

33
2E3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

" CUANTIFICACION DE METALES EN PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA MEDIANTE LA TECNICA DE EMISION DE RAYOS X INDUCIDA POR PARTICULAS (PIXE) "

T E S I S

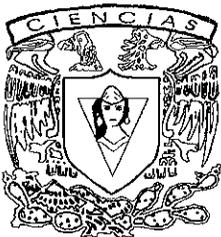
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A :

Roberto Cuevas Moreno

Director de Tesis: Dra. Corina Solís Rosales



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION BIBLIOTECARIA
1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Cuantificación de metales en proteínas en geles de poliacrilamida mediante la técnica de Emisión de Rayos X Inducida por Partículas (PIXE)"

realizado por Roberto Cuevas Moreno

con número de cuenta 9137152-4, pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Corina Solís Rosales.

Propietario

Dra. Alicia María Oliver Gutiérrez.

Propietario

Dr. Heliodoro Celis Sandoval.

Suplente

Dra. Irma Romero Alvarez.

Suplente

Dra. Margarita García Garduño.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM.

Consejo Departamental de Biología.

Edna M. Suárez D.

Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO DE BIOLÓGICA

DEDICATORIA

A mis padres, María Elena y Enrique.

A mis hermanos Ana María, Javier y Enrique.

A mi sobrina Viridiana.

A Aída y Alfredo.

A Oscar, Alma, y a sus hijos, Miguel y Oscar, sin olvidar a Miriam y a Loló como una mención especial.

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que me han apoyado a lo largo de mi vida.

A David Benavides, quien me ha ayudado a ser más humano.

A mis tíos.

A la familia Fernández Reséndiz.

A la familia Correa Zavala.

A mis compañeros de facultad, en especial a Paco, Adriana, Daniel y Arelí.

AGRADECIMIENTOS

A mis sinodales:

A la Dra. Corina Solís Rosales, cuya dirección hizo posible llevar a buen término ésta tesis.

Al Dr. Heliodoro Celis, por poner a nuestra disposición su laboratorio y reactivos para la preparación de muestras y por su asesoría en la discusión de los resultados.

A la Dra. Irma Romero por su asesoría en la preparación de muestras y discusión de los resultados.

A la Dra. Alicia Oliver por ayuda en la de revisión de la éste trabajo.

A la Dra. Margarita García por su ayuda en la revisión de la tesis.

Al Dr. Eduardo Andrade, ya que los primeros experimentos se realizaron en su laboratorio con acelerador Van der Graaff de 5.5 MV.

A la M. en C. Silvia Escobedo por su asesoría y ayuda en la preparación de las muestras de proteínas.

A Karim López, Francisco J. Jaimes, Eustacio Pérez y Juan Carlos Pineda por el mantenimiento y operación de los aceleradores.

A la Dra. María Esther Ortiz S., por el apoyo que me brindó.

A Lupita y en especial a Tere Cázares.

Se agradece el apoyo del CONACyT por medio del Proyecto de investigación G0010-E.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 1

CAPÍTULO I. FUNDAMENTOS FÍSICOS DE PIXE 3

I.1. Interacción de los protones con la materia 3

I.2. Bremsstrahlung 6

I.3. Límites de detección y cuantificación 6

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS 7

II.1. El acelerador Peletrón 7

II.2. PIXE al aire 9

II.3. Detectores de radiación 10

II.3.1. Detector de Si(Li) 10

II.3.2. Detector de Ge 11

II.4. Electrónica nuclear 11

II.5. Filtros de radiación 12

II.6. Análisis de espectros 12

II.7. Implementación de la técnica 13

II.7.1. Características de las enzimas empleadas 13

II.7.2. Preparación de los geles de poliacrilamida 14

II.7.2.1. Preparación de los geles de calibración 15

II.7.2.2. Preparación de los geles con las muestras de proteínas 15

II.7.3. Condiciones de las medidas mediante PIXE en geles de poliacrilamida	16
II.7.4. Medida de la carga acumulada en los geles	17

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 18

III.1. Densitogramas	18
III.2. Espectros de los geles de poliacrilamida	20
III.3. Efecto de la irradiación en la estructura de los geles	21
III.4. Geles de calibración	22
III.5. Determinación de la estequiometría de metales en las enzimas	23
III.6. Citocromo c	25
III.7. Anhidrasa carbónica	27
III.8. Deshidrogenasa alcohólica	28
III.9. Pirofosfatasa citoplásmica	30
III.10. Efecto de la tinción en la concentración de Zn	31

CAPITULO IV. CONCLUSIONES 33

APÉNDICE 1 35

APÉNDICE 2 37

BIBLIOGRAFÍA 38

ABREVIATURAS

AC; Anhidrasa carbónica

Da; Daltones.

DA; Deshidrogenasa alcohólica.

Cit c; Citocromo c.

mA; Miliamperes.

PPasa; Pirofosfatasa.

PAGE; Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PIXE; Emisión de Rayos X Inducida por Partículas.

R; Estequiometría.

R. rubrum; *Rhodospirillum rubrum*.

TEMED. N,N,N',N'-Tetrametilendiamina.

RESUMEN

La técnica de Emisión de Rayos X Inducida por Partículas (PIXE) se aplicó al estudio de metaloenzimas corridas en geles de poliacrilamida, con el fin de probar que dicha técnica permite identificar a los metales contenidos en estas biomoléculas (Fe y Zn según el caso) así como conocer su estequiometría "R" (número de metales por molécula). Las enzimas utilizadas fueron Citocromo c, en la que se encontró una estequiometría de 1 Fe por proteína y Deshidrogenasa alcohólica, cuya R observada fue de 4 Zn por proteína. Ambos datos corresponden a lo citado en la literatura. Otra enzima estudiada fue la Anhidrasa Carbónica, para la cual se encontró una estequiometría de 2 Zn por molécula, a diferencia de la R esperada que era de 1. Esta discrepancia se debió posiblemente a que esta enzima tenía su estequiometría alterada originalmente. Las tres enzimas mencionadas se obtuvieron comercialmente. También se utilizó a la Pirofosfatasa citoplásmica de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*, la cual se aisló y se purificó parcialmente a partir de un cultivo de dichas bacterias. La estequiometría encontrada para esta enzima fue de 2 Zn por proteína, siendo ésta la primera vez que se propone dicho dato.

INTRODUCCIÓN

Los metales son componentes de muchas enzimas, desempeñando tareas importantes en muy diversos tipos de reacciones catalíticas de los seres vivos o bien dándole estabilidad estructural a la enzima de la cual forman parte. Uno de los principales problemas en el estudio de las funciones de los metales en las proteínas es su localización y su cuantificación, lo cual se debe a las cantidades tan bajas en las cuales se encuentran dichos metales, mismos que escapan frecuentemente a los límites de detección de las técnicas analíticas convencionales [Solís *et al.*, 1998]. Por otro lado, las técnicas que normalmente se emplean en el estudio de metales en proteínas no son capaces de distinguir entre el metal libre y aquel que se encuentra unido a la molécula [Hilario, Romero y Celis, 1990]. De tal modo que nuevos métodos físicos con límites de detección cada vez más bajos se han venido aplicando en tiempos recientes con el fin de resolver los problemas mencionados. La técnica de emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE) ha sido muy útil en precisar la localización de algunos metales tales como Fe y Zn en subunidades proteínicas específicas [Szokefalvi-Nagy *et al.*, 1987, 1994, Szokefalvi-Nagy, 1996, Solís, *et al.*, Strivay *et al.*, 1998] y en la cuantificación de estos elementos traza [Szokefalvi-Nagy *et al.*, 1994, Weber *et al.*, 1996].

Entre las ventajas que presenta esta técnica se encuentra su amplio rango de aplicación a una gran cantidad de elementos con número atómico (Z) mayor a 11, a la vez que su efectividad de detección llega a ser unos cuantos microgramos por gramo. Además posee carácter multielemental, es decir, en un solo evento de medición pueden ser detectados varios elementos, mientras que puede manejarse como una técnica no destructiva de los materiales que se estudian; esto último, especialmente cuando se aplica al análisis de proteínas, posibilita diferenciar a los metales propios de las muestras que se analizan de aquellos que son externos a dicha muestra, ya que en principio se puede lograr que el haz de partículas empleado en la técnica incida directamente sobre el lugar en donde se encuentra la proteína [Johansson y Campbell, 1988, Koltay, 1988].

En otros métodos, tales como la microscopía electrónica analítica (AEM), se tienen límites de detección relativamente altos (unos 100 $\mu\text{g/g}$), por lo cual su aplicación en la detección de metales traza es bastante limitada [Thellier *et al.*, 1993].

Por su parte la técnica de fluorescencia de rayos X (XRF), a pesar de tener límites de detección comparables a los de PIXE (1 a 10 $\mu\text{g/g}$ en buenas condiciones experimentales), tiene la desventaja de requerir una cantidad de muestra mucho mayor, siendo ésta del orden de miligramos [Keszthelyi *et al.*, 1984, Willis, 1988].

La espectroscopía de absorción atómica (AAS) [Chan y Gamble, 1978, Veillon y Vallee, 1978, Szokefalvi-Nagy *et al.*, 1994] es altamente sensitiva en la detección de metales traza en muestras biológicas (llega a las partes por billón), sin embargo tiene la desventaja de ser destructiva y de que sólo es capaz de analizar un elemento a la vez, siendo

su aplicación multielemental bastante complicada. Por su parte, la espectroscopía de emisión atómica, aunque tiene carácter multielemental y cuenta con notables límites de detección, es también un método destructivo [Veillon y Vallee, 1978, Szokefalvi-Nagy *et al.*, 1987].

La técnica de difracción de rayos X ha sido ampliamente utilizada en el estudio de proteínas, en especial en lo referente a determinar el arreglo espacial de los átomos en dichas moléculas. La base del método consiste en detectar e identificar los distintos átomos gracias al patrón establecido por un haz de rayos X que penetra en la muestra y que es principalmente difractado por los electrones de la misma. Por esto, átomos grandes y con muchos electrones pueden ser detectados con una buena eficiencia. A pesar de lo anterior, el aplicar esta técnica resulta ser demasiado laborioso, por un lado porque frecuentemente se requiere de meses para la toma automatizada de datos y muchas horas de análisis de éstos en potentes computadoras, y por otro lado porque es un requisito contar con cristales con un alto grado de pureza, lo cual es en sí misma una tarea que demanda una gran cantidad de tiempo y esfuerzo [Alberts *et al.*, 1983].

En un contexto analítico diferente, la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), ha demostrado ser una de las más útiles y poderosas herramientas para la separación y el análisis de macromoléculas biológicas, debido a su gran sensibilidad y precisión para separar proteínas con base en su carga y/o masa [Hames, 1983]. De modo que, siendo PIXE una técnica no destructiva, rápida, muy sensible y multielemental, una combinación entre los métodos de PAGE y PIXE, es capaz de brindar una significativa cantidad de información acerca del tipo de metales y su estequiometría para los casos específicos de metaloproteínas y metaloenzimas.

OBJETIVOS

En la presente tesis, con el propósito de probar la viabilidad de PIXE en la cuantificación de metales en enzimas en geles de poliacrilamida, esta técnica se aplicó a tres metaloenzimas bien conocidas con el fin de verificar su estequiometría. Se eligieron enzimas con Fe y Zn porque estos dos metales están entre los más abundantes en las moléculas biológicas y son componentes esenciales de numerosas enzimas aisladas de diferentes especies. Para la detección de Fe se eligió el Citocromo c y para la detección del Zn se utilizaron Anhidrasa carbónica y Deshidrogenasa alcohólica. Estas metaloenzimas están bien caracterizadas y se utilizan frecuentemente como un control interno para la determinación de pesos moleculares de proteínas preparadas por medio de PAGE. Posteriormente se analizó a la enzima Pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodospirillum rubrum*, de la cual se sabe que posee Zn como componente estructural, pero cuya estequiometría es desconocida.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTOS FÍSICOS DE PIXE.

I.1. Interacción de los protones con la materia.

La emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE) es un método físico analítico basado en espectrometría de rayos X. Implica a un haz de partículas cargadas que se utilizan para expulsar a los electrones de las capas más internas de los átomos de una muestra, dejándolos en un estado de alta energía. La vacante electrónica producida es llenada por un electrón de capas superiores de mayor energía, por lo cual el átomo, a la vez que vuelve a su estado basal, emite rayos X característicos del átomo en cuestión.

En la descripción moderna del átomo se han introducido los llamados números cuánticos. Estos pueden emplearse para describir el estado de los electrones, asignándolos a diversas capas y subcapas de tal modo que el sistema quede en el menor estado energético posible; a la vez que, según el principio de exclusión de Pauli, en un átomo con dos o más electrones, estos no pueden tener los mismos números cuánticos. Esos son: el número cuántico principal (n) que representa el nivel energético principal del electrón y el número cuántico azimutal (l), que determina subniveles de energía para cada capa. Además existe el número cuántico magnético (m_l) y el número cuántico de spin (s).

La clave de la identidad de un elemento es la carga de su núcleo. Ésta determina el número de sus electrones atómicos y, por lo tanto, sus propiedades físicas y químicas. Los electrones de la capa K, al encontrarse tan cerca del núcleo, constituyen el análogo a una sonda, la cual es muy sensible a la carga de dicho núcleo [Halliday, Resnick y Krane, 1997]. De esta manera, el análisis de los electrones de capas internas es una fuente potencial de información muy valiosa acerca de los átomos estudiados y en consecuencia de la muestra de la cual forman parte.

En el caso de PIXE, un haz de partículas cargadas (protones, partículas alfa o iones pesados), se hace incidir sobre una muestra con el fin de expulsar los electrones de sus capas, en especial las capas cercanas al núcleo (ver Figura I.1.) Para propósitos analíticos mediante PIXE generalmente se utilizan haces de protones. El uso de iones más pesados hace más complejo el análisis debido a corrimientos en la energía de los rayos X y a rendimientos de fluorescencia variables debido a ionizaciones múltiples.

Cuando un haz de protones interactúa con los átomos de una muestra, éstos se ionizan y pasan a un estado de alta energía. Así, la vacante generada es inmediatamente ocupada por electrones de las capas superiores que migran para llenar dicho hueco, con lo cual el átomo regresa a su estado basal de energía, sólo que a su vez el exceso de energía

implicado es expulsado del átomo en forma de un fotón de rayos X, mismo fotón que es característico del tipo de átomo del cual se trate, teniendo éste una intensidad igual a la diferencia de energía entre los niveles de los cuales se llevó a cabo la transición. Aquí es importante remarcar que, en el caso de las capas más cercanas al núcleo, tales como la capa K o la L por ejemplo, cuya energía es descrita por los números cuánticos, constituyen la fuente de información más valiosa para la técnica.

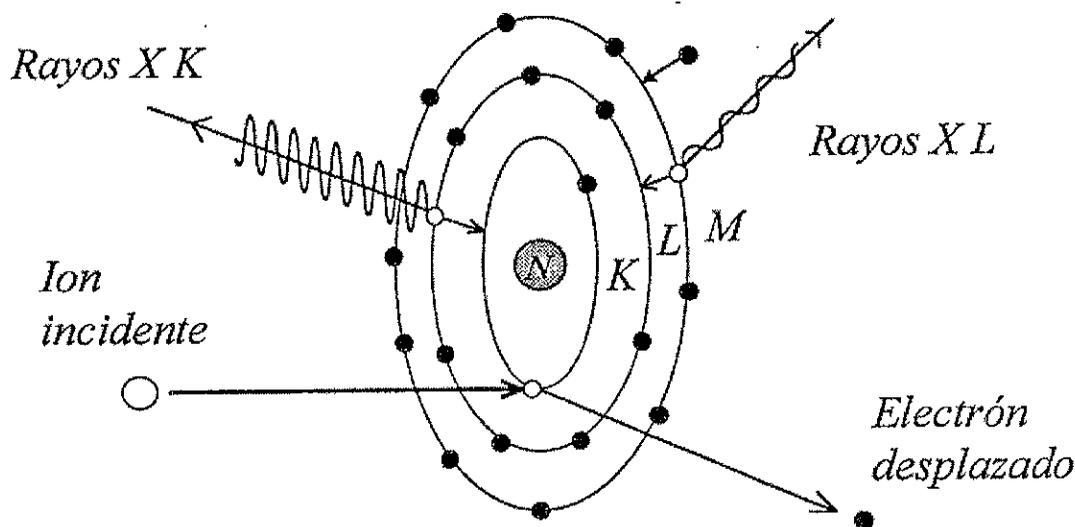


Figura I.1. Generación de vacancias en las capas internas y subsecuente emisión de Rayos X debida al bombardeo con protones. Tomada de Johansson y Campbell, (1988).

El electrón que ocupa la vacante puede provenir de un gran número de subcapas, aunque no de cualquiera, puesto que existen limitaciones impuestas por reglas de selección de transiciones atómicas. Los rayos X emitidos se designan en relación con la capa en la cual se generó el hueco. Si la vacante se produce en la capa K, la línea emitida se denomina K, si sucede en L, se denominará L y así sucesivamente.

Ya que el electrón que llena la vacante puede provenir de un gran número de subcapas, se producen varios tipos de líneas K, L, etc., cuya distinción se hace en virtud de la intensidad relativa que tiene cada una de estas líneas dentro de su grupo. De tal manera, la línea K más intensa será la $K\alpha$, y la siguiente, la $K\beta$. A su vez cada una de estas líneas pueden estar compuestas por cierto número de transiciones que se reconocen por los subíndices 1,2,3..., existiendo así las líneas $K\alpha_1$, $K\alpha_2$, $K\beta_1$, $K\beta_2$, etc. (ver Figura I.2.).

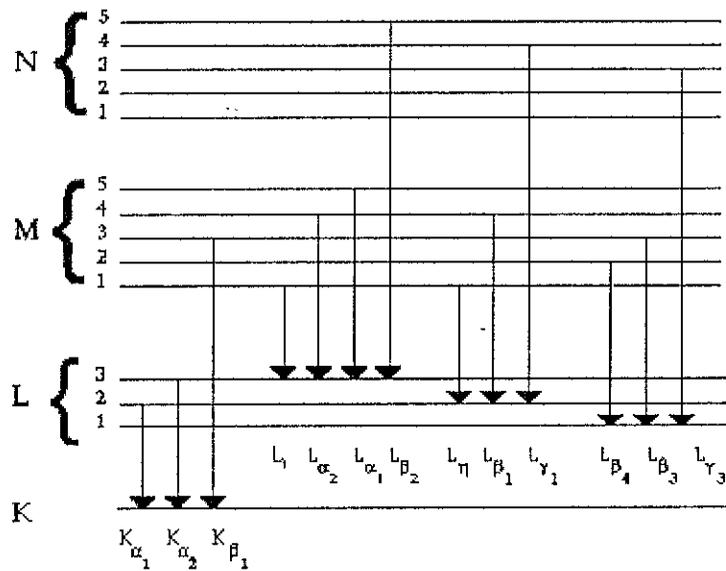


Figura I.2. Niveles de energía atómicos y transiciones que dan origen a los Rayos X de las capas K y L. Tomado de Miranda, (1996).

Ya que el fin que tiene el bombardeo de una muestra con un haz de protones es la extracción de electrones de las capas K y L y la subsiguiente emisión de rayos X portadores de información de la muestra, es de suma importancia saber cuál es la probabilidad de ionizar el átomo, a lo cual se le conoce como sección eficaz de ionización y cuyo conocimiento es fundamental para determinar la sección eficaz de producción de rayos X.

Asimismo otro parámetro importante para la técnica de PIXE es el de producción de fluorescencia (ω), la cual es el cociente del número total de fotones X emitidos con respecto al total de vacantes de una subcapa determinada.

Existen consideraciones teóricas para calcular las concentraciones de los distintos elementos en una muestra tomando en cuenta los parámetros mencionados anteriormente.

Para el caso particular de la determinación de metales en geles de poliacrilamida, no es necesario realizar ningún cálculo teórico, ya que es posible recurrir a un proceso de calibración sencillo que consiste en preparar geles adicionados con los metales de interés en concentraciones conocidas. Haciendo esto para todos los elementos de interés, se obtiene una relación lineal entre los rayos X producidos y la concentración de los elementos en los geles de calibración.

I.2. Bremsstrahlung.

El espectro del material que se analiza se compone fundamentalmente de un conjunto de rayos X característicos de los átomos que constituyen a la muestra más una radiación de fondo que se superpone. Esta radiación de fondo o Bremsstrahlung se produce cuando una partícula cargada cambia su velocidad o su dirección y emite en consecuencia radiación electromagnética. La causa principal de este fondo se debe al Bremsstrahlung de los electrones secundarios producidos o de los mismos iones del haz que pierden energía dentro de la muestra o que se desvían de sus trayectorias dentro de la misma [Johansson y Campbell, 1988].

I.3. Límites de detección y cuantificación.

La técnica de PIXE presenta una máxima sensibilidad en dos regiones de números atómicos (Z): $20 \leq Z \leq 35$ y $75 \leq Z \leq 85$ que contienen a la mayoría de los elementos traza de interés en Biología. Con esta técnica no pueden detectarse elementos muy ligeros tales como H, O y C. Esto en realidad representa una ventaja para la determinación de metales asociados a proteínas en geles de poliacrilamida porque sólo se detectan los metales y no hay ninguna contribución de la matriz de acrilamida a la medida [Johansson y Campbell, 1988].

En el espectro obtenido de una muestra, las alturas relativas de los picos de rayos X con respecto al nivel de la radiación de fondo determina el límite de detección del método para un elemento dado. En general se acepta que el número total de cuentas en un pico debe exceder tres veces la raíz cuadrada de las cuentas de la radiación de fondo sobre el mismo intervalo de energía, para una identificación segura y una cuantificación adecuada del pico correspondiente. Usando este criterio es posible calcular la mínima concentración detectable (C_{min}) para cada elemento mediante la siguiente relación:

$$C_{min} = \frac{3\sqrt{N_F}}{Q \times K(Z)} \quad (1)$$

donde N_F es la radiación de fondo, Q la carga acumulada y $K(Z)$ es la sensibilidad del elemento, la cual se entiende como las cuentas de rayos X del elemento Z por protón por $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y que se calcula irradiando un material estándar en las mismas condiciones que la muestra. Este parámetro está dado por:

$$K(Z) = \frac{N_x(Z)}{Q \times C(Z)_{std}} \quad (2)$$

donde $N_x(Z)$ corresponde a las cuentas del pico del elemento Z y $C(Z)_{std}$ la concentración conocida de un estándar, que en este caso puede ser uno de los geles usados en la calibración.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

II.1. El Acelerador Peletrón.

El acelerador de partículas utilizado para la aplicación de la espectroscopía PIXE fue un Peletrón 9SDH-2 en tándem [Scharf, 1990] (Figura II.1.), fabricado por la National Electrostatic Corporation (NEC), el cual alcanza un potencial de hasta 3 Megavolts (MV) en la terminal de alto voltaje. Este acelerador consta de las siguientes partes:

- * Una fuente de iones (1).
- * Una serie de electroimanes selectores (2).
- * El tanque con el sistema de carga y de aceleración de iones (3).
- * Cuadrupolo magnético (4).
- * Línea de implantación de iones (5).
- * Línea para PIXE (6).
- * Una cámara de vacío con un sistema de vacío anexo (7).
- * El sistema detector de rayos X (8).
- * Salida del acelerador para análisis de PIXE al aire (9).
- * Fuente de alto voltaje (10).
- * Consola (11).

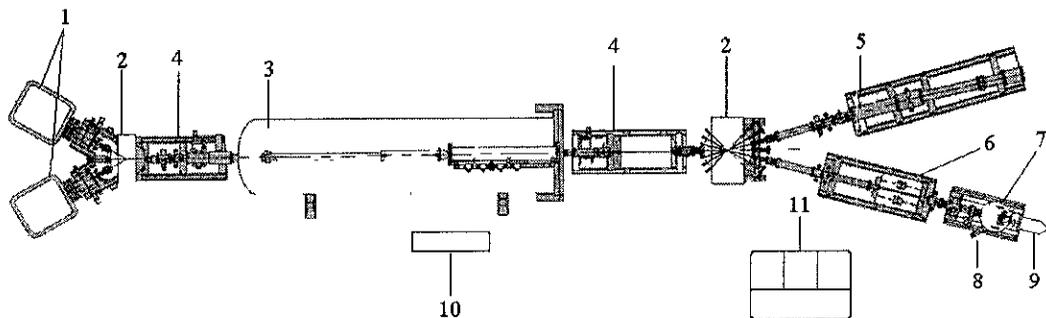


Figura II.1. Diagrama del acelerador Peletrón usado para PIXE. El sistema consiste de: 1. Fuente de iones. 2- Imán selector de 30°. 3-Tándem de 3 MV (NEC 9SDH). 4- Cuadrupolo magnético. 5- Línea de implantación de iones. 6- Línea para PIXE. 7- Cámara de vacío. 8- Detector. 9- Salida para hacer PIXE al aire. 10- Fuente principal de alto voltaje 11-Consola. Tomada del manual de operación del acelerador Peletrón.

La fuente de iones es una cámara cuyo propósito es generar iones a partir un cátodo sólido. En esta se produce vapor de cesio, el cual pierde electrones al chocar con una superficie de tantalio, siendo entonces acelerado hacia un cátodo de hidruro de titanio. Los iones de cesio interactúan con este último de tal manera que se producen iones negativos de hidrógeno (H⁻), los cuales son enfocados y dirigidos a la línea que conduce al tanque del acelerador por medio de un inyector magnético. Estos iones son acelerados hacia la terminal de alto voltaje, donde a su vez se cambia su carga a positiva con el fin de acelerarlos nuevamente según el proceso que se describirá más adelante. En varios puntos del acelerador se colocan cajas de Faraday, las cuales tienen la función de medir la cantidad de corriente que incide en un punto determinado.

Después de pasar por el imán inyector, el haz entra a un tanque, en el cual se generan las grandes diferencias de potencial características de los aceleradores de partículas. El sistema de carga consiste en una cadena en la cual se alternan barras metálicas con barras aislantes las cuales son cargadas por inducción. En este caso, un electrodo cargado negativamente expulsa a los electrones contenidos en las barras, las cuales, en consecuencia, adquieren una carga positiva neta. Entonces la cadena transporta dicha carga hacia la terminal de alto voltaje en la cual sucede el proceso inverso, es decir, en ella se depositan cargas positivas y los electrones son los que se transportan a la cadena. Después de cierto tiempo de funcionamiento del sistema, la terminal de alto voltaje reúne el suficiente número de cargas positivas como para generar una diferencia de potencial de varios megavolts, siendo esta diferencia de potencial la que atrae a las partículas que entran en el tanque, acelerándolas a una energía del orden de MeV (Figura II.2.) Con el fin de que no ocurran descargas en el interior del cilindro, éste se llena con hexafluoruro de azufre (SF₆); esto permite alcanzar diferencias de potencial aún mayores.

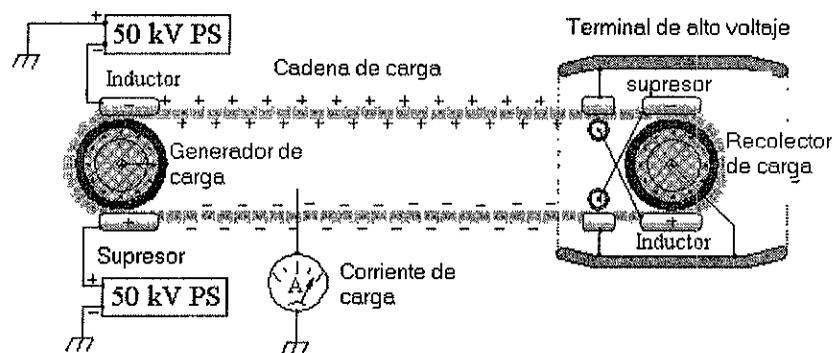


Figura II.2. Esquema que muestra el sistema de carga del acelerador Peletrón. Tomada del manual de operación del acelerador Peletrón.

En el centro del tanque se localiza una cámara con gas nitrógeno (N_2), el cual se conoce en este caso con el nombre de “stripper”. Cuando en el gas mencionado se da la incidencia del haz de partículas negativas, estas pierden electrones debido a las colisiones que se producen, por lo cual las partículas del haz adquieren carga positiva. Debido a que la terminal de alto voltaje posee el mismo signo de carga, las partículas se ven nuevamente aceleradas. El proceso de cambiar el signo a las partículas aceleradas determina que con una sola terminal de alto voltaje se pueda obtener haces con el doble de energía.

Una vez que el haz abandona el tanque, se encuentra un cuadrupolo magnético con la función de enfocar el haz obtenido. Ya que el haz ha sido enfocado, se dirige por medio de un imán (imán analizador o selector) a la cámara en la cual va a ser utilizado. Antes de hacerse incidir en la muestra, el haz se nivela gracias a unas rejillas y se vuelve a enfocar con otro cuadrupolo magnético, para finalmente llegar a una caja de Faraday que mide la carga final del haz.

Es importante mencionar que todas las etapas del acelerador, desde la fuente de iones hasta que el haz sale para incidir en la muestra, se manejan al vacío. Esto se logra por medio de bombas mecánicas con las cuales se logra el vacío necesario para que funcionen bombas turbomoleculares, las cuales proporcionan un vacío base en el acelerador de 10^{-8} Torr.

Todo lo descrito anteriormente se refiere a la producción y transporte del haz de partículas. Este haz puede entonces ser utilizado en diferentes técnicas de análisis que incluyen Reacciones nucleares (RN), Retrodispersión de Rutherford (RBS), Dispersión elástica por retroceso (ERDA) y PIXE.

En experimentos de PIXE un haz de protones incide sobre la muestra la cual se coloca en un portamuestras al interior de una cámara de vacío. La interacción de los protones con la muestra induce la emisión de rayos X. Estos rayos X son detectados por uno o más detectores situados a un cierto ángulo con respecto a la normal de la superficie de la muestra.

II.2. PIXE al aire.

Es muy frecuente que la técnica PIXE se aplique a muestras que se encuentran al vacío. De esta manera se evita la pérdida de energía del haz debido a colisiones que pudieran darse con las moléculas de la ventana de salida de la línea de vacío del acelerador y de la atmósfera donde se coloque la muestra. Debido a lo anterior, los límites de detección para PIXE al aire, pueden no ser tan buenos como cuando la técnica se lleva a cabo al vacío. Esto es porque los límites de detección se encuentran en gran parte determinados por la radiación de fondo, la cual se ve aumentada gracias a la interacción del haz con el material de la ventana de salida del acelerador, así como con el aire entre ésta y la muestra [Johansson y Campbell, 1988].

Sin embargo, existen situaciones donde es más conveniente bombardear a la muestra al aire. El no tener que evacuar el aire de la cámara de vacío cada vez que se hacen los análisis permite que un mayor número de muestras se analicen en menor tiempo. También el tener a la muestra fuera de una cámara implica en muchos casos poder manejar a los especímenes con mayor precisión [Johansson y Johansson, 1976].

Además ésta modalidad de la técnica conlleva ventajas tales como minimizar o evitar daños a especímenes que sean sensibles al calor, pues el aire es un medio que permite la dispersión de este tipo de energía, lo cual no sería posible en el vacío. Si bien es frecuente que muestras analizadas al aire sean dañadas por el haz de partículas, la corriente del mismo y su tiempo de incidencia pueden variarse de tal manera que el espécimen se conserve en buenas condiciones.

Otro aspecto del análisis al aire que puede ser de utilidad, es la inevitable aparición de un pico K de argón en los espectros obtenidos. Este puede emplearse para medir la carga relativa incidente sobre la muestra; sin embargo a esto se encuentra aunada la desventaja de que la $K\beta$ del argón se traslapa con la $K\alpha$ del potasio, haciendo entonces muy difícil la cuantificación y/o localización de este último elemento en el espécimen.

II.3. Detectores de radiación.

II.3.1. Detector de Si(Li).

El detector utilizado (Figura II.3.) presenta una configuración denominada p-i-n. Se compone de una zona semiconductora de tipo p (zona con predominio de impurezas aceptoras), otra llamada i de tipo compensado (zona con un número similar de impurezas aceptoras y donadoras que se comporta como un material sin impurezas o intrínseco, y otra zona de tipo n (zona con predominio de impurezas donadoras).

Se denomina semiconductor de Si(Li) puesto que se fabrica partiendo de un cristal tipo p al interior del cual se difunde Li. Como consecuencia, la concentración de Li es mayor que las impurezas p originales en la capa n, es igual a la concentración de las impurezas en la zona intrínseca y es menor que la concentración de las impurezas en la zona p.

Los átomos de Li se comportan entonces como impurezas donadoras, por pasar el electrón libre al ionizar un átomo de litio a la banda de conducción. El cristal semiconductor está orientado de forma que los rayos X entran por la región i. El electrón secundario producido cuando un átomo de Si es excitado por un rayo X, produce también una ionización, creando pares electrón-hueco que son colectados por la acción de una diferencia de potencial previamente establecida, dando lugar a una intensidad de corriente que se entrega al primer módulo de la electrónica. El número de pares creados es linealmente proporcional a la energía. Esta linealidad permite hacer una espectroscopía en energía.

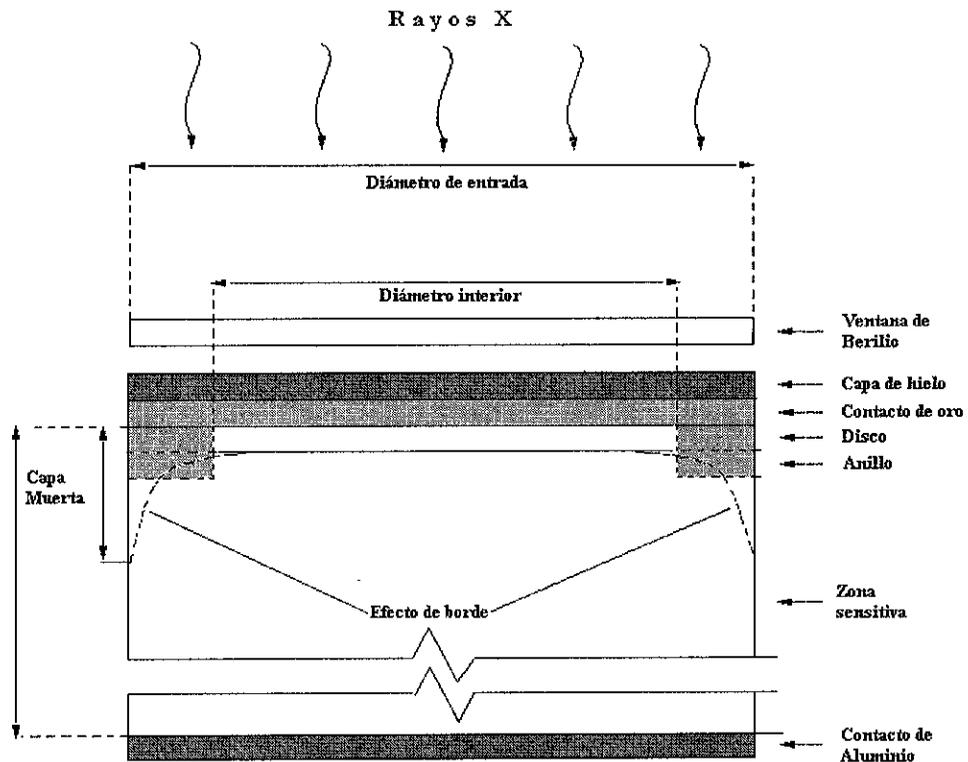


Figura II.3. Esquema del detector de Silicio-Litio (SiLi).

II.3.2 Detector de Germanio.

El detector de Germanio (Ge) es otro de los detectores semiconductores, el cual tiene la ventaja de que, al ser de un mayor número atómico y de una mayor densidad que el de silicio, presenta una mayor eficiencia de detección para fotones de energías más altas y por lo tanto para átomos con números atómicos grandes.

II.4. Electrónica nuclear.

Una vez que el detector ha convertido al espectro de energía proveniente de la muestra en pulsos de carga, se tiene la necesidad de amplificar y dar forma a tales pulsos, lo cual se logra mediante una serie de circuitos electrónicos [Miranda Martín del Campo, 1996]. Es importante decir que esta electrónica transforma a los pulsos del detector en una

señal cuya altura es proporcional a la energía del rayo X detectado, el cual es a su vez característico del átomo del que proviene.

Los primeros circuitos son un preamplificador y un amplificador, los cuales, como su nombre lo indica, tienen el objetivo de aumentar la magnitud de los pulsos provenientes del detector de manera que el siguiente módulo, el analizador multicanal, sea capaz de manejar la información adquirida. El analizador multicanal convierte la señal analógica que obtiene en digital, generando entonces el espectro en su forma final; esto lo logra haciendo corresponder un cierto intervalo de alturas de la señal con el valor de una nueva variable a la cual se le denomina canal, del tal modo que la representación de número de señales (cuentas) vs canal es lo que propiamente se denominará espectro.

II.5. Filtros de radiación.

Un filtro o absorbedor es un material que se coloca entre la muestra irradiada y el detector con el fin de atenuar la intensidad de la radiación de ciertos elementos específicos, lo cual se debe a que la energía de la capa $K\alpha$ del elemento en cuestión se traslapa con la energía de absorción K del elemento que compone al filtro. Es común utilizar filtros con el fin de absorber la radiación proveniente de la matriz donde se encuentran los elementos de interés o bien pueden emplearse para atenuar los fotones provenientes de otros elementos de la muestra. De esta manera se puede incrementar la corriente del haz y así obtener más cuentas de los metales traza. Para ilustrar lo anterior, puede mencionarse que un filtro de aluminio (el cual absorbe rayos X con energías de 1.56 KeV) puede suprimir en gran medida la $K\alpha$ del Si (1.74KeV), por lo cual puede utilizarse en los casos donde los picos de silicio sean indeseables [Johansson y Campbell, 1988, Swan y Fleming, 1990].

II.6. Análisis de espectros.

La información sobre la presencia y la concentración de un elemento en una muestra se encuentra en un espectro complejo de rayos X característicos [Koltay, 1988]. El análisis cualitativo se lleva a cabo asignando números atómicos a un pico o grupos de picos del espectro, mientras que la información cuantitativa puede obtenerse de fórmulas que se explicarán más adelante. Con el fin de llevar a cabo el análisis cuantitativo de un espectro, se emplean programas, los cuales deben llevar a cabo una serie de pasos que incluyen lo siguiente:

La energía de calibración de un espectro se hace con base en la energía de dos picos de referencia que tengan una energía conocida y que se seleccionen de entre los picos más altos del espectro. Los parámetros de calibración se determinan a partir del ancho medido de un pico de referencia, el cual se utiliza entonces para calcular los anchos de picos para cualquier energía. Los parámetros de la radiación de fondo a ser utilizados son obtenidos a partir del ajuste de un espectro simple. Las energías y las intensidades relativas son guardadas en diferentes partes de un archivo para las distintas líneas de rayos X obtenidas

para cada elemento durante el análisis. Los valores entre las diversas líneas de rayos X son corregidos debido a los cambios en energía introducidos por los filtros y absorbedores presentes. Las localizaciones de los centroides, alturas y anchos de cada pico del espectro son registradas y guardadas.

Se emplean gaussianas para la descripción de los picos obtenidos, haciéndose correcciones en el caso de que se presenten desviaciones con respecto a la forma mencionada. También deben hacerse correcciones si aparecen picos de escape o picos de apilamiento (pile-up) en el espectro. Se lleva a cabo un ajuste por mínimos cuadrados con el fin de optimizar los parámetros manejados y deducir el área neta del pico de emisión para cada elemento de la muestra.

II.7. Implementación de la técnica

II.7.1. Características de las enzimas empleadas.

Para el montaje de la técnica se escogieron enzimas bien caracterizadas y de las cuales se sabe que necesitan de cofactores para llevar a cabo su función.

Para la detección de Fe se usó el Citocromo c de mitocondria de caballo. Tiene un peso molecular de 12 300 Da, formando una sola cadena polipeptídica con cerca de 100 residuos de aminoácidos con un grupo hemo asociado. Contiene un átomo de Fe covalentemente ligado al grupo hemo de la proteína con una estequiometría "R" (metal/proteína) igual a 1. La carga neta de ésta molécula es positiva. Esta enzima es uno de los componentes de la cadena de transporte de electrones responsable de la fosforilación oxidativa en la mitocondria [Lehninger, 1982].

Para investigar el contenido de Zn se usaron las enzimas AC de eritrocito de bovino, y DA de levadura.

AC es una metaloenzima con un peso molecular de 29,000 Da. Tiene 1 Zn coordinado con 3 histidinas (R=1). Esta molécula ya ha sido obtenida en forma cristalizada. La AC es una enzima que cataliza la hidratación reversible del CO₂ en las células sanguíneas, participando en el proceso de transporte de esta molécula y del oxígeno, los cuales son muy importantes en los procesos respiratorios [Lindskog, 1986].

Por su parte la DA es un tetrámero de peso molecular de 140 000-150 000 Da. Esta enzima ya ha sido cristalizada. El número de átomos de Zn/proteína determinado por diferentes métodos varía entre 3.2-5.2, siendo generalmente aceptado el número de 4 átomos firmemente ligados por proteína o 1 Zn por subunidad (R=4) [Boyer, 1975]. Cunnane [1988] menciona que el papel del Zn en la Deshidrogenasa alcohólica es

funcionar como un donador de protones, catalizando la deshidrogenación de etanol para producir acetaldehído [Lehninger, 1982].

Las enzimas fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. St Louis, MD. Como ya se mencionó, estas proteínas tienen una estequiometría conocida. Sin embargo, es importante hacer notar que éstas se preparan para ser usadas como patrones de calibración en la determinación de pesos moleculares [Hames, 1983, SIGMA bulletin MKR-137]. Al adquirir este tipo de materiales con un grado de pureza de reactivo analítico, se tiene la certeza de que está libre de metales traza contaminantes, pero no se garantiza que se conserve la estequiometría metal/proteína propia de la molécula [Veillon y Vallee, 1978].

La última de las enzimas incluidas en la presente tesis es la Pirofosfatasa. Esta cataliza la hidrólisis de pirofosfato a ortofosfato, siendo este último una molécula muy importante en la fase de conversión de energía del metabolismo [Lathi, 1983]. Se sabe que esta enzima contiene zinc, el cual es un metal que tiene la función de estabilizar la conformación de la enzima, sin embargo, la estequiometría de este metal en la pirofosfatasa es desconocida [Klemme y Gest, 1971]. La PPasa fue extraída y purificada parcialmente como se describe en el apéndice 1, con base en el método seguido por Escobedo (1998). Se llevó a cabo sólo una purificación parcial ya que de lo contrario la enzima pierde actividad. La concentración de proteína se determinó mediante el micrométodo de Bradford [Bradford, 1976, Dryer y Lata, 1989].

II.7.2. Preparación de los geles de poliacrilamida.

Los geles utilizados se prepararon conforme a la técnica de electroforesis de pH discontinuo (o de disco), usando una placa rectangular (Figura II.4.), siguiendo el procedimiento descrito en el apéndice 2. En general esta técnica consiste en introducir las proteínas en un gel de poliacrilamida separado entre dos placas de vidrio rectangulares. El gel de acrilamida consiste de dos fases, las cuales difieren en su porosidad y pH. Al aplicar una diferencia de potencial, la mezcla de proteínas migra del gel más poroso (gel concentrador) al menos poroso (gel resolvidor). Esta migración es posible debido a que las proteínas tienen una carga neta. Las enzimas utilizadas migraban del electrodo negativo (en la parte superior) al positivo (en la parte inferior), tal y como lo indica la disposición mostrada en la figura, pero en el caso del Cit c, al tener éste carga positiva, la polaridad tuvo que ser invertida. En el gel resolvidor, la movilidad va a depender principalmente de la densidad de carga (carga/masa) de la molécula, así como de su tamaño, siendo entonces la función de este gel el actuar como un tamiz. Como resultado de lo anterior, las proteínas se separan individualmente en bandas muy estrechas. Finalmente gracias a lo compacto de dichas bandas se obtiene una resolución muy alta [Cooper, 1984, Gabler, 1978, Lehninger, 1975].

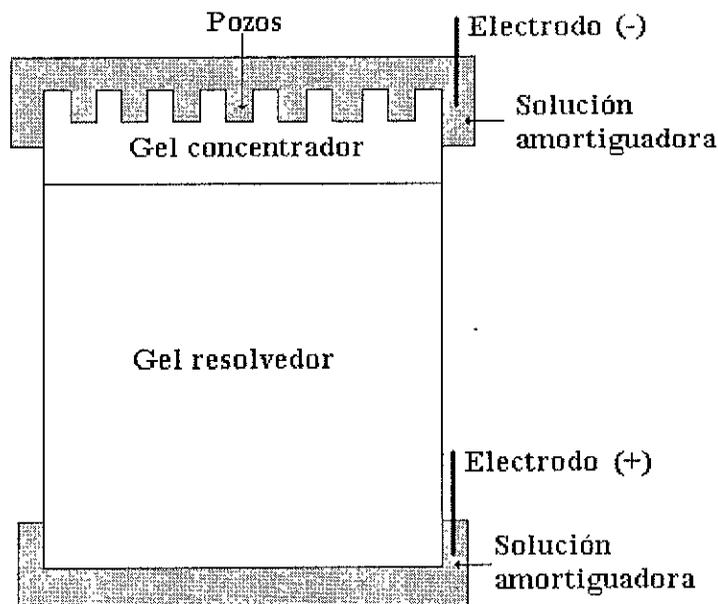


Figura II.4. Dispositivo empleado para la preparación de geles de poliacrilamida. Las muestras de proteínas se introducen directamente en los pozos del gel concentrador. Para el caso del Cit c, la electroforesis se llevó a cabo con la polaridad de los electrodos invertida con respecto a como se muestra en la figura.

II.7.2.1. Preparación de los geles de calibración.

Para determinar la cantidad de Fe o Zn detectada mediante PIXE en cada banda de los geles, fue necesario preparar geles de calibración con concentraciones conocidas de Fe y Zn. Estos se prepararon agregando a la acrilamida fresca diferentes cantidades de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (entre 0 y 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

II.7.2.2. Preparación de los geles con las muestras de proteínas.

Para introducir las enzimas de Cit c, AC y DA en los geles, éstas fueron resuspendidas en una solución amortiguadora conteniendo 0.5 M Tris HCl pH 8.0, 64% glicerol y 0.04% Azul bromofenol. Para el caso de la PPasa ésta se incubó en una solución amortiguadora 20 mM de Tris HCl pH 8.6 y 0.1 mM de ZnSO_4 , a la vez que su actividad fue monitoreada de acuerdo al procedimiento de Romero, Gómez y Celis [1991].

Para determinar en los geles la concentración de Fe del Cit c, cuyo peso molecular es relativamente bajo (12 300 Da), fue suficiente agregar volúmenes pequeños de proteína total (20-30 µg). Sin embargo para la determinación de Zn asociado a las enzimas AC, DA y PPasa, siendo éstas de mayor peso molecular, (AC:29 000 Da, DA:140 000 Da y PPasa 120 000 Da), se requirió más muestra para facilitar la detección del Zn. Esto implicó hacer preparaciones concentradas de estas enzimas. En el caso de la PPasa fue necesario liofilizar esta enzima para alcanzar las concentraciones deseadas. Las altas concentraciones empleadas para preparar los geles no afectaron la distribución esperada en las bandas de proteína y sólo produjeron bandas más gruesas. Tampoco se observó una agregación pues de lo contrario la mezcla hubiera entrado al gel resolvidor sólo en forma parcial, pero este no fue el caso.

En cada uno de los geles se corrieron simultáneamente dos muestras de cada una de las proteínas. Una de ellas se usaría posteriormente para ser teñida y de esta manera localizar las bandas de proteína, determinando a la vez su cantidad relativa mediante densitometría, mientras que la otra se emplearía en el análisis de PIXE. La tinción fue realizada incubando los geles en una solución conteniendo Azul de Coomassie 0.1%, metanol 45% y ácido acético 10%. La razón por la cual no se bombardearon los geles teñidos, es que se ha observado que la tinción elimina los metales asociados a las proteínas [Szokefalvi-Nagy *et al.*, 1987].

Los geles fueron secados en una capa de celofán y cubiertos con una capa de polietileno, la cual fue desprendida de los geles con el fin de exponerlos directamente al haz de partículas.

II.7.3. Condiciones de las medidas mediante PIXE en geles de poliacrilamida.

Los análisis con PIXE se efectuaron en geles intactos. Se usó un haz externo de protones de 3 a 4 MeV de energía generado por el acelerador de partículas (Figura II.5.) En la ventana de la salida del haz se colocó un colimador de grafito de sección rectangular de 4 x 1 mm. Cada gel fue colocado a 1.5 cm de la salida del haz. El bombardeo se realizó desplazando el gel a lo largo de la vertical en pasos de 1 a 1.5 mm. Los rayos X emitidos fueron detectados simultáneamente por 2 detectores, uno de Si(Li) y otro de Ge puro colocados a cada lado de la muestra. Los detectores formaban un ángulo menor de 70° con respecto al haz. Frente a los detectores se colocaron filtros de Mylar (10-35 µm) y Aluminio (10-40 µm) para reducir la alta tasa de conteo de elementos ligeros como el Ar. Cada vez que la geometría experimental era modificada, era necesario obtener nuevas curvas de calibración.

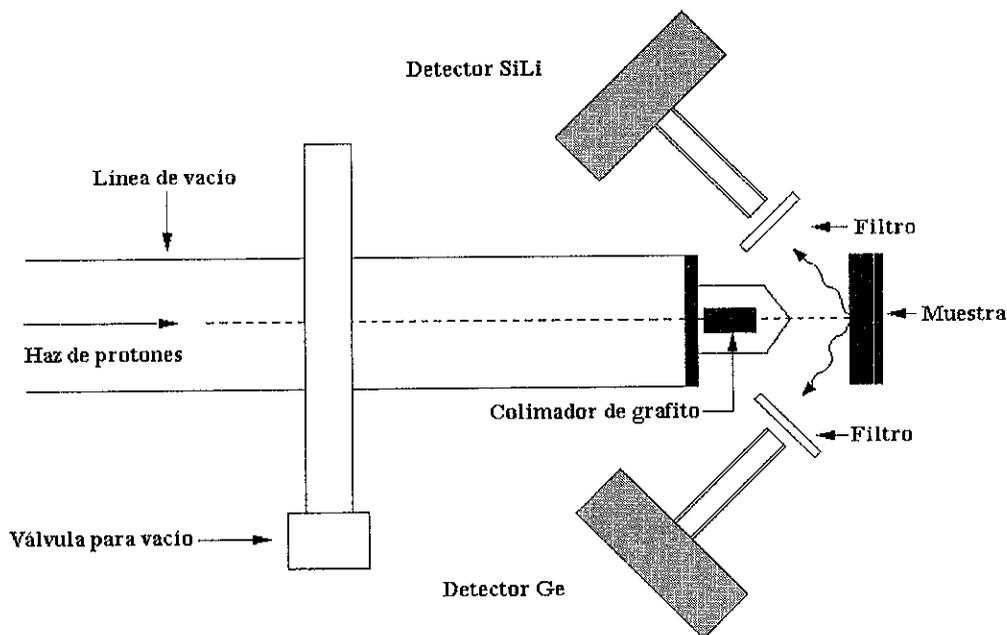


Figura II.5. Montaje experimental para el análisis de PIXE.

II.7.4. Medida de la carga acumulada en los geles.

Dado que los geles de poliacrilamida son dieléctricos, no es posible integrar la carga acumulada durante la medición. Sin embargo, como las medidas fueron realizadas al aire, la carga acumulada es proporcional al número de átomos de argón que el haz de protones encuentra en su trayectoria hacia el blanco. En consecuencia, la concentración de argón en el aire que aparece en cada espectro, se usó como una medida indirecta de la carga acumulada en los geles. Otra medida indirecta de la carga fue la señal de rayos X provenientes del oro que recubre el soporte de la ventana de salida del haz que es proporcional al número de protones que salen de la línea. Por lo tanto, las intensidades de los rayos X $K\alpha$ del Fe y del Zn fueron normalizadas a las intensidades de los rayos X K provenientes del Ar y/o del Au. Para medir la corriente que se recibía en el portamuestras se colocó un integrador de corriente. De esta manera se aseguró que los geles no fueran bombardeados con corrientes superiores a 10 nA.

CAPÍTULO III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Densitogramas

A partir de los geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie, se obtuvieron densitogramas para las enzimas estudiadas, estos se muestran en la figura III.1.

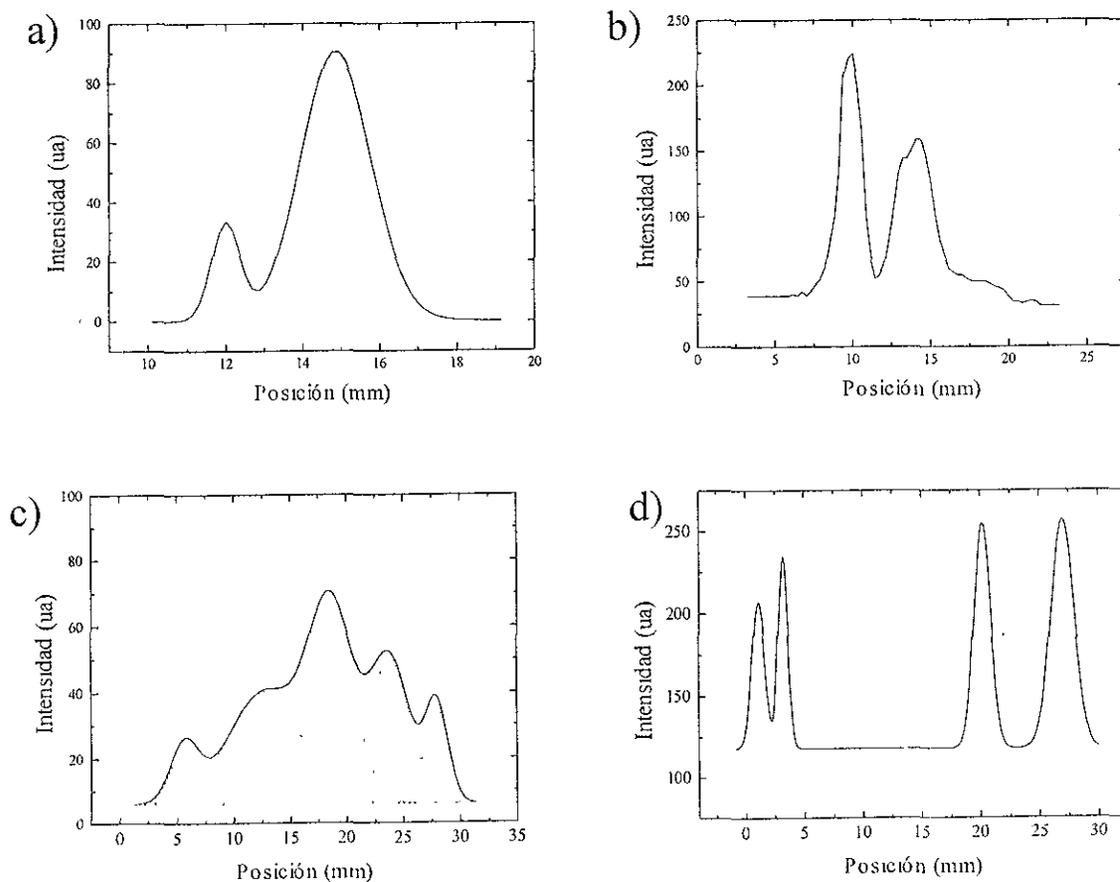


Figura III.1. Densitogramas de los geles teñidos con Azul de Coomassie mostrando la intensidad relativa en unidades arbitrarias (ua) de las bandas de proteínas a lo largo del gel. a) Citocromo c (20 μ g), b) Anhidrasa carbónica (100 μ g), c) Deshidrogenasa alcohólica (300 μ g) y d) Pirofosfatasa citoplásmica (10 μ g).

El barrido se inicia en la parte superior del gel, de manera que los picos de la izquierda de cada figura corresponden a las bandas cercanas al electrodo negativo. Para el caso del Cit c, que es una enzima con carga neta positiva, con el fin de que esta pudiera correr en el dispositivo para hacer los geles de poliacrilamida, se tuvo que invertir la polaridad de los electrodos de dicho dispositivo.

En los geles teñidos con Azul de Coomassie las enzimas estudiadas presentan varias bandas. El Cit c presenta dos bandas. La AC muestra 3 bandas que representan isómeros de carga. La diferencia en la distancia de migración de los isómeros es interpretada en términos de diferencias en la composición aminoacídica. La DA exhibe una banda ancha cuando se preparan geles con bajas concentraciones de esta enzima (10-30 μg). Sin embargo siendo esta una enzima de elevado peso molecular, fue necesario preparar geles con concentraciones de enzima más elevadas (100-300 μg). Los densitogramas de las preparaciones hechas con altas concentraciones revelaron la presencia de al menos cinco bandas. Estas pueden representar isómeros de carga o la presencia de proteínas contaminantes.

En lo que respecta a la muestra de la PPasa, la preparación posee cuatro bandas, de las que la tercera es la que corresponde a la PPasa citoplásmica. Esto fue corroborado por medio de un gel específico para actividad de pirofosfatasa.

Las altas concentraciones empleadas para preparar los geles de AC, DA y PPasa, necesarias para la detección del Zn, no afectaron la distribución esperada en las bandas de proteína y sólo produjeron bandas más gruesas.

En la tabla III.1. se muestra la proporción relativa de proteína obtenida con base en el área calculada de los densitogramas para cada banda (en %). Estas relaciones se mantienen constantes sin importar la proteína total introducida en el gel. Estas cantidades se usarán posteriormente para calcular la concentración de proteína presente en cada banda y así determinar la estequiometría metal /proteína.

Tabla III.1. Proporción (en porcentaje) de proteína en cada banda.

Proteína	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5
Cit c	13	87			
AC	51	47	2		
DA	6	31	32	22	9
PPasa	14	15	29	41	

III.2. Espectros de los geles de poliacrilamida.

En la figura III.2. se muestra un espectro típico obtenido con un gel de calibración con 40 $\mu\text{g/ml}$ de metal. Este se compone de un número de picos correspondientes a los rayos X $K\alpha$ y $K\beta$ de los elementos indicados en la figura. El hecho de que se noten uno o dos picos para cada elemento, depende de la resolución del detector. En la figura se observa una superposición entre los picos $K\beta$ del Fe y $K\alpha$ del Co. Además de los metales agregados (Fe, Co y Zn), se puede ver un pico de cloro, el cual se debe a que dicho elemento fue utilizado como parte de las soluciones amortiguadoras durante la preparación de los geles. A su vez puede observarse una zona afectada por la radiación de Bremsstrahlung entre los picos de argón y hierro, la cual, al encontrarse fuera de las regiones de interés, no interviene en las medidas. El pico debido al Au, aunque no aparece bien definido en el espectro mostrado, también está presente y su intensidad depende de la geometría empleada para las mediciones. Los espectros obtenidos con los geles de proteínas presentan además de los picos de Cl, Ar y Au el pico correspondiente al metal asociado a la proteína. En el caso del Fe y del Zn, al primero le corresponden picos más altos y definidos del espectro debido a que la eficiencia de detección de la técnica es mayor para el Fe que para el Zn.

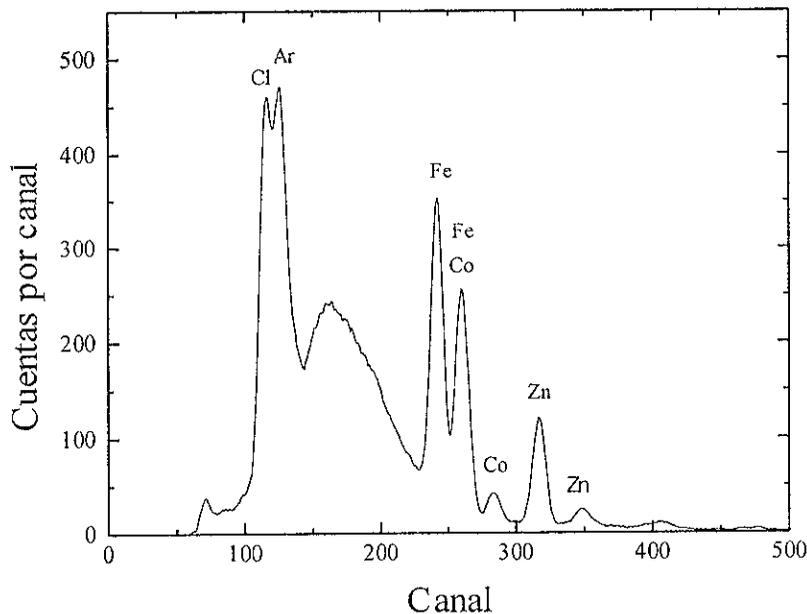


Figura III.2. Espectro típico obtenido mediante PIXE. Las concentraciones de Fe, Zn y Co son de 40 μg , mientras que el tiempo de irradiación fue de 300 segundos.

III.3. Efecto de la irradiación en la estructura de los geles

Para determinar si la irradiación daña a los geles o si ésta produce migración de los metales, éstos se bombardearon durante 30 minutos, lo cual es un intervalo de tiempo mucho mayor al que por lo general éstos se exponen al haz de protones (un máximo de 10 minutos). Se usaron geles con 8 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de metal. En la figura III.3. se muestra el comportamiento de la concentración de metal normalizado a la concentración promedio de éste para Zn y Fe, a través del tiempo de bombardeo para una energía de 4MeV y una corriente de 2 a 6 nA.

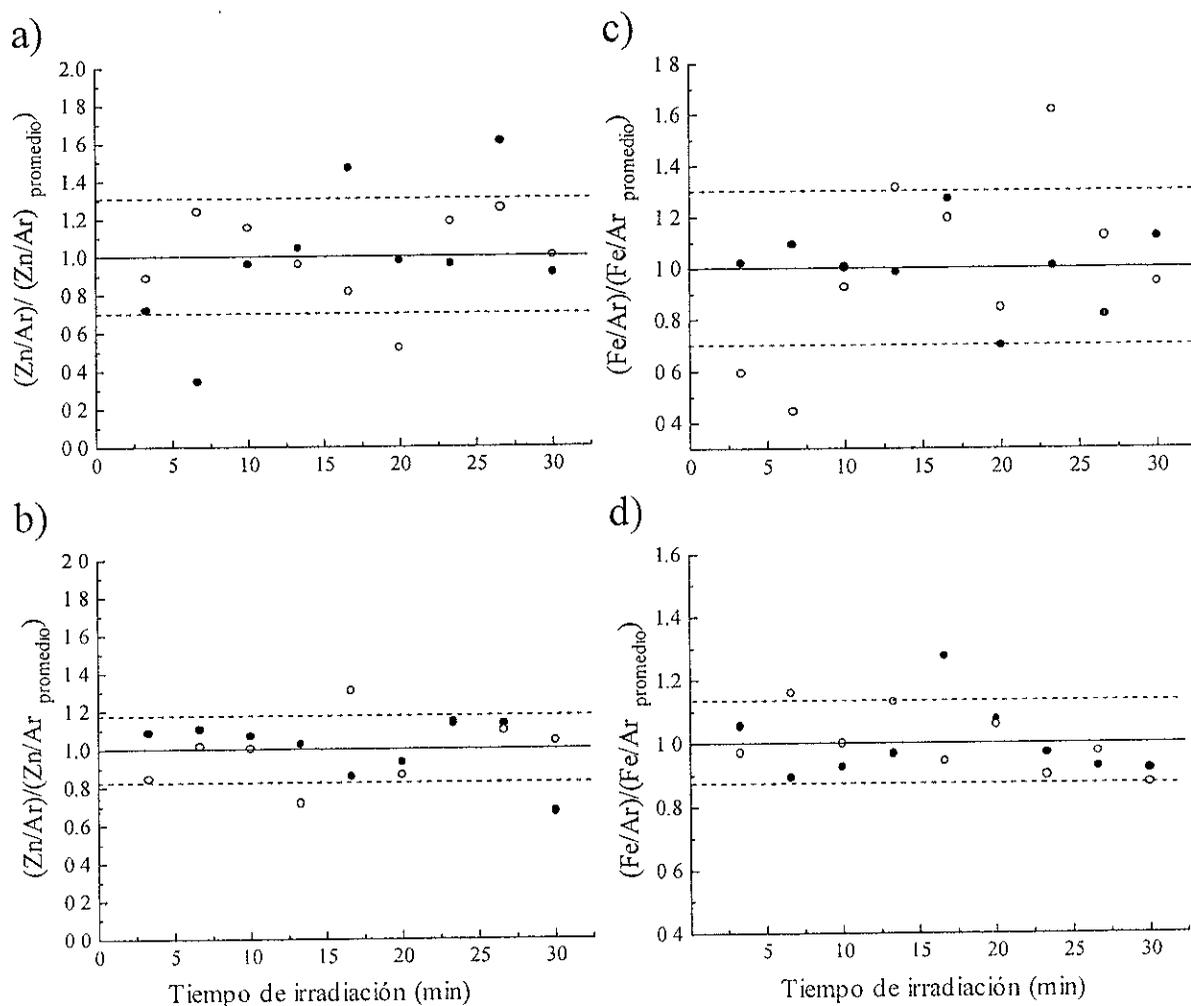


Figura III.3. Efecto de la irradiación en la concentración de Fe y Zn en los geles de poliacrilamida con las siguientes concentraciones de metal: a) 4 $\mu\text{g/ml}$ de Zn; b) 20 $\mu\text{g/ml}$ de Zn c) 4 $\mu\text{g/ml}$ de Fe; d) 20 $\mu\text{g/ml}$ de Fe. Las líneas punteadas corresponden a la magnitud de una desviación estándar de los datos.

Este resultado muestra que aunque el bombardeo deja una coloración amarilla y llega a deformar el gel cuando los tiempos de irradiación son largos (mayores a 600 segundos) no se observa una variación significativa en las concentraciones de los metales en ningún caso, ya que la mayor parte de los puntos correspondientes tanto al Zn como al Fe, conservan una dispersión que cae en el intervalo de una desviación estándar.

III.4. Geles de calibración

La figura III.4. muestra las intensidades de los rayos $K\alpha$ de Fe y Zn normalizadas a las intensidades de los rayos X K del Ar en función de la concentración (en $\mu\text{g/ml}$) de cada metal.

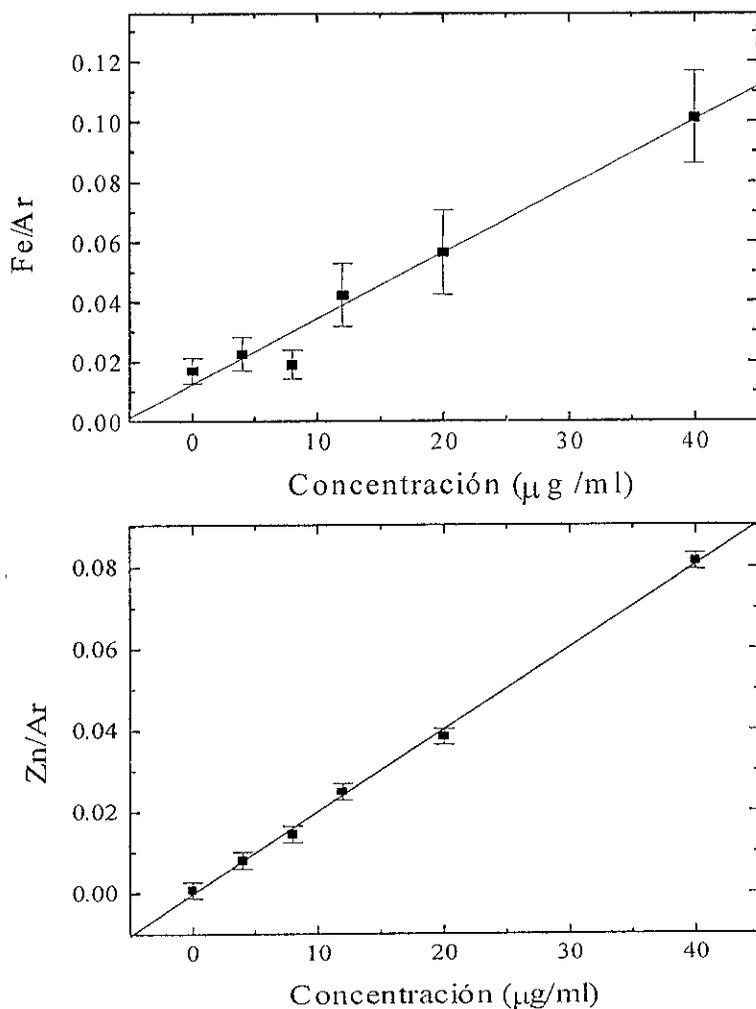


Figura III.4. Curvas de calibración de Fe y Zn. Los geles utilizados contenían $40 \mu\text{g}$ de cada metal. El tiempo de irradiación fue de 300 segundos.

La curva de calibración es lineal para concentraciones de Fe y Zn tan altas como 40 $\mu\text{g/ml}$. Esto indica una distribución homogénea de los iones metálicos y permite determinar metales en proteínas cuya concentración varía en un amplio rango. Aunque la eficiencia de detección para el Fe es mayor que para el Zn se observó una mayor dispersión de los valores de Fe que de los de Zn. Esta mayor dispersión observada para el Fe puede provenir del hecho de que el haz utilizado al aire no está perfectamente colimado y algunos protones son deflectados hacia el portamuestras que en este caso contenía tanto Al como Fe.

Los límites de detección fueron calculados usando los geles de calibración, para los cuales se conocen las concentraciones de los metales agregados, usando las ecuaciones 1 y 2 del capítulo I. La concentración mínima detectada C_{min} para el caso del Fe es de alrededor de 5 $\mu\text{g/g}$ y para el caso del Zn es de 10 $\mu\text{g/g}$. Una C_{min} de 5 $\mu\text{g/g}$ para un haz de 3.5 mm^2 de sección incidiendo sobre un gel de poliacrilamida cuyo peso seco es de 18 $\mu\text{g/cm}^2$, se convierte en una masa absoluta de Fe de aproximadamente 0.003 μg . De forma similar para el Zn una C_{min} de 10 $\mu\text{g/g}$ corresponde a una concentración absoluta de 0.006 μg . Ahora bien, si consideramos por ejemplo una banda de Cit c con 20 μg de ésta enzima, cuyo peso molecular es de 12 300 Da y que contiene un Fe por molécula, en dicha banda habría 0.1 μg de metal en una concentración absoluta, por lo cual los límites de detección para el Fe resultan ser adecuados para la detección de este metal en la banda de proteína.

Es importante aclarar que el valor del límite de detección varía en función de la muestra en particular, así como de las condiciones experimentales, tales como la geometría y la energía de los protones. Los límites de detección en algunos casos resultaron ser mejores que los mencionados anteriormente. En especial se observó que los geles con proteínas eran más "limpios" que los geles de calibración en el sentido que presentaban menor radiación de fondo, aunque actualmente se desconoce la explicación de este hecho.

III.5. Determinación de la estequiometría de metales en las enzimas.

La relación obtenida para cada curva de calibración es de la forma:

$$Me / Ar = m C (\mu\text{g} / \text{ml}) + b$$

donde "m" es la pendiente de la recta y "b" la ordenada al origen. De esta relación se puede obtener la concentración "C" del Metal (en μg) en cada punto bombardeado:

$$C = \frac{1}{m} \left(\frac{Me}{Ar} - b \right) V_{bomb} \cdot 10^{-3}$$

donde V_{bomb} es el volumen bombardeado en mm^3 .

De esta manera, cuando los geles con las distintas proteínas son bombardeados, puede asignársele a cada punto una determinada concentración en función del número de cuentas obtenidas. Entonces se grafica la concentración de metal "C" en función de la posición irradiada en el gel. La cantidad total de metal en la zona bombardeada puede ser calculada a partir del área "S" (en μg), bajo la gaussiana ajustada a los datos experimentales.

El número de átomos del metal N_{Me} en la zona bombardeada se calcula a partir de la relación:

$$N_{Me} = \frac{S \times N_{Av}}{PA_{Me}}$$

donde N_{Av} y PA_{Me} representan el número de Avogadro y el peso atómico del metal respectivamente. Por otro lado, la cantidad de proteína en la zona bombardeada C_p (en μg) se puede calcular a partir de la concentración total de proteína contenida en una banda particular (determinada a partir de los densitogramas). De esta manera el número de moléculas de proteína en la zona bombardeada N_p está dada por la relación:

$$N_p = \frac{C_p \times N_{Av}}{PM_p}$$

donde PM_p es el peso molecular de la proteína. La razón "R" de átomos de Fe o Zn por molécula de proteína puede ser entonces determinada usando la siguiente relación:

$$R = \frac{N_{Me}}{N_p}$$

Estas fórmulas fueron entonces aplicadas a los datos obtenidos para las distintas enzimas con el fin de conocer su estequiometría.

III.6. Citocromo c

En la figura III.5. se muestra la distribución de Fe obtenida mediante PIXE a lo largo del gel para dos preparaciones de Cit c de 20 y 30 μg respectivamente.

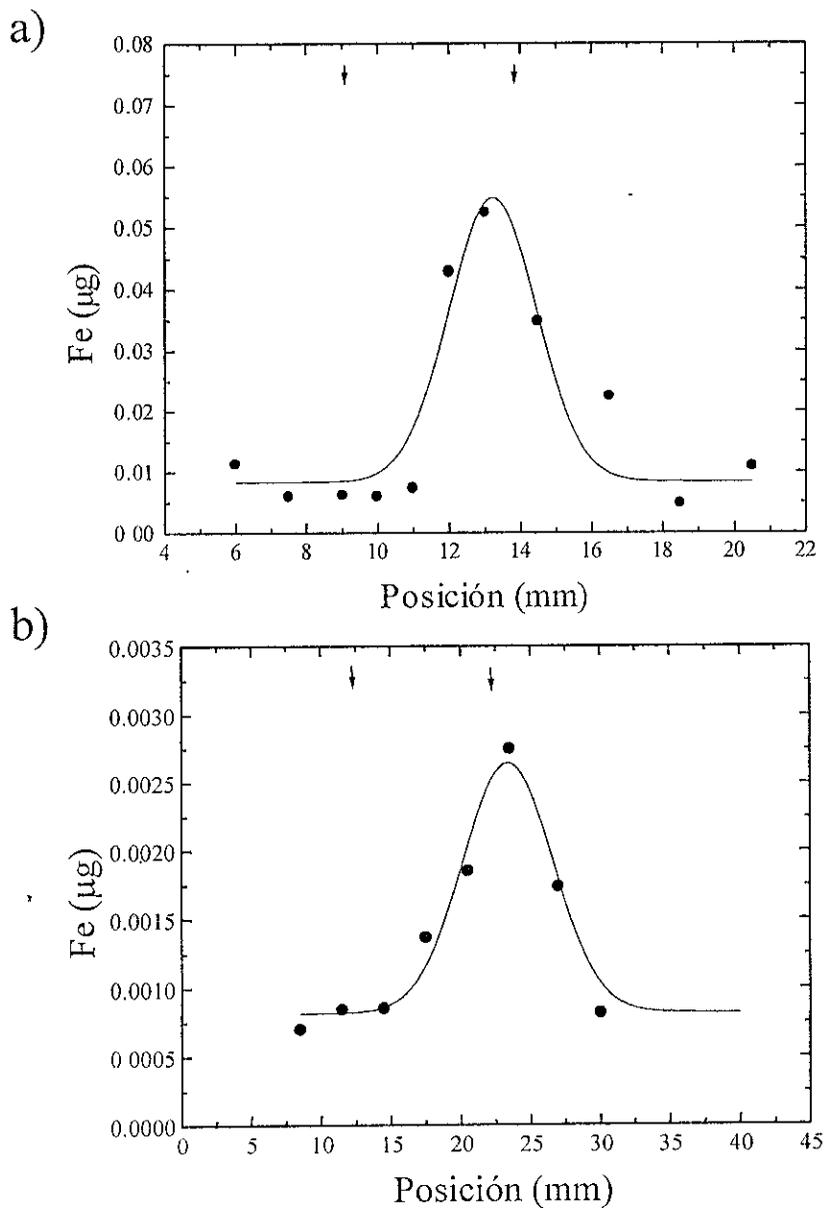


Figura III.5. Distribución de Fe a lo largo del gel conteniendo: a) 20 y b) 30 μg de Citocromo c. Las flechas indican la posición de las bandas obtenidas mediante la tinción con Azul de Coomassie. El tiempo de bombardeo fue de 300 segundos.

Aunque los geles de Citocromo c presentan dos bandas de proteína, el Fe fue detectado sólo en la segunda banda que representa el 87% del total de la proteína. Es posible que el contenido de proteína de la primera banda (13%) no sea suficiente para dar lugar a la formación de un pico de Fe.

Del área bajo el pico de Fe es posible determinar la cantidad de Fe total asociado a la porción bombardeada de la banda: Para el primer caso (Cit 20 µg), usando la ecuación 2, el número de átomos de Fe (N_{Fe}) calculado para la porción bombardeada de esta banda es de 5.5×10^{14} átomos. Por otro lado como la concentración relativa de proteína en esta banda es de 87% del total, el número de proteínas (N_p) calculada en esta banda usando la ecuación 3, es de 4.5×10^{14} , lo cual da una estequiometría R de 1.2 (tabla III.2.). Un cálculo similar para el caso del Cit c de 30 µg da una estequiometría de 0.9, siendo ambos valores de R muy similares al valor esperado (Tabla III.2.).

Es de hacer notar que en la figura III.5. b), fue posible detectar el pico de Fe por debajo de los límites de detección reportados en la sección III.3. Como ya se mencionó, a lo largo del estudio se observó que la radiación de fondo asociada a los geles con proteínas era menor que el asociado a los geles de calibración, lo que permitió detectar concentraciones de metales aún más bajas, el cual fue el caso de la figura III.5. b). En esta figura el pico de Fe corresponde a la banda de Citocromo c y la estequiometría metal/proteína es muy cercana al valor esperado, resultados que indican que los valores obtenidos reflejan valores reales y no artefactos de las mediciones.

Tabla III.2. Valores de R (Fe/Proteína) para el Cit c.

Enzima	Detector	$R_{\text{banda 1}}$	$R_{\text{banda 2}}$	R_{esperada}
Cit c 30 µg	Si/Li	-	0.9	1.0
Cit c 20 µg	Si Li	-	1.2	1.0
Promedio			1.0	1.0

También se tiene que la concentración detectada de Fe en el gel de 30 µg es un orden de magnitud superior a la que se encuentra en el gel con 20 µg de enzima. Esto se debe a que el área irradiada era más grande el día de bombardeo del Cit de 30 µg, por lo cual fue posible recibir un mayor número de cuentas de Fe en este caso.

III.7. Anhidrasa Carbónica

La distribución de Zn a lo largo del gel medida por PIXE para la AC se muestra en la figura III.6. para dos preparaciones de 128 y 100 μg de proteína.

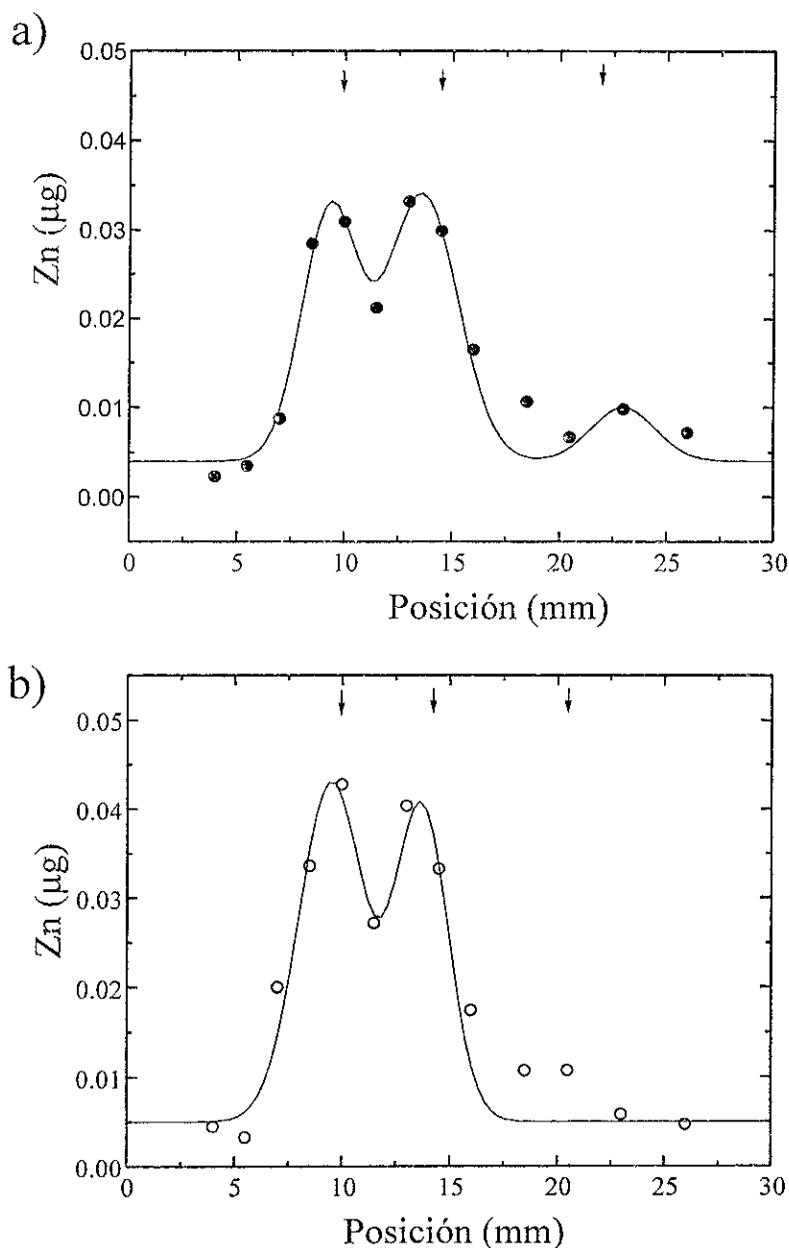


Figura III.6. Distribución del Zn a lo largo del gel conteniendo a) 128 μg y b) 100 μg de A.C. Las flechas indican la posición de las bandas teñidas con Azul de Coomassie. El tiempo de bombardeo de cada gel fue de 300 segundos.

Se puede observar que el Zn se detecta en las tres bandas, aunque en la tercera dicho metal es apenas perceptible (la posición de las tres bandas de proteína se indica por medio de flechas en la figura). Se ha reportado que en la AC existe un Zn por enzima. Sin embargo la distribución del metal indica que el Zn está presente con una estequiometría de aproximadamente 2:1 (Tabla III.3.) Estos altos valores de Zn fueron obtenidos consistentemente para diferentes preparaciones e independientemente de las condiciones experimentales (detector usado, geometría, concentración de proteína en el gel), lo cual indica que la estequiometría es uniforme en la preparación original. Estos resultados confirman nuestras expectativas originales en el sentido de que las preparaciones de proteínas concebidas para ser usadas como estándares en medidas de pesos moleculares no forzosamente conservan la estequiometría de la molécula original, esto debido probablemente a una contaminación por absorción o desorción del Zn durante su fabricación [Veillon y Vallee, 1978]. Lo anterior indica que, en la medida de lo posible, se deben emplear materiales de referencia o estándares de proteínas en los cuales se garantice que la molécula conserve la estequiometría original, o en su defecto verificar ésta última por métodos independientes.

Tabla III.3. Valores de R (Zn/Proteína) para la A.C.

Enzima	Detector	R_{banda 1}	R_{banda 2}	R_{esperada}
AC 128 µg	Ge	2.22	2.00	1
AC128 µg	Si/Li	2.05	2.04	1
AC 100 µg	Si/Li	2.17	1.72	1
Promedio		2.1	1.9	1

III.8. Deshidrogenasa Alcohólica.

Como se mencionó anteriormente, la muestra de DA utilizada al teñirse con azul de Coomassie presenta una zona muy amplia que sobresale del fondo y dentro de la cual se pueden distinguir 5 bandas de proteínas. Como ya se dijo anteriormente, las bandas adicionales representan probablemente proteínas contaminantes. Debido a que la DA es una enzima de alto peso molecular, para que la detección del Zn mediante PIXE fuera posible debió utilizarse una gran cantidad de proteína, preparándose geles con concentraciones que van desde 100 a 300 µg. Cuando se usa la DA a bajas concentraciones, los geles presentan una sola banda relativamente ancha. Al aumentar considerablemente la concentración de la proteína en los geles, dicha banda se resuelve en cinco bandas más finas, revelando una gran heterogenidad de la muestra (Figura III.1. c).

La distribución de Zn a lo largo de estos geles refleja la presencia de este metal en las cinco bandas. Sin embargo la cantidad asociada a los dos primeros picos es muy baja, y su variación está dentro de la incertidumbre de la medida, haciendo imposible el ajuste de una gaussiana a estos datos. Por lo anterior sólo se cuantificó el Zn para las tres últimas bandas (Figura III.7.)

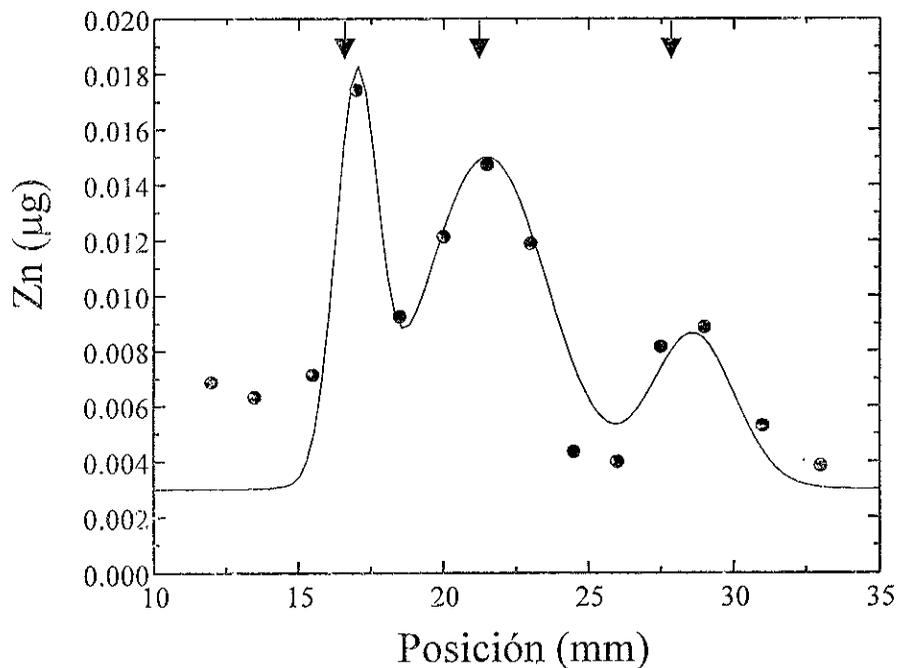


Figura III.7. Distribución del Zn a lo largo del gel conteniendo 133 µg de D.A. El tiempo de bombardeo fue de 300 segundos.

Dada la complejidad en la distribución del Zn por la cercanía de las bandas, se hizo una cuantificación aproximada de la estequiometría, estimando el Zn y la proteína contenidos en las tres últimas bandas. La estequiometría promedio es de 4 que es igual al valor esperado (tabla III.4.)

Tabla III.4. Valores de R (Zn/Proteína) para la DA.

Enzima	Detector	R _{prom}	R _{esperada}
DA 133 µg	SiLi	4.6 Zn/Ar	4
DA 133 µg	Ge	4.9	4
DA 133 µg	SiLi	2.4 Zn/Au	4
Promedio		4	4

III.9. Pirofosfatasa citoplásmica.

La distribución del Zn en el gel de pirofosfatasa citoplásmica de *R. rubrum* se muestra en la figura III.8.

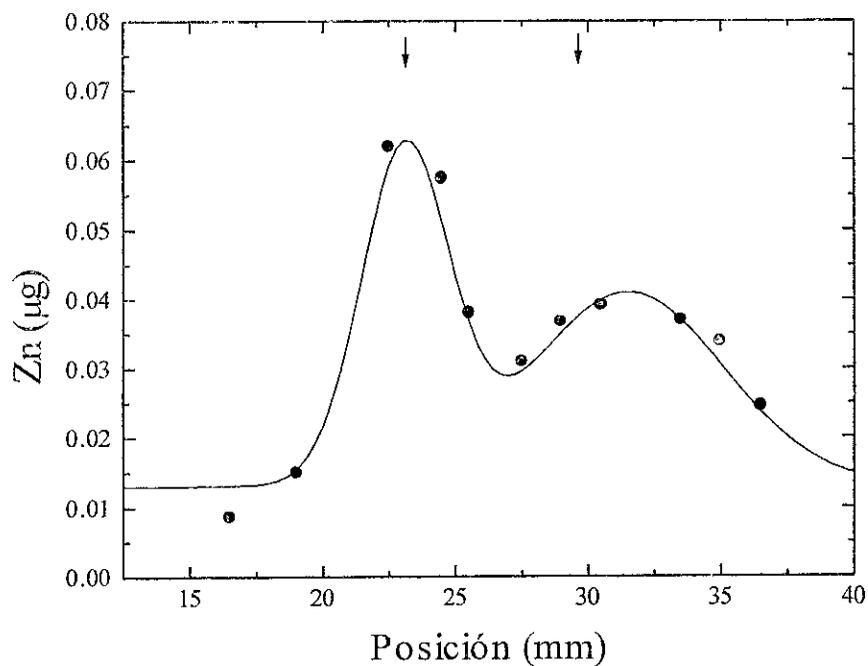


Figura III.8. Distribución del Zn a lo largo del gel conteniendo una concentración de 350 µg en la banda correspondiente a la Pirofosfatasa citoplásmica.

La preparación de esta enzima parcialmente purificada, mostró cuatro bandas para el caso de PAGE en condiciones nativas y con una tinción empleando azul de Coomassie. Sin embargo, cuando los geles fueron especialmente teñidos para la actividad de la PPasa, solamente la banda 3 presentó actividad para esta enzima, lo cual indica que esta banda es la que corresponde a la PPasa (su posición se indica con la flecha de la izquierda en la figura III.8.). Como se muestra en la figura, esta banda de pirofosfatasa tiene un pico de Zn bien definido y cuya estequiometría se calcula en 2.3 átomos de metal por proteína (Tabla III.5.)

Sin embargo, otra de las bandas, la cual es considerada como un contaminante (señalada por la flecha de la derecha en la figura III.8.), tiene también una cierta cantidad de Zn asociado, tal y como puede verse en la distribución de Zn. Esto sugiere que la banda contaminante corresponde a una proteína con Zn.

Se sabe que esta enzima requiere de Zn para conservar su estabilidad estructural. De hecho a lo largo de su purificación, el que la PPasa permanezca activa depende en gran medida de la presencia de este catión. Sin embargo la estequiometría o cantidad de Zn por proteína no ha sido reportada para esta enzima, siendo ésta la primera vez que se propone tal dato.

Tabla III.5. Valores de R (Zn/Proteína) para la PPasa.

Enzima	Detector	R banda 3	R esperada
PPasa 350 µg	SiLi	2.7	?
PPasa 350 µg	Ge	1.9	?
Promedio		2.3	?

III.10. Efecto de la tinción en la concentración de Zn.

Como se mencionó anteriormente el uso del Azul de Coomassie para teñir proteínas libera y elimina la mayoría de los iones ligados a estas moléculas [Szokefalvi-Nagy *et al.*, 1987]. Este efecto se debe probablemente al uso de metanol en el proceso. Es por esta razón que el análisis con PIXE debe hacerse en geles sin teñir. Como método alternativo de tinción se recurrió al uso del colorante Rojo de Ponceau que no requiere del uso de metanol para revelar las bandas de proteína. Para estos experimentos, se prepararon geles con 100 µg de AC. Después de la electroforesis, los geles a ser teñidos se incubaron en una solución

tanto teñidos como sin teñir se analizaron por PIXE. Desafortunadamente el colorante también tuvo el efecto de alterar la estequiometría de la enzima. En la tabla III.6. se muestra la estequiometría obtenida para el caso de la AC teñida con el colorante mencionado.

Tabla III.6. Efecto de la tinción en el contenido de metal de la A.C.

Enzima	Detector	R banda 1	R banda 2	R esperada
AC teñida	Si/Li	0.14	0.15	1
AC sin teñir	Si/Li	2.17	1.72	1

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

PIXE al aire ha demostrado ser una técnica adecuada para la cuantificación de metales en proteínas en geles de poliacrilamida. Entre las principales ventajas presentadas se encuentra la resolución espacial, buenos límites de detección, el carácter multielemental y la rapidez con la cual se llevaron a cabo los análisis. Adicionalmente, esta técnica es capaz de detectar y cuantificar de manera absoluta a la gran mayoría de metales que tienen importancia desde el punto de vista biológico, tales como el Fe, Zn, Cu, Co, etc.

A pesar de que se indujeron daños en algunos los geles irradiados, a juzgar por la coloración que queda después del bombardeo, se demostró que esto no implica una pérdida o una migración de los metales asociados a las enzimas analizadas; además es posible minimizar en gran medida los daños a dichos geles exponiéndolos un menor tiempo al haz de partículas y reduciendo la intensidad de la corriente utilizada durante las mediciones.

No obstante que PIXE al aire necesita de muestras que contengan una mayor concentración de enzimas con respecto a PIXE al vacío, las cantidades manejadas de proteína siguen siendo significativamente inferiores a las requeridas por otras técnicas de cuantificación de metales traza.

Aplicando esta técnica fue posible proponer una estequiometría de dos átomos de Zn por proteína para el caso de la enzima Pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodospirillum rubrum*, siendo ésta la primera vez que se propone dicho dato. También se obtuvieron resultados sobre la estequiometría del Cit c y de la DA que están en concordancia con los datos citados en la literatura; sin embargo en lo que respecta a la AC, este no fue el caso, pues se encontró una estequiometría de dos átomos de Zn por enzima en lugar de uno que era lo esperado. Esto pudo deberse a que la AC obtenida comercialmente tuviera su estequiometría alterada desde un principio.

Dadas las ventajas ya mencionadas, se establece la posibilidad de aplicar PIXE al estudio de otros aspectos en el contexto bioquímico, lo cual incluye aspectos de cinética enzimática.

Aunque los resultados obtenidos pueden considerarse exitosos en el sentido de que fue posible la detección y cuantificación de metales asociados a proteínas en geles de poliacrilamida, el desarrollo de este estudio permitió determinar los aspectos técnicos en que la metodología puede optimizarse para continuar con este tipo de estudios en el futuro. A saber: contar con un dispositivo que permita mover las muestras de manera automática y precisa, con lo cual es posible mejorar en gran medida la resolución espacial de la técnica. También resulta ser muy recomendable mantener lo más constante posible la geometría experimental para todas las muestras. Uno de los principales aspectos a tomar en cuenta es el contar con enzimas donde se garantice la conservación de la estequiometría original de la

molécula, ya que es posible que para el caso de proteínas estándar que se emplean como patrones de masa, la estequiometría se encuentre alterada desde un principio, esto probablemente debido a los métodos de purificación empleados. También es de suma importancia contar con un método de cuantificación precisa de las proteínas agregadas a los geles. En el caso de la PPasa, se requirió un método de cuantificación de proteína previo a su preparación en el gel de poliacrilamida. Para esto se aplicaron los métodos de Lowry y de Bradford, que se emplean rutinariamente en estas medidas, encontrándose algunas inconsistencias entre los resultados. Por esta razón se adoptó el micrométodo de Bradford para la determinación de las concentraciones de Pirofosfatasa, por considerarlo más preciso. Es por lo tanto muy recomendable asegurarse de obtener datos correctos de concentración de proteína o aplicar métodos bioquímicos de cuantificación alternativos.

Asimismo la técnica podría ser notablemente más efectiva si se pudiera bombardear un gel teñido. Sin embargo, lo anterior no se ha podido llevar a cabo debido a que los colorantes que comúnmente se emplean en las tinciones tienen el efecto de hacer que el metal se pierda de la enzima. En este sentido se requieren más estudios con otros métodos de tinción.

APÉNDICE 1.

Purificación parcial de pirofosfatasa citoplásmica de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*.

Reactivos:

Solución A = Tris HCl 50mM, MgCl₂ 10mM y ZnSO₄ 0.4mM pH 8.6

Solución B = Tris HCl 20 mM pH8.6, mercaptoetanol 2mM y ZnSO₄ 0.1mM.

Solución C = Tris HCl 20 mM pH 8.6

Procedimiento.

1. Se comienza con un determinado peso húmedo de bacterias.
2. Se resuspenden en A (aprox. 560 ml de amortiguador por cada 100 gramos de bacterias).
3. Se agrega una pizca de DNAsa
4. El resuspendido se homogeniza y se sonica durante dos minutos en alícuotas de 15 ml, manteniéndolas en baño de hielo.
5. Todo el producto sonicado se centrifuga a 100 000 x g durante 90 minutos a una temperatura de 40°C.
6. Se recupera el sobrenadante y su pH se ajusta 8.6 con A. Este se calienta en baño maría por 5 minutos a 60°C.
7. Después del baño maría, todo el producto se centrifuga a 20 000 x g durante 20 minutos a una temperatura de 4°C.
8. Se recupera el sobrenadante y se le agrega (NH₄)₂SO₄ de tal modo que el sobrenadante se lleve a un estado de saturación de 40%.
9. El sobrenadante resultante se centrifuga a 20 000 x g durante 20 minutos a 4°C.
10. Se agrega (NH₄)₂SO₄ para llevar de la saturación de 40% a una al 50%.
11. El sobrenadante se centrifuga a 20 000 x g durante 20 minutos a 4°C.
12. Se recupera el sobrenadante y se agrega la cantidad necesaria de sulfato de amonio para saturar de 50% a 65%.
13. El sobrenadante se centrifuga a 15 000 rpm durante 20 minutos a 4°C.
14. El precipitado obtenido se resuspende en 15 ml de B.
15. La muestra se dializa en 5 litros de B durante 12 horas a una temperatura de 4°C.
16. Se prepara una columna de cromatografía de afinidad con ω-aminohexilagarosa, la cual se empaca a 4°C, todo proceso que implique a esta columna deberá llevarse a cabo a la temperatura mencionada.
17. Se lava la columna con los siguientes amortiguadores según el orden señalado:
 - I) 50 ml de C.
 - II) 200 ml de MgCl₂ 0.4 M + C
 - III) 100 ml de NaCl 1M + C

- IV) 200 ml de *C*
- V) 50 ml de *B*

18. Una vez que la columna ha sido lavada, la muestra dializada se vierte a la columna, de manera que vaya saliendo lentamente por goteo.
19. Después de agregar el dializado se adiciona a la columna 200 ml de Tris HCl 20mM pH 8.6, mercaptoetanol 2mM, ZnSO₄ 0.1mM.
20. Se adiciona a la columna 200 ml de *B* + Pirofosfato de sodio (PPi-Na) 100 mM.
21. Se agregan 150 ml de *B*.
22. Se hace un gradiente de concentración de sales de 0 a 1.2 M con NaCl, colectándose fracciones de 200 gotas por tubo.
23. Se mide la actividad de las fracciones.
24. Se mide la proteína a 280 nm en espectrofotómetro. También se mide la actividad de pirofosfatasa de las fracciones, según el método seguido por Romero, Gómez y Celis (1991).
25. La enzima se guarda a -20°C para conservarla en buenas condiciones.

APÉNDICE 2.

Preparación de los geles de poliacrilamida en condiciones nativas

Reactivos.

Solución	Gel concentrador	Gel resolvidor
	4.5% final	7.5% final
Acrilamida-Bisacrilamida (30:0.8)	1.25 ml	2.5 ml
Amortiguador de gel concentrador Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml	-----
Amortiguador de gel resolvidor Tris-HCl pH 6.8	-----	1.25 ml
Persulfato de amonio 1.5%	250 μ l	500 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l
Agua	2.375 ml	5.75 ml
Volumen total	5 ml	10 ml

Solución amortiguadora de la cámara superior e inferior: Tris 0.025M, Glicina 0.192M pH 8.3.

Aparato empleado para preparar los geles.

El aparato empleado para preparar los geles fue un Dual Gel Caster Hoefer Scientific Instruments, Mightly Small SE-245. El gel se prepara entre dos placas de vidrio de aproximadamente 10 x 8 cm colocadas verticalmente y de manera paralela, separadas 1.5 mm por medio de dos tiras separadoras dispuestas a los lados. Los separadores se mantienen en posición mediante pinzas de plástico. El fondo se sella usando una tira de silicón. Se introduce el gel resolvidor, dejando un tiempo suficiente para que polimerize, colocándose sobre este el gel concentrador. En la parte superior del gel concentrador se ajusta un peine con el fin de formar espacios libres de gel (pozos), en los cuales se introducirá la mezcla de proteínas. Una vez que los geles han polimerizado y que se ha cargado la mezcla de proteínas en los pozos, el dispositivo se transfiere a un aparato que consiste en dos cámaras, una superior y una inferior que estarán en contacto con la parte superior e inferior del gel respectivamente y en las cuales se introduce una solución amortiguadora. La diferencia de potencial se aplica mediante una fuente de voltaje a través de electrodos de platino colocados en ambos extremos (superior e inferior) del aparato y se mantiene hasta que el frente de proteínas, que se distingue gracias al azul de bromofenol que se le adiciona a la muestra, alcance el extremo inferior. Para el caso particular de este estudio se aplicó una corriente de aproximadamente 40 mA. Al tratarse de una electroforesis en condiciones no desnaturizantes, el procedimiento se lleva a cabo en frío (4°C).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. "Molecular Biology of the Cell". Garland Publishing. USA. (1983). 1146 pp.
- [2] Boyer, P. D. "The enzymes". Oxydation-reduction. Parte A. Deshydrogenases (I). Ac. Press. (1975). 11: 283-430.
- [3] Bradford, M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. (1976). 72: 248-254.
- [4] Chan, S. I. y Gamble, R. C. "X-Ray absorption Spectroscopy of Metalloproteins". Methods in enzymology. Ac. Press. (1978). 54: 323-345.
- [5] Cooper, T. G. "Instrumentos y técnicas de bioquímica". Reverté, España. (1984). 442 pp.
- [6] Dryer, R. L., y Lata, G. F. "Experimental Biochemistry". Oxford, USA. (1989). 514 pp.
- [7] Escobedo, M. S. "Inhibición de la Pirofosfatasa Membranal de *Rhodospirillum rubrum* por trifenilestaño". Tesis de Maestría. Fac. Ciencias, UNAM. (1998). 82 pp.
- [8] Gabler, R. "Electrical interactions in molecular biophysics". Ac. Press, USA. (1978). pp:352.
- [9] Hilario, E., Romero, I. y Celis, H. "Determination of the physicochemical constants and spectrophotometric characteristics of the metallochromic Zincon and its potential uses in biological systems". J. Biochem. Biophys. Methods. (1990). 21: 197-207.
- [10] Halliday, D., Resnick, R. y Krane, K. S. "Física". CECSA. (1997). 691 pp.
- [11] Hames, B. D. "Introduction to PAGE". En Gel Electrophoresis of Proteins. A practical Approach. (Hames D. B y Rickwood, D. Eds). IRL Press, Oxford (1983) 1-91.
- [12] Instruction manual for operation and service of 9SDH-2 Peletron acelerator. 55 pp.
- [13] Johansson, S. A. E. y Campbell, J. L. "PIXE: A novel technique for elemental analysis". Jonh Wiley & Sons, USA. (1988). 347 pp
- [14] Johansson, S. A. E. y Johansson, T. B. "Analytical Application of Particle Induced X-Ray Emission". Nucl. Instr. and Meth. (1976). 137: 473-516.
- [15] Keszthelyi, L., Varga, L., Demeter, I. Hollós, K. y Szokefalvi-Nagy, Z. "Elemental analysis of biological origin relative to their protein content by means of charged particle bombardment". Analytical Biochemistry. (1984). 139: 418-426.
- [16] Klemme, J. H. y Gest, H. "Regulation of the cytoplasmic inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*" Eur. J. Biochem. (1971). 22: 529-537.
- [17] Koltay, E. "Particle Induced X Ray Emission: Basic Principles, instrumentation and interdisciplinary applications". En Proton Induced X ray Emission, Spectroscopy in Atomic and Solid State Physics. NATO ASI, Series B. Plenum Press. (1988). 187: 301-334.
- [18] Lathi, R. "Microbial inorganic phyrophosphatase". Microbiol. Rev. 4 (1983) 169.

- [19] Lehninger, A.L. "Biochemistry". Worth Publishers. (1975). 1104 pp.
- [20] Lehninger, A.L. "Principles of Biochemistry". Worth Publishers, USA. (1982). 1011 pp.
- [21] Lindskog, S. "The Structural Basis of Kinetic Differences between Carbonic Anhydrase Isoenzymes", en Zinc Enzymes (Bertini, Luchinat, Maret, Zeppezauer, Eds.) Birkauser, Boston. (1986). 307-316.
- [22] Miranda Martín del Campo, J. "Técnicas analíticas de origen nuclear: Un curso introductorio". UNAM, México. (1996). 82 pp.
- [23] Romero, I., Gomez, P. A. y Celis, H. "A membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membrane of *Rhodospirillum rubrum*" J. Gen. Microbiol. (1991). 137: 2611-2616.
- [24] Scharf, W. "Particle Accelerators and their uses". Harwood Ac. Publishers, Canadá. (1990). 169 pp.
- [25] SIGMA technical bulletin No. MKR-137.
- [26] Solís, C., Oliver, A. y Andrade, E. "PIXE analysis of proteins from a photochemical center". Nucl. Instr. and Meth. (1998). B 136/138: 928-931.
- [27] Strivay, D., Schoefs, B. y Weber, G. "Quantification by PIXE of metallic sites in proteins separated by electrophoresis". Nucl. Instr. and Meth. (1998). B 136/138. 932-935.
- [28] Swan, C.P. y S.J. Fleming. "Selective Filtering in PIXE Spectrometry". Nucl. Instr. and Meth. (1990). B 49: 65-69.
- [29] Szokefalvi-Nagy, Z. "Ion beam analysis of metalloproteins". Nucl. Instr. and Meth. (1996). B 109/110: 234-238.
- [30] Szokefalvi-Nagy, Z., I. Demeter, Cs. Bagynka y K.L. Kovacs. "PIXE analysis of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis". Nucl. Instr. and Meth. (1987). B 22: 156-158.
- [31] Szokefalvi-Nagy, Z. "Aplicaciones of PIXE in the life sciences". En: Biological Trace Element Research. (Schrauzer Ed.) The Human Press Inc. (1994). 73-78.
- [32] Thellier, M., C. Ripoll, C. Quintana, F. Sommer, P. Chevallier y J. Dainty. "Physical methods to locate metal atoms in biological systems". Methods in Enzymology. (J. F. Riordan y B.L. Valle, Eds.). Ac. Press. (1993) 227: 535-589.
- [33] Veillon, C. y Vallee, B. L. "Atomic Spectroscopy in metal analysis of enzymes and other biological material". Methods in Enzymology. Ac. Press. (1978). 54: 447-487.
- [34] Weber, G., Menendez, C., Schoefs, B. y Bertrand, M. "Quantitative measurement of metal ion concentration of proteins separated by electrophoresis". Int. J. of PIXE. (1996) 6: 215-225.
- [35] Willis, J.P. "XRFS and PIXE: Are they complementary or competitive techniques? A critical comparison." Nucl. Instr. and Meth. (1988). B 35: 378-387.

ESTE TEXTO NO DEBE
 SALIR DE LA INSTITUCIÓN