

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ENZIMOLOGIA EN SOLVENTES ORGANICOS.  
CORRELACION ENTRE EL TAMAÑO MICELAR Y/O  
SU CONTENIDO DE AGUA CON LA ACTIVIDAD  
ENZIMATICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A:

BIOL. HECTOR VAZQUEZ MEZA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN

MEXICO, D. F.

2000



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.

## AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Edgardo Escamilla Marván, por su amistad y paciencia. Además, por su apoyo incondicional para la terminación de este trabajo.

A mi comité de sinodales por darse tiempo para revisar y corregir esta tesis.

A mi compañera y amiga que nunca dejó de alentarme para terminar este trabajo, muchas gracias Esther, te amo mucho.

A mi familia y amigos por contar siempre con su apoyo y cariño, sin olvidar a mi familia política que nunca dejaron de motivarme para llegar a esta meta.

A todos mis compañeros del laboratorio 101 Ote. del Instituto de Fisiología Celular, pero en especial a dos personas que me apoyaron y asesoraron durante toda mi estancia en este laboratorio: a la Dra. Martha L. Contreras Zentella y al Sr. Juan Manuel Méndez Franco, muchas gracias.

Al M.C. Pablo Rangel Silva por su amistad y asesoría técnica para la purificación de la NADH DH y en el uso del HPLC. También, gracias a la MVZ Yesika Montes de Oca por su amistad y sus discretas carcajadas diarias.

A todos los amigos que encontré en el IFC, que es una lista muy grande y cada uno de ellos sabe que está en ella.

A la M. en C. Martha Zentella Mayer por permitirme terminar de escribir mi tesis en su laboratorio y darme todas las facilidades para obtener el grado.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

## INDICE

<b>INDICE</b> .....	I
<b>RESUMEN</b> .....	III
<b>TABLA DE ABREVIATURAS</b> .....	V
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Antecedentes .....	2
1.2 Propiedades Físicas de las Micelas Invertidas .....	4
1.3 Propiedades del Agua Micelar .....	6
1.4 Solubilización de una Proteína en un Sistema de Micelas Invertidas .....	7
1.5 Estructura de las Micelas Invertidas conteniendo Enzimas .....	8
1.6 Termoresistencia .....	12
1.7 Efecto del Grado de Hidratación en la Actividad Enzimática .....	12
1.8 Características de los Solventes Polares .....	13
1.8.1 Etilenglicol (Etlg) .....	13
1.8.2 Glicerol .....	14
1.8.3 Dimetilformamida (Form) .....	14
1.8.4 Dimetilsulfóxido (DMSO) .....	14
1.9 Características Bioquímicas de Catalasa, NADH deshidrogenasa y Glucosamina-6-P desaminasa .....	15
1.9.1 Catalasa de Hígado de Bovino .....	15
1.9.2 NADH Deshidrogenasa (NADH DH) .....	15
1.9.3 Glucosamina-6-Fosfato deshidrogenasa (GlcN-6-P desaminasa	16
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 Objetivo General .....	19
2.2 Objetivos Particulares .....	19
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b> .....	20
3.1 Enzimas Utilizadas (Monoméricas y Heteroméricas) .....	20
3.2 Solventes para la Formación de Micelas Invertidas .....	20
3.3 Determinación de la Actividad de Catalasa (Polarografía de Oxígeno) .....	21
3.4 Determinación de la Actividad de la NADH Deshidrogenasa (NADH DH) .....	22
3.5 Determinación de la Actividad de Glucosamina-6-Fosfato Desaminasa (GlcN-6-P deshidrogenasa) .....	23
3.6 Dterminación de Proteína .....	23
<b>4. RESULTADOS</b> .....	25
4.1 Actividad de Catalasa y NADH DH en Agua .....	25
4.2 Actividad Enzimática en Micelas Invertidas .....	26

4.3 Determinación de $W_0$ Optimo a Diferentes Concentraciones de Cosolventes .....	27
4.3.1 Catalasa .....	27
4.3.2 NADH DH .....	29
4.3.3 Glucosamina-6-P desaminasa .....	32
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	38
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	45
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	46

## RESUMEN

El estudio de las enzimas *in vitro* se ha basado en determinar su comportamiento en soluciones acuosas diluidas, sin embargo dentro de las células la mayoría de las enzimas se encuentran inmersas en una interfase membranal o cerca de ésta, lo que induce cambios en el medio citoplasmático, cuyas propiedades fisicoquímicas son completamente diferentes a las de un sistema acuoso. Por lo tanto, la enzimología realizada en soluciones acuosas nos da una realidad incompleta de lo que podría encontrarse dentro de una célula. Como se sabe las enzimas necesitan un poco de agua para realizar su actividad catalítica (agua de solvatación), por lo que decidimos utilizar el sistema de micelas invertidas en solventes orgánicos apolares, para simular *in vitro* lo que podría estar sucediendo en la célula. Dentro de las micelas invertidas se encuentran varios tipos de agua, que varían dependiendo de la cantidad en la que ésta se encuentre, que va desde agua de interfase hasta agua libre. Nuestro estudio se basa en determinar si las enzimas censan el tamaño de la cavidad micelar y/o la cantidad de agua que las rodea. De acuerdo a esto se decidió utilizar solventes miscibles en agua para manipular el diámetro micelar sin tener que depender exclusivamente del contenido de agua. Los resultados obtenidos con catalasa y con NADH DH apoyan fuertemente la idea de que las enzimas responden al tamaño micelar para expresar su actividad máxima y no directamente el contenido de agua; para la GlcN-6-P Desaminasa no se obtuvo el mismo comportamiento, ya que al ir incrementando la concentración de los cosolventes produjo un desplazamiento de máxima actividad hacia valores mayores de  $W_0$  y a mayores concentraciones de los cosolventes polares la curva de campana desaparece y aparecen curvas que son cada vez mas hiperbólicas.

Concluyendo la catalasa y la NADH DH pueden evaluar el tamaño de la cavidad micelar y que solo necesitan agua de solvatación, mientras que la GlcN-6-P Desaminasa presenta un comportamiento diferente debido, posiblemente a que le solvente polar este revirtiendo parcialmente el estado supertenso que tiene la enzima.

## TABLA DE ABREVIATURAS

AOT	bis-Dietilhexilsulfosuccinato de Sodio
CTAB	Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de Cobre
Cyt c	Citocromo c
DCPIP	Diclorofenil Indofenol
DMSO	Dimetilsulfoxido
Etgl	Etilemglicol
Form	Dimetil Formamida
GlcN-6-P Desaminasa	Glucosamina-6-Fosfato Desaminasa
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxido de Hidrógeno
KDa	KiloDaltones
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-Menten
Kp	No. de moles de sustrato transformado por minuto por mol de subunidad activa o centro catalítico.
Mg-ADP	Difosfato de Adenosina dependiente de magnesio
Na <sub>3</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de Sodio
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)
NADH DH	NADH Deshidrogenasa
NaOH	Hidróxido de Sodio
V <sub>max</sub>	Velocidad Máxima
W <sub>0</sub>	$\frac{[agua]M}{[tensoactivo]M}$

## 1. INTRODUCCION

El estudio de las enzimas *in vitro* se ha basado en determinar su comportamiento en soluciones acuosas diluidas, sin embargo, dentro de la célula la mayoría de las enzimas se encuentran inmersas en una interfase membranal o cerca de ésta; incluso las enzimas consideradas como libremente solubles se encuentran en un medio citoplasmático cuyas propiedades fisicoquímicas son completamente diferentes a las de un sistema acuoso (Martinek, y col., 1982).

Para determinar las propiedades fisicoquímicas del agua celular tales como: densidad, viscosidad, capacidad calorífica, movilidad translacional y rotacional y constante dieléctrica, se necesita llegar a condiciones en que las células y tejidos no podrían soportar. Sin embargo, los quistes de un crustáceo llamado *Artemia* (braquiópodo) pueden soportar varios ciclos de deshidratación e hidratación, además de que se conocen sus propiedades bioquímicas (Clegg, 1984, 1986a, 1986b); en estos quistes, por otra parte, se han hecho determinaciones de las propiedades fisicoquímicas del agua celular de estos, por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) y la dispersión de neutrones cuasielástica (DNC).

Por medio de RMN se determinó que los tiempos de relajación y el coeficiente de difusión, del agua en los quistes del crustáceo, eran menores en comparación con los encontrados en agua pura (Hazlewood, 1979). Por otro lado, con la DNC se midió la difusión del agua en tiempos muy pequeños ( $10^{-2}$  s) y en distancias de 1 a 2 Å, y se concluyó que la difusión era menor dentro de los quistes de la artemia, en comparación con el agua pura; lo que hizo suponer que, si no toda, una buena parte del agua celular presentaba propiedades fisicoquímicas diferentes (Clegg, 1984).

También se ha observado que las proteínas que son inyectadas al citoplasma de algunas células, presentan una difusión muy lenta como si

estuvieran en un medio viscoso, similar al de una solución de sacarosa al 60% (Wojcieszyn y col., 1981). Este hecho se trató de explicar por las restricciones estéricas que ejerce el retículo endoplasmático a la difusión de las macromoléculas (Mastro y Keith, 1984); sin embargo, Tanner (1983), demostró que si se inyectaban las proteínas a eritrocitos, los cuales carecen de microestructura celular, se observaba el mismo comportamiento de difusión.

Con estos datos se demostró que gran parte del agua celular presenta interacciones con las membranas celulares, lo cual combinado con la presencia de organelos, da origen a un tipo de agua altamente estructurada que es conocida como agua de interfase (Drost-Hansen y Clegg, 1979). Se ha propuesto que el agua que se encuentra a una distancia de hasta 500 Å de una membrana es agua de interfase; de acuerdo a Drost-Hansen y Clegg (1979) toda el agua celular está bajo la influencia de alguna superficie membranal.

Por todo lo anterior se puede observar que la enzimología realizada en soluciones acuosas nos muestra una realidad incompleta de lo que se podría encontrar dentro de una célula; y por lo tanto es necesario desarrollar métodos que nos permitan acercarnos a las condiciones fisicoquímicas que se encuentran dentro de ésta.

## **1.1 Antecedentes**

Se conoce que todas las enzimas necesitan agua, ya que tiene dos efectos sobre éstas: es esencial para que la enzima adquiera y mantenga su función catalíticamente activa, ya que el agua participa directa o indirectamente en todas las interacciones no covalentes (fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas) que determinan su conformación terciaria y cuaternaria. Por otro lado, al incrementar la cantidad de agua en contacto con la

enzima se incrementa la movilidad tridimensional y con ello se aumenta la posibilidad de que exista una inactivación térmica (Klibanov, 1984).

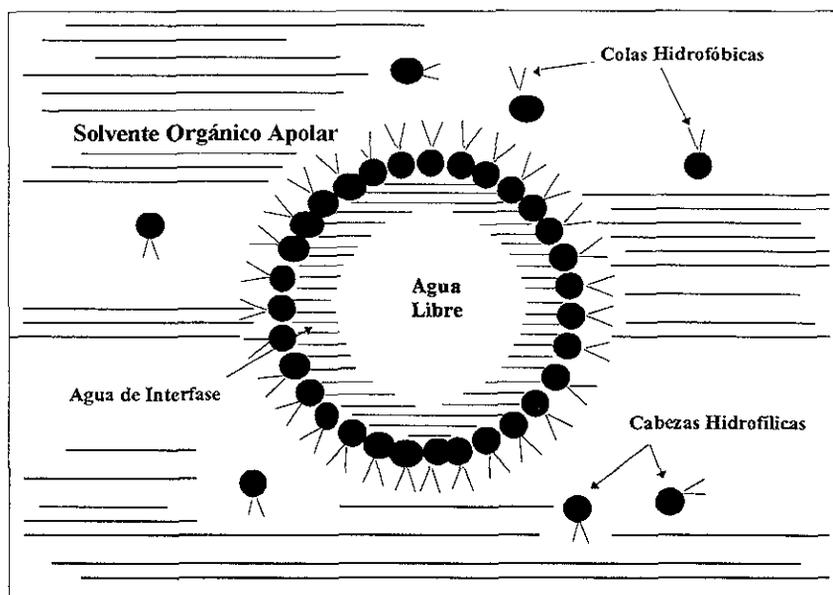
Estudios realizados por Klibanov (1986) con enzimas secas y después transferidas a solventes orgánicos, demostraron que el equivalente a la primera monocapa de agua, conocida como agua de solvatación, es suficiente para que lleve a cabo su actividad enzimática; incluso, con estos sistemas de solventes orgánicos, se logró activar enzimas que no presentan actividad en medios acuosos (Klibanov, 1986; Zaks y Klibanov, 1986).

Después de determinar que las enzimas necesitan muy poca agua para presentar actividad catalítica, se realizaron estudios sobre su comportamiento de la actividad catalítica, al variar la cantidad de agua que rodea a la enzima. Se utilizó, para simular *in vitro* lo que podría estar sucediendo dentro de la célula, el sistema de micelas invertidas en solventes orgánicos apolares (Luisi y Magid, 1986; Martinek y col., 1986; Luisi y col., 1988).

El primer sistema de micelas invertidas en solventes orgánicos fue desarrollado por Hanahan, en 1952, este sistema permitió que se desarrollara el estudio de enzimas en soluciones coloidales de agua en solventes orgánicos apolares.

Una micela invertida se define como una “gota de agua” de entre 20 a 200 Å de diámetro rodeada por una monocapa de tensoactivo en un medio orgánico no miscible en agua (Luisi y col., 1988) (ver figura 1.1). Este sistema es importante porque ayuda a determinar el comportamiento catalítico de las enzimas en diferentes microambientes acuosos con cantidades controladas de agua (de 0.1 a 10%) (Wong y col., 1976; Luisi y col., 1988; Haber y col., 1993). Los tipos de agua que se encuentran dentro de la micela varían dependiendo de la cantidad en la que ésta se encuentre, van desde sólo agua de interfase o altamente estructurada, que es la que está unida a los grupos polares del

tensoactivo, hasta “agua bulto”, que se encuentra en el centro de la micela, la cual tiene características similares a las del “agua libre”.



**Figura 1.1.** Esquema de micela invertida de AOT en un solvente orgánico apolar (El Seoud, 1984). Las cabezas polares del detergente se orientan hacia el interior de la micela, mientras que las colas hidrofóbicas se encuentran en contacto con el solvente orgánico.

## 1.2 Propiedades Físicas de las Micelas Invertidas

Las micelas presentan valores bajos de viscosidad y de temperatura de congelamiento en comparación con el agua (Douzou, 1980), aún con la enzima atrapada son transparentes, lo que favorece la utilización de técnicas espectrofotométricas para su estudio (Voss, y col., 1987). Además son catalogadas como entidades dinámicas, debido a que se encuentran en equilibrio con la forma monomérica del agente tensoactivo; es decir el tiempo de disociación de una micela es del orden de microsegundos. Otra características de los sistemas micelares es su alta estabilidad, ya que pueden conservarse por

semanas sin que se modifiquen sus propiedades físicas (O'Connor y Ramage, 1980).

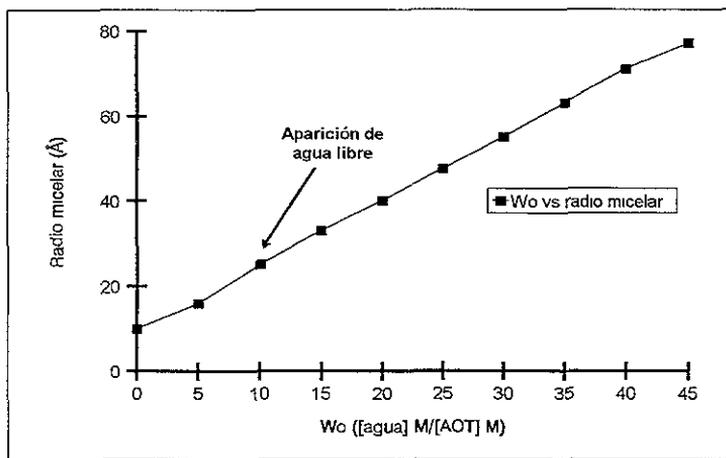
El término “micela invertida” define a pequeños agregados con bajo contenido de agua en el cual si se incrementa la cantidad de agua, dentro de un sistema micelar, la micela invertida tenderá a incrementar su tamaño (ver figura 1.2), si se usa el parámetro  $W_0$  (que representa la relación molar entre el agua y el tensoactivo para definirlo, ver ecuación 1.1), el límite superior para micelas invertidas sería de 15; a valores mayores de  $W_0$  es más apropiado usar el término “microemulsión agua-aceite” o simplemente microemulsión, esto es, sistemas ternarios que contienen cantidades mayores de agua; aunque en la práctica a los dos sistemas se las llama simplemente micelas invertidas.

$$\text{Ecuación 1.1} \quad W_0 = \frac{[\text{agua}]M}{[\text{tensoactivo}]M}$$

Los tensoactivos usados para formar micelas invertidas son muy variados y dependiendo de la naturaleza de sus grupos polares se clasifican en: no iónicos, catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos (dipolares). Todos ellos presentan una región apolar de longitud variable, con o sin enlaces insaturados y pueden estar formados por más de una cadena. También se han utilizado los fosfolípidos naturales o artificiales, debido a que son los constituyentes naturales de las membranas biológicas (Hilhorst y col., 1983).

Dependiendo de la naturaleza del tensoactivo, en algunos sistemas es necesaria la presencia de un cotensoactivo, que puede ser un alcohol de cadena corta o colesterol para ayudar a la estabilización del sistema micelar (Bru y col., 1989).

Al formarse la micela invertida los grupos cargados del tensoactivo se orientan hacia el interior acuoso de la micela, mientras que la parte apolar se encuentra en contacto con el solvente orgánico (ver figura 1.1).



**Figura 1.2.** Variación del radio micelar producido por el incremento en la cantidad de agua micelar (Pilen, 1989).

### 1.3 Propiedades del Agua Micelar

Como se dijo anteriormente para poder calcular la cantidad de agua existente en el interior de las micelas invertidas es necesario determinar la relación molar agua/tensoactivo, conocida como  $W_0$ . El tensoactivo más utilizado para la formación de micelas es el bis-dietilhexilsulfosuccinato de sodio o AOT, que al disolverse en un solvente orgánico apolar, es capaz de solubilizar hasta 50 moléculas de agua por cada molécula de tensoactivo (Merger y Saito, 1978), y se necesitan 10 moléculas de agua para solvatar a los grupos cargados del AOT; por lo que el “agua bulto” empieza a aparecer a  $W_0$  mayores de 10 (Luisi y Magid, 1986).

Una característica importante del agua micelar es su pH, el cual, es imposible determinarlo en forma precisa, por lo que se han utilizado escalas empíricas de acidez basadas en la correlación que existe entre el desplazamiento químico ( $\delta$ ) del  $^{31}\text{P}$  y el pH de amortiguadores de fosfato. De esta manera se ha

encontrado que el pH aparente del agua micelar se encuentra 0.4 unidades por arriba del pH de la solución amortiguadora (Smith y Luisi, 1980).

#### **1.4 Solubilización de una Proteína en un Sistema de Micelas Invertidas**

Se han descrito 3 métodos para solubilizar una enzima dentro de micelas invertidas:

a) Estado Sólido: Consiste en la incorporación de una proteína liofilizada a una solución micelar (Delahodt y col., 1984). Es importante mencionar que por este método la solubilidad máxima de la proteína ocurre a una concentración relativamente baja de agua en el sistema micelar ( $6 > W_0 < 8$ ).

b) Transferencia de Fase: La proteína disuelta en un medio acuoso salino se extrae con una fase de micelas invertidas (Luisi y col., 1979; Leser y col., 1986); para una extracción adecuada de la proteína debe utilizarse una concentración de sal óptima.

c) Método de Microinyección: Este método es el más sencillo y utilizado, consiste en inyectar un volumen muy pequeño de una solución concentrada de la proteína en una solución micelar (Luisi y Steinmann-Hofmann, 1987).

Los métodos de estado sólido y de microinyección presentan una solubilización total a los pocos segundos, y en algunos casos minutos, mientras que el método de transferencia de fases puede tardar varias horas (Kavanov y col., 1990; Klyachko y col., 1984; Levashov y col., 1982), pero puede ser acelerado sometándolo a sonicación por unos minutos, evitando desnaturar la proteína. Un problema que se puede presentar en los métodos de microinyección y de estado sólido es la posible saturación con agua o con la proteína concentrada, ya que el exceso de agua produce mezcla turbias; esto se puede corregir pasando por la muestra una corriente de nitrógeno que hará que

se obtenga una solución transparente (Ayala y col., 1986), la proteína no disuelta se elimina por centrifugación a baja velocidad.

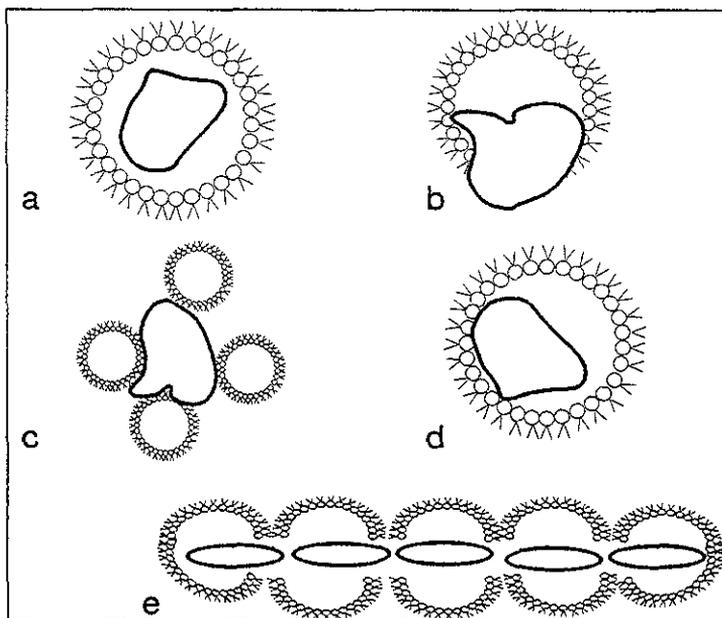
El método de transferencia en fase presenta dos desventajas: la primera es que se necesita mucho tiempo para alcanzar el equilibrio y la segunda es que no es posible controlar la cantidad de agua y proteína transferida de la fase acuosa a la fase orgánica, el contenido se conoce al final del experimento.

### **1.5 Estructura de las Micelas Invertidas conteniendo Enzimas**

Los procesos de solubilización de enzimas en sistemas micelares resultan en la formación de micelas invertidas sin importar el método de solubilización que se utilice. La enzima queda atrapada en el interior de la micela, rodeada por una capa o más capas de agua y la monocapa de tensoactivo protege a la molécula de entrar en contacto con el solvente apolar; además, se ha comprobado que una micela invertida contiene una sola enzima (Bonner y col., 1980), ya que el número de micelas invertidas que se forman en un solvente apolar es mucho mayor que el número de moléculas de enzima que pueden integrarse a la micela.

Se han propuestos varios modelos que explican de qué forma las proteínas, dependiendo de sus características, pueden solubilizarse dentro de las micelas invertidas. En el caso de que la enzima sea hidrofílica, ésta se encuentra en el centro de la micela rodeada por las capas de agua evitando el contacto con los grupos cargados del tensoactivo y con el solvente orgánico (figura 1.3a) (Bonner y col., 1980; Sheu y col., 1986). También se han sugerido modelos para el caso de una enzima hidrofóbica (Fig. 1.3b y 1.3c), la proteína interacciona con las cadenas hidrocarbonadas del tensoactivo o hasta con el solvente orgánico. Otro modelo es para una proteína cuyo centro activo interacciona con las cabezas cargadas del detergente (fig. 1.3d) (Luisi y Magid, 1986).

Se han encontrado indicios que sugieren la formación de agregados micelares de alto peso molecular (Ramakrishnan y col., 1983; Chantenay y col., 1985), y esto podrían favorecer la existencia de una población de estructuras entrecruzadas (fig. 1.3e).

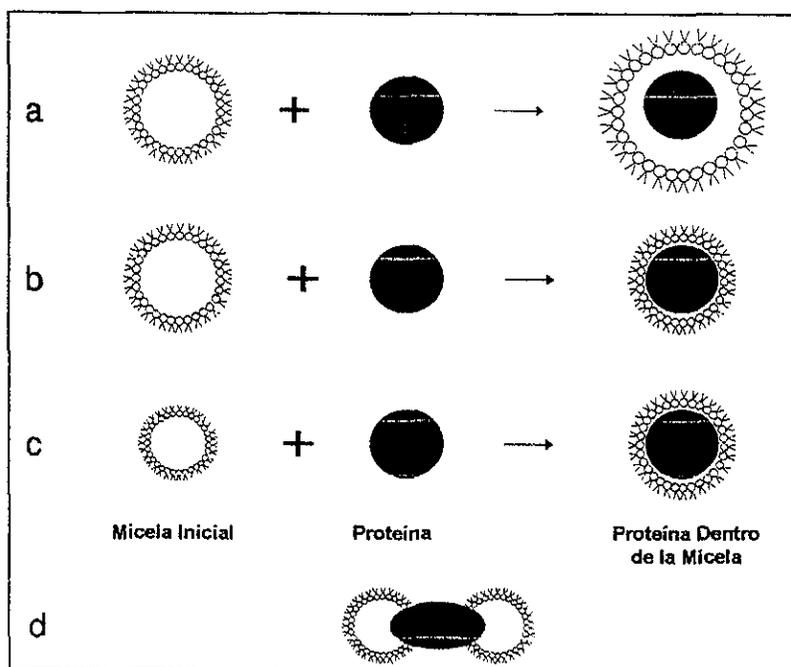


**Figura 1.3.** Estructuras propuestas para la solubilización de una proteína en un sistema de micelas invertidas. a) Proteína hidrofílica dentro de la poza de agua. b) Proteína con un dominio hidrofílico y otro hidrofóbico que interacciona con el agua micelar y con el solvente orgánico, respectivamente. c) Proteína totalmente hidrofóbica que se encuentra en contacto con las cadenas del tensoactivo y con el solvente orgánico. d) El sitio activo de una proteína hidrofílica interacciona con los grupos cargados del agente tensoactivo. e) Las micelas invertidas forman redes interconectadas por proteínas de membrana.

Cuando las enzimas son incorporadas a micelas invertidas, de acuerdo al modelo de tamaño fijo (Levashov y col., 1992; Fletcher y col., 1986) y dada la relación radio micelar ( $r_m$ ) vs  $W_0$  (ver fig.1.2) se puede estimar el tamaño micelar de acuerdo con el  $W_0$  óptimo para la actividad catalítica de la enzima en particular, ya que se ha demostrado que las enzimas tienen su máxima actividad

cuando el diámetro de la cavidad micelar es del mismo tamaño o un poco mayor al diámetro de la enzima (Pileni, 1989; Khmel'nitsky y cols., 1989).

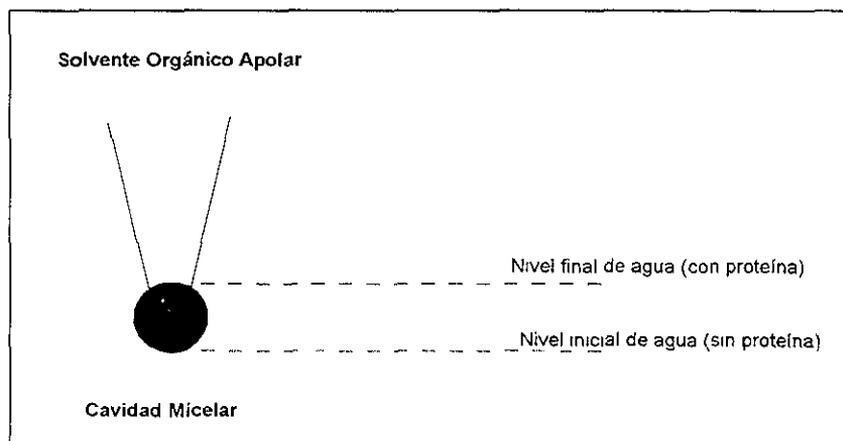
El tamaño que puede alcanzar una micela invertida depende, del contenido de agua, del tamaño de la cadena hidrocarbonada del tensoactivo, así como del solvente orgánico apolar; sin embargo, se duda que se pueda mantener la estabilidad de entidades de gran tamaño ya que el sistema micelar es termodinámicamente inestable, a pesar de que se mantengan las condiciones de mínima cantidad de agua, transparencia y homogeneidad del medio (Haring y col., 1985; Darszon y col., 1988; Pfammatter y col., 1989).



**Figura 1.4.** Modelos para la solubilización de proteínas en micelas invertidas. a) Modelo de la "capa de agua". b) Modelo de la inducción del tamaño adecuado. c) Modelo de tamaño fijo. d) Micelas invertidas conteniendo proteínas hidrofóbicas.

Se han propuesto dos modelos para determinar la organización estructural de la micela invertida. El primero es el modelo de capa de agua (Luisi y

Steinamann-Hofmann, 1987), en lo que se propone que el atrapamiento de la enzima esta acompañada por un aumento del tamaño de la micela y que por lo tanto cada micela tiene más moléculas de tensoactivo, y esto es debido a una redistribución de los componentes micelares (figura 1.3a). Por otro se encuentra el modelo de tamaño fijo, propuesto por el Martinek y colaboradores (Levashov y col., 1992) donde no varía el radio micelar, esto es debido a que el agua se desplaza entre las cabezas hidrofílicas del detergente (figura 1.3c), el cual fue comprobado por dichos autores por medio de resonancia magnética nuclear (RMN), utilizando a la  $\alpha$ -quimiotripsina y micelas invertidas hechas con AOT en octano, a un WO de 12, que tiene un radio aproximado de 25 Å. Por medio de esta técnica se determinó que el agua que se encuentra unida a los grupos polares del detergente, cuando la micela invertida esta vacía, se desplaza hacia el exterior de la cavidad micelar y penetra rodeado las cabezas del detergente (ver figura 1.5), con lo que se comprobó que una el modelo de tamaño fijo.



**Figura 1.5.** Representación esquemática de la expulsión de agua de la cavidad micelar de una micela invertida de AOT/octano cuando se integra una proteína (modelo de tamaño fijo).

## 1.6 Termorresistencia

Otra característica sobresaliente de las enzimas solubilizadas en micelas invertidas es su resistencia a la desnaturalización por el aumento en la temperatura, las enzimas se mantienen activas aún a temperaturas que provocan su desactivación en un medio acuoso. La resistencia a la inactivación térmica disminuye conforme aumenta la cantidad de agua en los sistemas micelares. Un ejemplo de este comportamiento es el observado con la ATPasa solubilizada en un medio micelar con solo el 0.3 % de agua (v/v) la cual adquiere una gran estabilidad, la vida media de la enzima a 70°, 80° y 90° C es alrededor de 11 h, 4 h y 20 minutos, respectivamente (Ayala y col., 1986). Este comportamiento se ha visto presente, también en la F<sub>1</sub> soluble de la ATPasa mitocondrial (Garza-Ramos y col., 1989).

## 1.7 Efecto del Grado de Hidratación en la Actividad Enzimática

En general, la cinética de las reacciones químicas catalizadas por las enzimas solubilizadas en sistemas micelares obedece la ecuación de Michaelis-Menten. Sin embargo, la teoría cinética de las reacciones enzimáticas que proceden de estos medios microheterogéneos debe tomar en cuenta la partición del sustrato entre la pseudofase acuosa de las micelas y la fase orgánica (Martinek y col., 1986; Hilhorst y col., 1984; Verheart y col., 1990).

Como criterio para evaluar la actividad catalítica de una enzima solubilizada en una micela invertida, se ha utilizado la constante catalítica (o número de recambio), que es el número de moles de sustrato transformados por mol de centro catalítico por unidad de tiempo (Martinek y col., 1981). Se ha observado que cuando se mezclan micelas invertidas que contienen enzima con micelas que contienen el sustrato se lleva a cabo la actividad catalítica; ésto indica que las micelas pueden transferir su contenido a otras. Bru y

colaboradores (1995) han determinado que dentro de los sistemas de micelas invertidas la transformación del sustrato en producto involucra varios pasos: a) que exista la colisión de las micelas que contienen a la enzima con las del sustrato; b) que se fusionen las micelas invertidas y que formen un dímero micelar transitorio; c) que se dé el intercambio de contenidos y d) que se divida el dímero para formar, de nuevo, dos micelas invertidas.

La actividad de las enzimas solubilizadas en las micelas invertidas muestra una fuerte dependencia del valor  $W_0$ . Uno de los efectos observados, cuando se estudian enzimas solubilizadas en micelas invertidas, es la dependencia de la actividad catalítica de la enzima en relación al grado de hidratación del sistema micelar. Esta dependencia ha sido observada para todas las enzimas estudiadas en micelas invertidas (Khmelnitsky y col., 1984; Martinek y col., 1986). Normalmente esta dependencia es en forma de campana, con un valor específico de  $W_0$  máximo al cual la actividad catalítica de la enzima solubilizada es máxima. El valor óptimo de  $W_0$ , que determina el tamaño de la poza de agua, depende de la naturaleza de la enzima y del tensoactivo (Eicke y Rehak, 1976).

Al analizar las curvas que representan esta dependencia se ha determinado que la mayor actividad enzimática se encuentra a valores de  $W_0$  que corresponden a micelas invertidas con el tamaño de su cavidad interna muy cercano al tamaño de la enzima; esta condición obliga a la enzima a adoptar el estado conformacional de máxima actividad

## **1.8 Características de los Solventes Polares**

### **1.8.1 Etilenglicol (Etlg)**

El etilenglicol es un alcohol que presenta propiedades intermedias entre el etil alcohol y la glicerina, es viscoso, además de ser incoloro e inodoro. Una

característica importante de este solvente polar es que es miscible con agua en cualquier proporción, además de otros disolventes polares como la acetona, el etanol, el butanol, etc.; no es miscible con solventes apolares como los aceites vegetales, hidrocarburos, eter, tetracloruro de carbono y cloroformo. Estas características lo hacen ser uno de los cosolventes ideales para realización de los ensayos planeados para la realización de este trabajo.

### **1.8.2 Glicerol**

En un alcohol de cadena corta que se obtiene de aceites vegetales y grasas animales, ya que es un componente de los triglicéridos, es altamente viscoso y es miscible con el agua en cualquier proporción, es nula su mezcla algún solvente apolar, por lo que lo hace un buen candidato para realizar los experimentos con las enzimas.

### **1.8.3 Dimetilformamida (Form)**

Es un disolvente polar que presenta un PM de 73.09, es miscible en agua y otros compuestos polares, pero además es un solvente que se puede mezclar perfectamente con varios solventes orgánicos apolares. Es un solvente de muy baja evaporación; por estas características es llamado el solvente por excelencia.

### **1.8.4 Dimetilsulóxido (DMSO)**

Es un líquido muy higroscópico, no presenta color ni olor, es completamente miscible en agua; también es miscible en etanol, acetona, eter, benceno y cloroformo, es altamente hidrofílico por lo que impide que pueda mezclarse con algún solvente apolar o que pueda interaccionar con él.

## 1.9 Características Bioquímicas de Catalasa, NADH deshidrogenasa y Glucosamina-6-fosfato desaminasa

### 1.9.1. Catalasa de Hígado de Bovino.

La catalasa de hígado de bovino es una molécula tetramérica compuesta de 4 subunidades con un peso molecular de 240 KDa, cada subunidad contiene un grupo hemo. Como en una gran cantidad de enzimas, la secuencia del sitio activo de las catalasas está altamente conservado, mientras que el resto de la molécula presenta variaciones entre especies.

El mecanismo de reacción de la catalasa se lleva a cabo en dos etapas: La primera conlleva la formación de un complejo primario entre el peróxido de hidrógeno y el hierro que se encuentra en el grupo prostético:



Este complejo reacciona con una segunda molécula de peróxido de hidrógeno para formar oxígeno molecular y agua, quedando la enzima en estado libre:



(Halliwell y Gutteridge, 1989).

### 1.9.2. NADH Deshidrogenasa (NADH DH)

Las mitocondrias de levadura son capaces de oxidar NADH externamente, esto ha sido demostrado debido a que se ha determinado la oxidación de NADH citosólico, por la cadena respiratoria, sin estar acoplada al sitio I de fosforilación; además esta actividad no es inhibida por pieridicina o rotenona, indicando que la NADH DH externa es estructuralmente diferente al complejo I.

La NADH DH muestra una cinética de Michaelis-Menten simple, con respecto al NADH, con una  $K_M$  de 31  $\mu M$ , usando como aceptor de electrones a

la quinona ( $Q_2$ ). Además se encontró un valor similar de  $K_M$  ( $33 \mu\text{M}$ ) en mitocondrias intactas para la actividad de NADH oxidasa. Otros sustratos, como NADPH ó deamino-NADH, muestran valores 250 veces menor que los obtenidos con NADH en un rango de pH de 5.5 a 8.5, ésto lleva a la conclusión que la enzima es específica para NADH.

La enzima puede utilizar como aceptores de electrones a las quinonas  $Q_2$ ,  $Q_6$ ,  $Q_{10}$ , además de diclorofenil indofenol (DCPIP), menaquinona o ferricianuro. La relación de las actividades de la NADH DH con  $Q_2$ : DCPIP: Ferricianuro:  $Q_6$  es de 30:8:6:1 respectivamente. La quinona  $Q_2$ , que es análogo de la  $Q_6$ , pero de cadena corta, es más activa debido a que la presencia de tritón X-100 dentro del medio de purificación evita que exista una solubilización completa de la  $Q_6$ , efecto que no sucede con la  $Q_2$  (Vries y Grivell, 1988).

La actividad de NADH  $Q_6$ : oxidoreductasa es inhibida con flavona, sin embargo, con compuestos como NAD, Mg-ADP o  $\text{Ca}^{2+}$  (todos a una concentración de 2 mM) o pieredicina y rotenona (a  $10 \mu\text{M}$  ambos) no presentan algún efecto estimulador o inhibitorio en su actividad (Vries y Grivell, 1988).

### 1.9.3. Glucosamina-6-Fosfato deshidrogenasa (GlcN-6-P desaminasa)

La GlcN-6-P desaminasa es una enzima alostérica que constituye el punto de control en la vía metabólica de los aminoazúcares de *E. coli* (Altamirano y col., 1992), cataliza la desaminación de la glucosamina-6 fosfato y su posterior isomerización hasta fructosa-6 fosfato. Presenta una fuerte cooperatividad positiva por su sustrato, con un coeficiente de Hill de 2.3. Su activador heterotrópico, la N-acetil-glucosamina-6 fosfato provoca la pérdida de la respuesta homotrópica; por lo que a concentraciones saturantes de este activador la enzima presenta una cinética Michaeliana típica.

La enzima es un hexámero en el que las 6 subunidades son idénticas y cada una de éstas pesa 29.7 KDa (Calcagno y col., 1984), dichas subunidades se unen por puentes disulfuro formándo dímeros, por lo que desde un punto de vista funcional se considera como un trímero de dímeros de gran estabilidad (Altamirano y col., 1992; Hernández-Arana y col., 1993, Altamirano y col., 1991). Estas características dan una idea de que la enzima es estable y activa por lo que es un buen candidato para ser utilizada en un sistema de micelas invertidas.

## JUSTIFICACION

Se ha demostrado que la actividad de una enzima en el seno de una micela invertida depende fuertemente del parámetro  $W_0$ , esto es, se necesita llegar a un valor crítico de  $W_0$  para obtener la máxima actividad de una enzima. Al incrementar el valor de la relación molar  $[H_2O] / [Tensoactivo]$  se está afectando tanto el contenido de agua en la micela invertida como el tamaño de la cavidad micelar.

Sin descartar el papel crucial del agua en la catálisis enzimática es evidente que surge la disyuntiva sobre si la enzima, evalúa la cantidad de agua *per se* en la micela o por el contrario el diámetro micelar es el factor crucial que permite la expresión de la máxima actividad. El valor de  $W_0$  óptimo determinado para varias enzimas (Khmelnitsky, 1989) corresponde a un diámetro micelar un poco mayor que el diámetro de la enzima en cuestión, por lo que es necesario determinar si las enzimas se encuentran en su estado de máxima actividad, por lo que necesitamos una estrategia que permita analizar el efecto del diámetro de la micela sobre la actividad enzimática sin tener que considerar los efectos directos del  $H_2O$  en la catálisis enzimática.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL:**

Definir el papel del tamaño de la cavidad micelar en la manifestación de la máxima actividad de una enzima en el seno de micelas invertidas.

### **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES:**

Definir las condiciones del ensayo que permitan analizar el papel del diámetro de la cavidad micelar, independientemente de su contenido de agua.

Definir la relación entre el diámetro de una enzima, el diámetro micelar y el valor de  $W_0$  óptimo; analizando el comportamiento de enzimas con diferente peso molecular y estados activos de agregación oligomérica (por ejemplo: monómero, dímero, tetrámero, etc.)

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Enzimas Utilizadas (Monoméricas y heteroméricas).

Las enzimas utilizadas durante el desarrollo de este proyecto fueron: la catalasa de hígado de bovino, (obtenida de Sigma Co.). Es una enzima tetramérica y cada una de sus subunidades pesa 60 KDa; cataliza la ruptura de peróxido de hidrógeno, en agua y oxígeno molecular. Una NADH deshidrogenasa (NADH DH) obtenida de mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es un monómero con un peso de 53 KDa y no se han detectado estados superiores de agregación y la Glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN-6-P D) de *Escherichia coli* la cual es un homohexámero con un peso molecular de 29.7 KDa por subunidad.

Para analizar el papel del tamaño de la cavidad micelar en la expresión de la máxima actividad de una enzima se diseñaron dos estrategias:

- 1.- Hacer crecer la micela invertida con mezclas a distintos porcentajes de algún solvente polar, miscible con el agua, por ejemplo: etilenglicol, glicerol, dimetil formamida, dimetilsulfoxido (DMSO), etc., así, el agua deja de ser el factor crítico en el crecimiento de la micela invertida y experimentalmente podríamos esperar que la máxima actividad de la enzima ocurra a un mismo tamaño micelar, sin importar el  $W_0$  alcanzado en las micelas.
- 2.- Analizar enzimas con distintos arreglos oligoméricos activos, de tal manera que monómeros, dímeros, tetrámeros, etc., presenten diferentes diámetros proporcionales a su estado de agregación y su actividad principal se presente a tamaños proporcionales de las micelas invertidas.

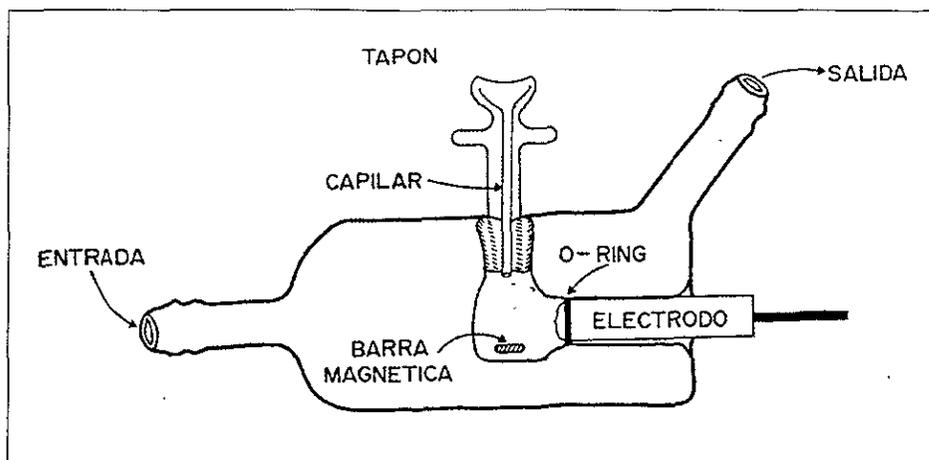
#### 3.2 Solventes para la Formación de Micelas Invertidas.

El sistema ternario que se utilizó para la formación de las micelas invertidas fue agua/AOT/isooctano. Los solventes miscibles en agua utilizados

fueron: etilenglicol y glicerol de la marca Baker (grado reactivo), además de dimetilformamida y dimetil sulfóxido de Merck.

### **3.3 Determinación de la Actividad de Catalasa (Polarografía de Oxígeno)**

La cuantificación de la actividad de la catalasa, tanto en agua como en solventes orgánicos, se realizó por medio de la determinación polarográfica de oxígeno utilizando un electrodo de oxígeno estándar de Clark y un oxímetro Yellow Springs Instruments, modelo 53. La cámara de reacción utilizada presenta las siguientes características: 1) Es de vidrio, debido a que el uso de solventes orgánicos lo requiere; 2) Esta rodeada de una para mantener una temperatura constante (30° C) durante la realización de todos los experimentos; 3) Presenta un orificio lateral por el cual se introduce el electrodo herméticamente ajustado con el empaque que sostiene a la membrana. Para evitar el intercambio gaseoso de la atmósfera con el interior de la cámara se utilizó un tapón de vidrio esmerilado el cual tenía un capilar por donde se adicionaban las sustancias utilizadas durante cada experimento (ver esquema 3.1). La determinación de la actividad de catalasa en agua se realizó en un amortiguador de fosfatos 25 mM, pH 8. La enzima se añadió a la cámara de reacción a una concentración final de 1.5 ng de proteína por ml; el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se agregó a una concentración final de 1.8 µg/ml.



**Esquema 3.1** Cámara de reacción para la determinación de la actividad de la catalasa por medio de la polarografía de oxígeno.

La determinación de la actividad de catalasa en micelas invertidas se realizó de la siguiente manera: se prepararon micelas a diferentes  $W_0$ , conteniendo a la enzima, a una concentración final de 7.52 ng de proteína por ml (volumen total de la solución micelar), y se agregaron 1.8 ml a la cámara de reacción. La reacción fue iniciada agregando 50  $\mu\text{l}$  de micelas invertidas que contenían peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); se prepararon agregando 60  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 300  $\mu\text{l}$  de una solución de AOT-isooctano 0.25 M, se agitó vigorosamente, por unos segundos, en vortex. Alternativamente, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede añadirse directamente a la mezcla de reacción.

### 3.4 Determinación de la Actividad de la NADH Deshidrogenasa (NADH DH)

La NADH deshidrogenasa (NADH:  $\text{Q}_6$  oxidorreductasa) se obtuvo purificándola de membranas mitocondriales de *S. cerevisiae* por medio del método descrito por Vries y Grivell (1988). La actividad enzimática se

determinó espectroscópicamente a 600 nm, utilizando como aceptor de protones a 2,6-diclorofenilindofenol (DCPIP) (Escamilla, y col., 1989), que tiene un coeficiente de extinción molar de  $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; el DCPIP fue incorporado, también, en micelas invertidas para incrementar la velocidad de interacción con las micelas que contienen a la enzima.

### **3.5 Determinación de la Actividad Glucosamina-6-fosfato Desaminasa (GlcN-6-P D).**

Se hicieron micelas invertidas con el sustrato y con la enzima que también contenía el activador. Después de haber preparado las micelas, éstas se mezclaron entre sí, a 1.8 ml de micelas con sustrato se agregaron 0.2 ml de micelas con enzima. Cada tubo fue activado a intervalos de 15 segundos y después se colocaron los tubos en un baño a  $30^{\circ} \text{ C}$  por 6 minutos. Para detener la reacción y romper el sistema micelar se agregaron 2 ml de ácido clorhídrico (HCl) 10 N. Por último se recuperó 1.8 ml de la fase ácida (y donde se encuentra el producto de la reacción) y por el método de Davis y Garden (1967) se determinó el producto de la reacción, el cual consiste en agregar 0.45 ml de resorcinol al 1% en etanol al 70% a cada uno de los tubos y se ponen a incubar en un baño a una temperatura de  $68$  a  $70^{\circ} \text{ C}$  por 10 minutos para finalmente leerlos en el espectrofotómetro a 512 nm.

### **3.6 Determinación de Proteína**

La determinación de proteína se llevó a cabo por el método de Lowry (1951) modificado por Markwell (1981), el cual tiene una sensibilidad de 0.005 a 0.02 mg de proteína. Se trazó una curva patrón con diferentes concentraciones de albúmina, agregando 0, 5, 10, 15, 20 y 30  $\mu\text{g/ml}$  de una solución estándar de albúmina sérica bovina a una concentración de 1 mg por ml. en otros tubos

de colocaron cantidades crecientes de la muestra problema. En ambos casos se aforó a 50  $\mu$ l con agua destilada.

Después de completar la curva patrón y los problemas se les adicionó 1 ml de la siguiente mezcla:

- a) 1 ml de Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) al 1%,
- b) 1 ml de Tartrato de Sodio y Potasio al 2%, y
- c) 23 ml de Hidróxido de Sodio ( $\text{NaOH}$ ) 0.1 N conteniendo Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 2%.

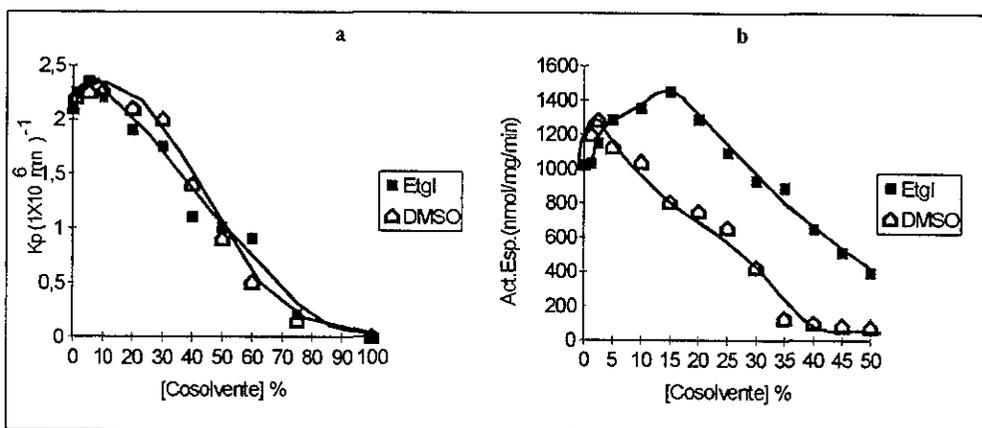
Los tubos fueron agitados perfectamente en un vórtex y se dejaron reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se les agregó 50  $\mu$ l de reactivo de Folín-Ciocalteu diluido con agua destilada 2:1 (1 ml de folín + 0.5 ml de agua) agitando inmediatamente en el vórtex y después de 10 minutos se hizo la lectura de densidad óptica a 750 nm. Como referencia se calibró el espectrofotómetro con el tubo de la curva patrón que no contenía albúmina.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Actividad de Catalasa y NADH DH en Agua.

Se analizó el efecto de cosolventes miscibles en agua sobre la actividad de catalasa y NADH DH en medio acuoso en ensayos donde se fue incrementando la concentración del cosolvente a partir de cero y hasta llegar a 100%.

El comportamiento de la actividad de catalasa se puede ver en la figura 5.1a. Se observa que al tener concentraciones bajas del cosolvente, etilenglicol y DMSO, la actividad de la enzima aumenta ligeramente, posteriormente, va disminuyendo conforme se va incrementando la concentración de cosolvente hasta inhibirla totalmente cuando se tiene el 100% del solvente polar en la cámara de reacción. Un comportamiento similar se observó en la actividad de la NADH DH (ver figura 5.1b).



**Figura 5.1** Curvas de actividad de Catalasa (a) y NADH DH (b) en medio acuoso con diferentes concentraciones de cosolvente, que para estos ensayos se utilizaron etilenglicol (■) y DMSO (△).

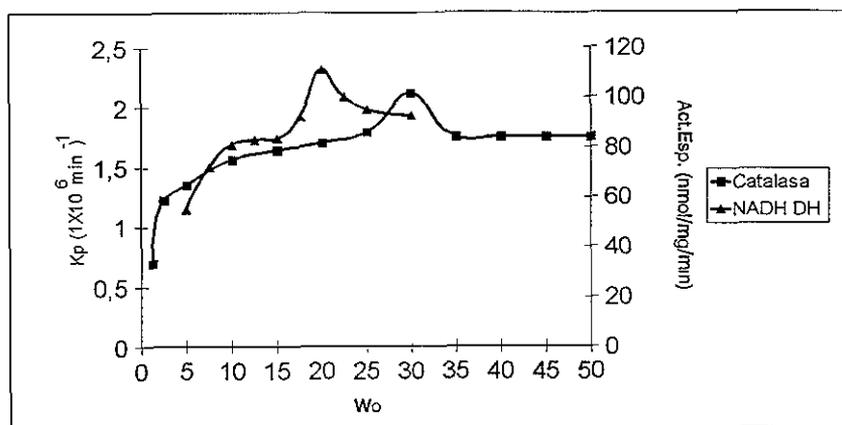
Es evidente que los cosolventes polares tienen un efecto inhibitorio *per se* sobre la actividad de las enzimas y este efecto inhibitorio, que depende

claramente de la concentración del solvente orgánico en agua. Para evitar la interferencia con el análisis cualitativo del comportamiento enzimático, toda vez que los experimentos se realizaron en micelas invertidas, se hicieron con mezclas de los cosolventes en agua, en proporciones que van de 0 a 30 %, rango de concentración que no causa una inhibición mayor al 15 % en medio acuoso.

#### 4.2 Actividad Enzimática en Micelas Invertidas

En este caso se determinó el  $W_0$  óptimo para la actividad máxima tanto de la catalasa como de la NADH DH en micelas invertidas. El primer paso fue determinar la actividad de la catalasa en micelas sin cosolvente. Como puede observarse en la figura 5.2 el máximo de actividad de la enzima se presenta a un  $W_0$  de 30, que concuerda con los datos publicados por Khmel'nitsky y colaboradores (1989) y donde el tamaño micelar corresponde al diámetro de la enzima, en su estado tetramérico (Pileni, 1989). Algo interesante es que parece formarse un pequeño hombro a un  $W_0$  de 10; ésto podría indicar que la enzima se disocia parcialmente formando diferentes conformeros activos. Los ensayos realizados con catalasa se determinaron calculando la  $K_p$  que se define como el número de moles de sustrato transformado por minuto por mol de subunidad activa o centro catalítico.

Al repetir los ensayos, ahora con la NADH DH, se encontró un máximo de actividad a un  $W_0$  de 20 y parece haber un pequeño hombro a un  $W_0$  de 12. Esto posiblemente nos indica que esta enzima monomérica este formando agregados (dímeros) que presentan mayor actividad enzimática, siendo este tipo de población el que se encuentra al  $W_0$  de 20, mientras que el monómero se localice en el hombro ( $W_0$  12).

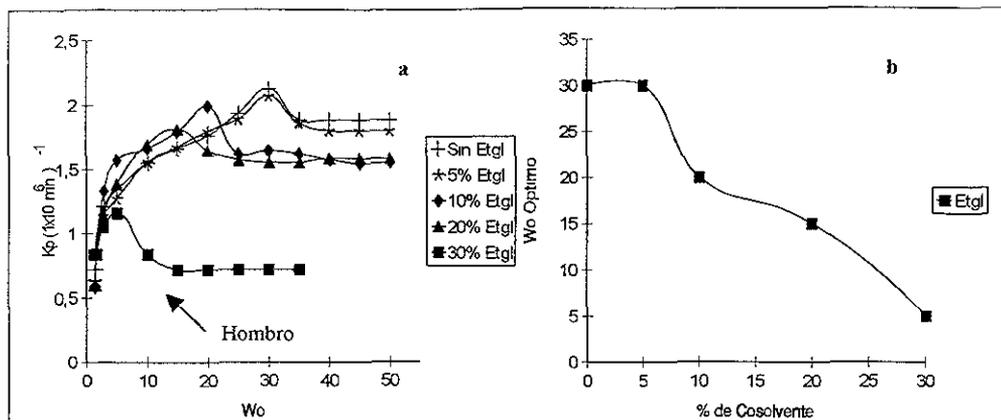


**Figura 5.2** Determinación de  $W_0$  óptimo para catalasa (■) y para NADH DH (▲) en micelas invertidas de AOT/isooctano/agua.

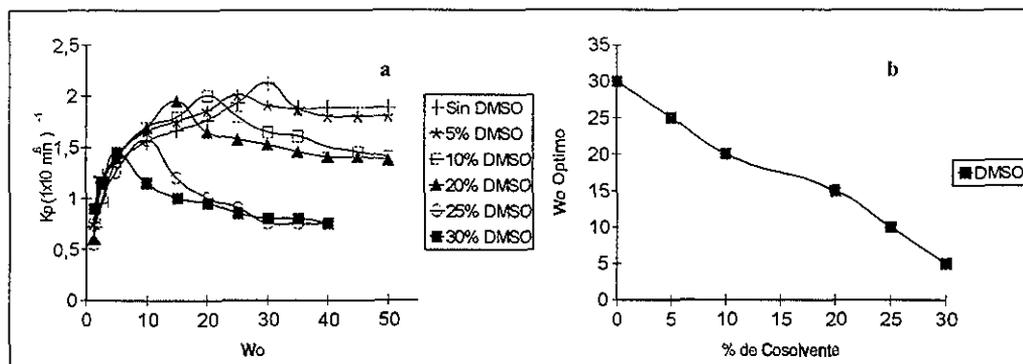
### 4.3 Determinación de $W_0$ Óptimo a Diferentes Concentraciones de Cosolventes

#### 4.3.1 Catalasa

Para estos ensayos se sustituyó el agua micelar por los cosolventes polares en concentraciones crecientes, desde 5 hasta un 30 % (v/v). En la figura 5.3a se observa que conforme se incrementa la concentración de los cosolventes en la mezcla de reacción se va produciendo un corrimiento del máximo de actividad de la catalasa hacia la izquierda, esto es, a valores menores de  $W_0$ , lo que estaría indicando que las micelas invertidas están creciendo debido al incremento en la concentración del cosolvente orgánico, además de que el hombro también se va corriendo hasta quedar integrado en el pico actividad actividad.



**Figura 5.3** (a) Actividades de catalasa variando la concentración de etilenglicol y el  $W_0$ . (b) Efecto de la concentración de etilenglicol sobre el valor de  $W_0$  óptimo de la catalasa en micelas invertidas.



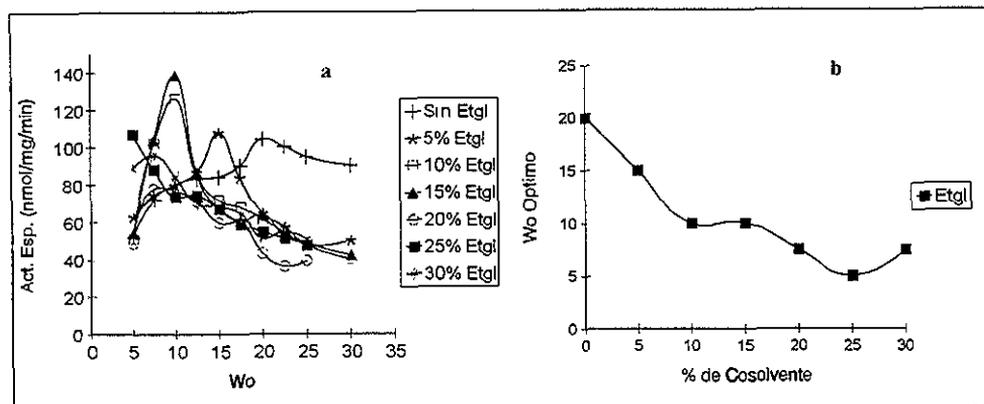
**Figura 5.4** (a) Actividades de catalasa variando la concentración de DMSO y el  $W_0$ . (b) Efecto de la concentración de DMSO sobre el valor del  $W_0$  óptimo de la catalasa en micelas invertidas.

Un punto muy importante es que al aumentar la concentración del cosolvente, ya sea etilenglicol o DMSO, los máximos de actividad sufren una disminución en el valor de la  $K_p$ , bajo condiciones óptimas, que llega a ser hasta un 40%, cuando se sustituye el agua micelar por el cosolvente hasta un 30%. Este comportamiento se ve más claramente en la figura 5.3a, donde se observa una disminución en la actividad de la enzima ( $K_p$ ) conforme se va incrementando la concentración de cosolvente y esto concuerda con los datos

obtenidos en agua. Posteriormente se utilizó al DMSO como sustituto del agua micelar y al realizar la familia de curvas se obtuvo un comportamiento similar observado en los ensayos de sustitución con etilenglicol (ver figura 5.4a).

### 4.3.2 NADH DH

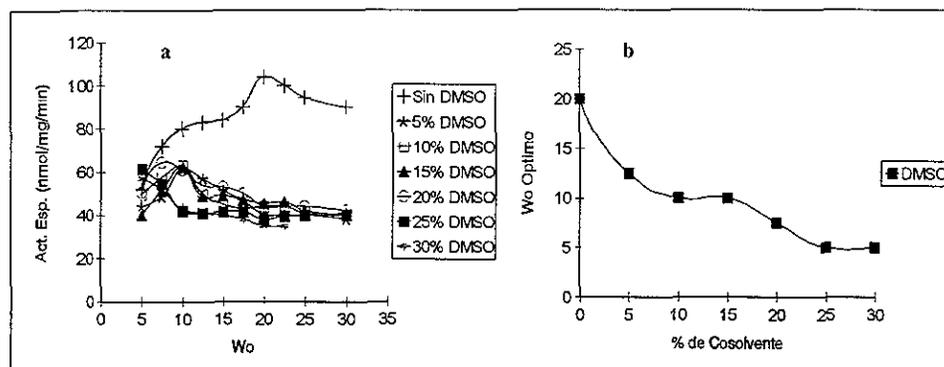
Los experimentos con esta enzima se realizaron de la misma manera que con la catalasa, es decir, se sustituyó el agua micelar por concentraciones crecientes de los diferentes cosolventes polares. En la figura 5.5a se observa, también, un corrimiento del máximo de actividad de la NADH DH hacia la izquierda cuando se sustituye el agua micelar con etilenglicol (v/v), así mismo el hombro que se observaba al  $W_0$  de 12, hasta ser incluido por el pico de máximo actividad.



**Figura 5.5** (a) Actividades de NADH DH variando la concentración de etilenglicol y el  $W_0$ . (b) Efecto de la concentración de etilenglicol sobre el valor del  $W_0$  óptimo de la NADH DH en micelas invertidas.

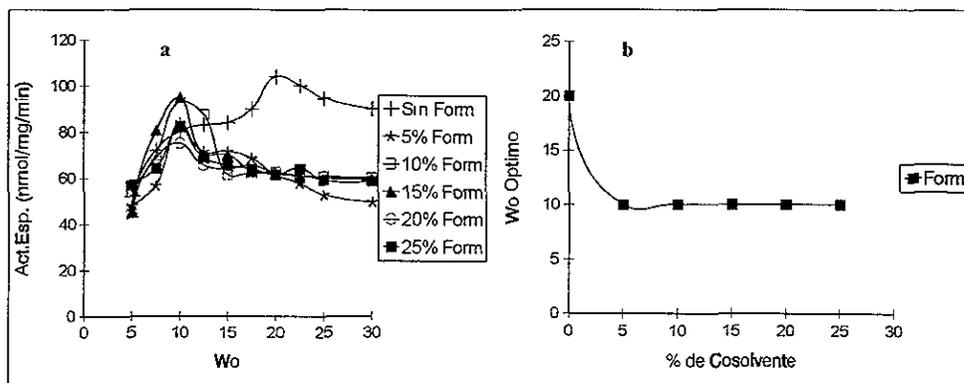
Este corrimiento se observa mejor en la figura 5.5b, en donde se compara el valor del  $W_0$  óptimo donde se obtiene la actividad máxima conforme se incrementa la concentración del etilenglicol.

Los resultados obtenidos cuando se sustituyó el agua micelar por DMSO se presentan en la figura 5.6a, donde se observa un corrimiento del máximo de actividad de la NADH DH dentro de las micelas invertidas, similar al presentado cuando se sustituyó con etilenglicol. Esto se ve más claro en la figura 5.6b.



**Figura 5.6** (a) Actividades de NADH DH variando la concentración de DMSO y el  $W_0$ . (b) Efecto de la concentración de DMSO sobre el valor del  $W_0$  óptimo de la NADH DH en micelas invertidas.

Después de esto se decidió utilizar otros solventes polares para determinar si el comportamiento de la enzima era similar a los obtenidos con el etilenglicol y con el DMSO. Cuando se sustituyó el agua micelar por otro cosolvente polar, que en este caso fue la dimetil formamida, se obtuvieron resultados diferentes (figura 5.7a).

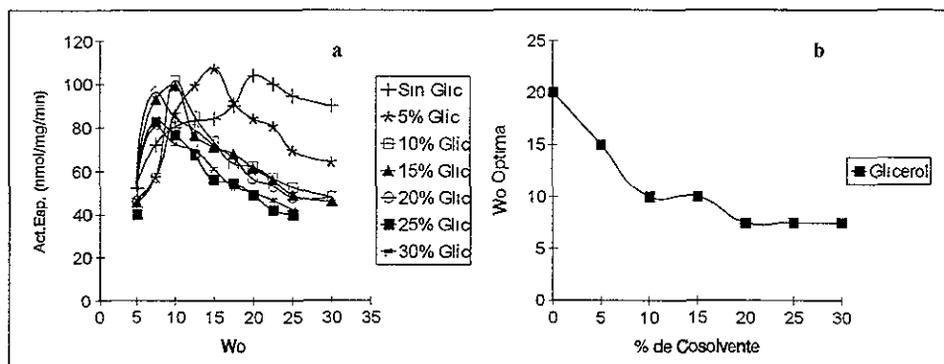


**Figura 5.7 (a)** Actividades de NADH DH variando la concentración de dimetil formamida y el  $W_0$ . (b) Efecto de la concentración de dimetil formamida sobre el valor del  $W_0$  óptimo de la NADH DH en micelas invertidas.

No se presentó un corrimiento paulatino de los máximos de actividad, sino que desde la concentración más baja de dimetil formamida (5%, v/v) el máximo se presentó a un  $W_0$  de 10 y al ir incrementando la concentración de este cosolvente hasta 30% el  $W_0$  donde el máximo de actividad se mantuvo constante. Este comportamiento se ve más claro en la figura 5.7b, en donde se ve una línea recta que inicia desde la concentración más baja hasta la más alta del cosolvente. Este comportamiento nos hizo pensar que el cosolvente estaba interactuando directamente con la enzima y que estaba modificando posiblemente su estado de agregación, por lo que se decidió no utilizar más, la dimetil formamida.

Por último, se obtuvo la familia de curvas de la NADH DH utilizando como cosolvente al glicerol. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 5.8a, donde se observa nuevamente el corrimiento del  $W_0$  correspondiente al máximo de actividad para cada una de las concentraciones utilizadas. Este comportamiento se ve más claramente en la figura 5.8b.

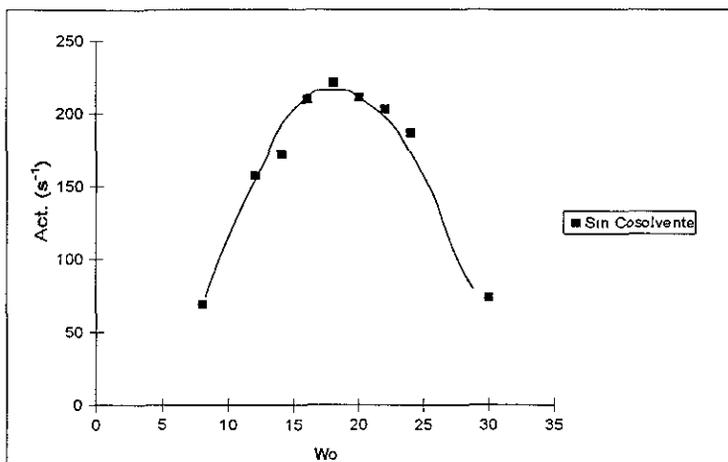
Como se observa en la figura 5.8a, el comportamiento de la actividad de la NADH DH es similar al que presentó utilizando etilenglicol y al DMSO como sustituyentes del agua.



**Figura 5.8** (a) Actividades de NADH DH variando la concentración de glicerol y el  $W_0$ . (b) Efecto de la concentración de glicerol sobre el valor del  $W_0$  óptimo de la NADH DH en micelas invertidas.

### 4.3.3 Glucosamina-6-P desaminasa (GlcN-6-P desaminasa)

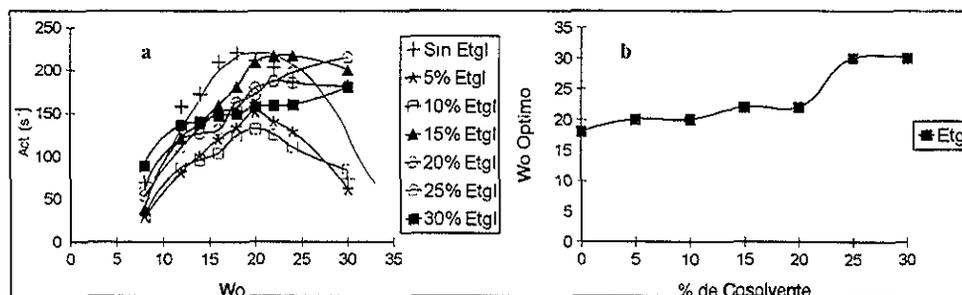
Después de revisar los resultados obtenidos, tanto con catalasa como con NADH DH, se decidió trabajar con una enzima que tuviera un arreglo oligomérico diferente al de estas enzimas, es decir que no fuera ni monomérica o tetramérica como lo eran las enzimas anteriormente utilizadas y que además tuviera las características siguientes: que careciera de diferentes arreglos oligoméricos activos y que se tuviera experiencia en su manejo dentro de micelas invertidas. Por ello se decidió trabajar con la glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN-6-P desaminasa) que presentaba las características requeridas y que además se conocían algunos aspectos cinéticos dentro de micelas invertidas. Se determinó el  $W_0$  óptimo para la actividad de la GlcN-6-P desaminasa y la gráfica obtenida, que se ve en la figura 5.8, nos presenta un comportamiento clásico de campana.



**Figura 5.9** Determinación de  $W_0$  óptimo para la Gln-6-P desaminasa en micelas invertidas de AOT/isooctano/agua

Posteriormente se iniciaron los experimentos de sustitución del agua y en este caso se decidió utilizar etilenglicol y DMSO, dado que para las enzimas anteriormente descritas, estos dos cosolventes fueron los que menos afectaron a las enzimas.

El  $W_0$  óptimo, en ausencia de cosolvente fue de 18 y este  $W_0$  corresponde a un tamaño micelar que está muy cercano con el diámetro calculado para la enzima, de acuerdo a su composición hexamérica.



**Figura 5.10** (a) Actividades de Gln-6-P desaminasas variando la concentración de etilenglicol y el  $W_0$ . (b) Efecto de la concentración de etilenglicol sobre la actividad de Gln-6-P desaminasa ( $W_0$  óptimo) en micelas invertidas.

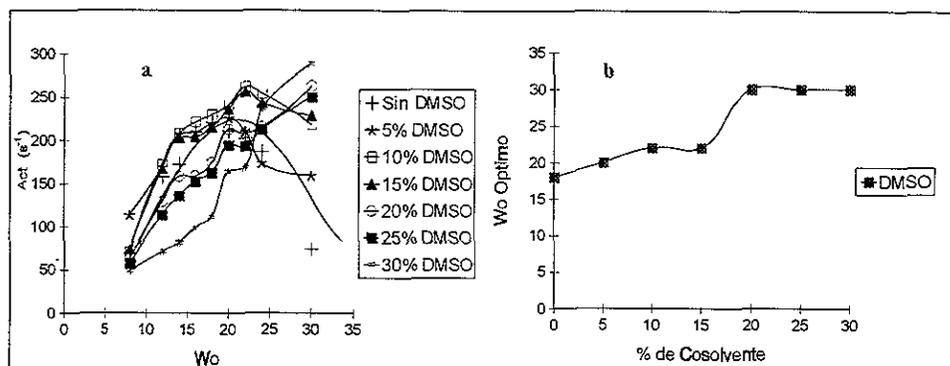
Cuando sustituimos parte del agua micelar con cantidades crecientes de cosolventes polares el resultado fue sorprendente, pues se observó un comportamiento no esperado para ambos cosolventes. Por ejemplo, con etilenglicol, a las concentraciones de 5 y 10 %, se observó un corrimiento de la curva de campana a la derecha, en lugar de hacia la izquierda, como se había presentado para las enzimas anteriormente estudiadas.

A partir del 15 % de etilenglicol se tuvo un efecto sorprendente, pues no sólo se presentó el corrimiento del punto de actividad máxima hacia la derecha, sino que además perdemos el comportamiento cinético de campana y se observa en 15, 20 hasta 30% de etilenglicol, un comportamiento cinético cuya curva tiende hacia la hipérbola.

No se tiene una explicación clara para el comportamiento de la GlcN-6-P desaminasa, pero es evidente que el cosolvente polar está interactuando directamente con algunos sitios de la enzima que producen el comportamiento observado, que parecería no tener que ver con la típica respuesta de la actividad enzimática al diámetro micelar; comportamiento que también ha sido documentado por varios autores para un número considerable de enzimas. El ligero corrimiento del  $W_0$  a la derecha (ejemplo: 18 con agua en la cavidad micelar a  $W_0$  22 con 15% de etilenglicol) se debe probablemente a un reajuste estructural de la enzima, inducido por el cosolvente, dando una enzima que tiene un diámetro un poco mayor que la enzima en el sistema de micelas invertidas solo con agua

Cuando se hicieron los experimentos con DMSO observamos un comportamiento similar al descrito para el etilenglicol; esto es, a bajas concentraciones el DMSO provoca un corrimiento del  $W_0$  óptimo a un  $W_0$  de 22 y se conserva algo del comportamiento de campana. A altas concentraciones

de DMSO, también se elimina la cinética de campana, dando curvas que se acercan a un comportamiento hiperbólico.



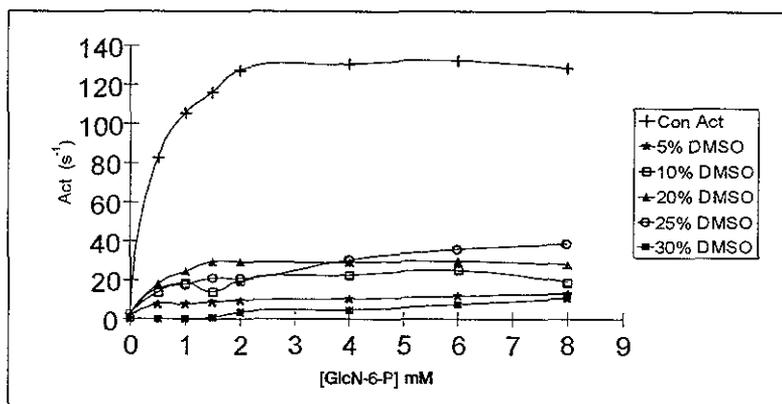
**Figura 5.11** (a) Actividades de GlcN-6-P desaminasaes variando la concentración de DMSO y el  $W_0$ . (b) Efecto de la concentración de DMSO sobre la actividad de GlcN-6-P desaminasa ( $W_0$  óptimo) en micelas invertidas.

Con respecto al resultado anteriormente descrito podemos adelantar que experimentos realizados por Jorge R. Dávila (tesis Doctoral) sugieren que el AOT podría tener un efecto inhibitorio sobre la enzima actuando a nivel del sitio alostérico, donde se une el activador alostérico. De este modo la segunda parte de la gráfica, donde se presenta una caída en la curva de campana a  $W_0$  altos, podría ser explicada por el efecto inhibitorio descrito y podríamos sugerir que el etilenglicol y el DMSO interfieren con la unión del AOT al sitio regulatorio, y por tanto se obtiene una cinética hiperbólica en ausencia de la de la inhibición descrita.

Dicho lo anterior es claro que los cosolventes podrían no sólo afectar el  $W_0$  óptimo de la enzima estudiada, sino que en algunos casos éste puede tener efectos directos sobre la enzima y/o la interacción de la enzima con ligandos como sustratos, activadores o inhibidores potenciales.

La tesis que se esta proponiendo, de que el cosolvente podría estar interfiriendo en el efecto inhibitorio del detergente AOT sobre la enzima, se

demuestra con el experimento que se describe a continuación, donde se ensayó el efecto del DMSO sobre la cinética para sustrato (GlcN-6-P), en ausencia del activador heterotrópico N-acetil glucosamina.



**Figura 5.12** Gráfica de activación, por DMSO, de la GlcN-6-P desaminasa sin activador a un  $W_0$  constante (18) y a diferentes concentraciones de DMSO.

Se hicieron micelas invertidas de AOT/isooctano/agua a un  $W_0$  de 18 y variando la concentración del DMSO obteniéndose lo siguiente: en ausencia del activador la enzima presenta una actividad despreciable a cualquier concentración de sustrato ensayado (desde 0.5 mM hasta concentraciones francamente saturantes de 8 mM). Cuando el ensayo se repite, en presencia del activador heterotrópico la actividad aparece con una cinética claramente hiperbólica. Si se ensaya a diferentes concentraciones de DMSO (entre 5 y 25%) observamos que el cosolvente es capaz de revelar al menos parte de la actividad (ver figura 5.12), que en otra condición se encuentra inhibida en el interior de la micela.

Así, en conclusión dentro de la micela invertida de AOT la GlcN-6-P desaminasa se encuentra en una conformación supertensa que no responde a la activación por sustrato (actividad homotrópica), pero sí es capaz de responder a

la activación por el activador alostérico; el cosolvente polar de alguna manera revierte, parcialmente, el estado supertenso y permite una respuesta discreta de activación por sustrato.

## 5. DISCUSIÓN

Se ha postulado que las enzimas, dentro de la célula, se encuentran presentes en condiciones completamente diferentes a las que se encuentran *in vitro*, ya que el agua que las rodea está influenciada por la carga de superficie de las membranas de los diferentes organelos y de la membrana plasmática, que la confinan y la “estructuran” (Martinek, y col., 1982); es decir las condiciones en las que se encuentran las enzimas *in vivo* son diferentes a las condiciones que usamos *in vitro* para su ensayo.

Se ha propuesto que los sistemas de micelas invertidas en solventes orgánicos apolares de alguna manera imitan o reproducen las condiciones del agua estructurada de la célula. Este sistema se aplicó en el presente estudio para evaluar el comportamiento de varias enzimas en sistemas de micelas invertidas de AOT en isoctano, en donde el diámetro micelar fue controlado por mezclas de H<sub>2</sub>O/cosolvente polar en lugar de sólo H<sub>2</sub>O como tradicionalmente se ha usado.

En sistemas tradicionales de micelas invertidas el diámetro micelar es modificado por el contenido de H<sub>2</sub>O (Pileni, 1989, Luisi y col, 1988), actualmente se discute si las enzimas, al desplegar su actividad máxima, dentro del sistema micelar, a un valor específico de  $W_0$  están censando directamente el contenido de agua y/o el diámetro micelar. Es interesante que Khmelnsky y colaboradores (1989) al relacionar los valores de  $W_0$  óptimo con el tamaño micelar y el diámetro de las enzimas analizadas encontró que existe una clara relación entre el valor de  $W_0$  óptimo, el diámetro de la enzima y el diámetro de la cavidad micelar, resultando que las enzimas parecen alcanzar su actividad máxima cuando el diámetro de la cavidad es justamente el diámetro de la enzima, proponiéndose que dentro de la micela invertida al valor de  $W_0$  óptimo

la enzima está atrapada en su conformación más activa, sin dejar de lado que el agua es importante pero que solamente necesita pequeñas cantidades de agua que solvaten sus grupos hidrofílicos.

De acuerdo con esta idea, se decidió utilizar solventes miscibles en agua (etilenglicol, glicerol, formamida y DMSO) para manipular el diámetro micelar sin tener que depender exclusivamente del contenido de agua; por lo tanto los diámetros micelares deseados pueden ser alcanzados a valores de  $W_0$  menores ( $W_0 = [H_2O/AOT] M$ ), aunque no se ha determinado el tamaño micelar que se alcanza al agregar los cosolvente si es lógico que la micela crezca, ya que si recordamos que el  $W_0$  se determina por las concentraciones molares del agua sobre el tensoactivo, próximamente lo interesante es medir el crecimiento micelar cuando se agreguen las diferentes concentraciones de los cosolvente polares. Así con este sistema, en ausencia de efectos no deseados de los cosolventes usados, se podría esperar que las enzimas, en verdad, evalúa el tamaño micelar y no directamente el contenido de agua. Por lo tanto las enzimas deberían expresar su actividad máxima, a valores de  $W_0$  cada vez menores, conforme se aumentara la concentración del cosolvente sustituyendo al agua, claro sin que haya suficiente agua para solvatar los grupos polares de las enzimas.

De los cosolventes analizados encontramos que el etilenglicol y el DMSO daban los resultados más satisfactorios, debido a que las mezclas con agua tienen una viscosidad parecida a la del agua; en cambio, por ejemplo el glicerol, a medida que se incrementa su concentración genera mezclas viscosas que no fueron adecuadas para la formación de micelas invertidas. Por otro lado, el DMSO y el etilenglicol no tuvieron efectos directos sobre la actividad enzimática, al menos para la catalasa y la NADH DH. En relación a esto, la

formamida tuvo un efecto abrupto en el comportamiento de las enzimas en micelas invertidas, sugiriendo que este cosolvente podría, aún en bajas concentraciones, tener un efecto directo sobre el estado de agregación de la enzima ensayada. Por ejemplo, en la figura 5.7 se observó que a cualquier concentración del cosolvente, el  $W_0$  óptimo de la NADH DH, se recorre de su valor de 20, en ausencia de cosolvente, hasta un valor de 10, en presencia de cosolvente, esto puede explicarse porque la formamida es un solvente que tiene la capacidad de mezclarse con disolvente orgánicos apolares por lo que, posiblemente, parte de la formamida se quedaba en la cavidad micelar y parte en el isoctano o toda la formamida se disolvía en el isoctano por lo podría provocar una deshidratación de la micela invertida, y por lo tanto la NADH DH no tenía el espacio suficiente para realizar sus cambios estructurales.

Los resultados obtenidos con catalasa y con NADH DH, variando el contenido de DMSO o etilenglicol apoyan fuertemente la idea de que las enzimas responden al tamaño micelar para expresar su actividad máxima y no directamente el contenido de agua. Conforme se fueron aumentando el porcentaje de cosolvente en el agua micelar se observó que el valor de  $W_0$  óptimo se desplaza hacia la izquierda de la gráfica, sugiriendo que el tamaño micelar es el factor crítico en la expresión de la actividad enzimática en micelas invertidas.

En este sentido, hay que recordar que los experimentos, de Klivanov y colaboradores (1986), con enzimas “desnudas” en solventes orgánicos apolares, tienden a demostrar que se requiere muy poca agua para alcanzar los niveles máximos de actividad en estos sistemas. Klivanov ha calculado que el equivalente de una monocapa de agua, alrededor de la enzima es suficiente para alcanzar la velocidad máxima de la enzima “desnuda”. Desde luego se

considera que el agua no está distribuida homogéneamente en el perímetro enzimático, sino que posiblemente se encuentre formando varias capas de solvatación alrededor de los grupos polares expuestos de las enzimas.

De acuerdo con lo anterior no toda el agua que usamos para obtener el diámetro micelar, en los sistemas habituales, sería necesaria para obtener la máxima activación de las enzimas, y de este modo podemos sustituir el agua en exceso por un cosolvente polar y miscible con el H<sub>2</sub>O. Además, Kliachko y colaboradores (1988) han demostrado que el comportamiento en micelas invertidas de varias enzimas, con diferentes estados de agregación oligomérica, está de acuerdo con la respuesta de las enzimas a un tamaño micelar óptimo. Estos autores demuestran que de acuerdo con los estados de agregación ensayados, es que se pueden obtener varios valores de  $W_0$  óptimos y que cada valor correspondería a un estado de agregación específico, y por tanto, a un diámetro oligomérico diferente (monómero, dímero, tetramero etc.). En algunos casos se ha probado la existencia de varios picos de actividad en respuesta al parámetro  $W_0$ , los diferentes máximos de actividad corresponden a estados de agregación coexistentes que son activos. En nuestro estudio desgraciadamente no contamos con ninguna enzima con estados de agregación diferentes y activos. La catalasa bovina, a pesar de ser un tetramero formado por subunidades idénticas no se le ha probado que sea activa en otro estado que no sea el tetramero, por lo tanto no contamos con los diferentes estados de agregación deseables para nuestros experimentos.

En el caso de la GlcN-6-P desaminasa los estudios realizados por Calcagno y colaboradores (1991; 1992) tienden a demostrar que existe una interacción muy fuerte entre las subunidades para dar su estado hexamérico de agregación, de hecho la enzima está considerada como un dímero de trímeros y

no se tiene idea sobre si los trímeros son capaces de manifestar alguna actividad.

El criterio aplicado a los experimentos realizados para la catalasa y la NADH DH, no pudo ser aplicado de igual forma para la GlcN-6-P desaminasa; aquí es claro que la enzima, a pesar de tener una respuesta cinética de campana muy clara, frente al parámetro  $W_0$ , la inclusión de cosolventes polares en la mezcla de reacción micelar produjo cambios en la cinética que aún no podemos explicar. Estos cambios fueron de 2 tipos: 1) la concentración baja de cosolvente produjo un discreto corrimiento hacia valores mayores de  $W_0$  (de 4 unidades). Esto podría ser explicado por cambios discretos en la conformación enzimática, que daría un arreglo menos compacto, del que se tiene en agua; 2) El segundo tipo de cambio, es más sorprendente, pues a concentraciones altas del cosolvente (20, 25 y 30%) se produce un cambio notable en la cinética de respuesta, tendiendo a desaparecer la curva de campana y produciendo curvas que cada vez son más hiperbólicas.

En años anteriores ha habido una larga discusión sobre el significado de las curvas de campana (Khmelnitsky y cols, 1989; Kliachko y cols., 1988 Luisi, y Magid, 1986), para el parámetro  $W_0$ . Se entiende claramente que la parte ascendente de la curva de actividad se produzca en respuesta a un incremento en el agua libre micelar; de hecho, la activación de las enzimas generalmente ocurre cuando se alcanza un  $W_0$  de 10, que en el caso de las micelas invertidas de AOT, corresponde a la aparición del agua libre en el interior de la micela. Se requiere de 8 a 10 moléculas de agua para solvatar (hidratar) al radical sulfonato del AOT (Luisi y Magid, 1986; Thompson y Gierasch, 1984). Del mismo modo, no es fácilmente explicable el por qué una vez alcanzada la máxima actividad ( $W_0$  óptimo) la actividad de la enzima decae con el

incremento del agua o tamaño micelar y sobre todo, porque en algunos casos, como la GlcN-6-P D, a valores elevados de  $W_0$  la enzima está prácticamente inactiva.

Al revisar la bibliografía (Kliachko y col., 1988; Martinek y col., 1986; Khmel'nitsky y col., 1989) sobre micelas invertidas se encuentra que el 99% de los casos reportados, con cinéticas de campana, corresponden al detergente AOT (-), pero de acuerdo a nuestra investigación bibliográfica, existe un sólo caso reportado para el CTAB (+). Más aún, nuestros estudios con la GlcN-6-P desaminasa presentan curva de campana en micelas de AOT y comportamiento hiperbólico con CTAB (J.R. Dávila, comunicación personal). Varios autores han considerado que el comportamiento de campana podría estar relacionado con efectos adversos del AOT sobre la actividad de las enzimas (Pshezhetskii y col, 1993). Estos efectos adversos (inhibición) de alguna manera requieren de agua libre en concentraciones significativas dentro de la micela; esta condición probablemente favorecería la partición del detergente desde el medio acuoso intramicelar hacia sitios específicos de la enzima, donde al penetrar el detergente interferiría con la actividad enzimática.

La presencia de cosolventes en la micela invertida tendría un efecto notable en la polaridad del medio intramicelar: a medida que aumentamos la concentración del cosolvente se disminuye la polaridad del agua libre intramicelar. Algunos estudios con la GlcN-6-P desaminasa (Jorge Dávila) tienden a demostrar que en el medio intramicelar de AOT, la enzima permanece refractaria al sustrato (conformación supertensa), en ausencia del efector alostérico heterotrópico. Esto ha sido explicado satisfactoriamente por un efecto inhibitorio directo del AOT sobre el sitio heterotrópico de la enzima; por esto, cuando nosotros incluimos los solventes polares, disminuyendo la

polaridad del medio acuoso micelar, de alguna manera estamos interfiriendo con la partición del AOT hacia el sitio heterotrópico y, por lo tanto revertimos parcialmente el estado supertenso de la enzima.

Los resultados explican satisfactoriamente el papel del tamaño micelar en la actividad enzimática expresada, sin embargo estas conclusiones no son extensivas a todas las enzimas, específicamente a la GlcN-6-P desaminasa, la cual tiene un comportamiento que no se ajusta a nuestra predicción. Esta controversia pone de manifiesto que es necesario conocer más acerca de las interacciones no deseadas entre los detergentes empleados para formar un sistema de micelas invertidas y las enzimas ensayadas.

Las explicaciones que se han propuesto para entender las cinéticas de campana de micelas invertidas de AOT son ambiguas y en este sentido al menos existen 2 casos comprobados de inactivación de la enzima en cuestión, por el AOT, éste es el caso del citocromo c (cyt c), para el cual se ha demostrado que el AOT tiene un fuerte efecto inhibitorio y tal es el caso, también con el mismo detergente, sobre el comportamiento de la GlcN-6-P desaminasa, descrito en este trabajo.

## 6. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones:

1.- Se determinó que la catalasa y la NADH DH, para llevar a cabo su actividad enzimática dentro de micelas invertidas de AOT/isooctano/agua, sienten el tamaño de la cavidad micelar y no la cantidad de agua dentro de la micela.

2 - Que se necesitan solventes polares, para sustituir al agua dentro de las micelas invertidas, que presenten una viscosidad similar a las de la misma agua (como etilenglicol y/o DMSO) para que las enzimas no presenten alguna alteración en su comportamiento cinético.

3.- Que la Glc-6-P desaminasa presenta un comportamiento diferente al presentado por las enzimas antes mencionadas dentro de micelas invertidas de AOT/isooctano/agua, esto se debe, posiblemente, a que la enzima al ser alosterica y necesitar de un activador heterotrópico para su cambio de estado supertenso a relajado el solvente polar esté revirtiendo, parcialmente el estado supertenso y permita una respuesta discreta de activación por sustrato.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano, M.M.**, Plumbridge, J.A., Hernández-Arana, A. y Calcagno, M., 1991, "Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from aminoacid sequence and circular dichroism spectroscopy", *Biochem Biophys Acta*, 1076 (2): 266-272.
- Altamirano, M.M.**, Plumbridge, J.A. y Calcagno, M., 1992, "Identification of two cysteine residues forming a pair of vecinal thiols in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* and a study of their funcional role by site-directed mutagenesis", *Biochemistry*, 31: 1153- 1158.
- Ayala, G.**, Nacimiento, A., Gómez-Puyou, A. y Darzon, A., 1985, "Extraction of mitochondrial membrane proteins into organic solvents in a funtional state", *Biochem. Biophys. Acta*, 810: 115-122.
- Bonner, E.J.**, Wolf, R. y Luisi, P.L., 1980, "Micellar solubilization of biopolimers in hidrocarbon solvents. I. A structural model for protein-containing reverse micelles", *J. Solid-Phase Biochem.*, 5: 255-268.
- Bru, R.**, Sánchez-Ferrer, A. y García-Carmona, F., 1989, "A theoretical study on the expression of enzymic activity in reverse micelles", *Biochem. J.*, 259: 355.
- Bru, R.**, Sánchez-Ferrer, A. y García-Carmona, F., 1995, "Kinetics models in reverse micelles", *Biochem. J.*, 310 (3): 721-739.
- Calcagno, M.**, Campos, P.J., Mulliert, G. y Suástegui, J., 1984, "Purification, molecular and kinetics properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*", *Biochem. Biophys. Acta*, 787: 165-173.
- Clegg, J.S.**, 1984, "Properties and metabolism of the aqueous cytoplam and its boundaries", *Am. J. Physiol.*, 246 (2): 133-151.
- Clegg, J.S.**, 1986a, "Artemia cysts as a model for the study of water in biological systems", *Methods Enzymol.*, 127: 230-239.
- Clegg, J.S.**, 1986b, "The physical properties and metabolic status of Artemia cysts at low water contens" en: *Membranes, Metabolism and Dry Organisms* (Leopold, C., ed), Cornell Univ. Press, Nueva York.

- Delord, P.** y Larche, F.C., 1984, "Hydrolysis of aerosol-OT and phase diagram", *J. Colloid Interface Sci.*, 98 (1): 227-228.
- Drost-Hansen, W.** y Clegg, J.S., Cell Associated Water, Academic Press, New York, 1979.
- Douzou, P.**, 1980, "Cryoenzymology in aqueous media", *Adv. in Enzymol.* 50: 1-74.
- El Seoud, O.A.**, Reverse Micelles, (Luisi y Straub, eds.), Plenum Press, Nueva York, 1984.
- Escamilla, J.E.**, Ramírez, R., Del Arenal, I.P., Zarzoza, G. y Linares, V., 1989, "Expression of cytochrome oxidases in *Bacillus cereus*: effects of oxygen tension and carbon source", *J.Gen. Microb.*, 133: 3549-3555.
- Fletcher, P.D.I.**, Robinson, B.H. y Tabony, J., 1988, "A quasi-elastic neutron-scattering study of the molecular mobility of water associated with a protein both in aqueous solution and adjacent to a charged surfactant interface", *Biochim Biophys Acta*, 954(1):27-36
- Haber, J.**, Mąslakiewicz, P., Rodakiewicz-Novak, J. y Walde, P., 1993, "Activity and spectroscopic properties of bovine liver catalase in sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate/isooctane reverse micelles", *Eur. J. Biochem.*, 217:567-573.
- Hanahan, D.L.**, 1953, "The enzymatic degradation of phosphatidyl choline in diethyl ether", *J. Biol. Chem.*, 155: 199-209.
- Hazlewood, C.F.**, 1979, "A view of the significance and understanding of the physical properties of cell-associated water" en: Cell-Associated Water (Drost-Hansen, W. y Clegg, J.S., eds.) Academic, Nueva York.
- Hernández-Arana, A.**, Rojo-Domínguez, A., Altamirano, M.M. y Calcagno, M., 1993, "Differential scanning calorimetric of the irreversible denaturation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase", *Biochemistry*, 32 (14): 3644-3648.

- Hilhost, R.**, Laane, C. y Veerger, C., 1983, "Enzymatic conversion of apolar compounds in organic media using an NADH-regenerating system and degradation as reductant", *FEBS Letters*, 159: 225-228
- Khmelnitsky, Y.L.**, Kavanov, A.V., Klyachko, N.L., Levashov, A.V., y Martinek, K., 1989, "Enzymatic catalysis in reverse micelles" en: *Structure and Reactivity in Reverse Micelles*, (Pileni, ed), pp. 230-261, Elsevier, Amsterdam.
- Kliachko, N.L.**, Merker, Sh., Vakula, S.V., Ivanov, M.V. y Berezin, I.V., 1988, "Regulation of the catalytic activity of oligomeric enzymes in a system of reversed surfactant micelles" *Dokl Akad Nauk SSSR*, 298(6):1479-1481.
- Klibanov, A.M.**, 1986, "Enzymes that work in organic solvents", *CHEMETEC*, 16: 354-359.
- Lang, D.R.**, Felix, J. y Lungren, D.G., 1972, "Development of a membrane bound respiratory system prior to and during sporulation in *Bacillus cereus* and its relationship to membrane structure", *J. Bacteriol.*, 110: 968-977.
- Levashov, A.V.**, Khmelnitski, Y.L., Klyachko, N.L., Cherniak, V. Y. y Martinek, 1982, *J. Colloid. Interface Sci.*, 88: 444-450.
- Levashov, A.V.**, Ugolnikova, A.V., Ivanov, M.V. y Klyachko, N.L., 1997, "Formation of homo- and heterooligomeric supramolecular structures by D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in reversed micelles of aerosol OT in octane" *Biochem Mol Biol Int*, 42(3):527-534
- Leser, M.E.**, Wei, G., Luisi, P.L. y Maestro, M., 1986, "Application of reverse micelles for the extraction of proteins", *Biochem Biophys Res Commun*, 135 (2): 629-635.
- Luisi, P.L.** y Magid, L.J., 1986, "Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions", *Crit. Rev. Biochem.* 20: 409-474.
- Luisi, P.L.**, Giomini, M., Pileni, M.P. y Robinson, B.H., 1988, "Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules", *Biochim. Biophys. Acta*, 947: 209-246.

-**Martinek, K.**, Levashov, A.V., Khmelnskiy, Y.L., Khachko, N.L. y Beresi, N.L., 1982, "Colloidal solutions of water in organic solvents: a microheterogeneous medium for enzymatic reactions", *Science*, 218: 889-891.

-**Martinek, K.**, Levashov, A.V., Klyachko, N., Khmelnski, Y.L. y Berezin, I.V., 1986, "Micellar enzymology", *Eur. J. Biochem.*, 155: 453-468.

-**Mastro, A.M.** y Keith, A.D., 1984, "Diffusion in the aqueous compartment", *J. Cell Biol.*, 99 (2):180s-187s.

-**Nametkin, S.P.**, Kabanov, A.V., Kliachko, N.L. y Levashov, A.B., 1991, "Alkaline phosphatase in reverse micelles of surfactants inorganic solvent", *Bioorg Khim*, 17(5):606-609

-**Pileni**, 1989, en: *Structure and Reactivity in Reverse Micelles*, (Pileni, ed), pp. 230-261, Elsevier, Amsterdam.

-**Pshezhetskii, A.V.**, Beier, E.M., Buneeva, O.A., Vinogradova, M.V., Levashov, A.V., Vidershain, G., 1993, "Human glycosidase in the AOT reversed micelle system: features of properties and kinetic regularities of catalysis", *Bioorg Khim*, 19(2):161-73

-**Tanner, J.E.**, 1983, "Intracellular diffusion of water", *Arch. Biochem. Biophys.*, 224: 416-428.

-**Thompson, K.F.** y Gierasch, L.M., 1984, "", *J. Am. Chem. Soc.*, 106: 3648-3652

-**Voss, K.**, Laane, C. y Visser, A.J.W.G., 1987, "Spectroscopy of reversed micelles", *Photochem. Photobiol.* 45: 863-878.

-**Vries, S.** y Grivell, A., 1988, "Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*", *Eur. J. Biochem.*, 176: 377-384.

-**Wojcieszyn, J.W.**, Schlegel, R.A., Wu, E.S y Jacobson, K.A., 1981, *Proc Natl. Acad. Sci. (USA)*, 78: 4407-4410.

-**Wong, M.**, Thomas, J.K. y Gratzel, M., 1976, Fluorescence probing of inverted micelles. The state of solubilized water clusters in alkane/diisooctyl sulfosuccinate (Aerosol OT)”

-**Wong, M.**, Thomas, J.K. y Nowak, T., 1977, “Structure and state of H<sub>2</sub>O in reverse micelles”, *J. Am. Chem. Soc.*, 99: 4730-4737.

-**Zaks, A.** y Klibanov, A.M., 1984, “Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C”, *Science*, 224: 1249-1251.

-**Zaks, A.** y Klibanov, A.M., 1986, “Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs water is reversed”, *J. Am. Chem. Soc.*, 108: 2767-2768.