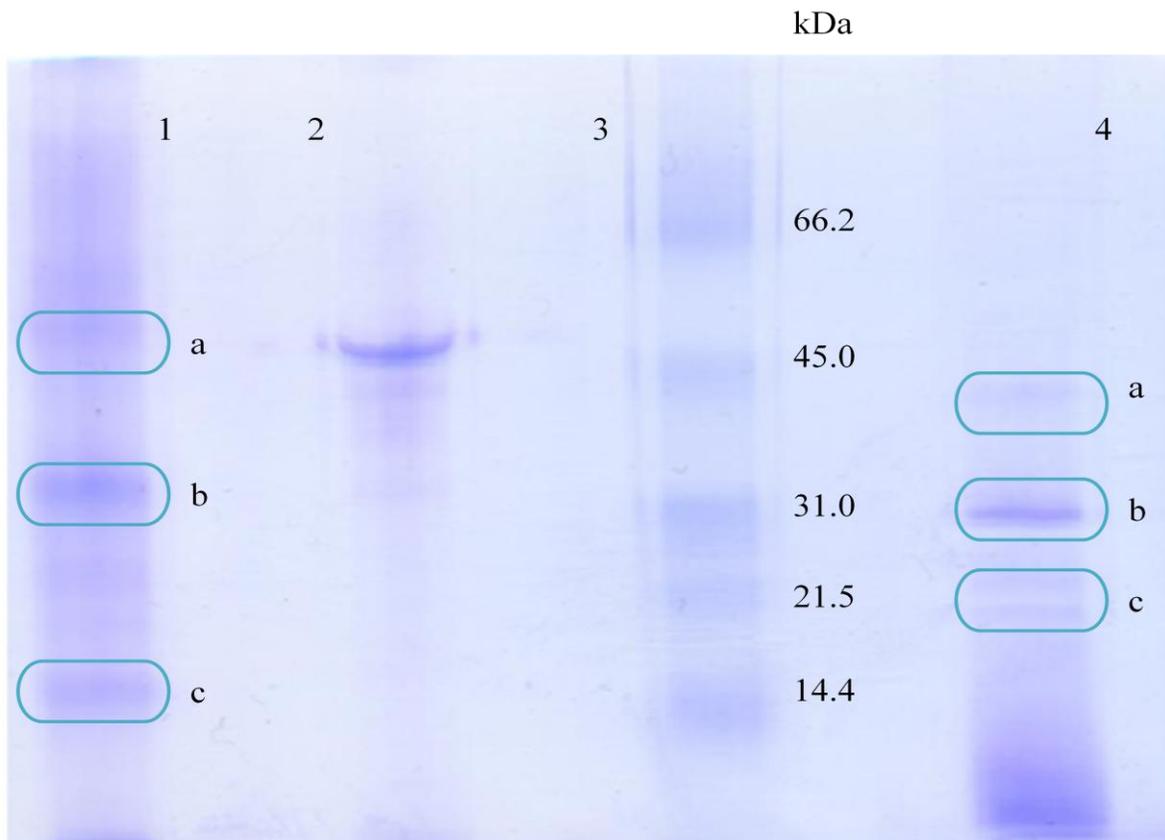


Figura 6. Gel de electroforesis nativa (10%) revelado con azul de Coomassie cargando 250 μ g en cada pozo. Carril: 1) lipasa A-12, 2) lipasa AY-30, 3) marcador de peso molecular de bajo rango, 4) lipasa F-AP15.

Concentración del gel. Generalmente las muestras analizadas por electroforesis se utilizan geles con concentración de separación del 12%, sin embargo se observó que se obtuvo una mejor separación en geles con una concentración del 10% de entrecruzamiento.

Búfer. En el desarrollo electroforético se logró la electrotransferencia de las lipasas usando un búfer Trizma-HCl con pH 6.8. Mientras que la actividad lipásica fue detectada en un búfer de fosfatos pH 7.0.

Muestra. Se observó que las lipasas se lograron visualizar por medio de tinción con Coomassie para concentraciones superiores a los 100 μg de cada lipasa cargada en los pozos respectivos. Sin embargo, para que las bandas se obtengan bien definidas se requiere cargar en cada pozo un promedio de 250 μg de cada lipasa.

Temperatura. Se observó que la temperatura de los reactivos así como del ambiente afecta la polimerización, a temperaturas menores a 25°C la homogeneidad del gel se vio afectada así como el tiempo de polimerización se prolongó. Una temperatura ambiente de 25°C ofreció una mejor polimerización efectuándose en un tiempo promedio de 30 min.

Desarrollo Electroforético. El tiempo promedio del desarrollo completo fue de 2.5 h. con una corriente eléctrica inicial de 80 V y una final de 100 V.

Tinción. Para revelar las bandas correspondientes a las lipasas se utilizó la tinción con azul de Coomassie 0.05 %. La tinción se efectuó por 12 h y la destinción 35 min en total.

Inmovilización de Sustratos

Derivados de p-nitrofenol. En la Figura 7 podemos observar la imagen del gel obtenido de esta corrida electroforética. Durante el desarrollo electroforético se observaron bandas amarillentas, características de la hidrólisis de los derivados de p-nitrofenol, sin embargo al no haber una unión química, o interacción física entre la poliacrilamida y los derivados, éstos no permanecieron en el gel junto con las lipasas desapareciendo el color indicativo de las bandas pertenecientes a la actividad lipásica.

Cloruro de acrilóilo. En la Figura 8 podemos observar el gel obtenido de este protocolo. En la copolimerización de la poliacrilamida con el cloruro de acrilóilo conteniendo al acetato p-nitrofenol esterificado se obtuvo un gel teñido de rojo sin observación de bandas. El procedimiento requiere establecer el grado de esterificación para confirmar el mismo, junto al procedimiento de esterificación y copolimerización, complica y retarda el procedimiento normal de la corrida electroforética.

Sustrato 4-MUFB. En la Figura 9 podemos observar la imagen de un mismo gel que fue revelado con el sustrato 4-MUFB y posteriormente con Azul de Coomassie. El gel revelado con 4-MUFB mostró únicamente una banda correspondiente a la lipasa mientras que cuando se tiñó con Azul de Coomassie mostró varias bandas, ya que la enzima A-12 no se encuentra totalmente pura. Se determinó que a actividad lipásica máxima se mostró a los 14 min iniciada la reacción de revelado con 4-MUFB, obteniendo una reducción del 98% del tiempo de revelado sin la necesidad de desteñir.



Figura 7. Gel con derivados de p-nitrofenol. No se observa ninguna banda

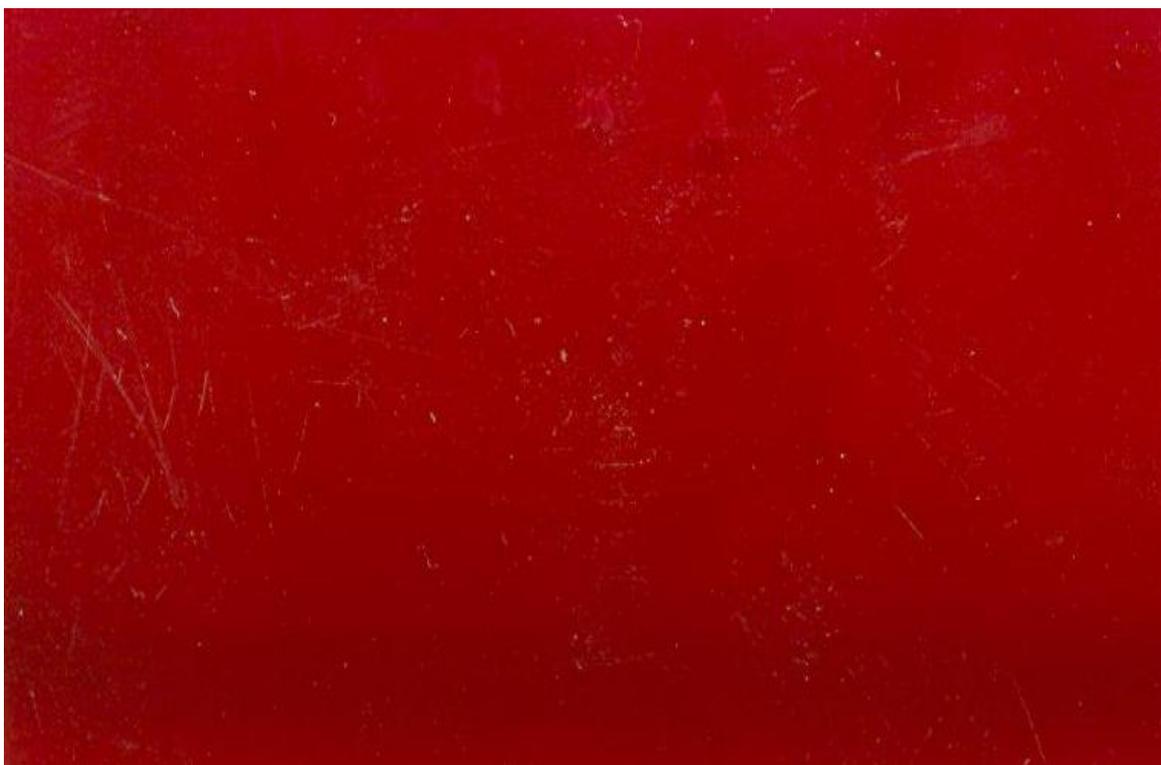


Figura 8. Imagen del gel copolimerizado con poliacrilamida y acrilato de p-nitrofenilo. No se observa ninguna banda.

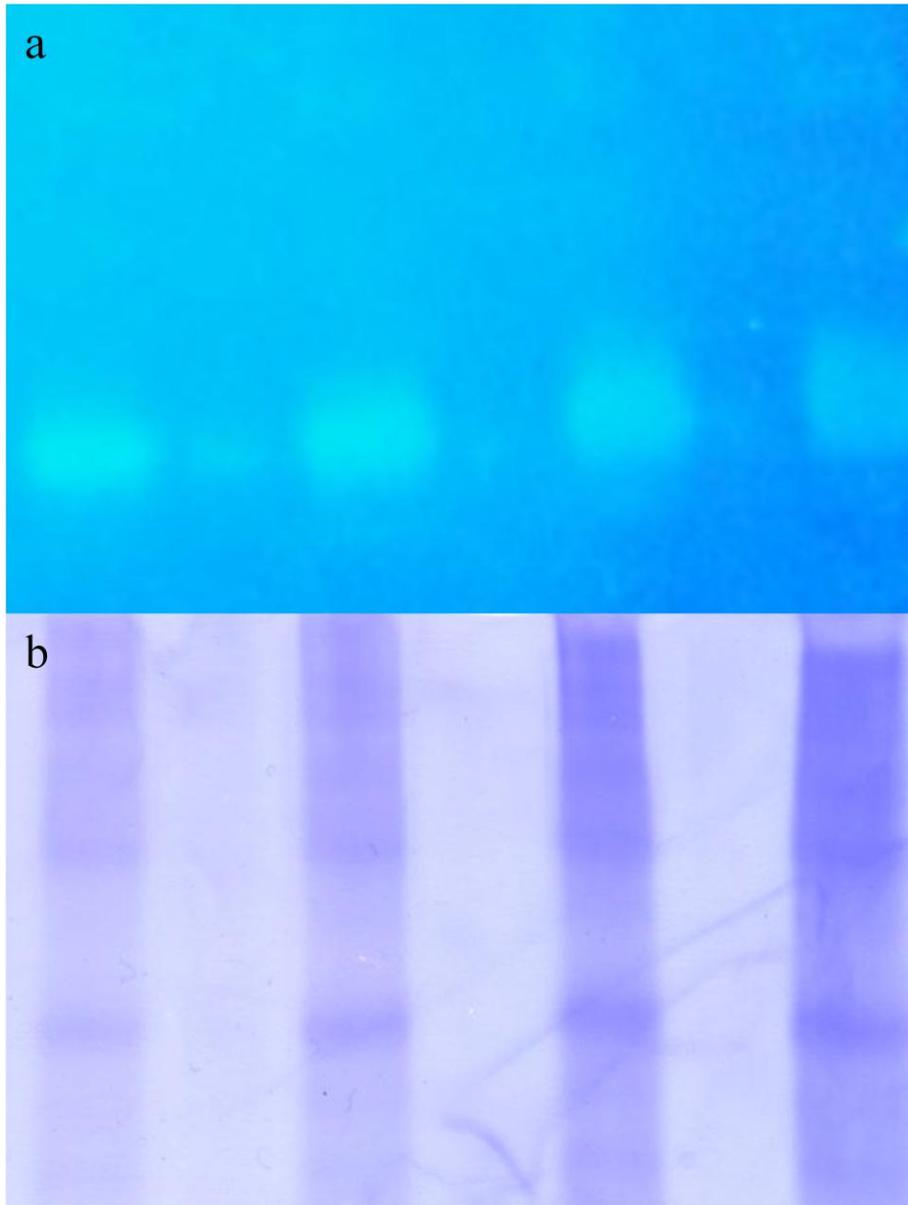


Figura 9. Imagen del gel revelado con (a) sustrato específico 4-MUFB y posteriormente teñido con (b) Azul de Coomassie.

Validación de la Técnica de Zimografía

Linealidad. En la Figura 10 se muestra la imagen del gel revelado con 4-MUFB, se realizó el análisis de las 5 diluciones con la lipasa A-12. En la Figura 11 se presenta la gráfica del análisis de datos obteniendo la ecuación de la regresión lineal. La Tabla 1 muestra los valores del análisis estadístico, se encontró que el método zimigráfico presenta una relación lineal positiva y fuerte, además que el 99.6 % de la variación del área bajo la curva se explica por la variabilidad de la concentración de la lipasa y considerando el número de diluciones se obtuvo un coeficiente de determinación ajustado del 99.3 %.

LD y LC. En la tabla 2 se presenta el análisis de las cinco diluciones de la lipasa A-12 en el gel revelado y se aplicó la ecuación obtenida en la regresión lineal a las cinco concentraciones de lipasa para obtener la concentración experimental y obtener los dos límites.

Reproducibilidad. En la figura 12 se muestran dos geles revelados bajo las mismas condiciones y a la misma concentración de lipasa A-12. La figura 13 muestra la gráfica de las dos replicas. En la tabla 3 se muestran los datos obtenidos del análisis de los dos geles de las 5 diluciones de A-12 revelados con 4-MUFB en las mismas condiciones, los datos se compararon estableciendo los coeficientes de variación para cada dilución y sus promedios oscilando en el 5 % obteniendo una precisión entre los dos geles del 94.2.

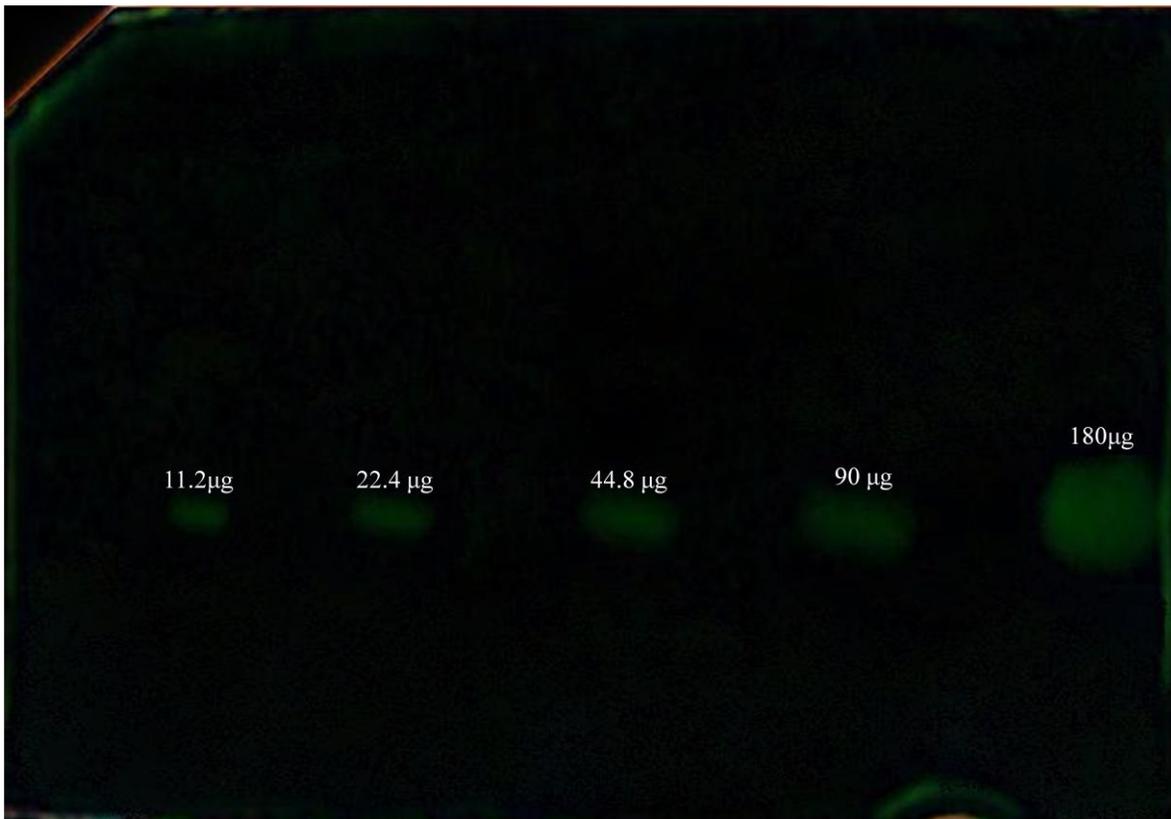


Figura 10. Imagen del gel revelado con 4-MUFB analizado con ImageJ. Las bandas corresponden a la lipasa A-12 mostrando fluorescencia bajo luz UV.

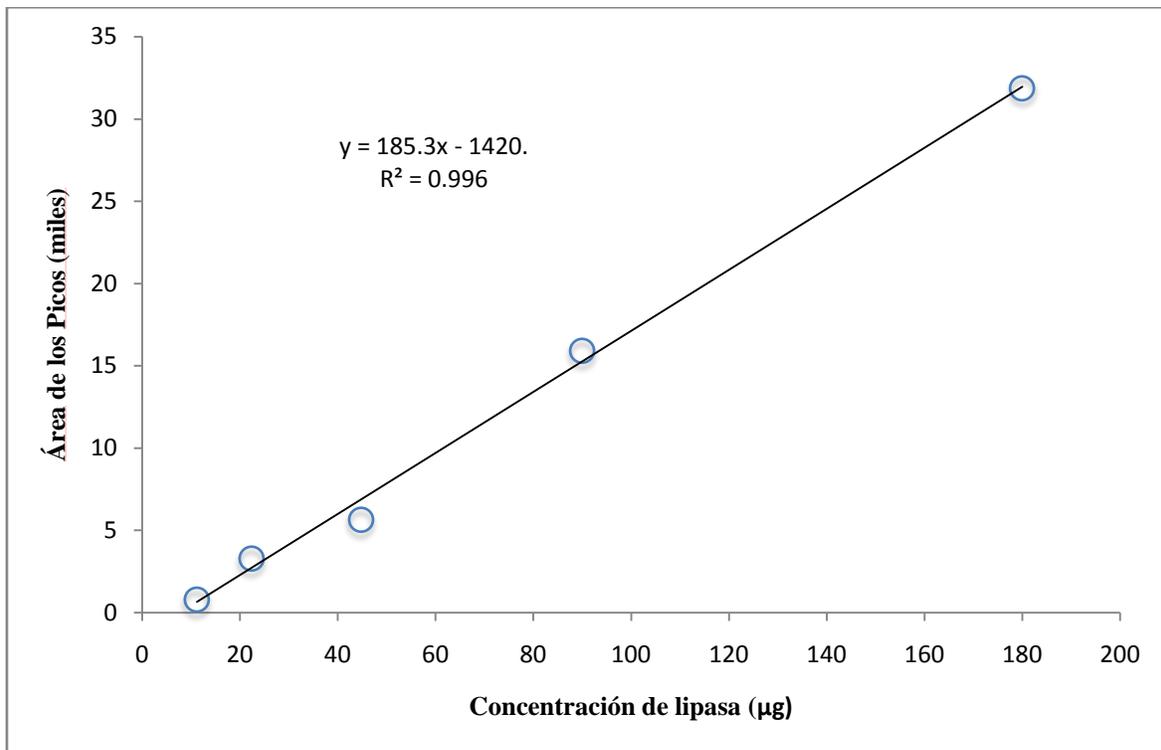


Figura 11. Gráfica de la relación lineal del método zimográfico entre el área de los picos y la concentración de la lipasa A-12

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.998
Coefficiente de determinación r^2	0.996
r^2 ajustado	0.993
Error típico	1059.86
Observaciones	4

Tabla 1. Linealidad del método zimográfico para la determinación de actividad lipásica con 4-MUFB como sustrato de revelado

Concentración de lipasa A (μg)	y_i	\hat{y}_i	$y_i - \hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
11.2	789.4	655.3	134.0	17968.3
22.4	3286.5	2730.7	555.8	308968.1
44.8	5645.7	6881.4	-1235.6	1526850.6
90.0	15902.0	15257.0	645.0	416098.5
180.0	31857.9	31934.0	-76.0	5782.5
Sumatoria				2275668.2
Promedio				455133.6
D.S.				674.6
L.D.				10.92
L.C.				36.40

Tabla 2. Limite de detección y cuantificación a diferentes concentraciones de lipasa A-12 con el método zimigráfico utilizando 4-MUFB como sustrato de revelado.

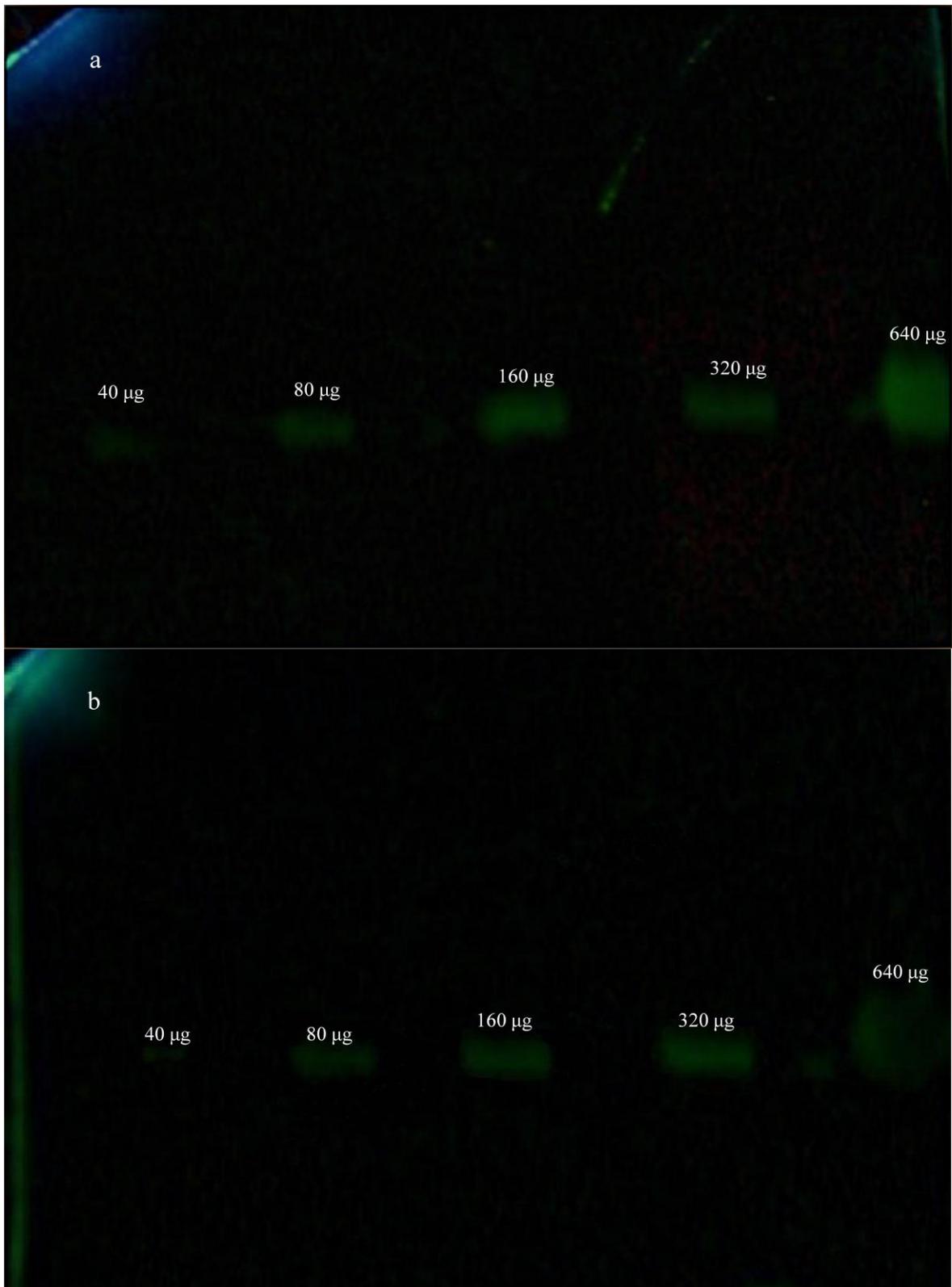


Figura 12. Reproducibilidad de dos geles electro-transferidos en igualdad de condiciones y concentraciones de la lipasa A-12 revelados con 4-MUFB analizados con ImageJ.

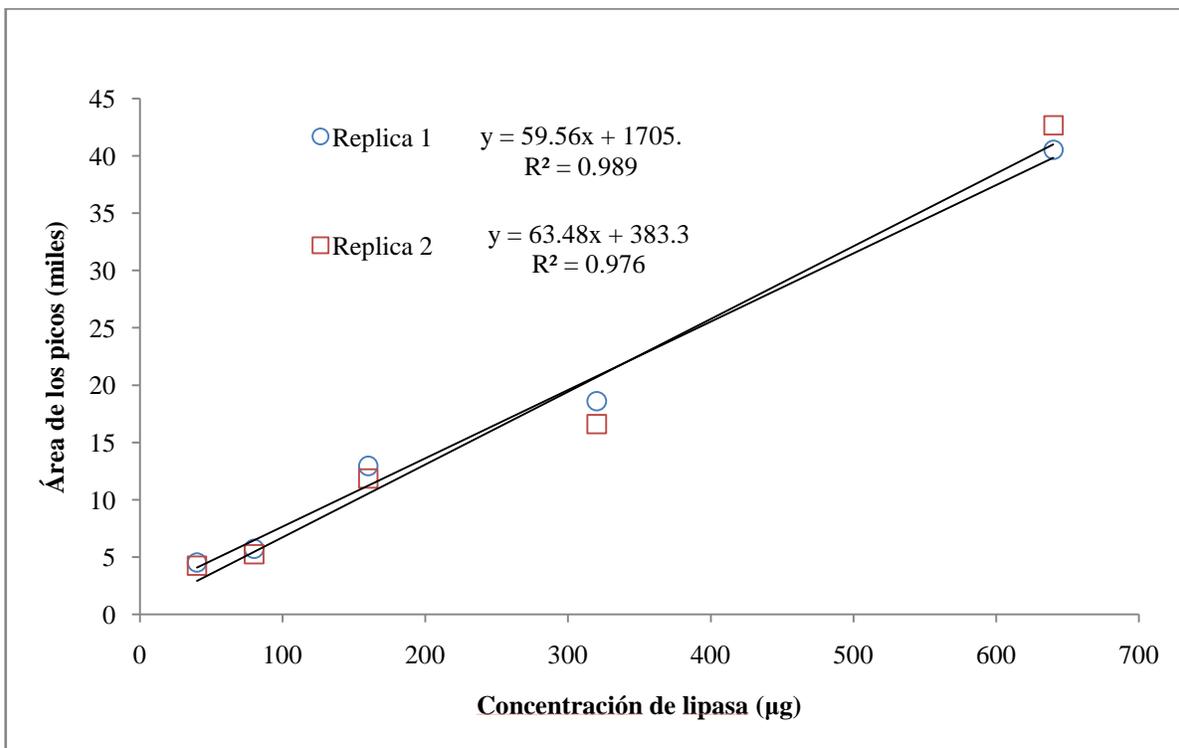


Figura 13. Gráfica de reproducibilidad del método zimográfico para la determinación de actividad lipásica con 4-MUFB como sustrato de revelado

Concentración de lipasa A12 (μg)	Área de los picos		Promedio del área	D.E.	CV (%)
	Replica 1	Replica 2			
40	4543.296	4256.468	4399.882	202.8180238	4.61
80	5734.731	5243.782	5489.2565	347.1533671	6.32
160	12961.865	11854.38	12408.1225	783.1101536	6.31
320	18610.664	16608.643	17609.6535	1415.642625	8.04
640	40535.777	42672.798	41604.2875	1511.102041	3.63
Promedio de C.V.					5.78
Precisión					94.22

Tabla 3. Reproducibilidad del método zimográfico a diferentes concentraciones de lipasa A-12 revelado con 4-MUFB.

CONCLUSIONES

La electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% logró la separación de las proteínas de lipasas comerciales manteniendo su forma nativa encontrando que no son puras.

Con la metodología establecida, al utilizar un sustrato específico se pudo identificar la banda correspondiente a la lipasa por medio de su actividad hidrolítica. Además, se redujo significativamente el tiempo de análisis.

Se encontró un intervalo lineal para la semi-cuantificación de enzima por medio su actividad lipásica.

La validación de la metodología permite concluir que es factible utilizar método de zimografía establecido para el análisis de muestras de investigación o diagnóstico clínico donde se requiera conocer la actividad lipásica

BIBLIOGRAFÍA

1. Miguel Arroyo, Síntesis enantioselectivas catalizadas por lipasas microbianas, 2000. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Universidad Complutense de Madrid.
2. Anderson, L., Anderson, N.G., 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins, Vol. 74, No. 12, pp. 5421-5425, *Biochemistry*.
3. Estefan Miranda Miranda *et al.*, 2006. Marcadores enzimáticos como indicadores de resistencia a los antihelmínticos en el nematodo parásito gastroentérico de rumiantes *haemonchus contortus*, Asociación Mexicana de Bioquímica clínica, DF, MEXICO
4. Jaeger *et al.*, 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases, K-E. *annu. Rev. microbial.* 53:315-51.
5. F.H. Mattson and R.A. Volpenhein. 2010. Relative rates of hydrolysis by rat pancreatic lipase of esters of C₂-C₁₈ primary *n*-alcohols. The Procter & Gamble Company, Miami Valley Laboratories, Cincinnati, Ohio.
6. Miguel García Román. "Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones o/w. Aplicación a formulaciones detergentes". **Tesis Doctoral**. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Granada, Granada 2005.
7. Neil J. Simpkin, Stephen E. Harding, Michael P. Tombs. 1991. Solution behaviour of *Chromobacterium viscosum* and *Pseudomonas* sp. Lipases, *Biochem. J.* 273, 611-613
8. Thomson, Carrie A., Delaquis, Pascal J. and Mazza, G. 1999. 'Detection and Measurement of Microbial Lipase Activity: A Review', *Critical Reviews*.
9. Kyeong Kyu Kim, Hyun Kyu Song, Dong Hae Shin, Kwang Yeon Hwang, Se Won Suh. 1997. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of bound

- inhibitor.5:173-185. Department of chemistry, college of natural sciences, Seoul National University.
10. Layla Fernández Torres. “Clonación, expresión y evaluación molecular de la lipase I de *Galactomyces geotrichum*,” **Tesis Doctoral**. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Granada, Granada 2005.
 11. Cepeda Patiño Leidy Andrea, Valencia Cárdenas Sandra Patricia. “Aislamiento de bacterias lipolíticas y determinación de patógenos humano *Escherichiacoliy Salmonella sp.* A partir de residuos orgánicos domiciliarios en compostaje”. **Tesis de Licenciatura**, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2007.
 12. P. Grochulski, Y. LI, J. D. Schrag, M. Cygler. 1994. Two conformational states of *Candida rugosalipase*, *Protein Science* 3:82-91. Cambridge University Press.
 13. José Miguel Palomo Carmona. “Control y modulación de la selectividad de derivados inmovilizados de distintas lipasas, en reacciones de química orgánica desarrolladas en sistemas macro-acuosos”. **Tesis Doctoral**. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 2003.
 14. K.E. Jaeger, T Eggert. 2002. Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:390–397.
 15. Klaus Liebeton *et al.* 2000. Directed evolution of an enantioselective lipase, *Chemistry y Biology*, 7:709–718.
 16. S. Higaki, M. Nakamura, M. Morohashi, T. Yamagishi. 2004. *Propionibacterium acnes* biotypes and susceptibility to minocycline and *Keigai-rengyo-to*. *International Journal of Dermatology*; 43: 103-107.
 17. Ichiro Kurokawa, *et al.* 2009. New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Experimental Dermatology*; 18: 821–832.
 18. N. F. Tanih, L. M. Ndip, A. M. Clarke, R. N. Ndip. 2010. An overview of pathogenesis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection, *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4 (6), pp. 426-436.
 19. Aleksandar Nagorni. 2000. *Helicobacter Pylori* at the End of the Second Millennium, The scientific journal, *Series: Medicine and Biology* Vol. 7, No 1, pp. 15 – 25.
 20. J. P. Ledesma-Heyer, J. A. Amaral. 2009. Pancreatitis aguda. *Med. Int. Mex*; 25(4):285-94.

21. D. E. Lekuona, A. P. Royo, E. A. Daubagna, E. M. Pomar. 2004. PANCREATITIS AGUDA. Libro electrónico de Temas de urgencia, Servicio Navarro de Salud.
22. Boletín del Instituto Nacional de Salud Pública, “La Obesidad en México”. 01.06.2007, 14:15
23. Secretaría de Salud, Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria, Estrategia contra el sobrepeso y la obesidad. 2010, pp 7-14
24. F. Beisson, A. Tiss, C. Rivière, R. Verger. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 133–153.
25. H. Kannisto, M. Laija, E. Lukkari. 1983. Characterization and Elimination of a Factor in Serum that Interferes with Turbidimetry and Nephelometry of Lipase, *CLIN. CHEM.* 29/1, 96-99.
26. Jochen Weiss. 2003. Static and Dynamic Interfacial Tension Analysis. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* D3.6.1-D3.6.16.
27. Lars K. Nielsen, J. Risbo, Thomas H. Callisen, T. Björnholm. 1999. Lag-burst kinetics in phospholipase A2 hydrolysis of DPPC bilayers visualized by atomic force microscopy, *Biochimica et Biophysica Acta* 1420 266-271.
28. Ricardo N. Farias, Rosana N. Chehin, Ramon Canela, 2000. Fourier-transformed infrared assay for the determination of the positional specificity of non-specific and 1, 3-specific lipases. *Biotechnology Letters* 22: 905–908.
29. W. G. Duncombe. 1963. The Colorimetric Micro-Determination of Long-Chain Fatty Acids, *Biochem. J.* 88, 7
30. P. Pinsirom, Kirk L. Parkin. 2001. Lipase Assays, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* C3.1.1-C3.1.13.
31. R. Gupta, P. Rathi, N. Gupta, S. Bradoo. 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 63–71.
32. G. Kouker, K. E. Jaeger. 1987. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases, *Applied and Environmental Microbiology*, p. 211-213.
33. David C. Wilton. 1991. A continuous fluorescence-displacement assay for triacylglycerol lipase and phospholipase C that also allows the measurement of acylglycerols. *Biochem. J.* 276, 129-133.

34. M. J. Hills, K. D. Mukherjee.1988. Assay for triacylglycerol lipase by a rapid thin-layer chromatographic technique. *Journal of Lipid Research* Volume 29, 1397-1399.
35. K. W. Cho, SangJun Mo, H. S.Lee, J. R.Rho, J. Shin.2000. Bioluminescent Assay of Phospholipase C Using A Luminescent Marine Mutant Bacterium *Vibrio harveyi*M-17.The *Journal of Microbiology*, p.150-155.
36. I. M. Roberts, L. E. Nochomovitz, R. Jaffe, S. I. Hanela, M. Rojas, R.A. Agostini Jr. 1987. Immunocytochemical Localization of Lingual Lipase in Serous Cells of the Developing Rat Tongue.*Lipids* 22, 764-766.
37. F. Murata, S. Yokota, T. Nagata.1968. Electron microscopic demonstration of lipase in the pancreatic acinar cells of mice. *Histochemie*13; 215–222.
38. V. Briquet-Laugier, O. Ben-Zeev, M. H. Doolittle. 1999. Determining Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase Activity Using Radiolabelled Substrates. In: *Methods in Molecular Biology*, pp. 81–94.
39. C. Ballot, G. Favre-Bonvin, J. M. Wallach. 1982. Conductimetric assay of a bacterial lipase, using triacetin as a substrate. *Anal. Lett.* 15 119–129.
40. F. Dati, G. Grenner.1984. A new approach to the diagnosis of pancreatic diseases by immunochemical lipase quantitation. *Ric. Clin. Lab.* 14; 399–407.
41. S. Bezzine, F. Carriere, J. De Caro, R. Verger, A. De Caro.1998. Human Pancreatic Lipase: An exposed hydrophobic loop from the C-terminal domain may contribute to interfacial binding. *Biochem.* 37; 11846–11855.
42. R.Westermeier. 2005. *Electrophoresis in Practice*. Ed WILEY-VCH Verlag GmbH, CoWeinheim. UK. Pp. 9-44.
43. F. Patron C, Hardy E, Sosa A, Seoane J, Castellanos L. 1995. Double staining of coomassie blue-stained polyacrylamide gels by imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining: sensitive detection of coomassie blue-undetected proteins. *Anal Biochem.* 1; 224(1):263-9.
44. Hames BD, Ricwood D (2002): “Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach”, 3^a ed. Oxford UniversityPress.
45. H. G. Pérez, 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia.univ diag;1(2):31-41

46. Schuhmacher M, Glocker M.O., Wunderlin M., Przybylski M. Direct isolation of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and analysis by electro spray-ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* 1996; 17(5):848-54.
47. Jeannot M.A., Zheng J., Li L. Observation of sodium gel induced protein modifications in dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and its implications for accurate molecular weight determination of gel separated proteins by matrix-assisted laser desorption ionisation time of- flight mass spectrometry. *J Am M Spectrum* 1999;10 (6):512-20.
48. Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, imagej.nih.gov/ij/, 1997–2011.
49. Ferreira T. and Rasband W. (2010-2011) The imageJ User Guide — IJ 1.45 pp. 129-130, imagej.nih.gov/ij/docs/guide/.
50. Herrera V., Ticona J. C., Udaeta E. *et al.* 2008. Validación del método analítico para la cuantificación de alcaloides quinolínicos del extracto de *Galipea longiflora* Krause Kallunki. *BIOFARBO*, dez., vol.16, no.1, p.47-53. ISSN 1813-5363.

ANEXO A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE STOCK Y BÚFERS

1. Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C)

87.6 g acrilamida (Sigma, A-3553) (29.2 g/100 mL)
2.4 g N'N'-bis-metilen-acrilamida (Sigma, M-7279) (0.8 g/100 mL)

Para realizar 300mL en agua deionizada. Se filtra y se almacena en frasco ámbar*.

2. 1.5M Tris-HCl, pH 8.8

27.23 g Trizma base (Sigma, T1503-500G) (18.15 g/100 mL)
80 mL Agua deionizada

Ajustar pH a 8.8 con 6N HCl, aforar a 150 mL con agua deionizada*.

3. 0.5M Tris-HCl, pH 6.8

6 g Trizma base (Sigma, T1503-500G)
60 mL Agua deionizada

Ajustar pH a 6.8 con 6N HCl, aforar a 100 mL con agua deionizada*.

*. Mantener a 4°C.

ANEXO A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE STOCK Y BÚFERS
(CONTINUACIÓN)

4. Búfer de muestra

5.55 mL	Agua deionizada
1.25 mL	0.5M Tris-HCl, pH 6.8
3.0 mL	glicerol
<u>0.2 mL</u>	<u>0.5% (p/v) azul de bromofenol (Sigma, B5525-10G)</u>
10 mL	Volumen total

Mantener a temperatura ambiente.

5. 10x búfer de corrida, pH 8.3

15 g	Trizma base (Sigma, T1503-500G)
72 g	Glicina (Sigma G-8898)

Aforar a 1000mL con agua deionizada. No es necesario ajustar pH.

Uso: diluir 50 mL de solución 10x con 450 mL de agua deionizada.

ANEXO A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE STOCK Y BÚFERS
(CONTINUACIÓN)

6. Tinción con azul de Coomassie

Metanol	50 % (v/v)
Azul de Coomassie (Sigma, 27816-25G)	0.05 % (P/v)
Ácido acético	10 % (v/v)
Agua deionizada	40 %

7. Soluciondesteñidora I

Metanol	50 % (v/v)
Ácido acético	10 % (v/v)
Agua deionizada	40 % (v/v)

8. Soluciondesteñidora II

Metanol	5 % (v/v)
Ácido acético	7 % (v/v)
Agua deionizada	88 % (v/v)

**ANEXO A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE STOCK Y BÚFERS
(CONTINUACIÓN)**

8. Persulfato de amonio 10% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

0.01 g de persulfato de amonio (Sigma, A3678-25G) se disuelven en 100 μL de agua deionizada.

9. TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina) (Fluka, 87689), listo para usarse.

10. Búfer fosfato 0.05 mol pH 7.0

A partir de Fosfato de Sodio Monobásico (NaH_2PO_4) y Fosfato de Sodio bibásico (Na_2HPO_4).

0.413 g de NaH_2PO_4 (Sigma, S3522) en 100mL de agua desionizada.

0.255 g de Na_2HPO_4 (Sigma, S0876) en 100 mL de agua desionizada.

11. butirato 4-Metilumbeliferilo(MUFB) (Sigma, 19362)

Se disuelven 0.70 g de MUFB en 11mL de Dietilenglicol y 4 mL de búfer fosfato 0.05 mol.

ANEXO B. ESPECIFICACIONES DEL SISTEMA

Cristal espaciador

El cristal espaciador es el cristal más alto, con espaciadores de gel permanentes a los lados de 0.75 mm de grosor.

Cristal cortó

Es el cristal más corto, es un cristal plano que se combina con el cristal espaciador para formar el “sándwich de casete de gel”

Marco

Se coloca en el soporte para asegurar uniformemente y alinear los cristales para forma el “sándwich de casete de gel”

Soporte

Es un soporte para asegurar el marco donde se encuentran los cristales unidos donde se verterá la solución para formar el gel.

Esponjas

Son una pequeñas esponjas que se colocan en el soporte debajo del marco para sellar y evitar fugas de la solución en los cristales durante la polimerización.

ANEXO B. ESPECIFICACIONES DEL SISTEMA

(CONTINUACIÓN)

Peines

Un par de peines se usa para crear los pozos de los dos geles, en la parte superior del casete donde se encuentra el gel concentrador y que servirá para cargar las muestras.

Soporte con electrodos

Es la estructura donde se coloca el “sándwich de casete de gel” una vez ya formado el gel, en esta estructura se encuentra el ánodo (rojo) y el cátodo (negro).

Marco de sujeción

Este marco sirve para sostener el soporte con electrodos que lleva el casete, cuenta con cierres de presión para sostener el casete que se encuentra en el soporte con electrodos. Y se forma una cámara de búfer interior.

Guía de muestra

Esta guía sirve para agregar en cada pozo del gel concentrador la muestra correspondiente. En la parte superior se encuentra enumerado para cada pozo.

Espátula

Un par de espátulas pequeñas sirven para separar los cristales después de la corrida para extraer el gel.

ANEXO B. ESPECIFICACIONES DEL SISTEMA

(CONTINUACIÓN)**Mini tanque y tapadera**

Una vez cargadas las muestras y ensamblado el marco de sujeción con el ensamble con electrodos, se coloca dentro del mini tanque que contendrá el búfer de corrida y se coloca la tapadera que tiene las entradas y líneas correspondientes para el ánodo y el cátodo.

Fuente de poder

Es un equipo que permite suministrar y regular la corriente eléctrica para que se lleve a cabo la electroforesis. Tiene las entradas para las líneas provenientes de la tapadera que están conectadas al ánodo y cátodo.

Para evitar electroendosmosis el material se lavó con jabón comercial y agua potable primeramente, una segunda lavada fue hecha con extran al 2 % enjuagado con agua destilada y deionizada. Este es el procedimiento para montar el material y equipo y llevar a cabo la corrida.

1. montar el casete sobre el soporte y el marco. Primero se coloca el cristal corto frente al cristal separador por el lado de los bordes y se alinean de los lados y de la parte inferior, con las manijas abiertas se colocan dentro del marco, se alinean nuevamente y se cierran la manijas. Se lleva el marco hacia el soporte y se coloca sobre las esponjas y se asegura con el broche que se encuentra en la parte superior del soporte. Se agrega agua deionizada en el espacio entre los cristales y observar el nivel de agua para descartar fugas. Si hay fuga volver a ensamblar. Si no hay fuga, vaciar el agua volteando el soporte con el cuidado de no mover los cristales para no desacomodar.
2. Se vierte la solución del primer gel o gel separador entre los cristales hasta $\frac{3}{4}$ partes del vidrio corto. Se termina de llenar con agua deionizada para evitar burbujas en la superficie y esperar a que polimerice.
3. Ya completa la polimerización del gel separador se retira el excedente de agua y se vierte la solución del gel concentrador hasta el tope evitando burbujas. Inmediatamente se coloca el peine entre los cristales hasta el tope del peine y dejar polimerizar.

ANEXO C. PROCEDIMIENTO Y ENSAMBLE DEL EQUIPO PARA

CORRIDA (CONTINUACION)

4. Desmontar. Primero se retira el peine con cuidado, se abre el broche del soporte y se quita el marco, se abren las manijas del marco y se saca el casete.
5. Ensamble para corrida. Se lleva el casete al soporte con electrodos y se coloca dentro de los carriles. Deteniendo el casete con la mano, se lleva al marco de sujeción con los cierres para detener el casete con el soporte.
6. Cargar la muestra. Se coloca la guía de muestra en el carril del soporte con electrodos en la parte superior en medio. Usando los carriles de la guía se carga la muestra dentro del gel concentrador con la ayuda de micropipeta, se mete la puntilla de la micropipeta entre los cristales y se agrega la muestra con cuidado al pozo. Para evitar la contaminación del pozo con varias muestras se deja un pozo vacío de separación entre muestra. Se retira la guía.
7. Corrida. Se lleva el marco de sujeción dentro del mini tanque y se llena con el 10x búfer de corrida, entre el soporte con electrodos también hasta llegar a la parte superior de los cristales, se coloca la tapadera con la entradas a los electrodos correspondientes, así como las líneas de la tapa se conectan a la fuente de poder y esta se conecta a la corriente.
8. Desmontar. una vez terminada la corrida se detiene la corriente y se extrae el marco de sujeción quitando el búfer de corrida, se saca el casete y con la ayuda de la espátula se separan los cristales abriéndolos de en medio con cuidado. Con la misma espátula y precavidos de no rasgar el gel se separa del cristal.