



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Purificación y caracterización fisicoquímica y estructural de
una lectina de la hemolinfa de *Megathura crenulata* (Mollusca:
Gastropoda)**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ADRIÁN QUINTERO MARTÍNEZ

Tutora: Dra. Alejandra Hernández Santoyo

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Sta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis maestros, familiares y amigos quienes
me han alentado a continuar.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a las facultades de Ciencias y de Química por darme la oportunidad de instruirme en sus aulas.

Al Instituto de Química de la UNAM, por brindarme las facilidades y el espacio para la realización de esta tesis.

A los miembros presentes y pasados del Departamento de Bioquímica del Instituto de Química, quienes me han acompañado y guiado en mi desarrollo académico y personal. En especial, a la Dra. Adela Rodríguez Romero quien me permitió ingresar como estudiante a él.

A mi directora de tesis, la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, y a los miembros del jurado: Dra. Alejandra Hernández Santoyo, Dra. Adela Rodríguez Romero, M. en IBB. Claudia Segal Kischinevzky, Biól. Jorge Antonio García Álvarez y M. en C. María de los Remedios Josefina Ramírez Rangel, por haber revisado la presente tesis.

A la M. en C. Michelle Gold Morgan del taller de Análisis de los Problemas Biológicos Nacionales y del Mercado de Trabajo del Biólogo por el análisis de las implicaciones ontológicas y epistemológicas en el desarrollo de este trabajo.

« La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés. »

Louis Pasteur

INDICE

	Pág.
RESUMEN	1
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	6
GENERALIDADES	8
Clasificación de las lectinas animales: clases y familias	8
Interacciones lectina-ligando	9
Multivalencia de las lectinas animales.....	13
Las interacciones débiles proteína-proteína y la unión multivalente lectina-carbohidrato	13
ANTECEDENTES	16
BIOLOGÍA DE <i>Megathura crenulata</i>	17
Posición taxonómica de <i>M. crenulata</i>	18
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares.	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Material biológico.....	21
Extracción y purificación	21
Preparación de los estromas de eritrocitos.....	21
Preparación de eritrocitos formalinizados	22
Determinación de la actividad hemaglutinante.....	22
Cuantificación de proteína	23
Curva de calibración	23
Espectro de absorción UV-visible	24
Estabilidad de la proteína.....	24
Cuantificación de carbohidratos totales en la muestra de proteína.....	25
Identificación del ligando	25
Estudios electroforéticos.....	28
Estudios de espectrometría de masas MALDI-TOF.....	28
Estudios mediante dispersión dinámica de luz	29
Estudios mediante dicroísmo circular	30
Estudios de calorimetría de titulación isotérmica	31
Cristalización	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
Extracción y purificación.....	34
Masa molecular y punto isoeléctrico	34
Espectro de absorción de luz UV-visible.....	37
Determinación de la actividad y rendimiento de la purificación	38
Contenido de carbohidratos	40
Pruebas de estabilidad.....	41
Identificación de ligandos	44
Estudios mediante DLS.....	46

Efecto de la temperatura en el comportamiento de agregación de la lectina de la hemolinfa de <i>M. crenulata</i>	46
Estudios mediante dicroísmo circular	48
Contenido de estructura secundaria	48
Efecto de la temperatura en el contenido de estructura secundaria	49
Efecto de la adición de laminaribiosa en el contenido de estructura secundaria	53
Estudios de Calorimetría de Titulación Isotérmica	56
Cristalización	59
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

RESUMEN

Las lectinas son proteínas que reconocen glicótopos, pero tienen un origen distinto al de las inmunoglobulinas. Estas proteínas participan en numerosos eventos biológicos. En este trabajo, se purificó una lectina de tipo C de la hemolinfa de la lapa *Megathura crenulata*. La purificación se realizó por afinidad a membranas de eritrocitos glutaraldehizados de conejo. Se caracterizó la proteína, encontrando una masa molecular aproximada de 100 kDa por MALDI-TOF y un pI de 7.8. También se determinó el contenido de estructura secundaria y el efecto de la adición de laminaribiosa en la estructura por dicroísmo circular. Estos resultados mostraron que la proteína presenta un contenido más elevado de hélices alfa que de hojas beta. Este resultado difiere del determinado para la estructura de la lectina de *Musa acuminata*, la cual presenta una estructura constituida exclusivamente por hojas beta. Se observó que la temperatura modificó levemente el contenido de estructura secundaria de la proteína, mientras que con la adición del ligando sólo se observó un ligero incremento en el contenido de hélice alfa. Esta tesis reporta los resultados de estudio del efecto de la temperatura y de la adición de los ligandos laminaribiosa y GlcNAc en el tamaño de partícula y polidispersidad de la proteína. Los resultados reflejaron que el aumento de la temperatura tiene un efecto significativo ($p < 0.05$) en la masa molecular de la proteína, incrementándola notoriamente. Por otra parte, la adición de los azúcares laminaribiosa y GlcNAc tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) incrementando la masa molecular de la proteína. La lectina fue inhibida por laminaribiosa y GlcNAc. A la fecha, esta lectina purificada es la segunda encontrada con una unión preferencial a laminaribiosa, después de la lectina reportada para *Musa acuminata*. Un estudio de calorimetría de titulación isotérmica mostró que la unión a laminaribiosa se lleva de forma espontánea, en una reacción exotérmica y en la que existen dos sitios secuenciales con cooperatividad negativa. En los ensayos preliminares de cristalización se obtuvieron microcristales de la lectina en varias condiciones del kit Cristal Clear 1. La interacción con el β -glucano laminaribiosa es importante desde el punto de vista biológico, ya que este tipo de azúcares estimulan la respuesta inmune tanto en invertebrados como en vertebrados.

ABREVIATURAS

Å: Ångstrom

Asn: Asparagina

Asp: Ácido aspártico

BSA: Albúmina de suero de bovino

BCA: Ácido bicinconínico (Bicinchoninic Acid)

CEL-I: Lectina-I de *Cucumaria echinata*

CMC: Carboximetilcelulosa

CPK: Modelo de Corey-Pauling-Koltun

CRD: Dominio de reconocimiento a carbohidrato (Carbohydrate Recognition Domain)

DC: Dicroísmo circular

DLS: Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering)

ECF: Eritrocitos formalinizados de conejo

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

ERGIC-53: Marcador 53 del compartimiento intermedio retículo endoplásmico-Golgi (ER-Golgi intermediate compartment marker-53)

FRIL: Lectina que interactúa con el receptor Flt3 (Flt3 receptor-interacting lectin)

ΔG : Energía libre de Gibbs

Gln: Glutamina

g : Fuerza centrífuga relativa

GAG: Glicosaminoglicano

GalNAc: N-acetil-D-galactosamina

GlcNAc: N-acetil-D-glucosamina

ΔH : Entalpía

HA: Hialuronano

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico

ITC: Calorimetría de titulación isotérmica

K: Constante de unión

kDa: Kilodaltones

λ : Longitud de onda

MALDI-TOF: Espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por la matriz

Man: Manosa

μL : microlitros

μmol : micromoles

mR: receptor de manosa

n: Estequiometría de reacción.

NAM: Ácido N-acetilmurámico

NANA: Ácido N-acetilneuramínico

nm: nanómetros

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PEG: Polietilenglicol

PBS: Amortiguador de fosfatos salino

pI: Punto isoeléctrico

ΔS : Entropía

S4GGnM: SO₄-4GalNAc β 1, 4GlcNAc β 1,2Man α , una secuencia de oligosacáridos muy común en glicoproteínas.

SDS: Dodecil sulfato de sodio

Siglec: Lectina que une ácido siálico; un grupo de lectinas relacionadas estructuralmente

T: Temperatura

TBS: Amortiguador de Tris-HCl salino

Tris: Tris (hidroximetil) amino-metano

TSG-6: Gen estimulado-6 del factor de necrosis de tumor

UA: Unidades de absorbancia

UV: Ultravioleta

VIP-36: proteína vesicular integral de membrana 36

INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas de origen distinto a las inmunoglobulinas, con las cuales comparten el hecho de pertenecer al sistema de defensa de los organismos y el de reconocer epítomos o glicótopos específicos. Las lectinas, en particular, se unen a carbohidratos y no despliegan actividad enzimática hacia los azúcares que reconocen, ni alteran en modo alguno su estructura covalente (Kocourek y Horejsi, 1983). Se encuentran en todos los seres vivos, desde las bacterias y plantas, hasta animales e incluso virus. El reconocimiento de carbohidratos se da en un gran número de contextos biológicos diferentes. Por lo tanto, las lectinas son un grupo altamente diverso de proteínas, que está formado de varias familias no relacionadas.

En el caso particular de las lectinas animales, que incluyen a la lectina del presente estudio, no son un grupo homogéneo y con un origen común, sino que se han agrupado en familias diversas, aunque debe aclararse que varias si son homólogas o poseen un origen común.

A pesar de que existen numerosos estudios de lectinas, los referentes a lectinas de invertebrados no son suficientes para comprender plenamente su funcionamiento y sus estructuras son prácticamente desconocidas. Las lectinas en los moluscos son parte fundamental de su sistema de reconocimiento protoinmune. Por lo tanto, para tener una mejor idea de la intervención de estas proteínas en el reconocimiento de carbohidratos de la superficie de organismos patógenos, es importante conocer las bases de la estructura de las lectinas y de la interacción lectina-carbohidrato.

Se ha demostrado que las lectinas tienen un papel importante en la mediación de la inmunidad basada en células, particularmente en la fagocitosis, en los moluscos (Chen *et al.*, 1999). En los animales se ha demostrado que los β -1,3-glucanos, como la laminaribiosa, funcionan como estimulantes exógenos para las células. En los vertebrados inician la vía alternativa del complemento y activan macrófagos y monocitos murinos y humanos para matar bacterias, parásitos y células tumorales (Böggwald *et al.*, 1982; Diluzio *et al.*, 1979).

En el presente estudio, se realizó la purificación y caracterización desde un punto de vista fisicoquímico y estructural de una lectina del molusco marino *Megathura crenulata*, donde

además se analizaron el tipo de interacciones proteína-proteína y proteína-ligando que presenta la misma, dando importancia a la interacción que exhibe la proteína con laminaribiosa, dada la importancia que tiene biológicamente la interacción con β -1,3-glucanos.

GENERALIDADES

Clasificación de las lectinas animales: clases y familias

Originalmente las lectinas, tanto de animales como de otros organismos, se clasificaban de acuerdo a las secuencias de carbohidratos que reconocían y a las cuales se adherían mejor. Sólo con el advenimiento de la clonación molecular, emergió un sistema de clasificación más consistente, basado en la similitud de secuencia de aminoácidos y en la relación evolutiva de estas secuencias (Tabla 1). La primera de tales clasificaciones la creó Drickamer (1988), basado en ciertos motivos de secuencia de aminoácidos altamente conservados en los dominios de reconocimiento de carbohidratos de dos grupos de lectinas.

Tabla 1. Clases y familias de lectinas animales (Varki *et al.*, 1999).

Tipificación basada en similitud de secuencias			
Clase	Características en la secuencia	Dependencia de calcio	Reconocimiento de carbohidrato
Tipo C (incluye selectina, colectinas, etc.)	Motivo de secuencia de lectina tipo C	Sí (la mayoría)	Altamente diverso
Tipo S (galectinas)	Motivo de secuencia tipo S	No	Beta-galactósidos y poly-N-acetil-lactosaminas
Tipo P (M6PRs)	Motivo repetitivo único	Variable	Man-6-P en N-glicanos de tipo de alta manosa
Tipo I (incluye la familia Siglec)	Dominios semejantes a inmunoglobulina	No	Ácidos siálicos (Siglecs), otros
Calnexina, calcireticulina, calmegina	Similitud entre ellas	Sí	N-glicanos de tipo de alta manosa en el retículo endoplásmico
Proteínas de unión a hialuronanos (CD44, proteína de unión, verscana, agrecana)	Similitud de secuencia en el sitio de unión	No	Cadenas de hialuronano
Lectinas de huevos de rana	Similitud de secuencia	Sí	Galactosa, ácidos siálicos, heparina
Agrupamientos con base en criterios diversos			
Clase	Características en la secuencia	Dependencia de calcio	Reconocimiento de carbohidrato
Pentraxinas	Estructuración de subunidades pentaméricas	Sí (la mayoría)	Variable
Proteínas de unión a glicosaminoglicanos	Agrupaciones de aminoácidos básicos (variable)	No	Glicosaminoglicanos
ERGIC-53 y VIP-36	Similitud a secuencias		Posiblemente glicanos de la

	de lectinas vegetales		vía retículo endoplásmico-Golgi
Receptor de S4GnM	Dominio rico en Cys en la proteína de unión a manosa	No	Residuos GalNAc sulfatados en hormonas glicoproteicas de la pituitaria
Proteínas de unión a gangliósidos	Sin información de secuencia	No	Glicolípidos sialilados
Proteína de unión a sulfoglucoronosil lípidos	Sin información de secuencia	Sí	Sulfoglucoronosil glicolípidos
Lectinas de la hemolinfa de los insectos	Sin información de secuencia		Ácidos siálicos
Interleucinas I y II		No	Oligosacáridos de alta manosa

Interacciones lectina-ligando

Las interacciones lectina-ligando pueden ser divididas en dos grupos generales: aquellas que involucran N- y O-glicanos, las cuales han sido muy estudiadas, (Figuras 1 y 2) (Varki *et al.*, 1999) y aquellas que involucran cadenas GAG (la mayoría mediadas por arreglos ordenados de contactos de carga superficial) (Figuras 3 y 4). Los principios que han emergido de las primeras, son los siguientes: Primero, los sitios de unión son de baja afinidad relativamente y se encuentran en cavidades poco profundas de la superficie de las proteínas. Segundo, la selectividad se da mayoritariamente por medio de una combinación de puentes de hidrógeno (que involucran a los grupos hidroxilo de los azúcares) y por empaquetamiento originado por fuerzas tipo Van der Waals de la cara hidrofóbica de los anillos de monosacáridos contra las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos. Tercero, la selectividad también puede ser otorgada por los puentes de hidrógeno entre moléculas de agua o de iones divalentes. Finalmente, la región de contacto real entre el sacárido y el polipéptido involucra típicamente a sólo un residuo de monosacárido. Como consecuencia de ello, estos sitios de unión de las lectinas tienden a tener una afinidad relativamente baja, pero son de gran especificidad (Figura 2). La capacidad de los sitios de baja afinidad para mediar interacciones biológicamente relevantes en el sistema de defensa, al parecer requiere de multivalencia. (Rini, 1995; Weis y Drickamer, 1996).

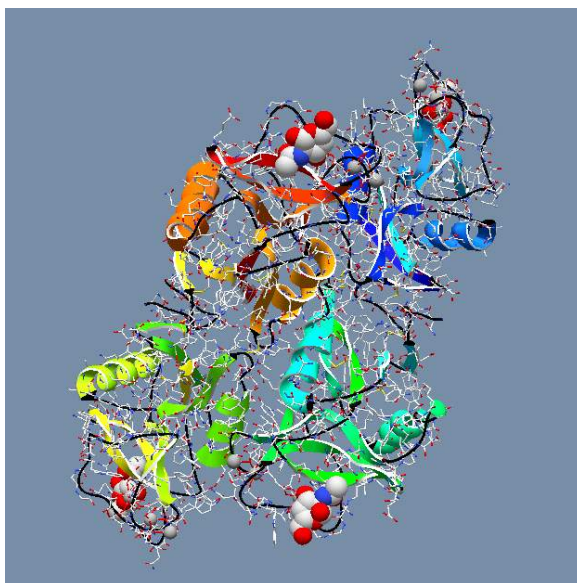


Figura 1. Estructura de CEL-I de *Cucumaria echinata*, en complejo con GalNAc (Sugawara *et al.*, 2004).

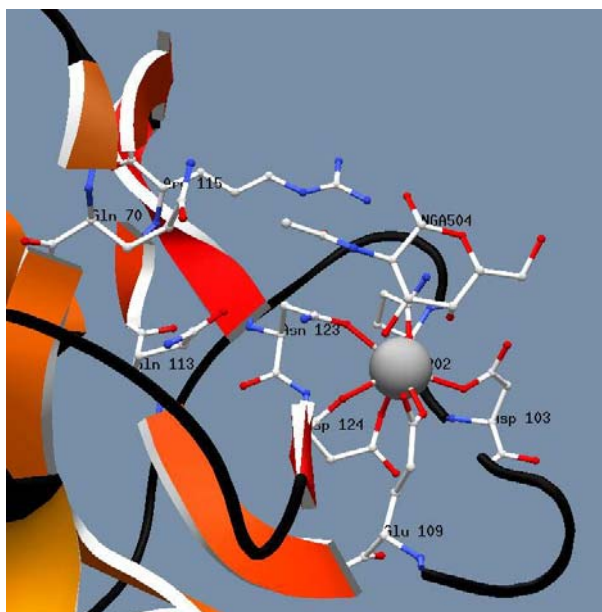


Figura 2. La GalNAc se coordina con el CA2 por medio de sus 3-OH y 4-OH. Estos grupos forman puentes de hidrógeno con la Gln¹⁰¹, la Asp¹⁰³, la Glu¹⁰⁹, la Asn¹²³, la Arg¹¹⁵ y la GalNAc. Además la GalNAc tiene contactos de Van der Waals con la Gln⁷⁰ y la Asn¹²³ (Sugawara *et al.*, 2004).

Respecto a las interacciones lectina-GAG, no se ha reportado mucha información. Sin embargo, recientemente se han resuelto estructuras que han revelado varias características

sobre estas interacciones, no obstante, no se comprenden bien algunas especificidades, como en el caso de la interacción anexina-GAG. Una de las estructuras que ha aportado mayor información, ha sido la de la proteína TSG-6 en complejo con un octasacárido de hialuronano, estructura que ha revelado además los cambios conformacionales llevados a cabo para interactuar con el azúcar (Figura 3) (Itshitsuka *et al.*, 1998; Blundell *et al.*, 2003). A diferencia de las lectinas que unen N- y O-glicanos, las cuales tienden a reconocer los monosacáridos terminales específicos de las cadenas de polisacáridos, acomodándolos en cavidades de unión poco profundas pero relativamente bien definidas, las interacciones proteína-GAG involucran agrupamientos superficiales de aminoácidos cargados positivamente que se alinean contra las regiones internas de las cadenas aniónicas de los GAG. Cabe señalar que las características descritas para las interacciones lectina-GAG son sólo generalizaciones que se han establecido a partir de muy pocos estudios estructurales realizados, las cuales podrían reflejar tan sólo particularidades de ciertas interacciones. Es necesario que se tenga más información de otros ejemplos de interacción de este tipo para que se puedan establecer aspectos generales de las interacciones lectina-GAG, los cuales sean abundantes como los que se tienen para interacciones de tipo lectina-N- y O-glicanos.

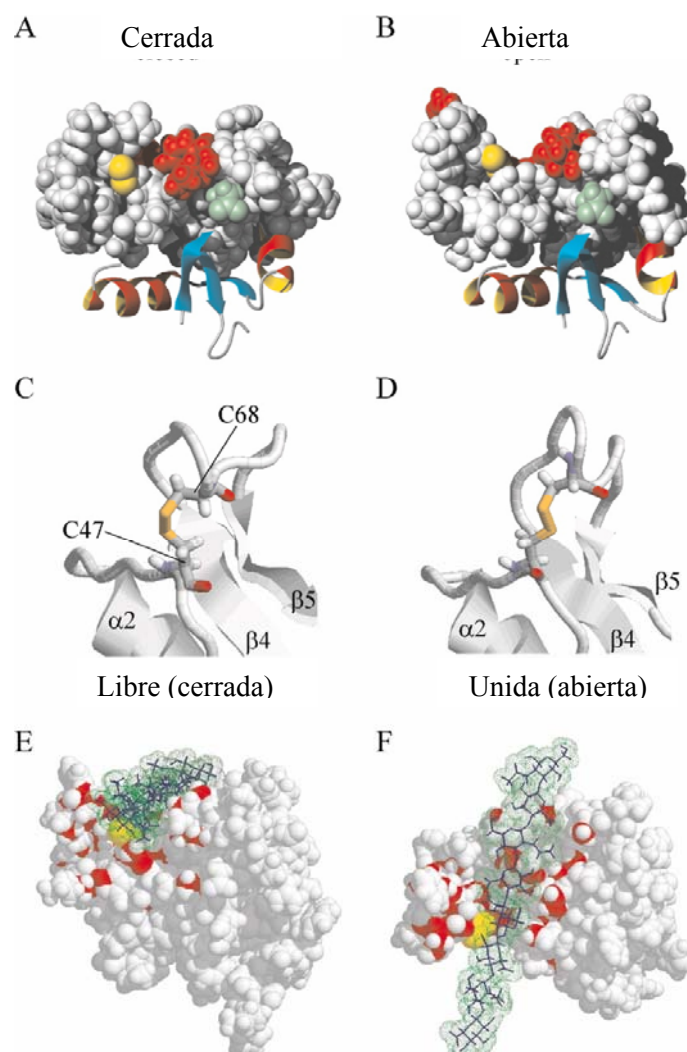


Figura 3. La interacción de hialuronano (HA) con la región de unión de la TSG-6 induce la apertura del surco de unión. *A* es el estado de mínima energía y *B* está unida a un octasacárido de HA, en la misma orientación. El cambio conformacional abre un surco, exponiendo residuos clave para la unión a HA (en rojo); el sitio de unión puede ser extendido, lo que resulta en una interacción de mayor afinidad con el HA. Los estados cerrado (*A*) y abierto (*B*) difieren principalmente en la geometría del puente disulfuro (átomos de azufre mostrados en amarillo) que se encuentra uniendo el giro $\beta 4$ - $\beta 5$ a la conexión rígida entre la hélice $\alpha 2$ y la estructura $\beta 4$, como se muestra por varillas en *C* y *D*. En *E* y *F*, el surco abierto, que está alineado con átomos que experimentan perturbaciones significativas por la unión con el ligando (rojo), puede acomodar un octasacárido de HA (varillas azules y esferas atómicas verdes) en una geometría favorable sin impedimentos estéricos. *F*, rotación de 90° hacia el lector alrededor del eje horizontal de la TSG-6 unida al octasacárido de HA, en relación a *E* (Blundell *et al.*, 2003).

Multivalencia de las lectinas animales

Hasta la década de los noventas, todas las lectinas animales descubiertas habían sido multivalentes, ya fuera por su estructura multimérica definida o por poseer múltiples sitios de unión a carbohidrato en un solo polipéptido (Sharon, 1993). La avidéz generada por la unión multivalente a sitios de baja afinidad parece ser un mecanismo común para la optimización de la función de las lectinas (Varki *et al.*, 1999). La primera excepción a esta regla general la constituyen las selectinas que sólo poseen un dominio de reconocimiento de carbohidrato (CRD), el cual se localiza extracelularmente (McEver *et al.*, 1995). La misma situación se aplica para las Siglecs (Varki, 1997). Sin embargo, está surgiendo evidencia que indicaría que las moléculas se vuelven funcionalmente multiméricas, ya sea por asociación no covalente o por la aglomeración sobre superficies celulares (Lee, 1992; Drickamer y Taylor, 1993). Aún se espera saber si una unión biológica significativa de cualquier lectina animal puede surgir de una interacción estrictamente monovalente. Hay que mencionar que una lectina puede poseer varios sitios de unión para múltiples ligandos, como en el caso del receptor de manosa de los macrófagos que es conocido por unirse no sólo a mananos, sino también, por medio de otro CRD distinto, a residuos de GalNAc 4-O-sulfatados de las hormonas glicoproteicas de la glándula pituitaria (Kornfeld, 1992).

Las interacciones débiles proteína-proteína y la unión multivalente lectina-carbohidrato

Las lectinas multivalentes pueden formar complejos entrecruzados con epítopos de carbohidrato multivalentes que se clasifican en dos tipos distintos (Brewer, 1996): Los entrecruzados lineales, llamados de tipo I, que son la mayoría solubles y ocurren entre una lectina divalente y un carbohidrato divalente y los entrecruzados no lineales, de dos o tres dimensiones, llamados de tipo II, que son la mayoría insolubles y que ocurren cuando las lectinas y/o los carbohidratos involucrados tienen una valencia mayor a dos. La formación de complejos entrecruzados de tipo II confiere especificidad adicional a las lectinas, ya que los complejos homogéneos entrecruzados se forman incluso en presencia de mezclas de

lectinas y carbohidratos o glicoproteínas (Gupta *et al.*, 1994). Se piensa que esta especificidad adicional llega a ser importante cuando una lectina entrecruza glicoconjugados en la superficie celular, lo que comúnmente lleva a efectos de transducción de señales (Heldin, 1995).

Estudios realizados con la FRIL (lectina que interactúa con el receptor de Flt3), que incluyen la resolución por cristalografía de un complejo de la FRIL con un trisacárido, proveen de imágenes que evidencian como las interacciones débiles proteína-proteína son importantes para formar nuevos sitios de unión al ligando (Hameryck *et al.*, 2000) (Figuras 4 y 5).

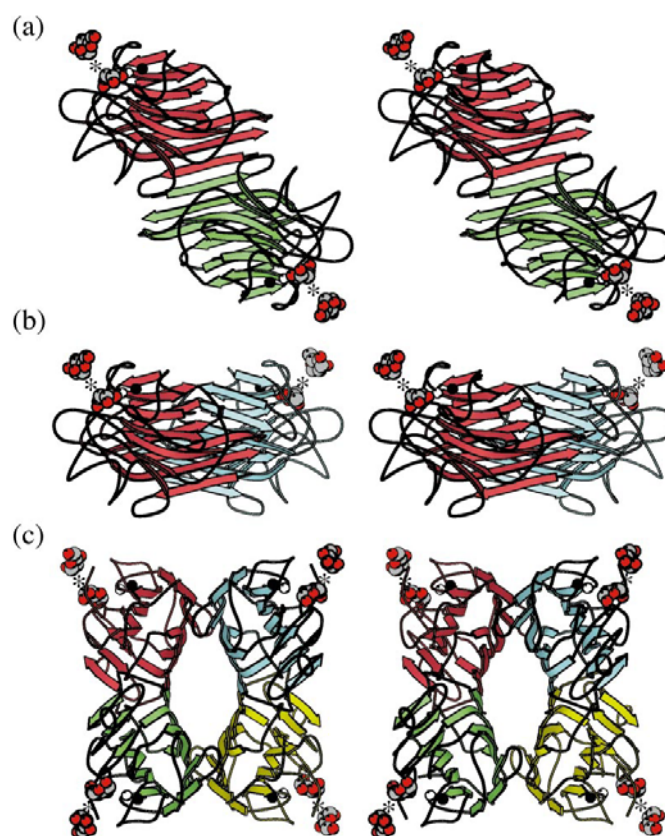


Figura 4. (a), Vista en estéreo del dímero canónico de FRIL en complejo con M3M6M. Ambas subunidades están mostradas en diferentes colores. Los iones Ca^{2+} se muestran como esferas blancas y los iones Mg^{2+} como esferas negras. Los residuos Man visibles se muestran como modelos CPK. (b), vista en estéreo del dímero de FRIL en complejo con el trisacárido $\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}$. Esta vista es idéntica a la vista en (a). (c), vista en estéreo del tetrámero de FRIL semejante a Con A (Hameryck *et al.*, 2000).

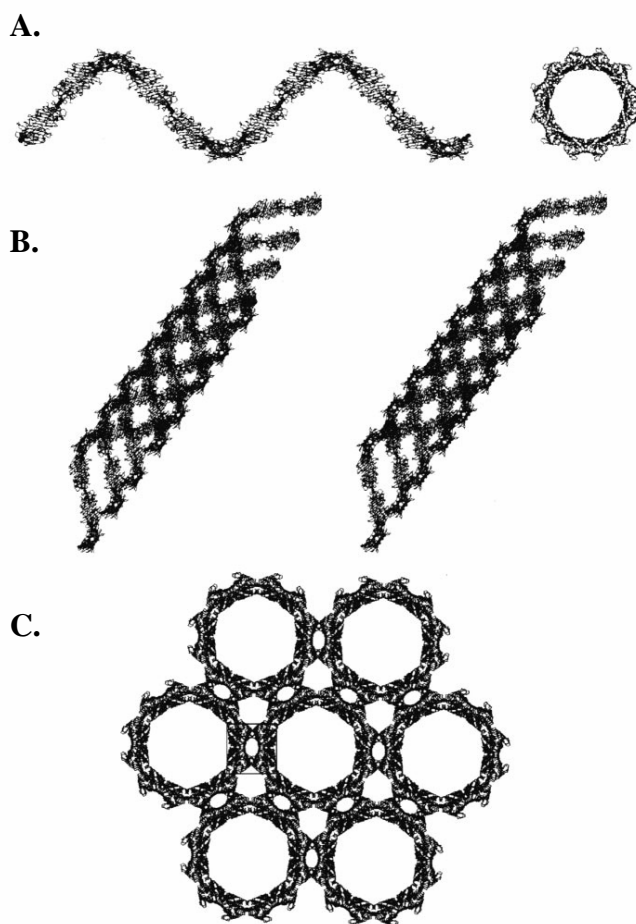


Figura 5. *A*, hélice singular de dímeros canónicos de FRIL entrecruzados. El azúcar se muestra como un modelo CPK negro, el dímero de FRIL se representa como un trazado de C^{α} . La vista es perpendicular al eje. La parte derecha de la figura muestra una vista de la hélice a lo largo de su eje helicoidal. *B*, vista estéreo de la hélice cuádruple de dímeros canónicos de FRIL entrecruzados. *C*, una vista del empaquetamiento de la FRIL en el cristal, a lo largo de su eje helicoidal. Se muestra una superhélice cuádruple central, junto con sus seis superhélices vecinas. Cada dímero canónico de FRIL de una superhélice forma un tetrámero de tipo Con A con un dímero de la superhélice vecina (Hamerlyck *et al.*, 2000).

ANTECEDENTES

Desde finales del siglo pasado ha habido un interés renovado en los papeles biológicos y la evolución de las lectinas (Ey y Jenkin, 1982). El descubrimiento de que los invertebrados exhiben lectinas en la superficie de hemocitos fagocíticos, las cuales pueden selectivamente unirse a bacterias y hongos patógenos, estimuló estudios en estas lectinas como posibles moléculas de reconocimiento involucradas en mecanismos de defensa (Vasta, 1987). Sus papeles en la agregación celular de las esponjas y la modulación de las relaciones simbióticas en tunicados y taclubos fueron explorados durante esos años (Uhlenbruck *et al.*, 1977; Müller, Zahn *et al.*, 1981; Müller, Maidhof *et al.*, 1984).

Durante los últimos años se han reportado caracterizaciones de numerosas lectinas de invertebrados y protocordados: de tunicados (Pearce *et al.*, 2001), crustáceos (Cominetti, *et al.*, 2002) y moluscos, inclusive se han hecho comparaciones entre las lectinas de algunos moluscos (Wootton *et al.*, 2003).

Con el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, la investigación en la estructura de los genes, su expresión y evolución ha rendido información importante relacionada con las lectinas de invertebrados (Hatakeyama *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2004).

Los estudios estructurales de lectinas, comenzaron en 1970, con la resolución de la estructura cristalina de la concanavalina A (Edelman *et al.* 1972; Hardman, 1972). La primera estructura de una lectina animal, la cual fue una galectina humana, la resolvieron Lobsanov *et al.* (1993). Desde entonces se han elucidado varias estructuras de lectinas animales, tanto en su forma libre como en complejo con carbohidratos. Se conocen las estructuras tridimensionales de al menos un miembro de cada una de las trece familias de lectinas animales reconocidas por Loris (2002). Sin embargo, en lo que respecta a la resolución de estructuras tridimensionales de lectinas de invertebrados, solamente se tienen la estructura de la SAP de *Limulus polyphemus* (Shrive *et al.*, 1999), la CEL-I de *Cucumaria echinata* (Hatakeyama *et al.*, 2002) y de la CEL-III también de *C. echinata* (Uchida *et al.*, 2004). Y, en lo que respecta a las lectinas de moluscos, solamente se ha logrado cristalizar la aglutinina de *H. pomatia*, aunque difractó a baja resolución y no se pudo resolver su estructura (Lisgarten, 1999).

En cuanto a las lectinas presentes en la hemolinfa de *M. crenulata*, se tienen reportes de detección de actividad hemaglutinante. En 1981, Decker y sus colaboradores detectaron una actividad hemolisante trabajando con monocitos de la especie sobre eritrocitos humanos. Esta actividad fue baja, en comparación con otros organismos en tiempos cortos (8 horas), aunque en exposición larga (24 horas), hemolisó una proporción elevada de eritrocitos, en comparación con otros invertebrados. En el estudio se observó además una mayor actividad hemolizante a 10 °C y a 20 °C que a temperaturas más elevadas y se detectaron carbohidratos que podrían ser identificados como posibles ligandos de lectina, al evitar en mayor grado la hemólisis de eritrocitos. Para eritrocitos de pollo se detectaron como posibles inhibidores los siguientes azúcares: celobiosa, D-galactosa, gentiobiosa y L-fucosa; mientras que para eritrocitos humanos se observó inhibición significativa con gentiobiosa.

En cuanto a las interacciones con β -1,3-glucanos se ha detectado presencia de lectinas, todas de tipo C y con receptores tipo MR en varios organismos (McGreal *et al.*, 2005). En vertebrados se ha detectado en numerosos organismos, especialmente en peces y mamíferos (Fock *et al.*, 2001). En invertebrados se han estudiado sobre todo en artrópodos, principalmente insectos (Chen *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2004; Duvic y Brehélin, 1998; y en crustáceos (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). También se han detectado en tremátodos (Mikeš y Horák, 2001) y en algunos moluscos (Renwrantz *et al.*, 1978; Renwrantz y Stahmer, 1983)

BIOLOGÍA DE *Megathura crenulata*

La especie *M. crenulata* (Fig. 6) se caracteriza por tener de 6.35 a 10.16 cm de longitud y 0.51 cm de altura. La concha posee un orificio apical grande, con lados redondeados, de un sexto de la longitud de la concha y bordeado externamente por un margen blanco. Su interior es blanco brillante. El margen basal está finamente crenado. El exterior está cubierto de pequeños bultos y de color morado-café claro. El animal es mucho más grande que la concha, con un pie masivo de color amarillo y un manto café que casi cubre la

concha entera. Es un organismo común en muchas áreas rocosas de marea baja, tales como rompeolas. Habita la costa occidental norteamericana, desde Monterey, California hasta la Baja California (Abbott, 1974).

Posición taxonómica de M. crenulata

Clase: Gastropoda Cuvier, 1797

Subclase: Prosobranchia Milne-Edwards, 1848

Orden: Archaeogastropoda Thiele, 1925

Suborden: Pleurotomariinae Cox y Knight, 1960

Súperfamilia: Pleurotomariaceae Swainson, 1840

Familia: Pleurotomariidae Swainson, 1840

Subfamilia: Diodorinae Odhner, 1932

Género: *Megathura* Pilsbry, 1890; sinonimia: *Macrochasma* Dall, 1915

Especie: *Megathura crenulata* (Sowerby, 1825)



Figura 6. *Megathura crenulata* (Gastropoda: Pleurotomariidae; Sowerby, 1825).

JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios estructurales referentes a lectinas de invertebrados no son suficientes para comprender plenamente su funcionamiento. Respecto a las lectinas de moluscos, las estructuras son prácticamente desconocidas.

En lo particular, las lectinas en los moluscos son parte fundamental de su sistema de reconocimiento protoinmune. Por lo tanto, para tener una mejor idea de la intervención de estas proteínas en el reconocimiento de carbohidratos de la superficie de organismos patógenos, es importante conocer la estructura de las lectinas y las bases de la interacción lectina-carbohidrato.

El estudio de las interacciones que presenta la proteína con laminaribiosa tiene una gran importancia biológica. Las lectinas tienen un papel importante en la mediación de la inmunidad celular, tal como la fagocitosis. Ésta se ha observado en varios moluscos (Remwranz y Stahmer, 1983) y en insectos (Chen *et al.*, 1999). En los estudios anteriores, las lectinas interactuaban con los hemocitos efectores como receptores en la superficie celular o como mediadores libres en el plasma. Se ha sugerido que los ligandos con los que interactúan estos receptores/mediadores incluyen tanto glicoproteínas endógenas como componentes microbianos como peptidoglicanos bacterianos, polisacáridos y componentes de las paredes celulares fúngicas, incluyendo β -1,3-glucanos. En los animales, los β -1,3-glucanos actúan como estimulantes exógenos para las células que despliegan varias funciones biológicas. En los vertebrados los β -1,3-glucanos pueden iniciar la vía alternativa del complemento y activar monocitos humanos y murinos para contrarrestar bacterias, parásitos o células tumorales. En los invertebrados se sabe que estimulan mecanismos de defensa contra infecciones fúngicas y activan el sistema de coagulación en *Limulus polyphemus* (Nakamura *et al.*, 1986). Tales funciones podrían estar mediadas por las proteínas que se unen a estos carbohidratos, como la lectina en estudio.

Teniendo en cuenta los aspectos mencionados anteriormente, este trabajo pretende contribuir al conocimiento de lectinas de moluscos y su selectividad hacia ligandos, ya que es muy escasa la información que se tiene de lectinas en estos organismos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar fisicoquímica y estructuralmente una lectina, purificada del pleurotomárido *Megathura crenulata* (Sowerby, 1825) y sus interacciones proteína-proteína y proteína-ligando.

Objetivos particulares.

- a) Caracterizar bioquímicamente una lectina purificada de la hemolinfa de *M. crenulata*; determinar su punto isoeléctrico, masa molecular, especificidad y los valores óptimos de temperatura y de pH para su actividad.
- b) Estudiar el comportamiento en solución y las interacciones proteína-proteína por técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS).
- c) Determinar la proporción de estructura secundaria de la proteína y los cambios conformacionales llevados a cabo durante la interacción proteína-ligando mediante técnicas de dicroísmo circular (DC).
- d) Determinar los parámetros termodinámicos de la interacción proteína-ligando por técnicas de calorimetría de titulación isotérmica (ITC).
- e) Establecer las condiciones iniciales de cristalización de la proteína.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se obtuvieron organismos de la especie *M. crenulata*, provenientes de Bahía de Todos Santos, Baja California, que se mantuvieron vivos hasta su uso.

Extracción y purificación

La hemolinfa de los ejemplares de *M. crenulata* se obtuvo por drenado utilizando una jeringa. El drenado se llevó a cabo por punción en el pie muscular practicada hasta alcanzar la cavidad corporal principal. Posteriormente, se dejó que coagularan los hemocitos y se centrifugó a 13 000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante (suero) se diluyó cinco veces con amortiguador TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 6.5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM). Este suero se mezcló con estromas de eritrocitos de conejo, técnica derivada de la presentada por Zenteno *et al.* (1991), originalmente desarrollada por Ochoa y Kristiansen (1978). Los estromas se encontraban glutaraldehizados para promover la estabilidad de sus residuos de glicoconjugados.

Para eluir la proteína, unida a los estromas de eritrocitos, se utilizó un gradiente escalonado de NaCl (0.5 M, 1.0 M y 3.0 M) en TBS.

La fracción con actividad se repurificó usando dos valores de pH (5.5 y 7.5). Ambas fracciones eluidas mostraron actividad, pero la fracción obtenida a pH 7.5 mostró una sola banda en un gel de SDS-PAGE. La otra fracción fue congelada para un uso futuro.

Preparación de los estromas de eritrocitos

Los estromas se glutaraldehizaron según la técnica de Ochoa y Kristiansen (1978). Los estromas se obtuvieron por hemólisis de eritrocitos de conejo, que se lavaron en amortiguador de fosfatos hipotónico (Fosfato monobásico 100 mOsm, pH 7.4). Los estromas se liofilizaron y después de su secado, se polimerizaron con glutaraldehído. Se colocaron 52 mg de estromas liofilizados en 23 mL de amortiguador TBS y se mezclaron

2.5 mL de una solución de glutaraldehído al 25 % y pH a 7.2 ajustado con KOH. Posteriormente se incubaron durante 16 h a 20 °C, el material polimerizado fue lavado extensivamente con amortiguador TBS y se incubó nuevamente durante 12 h con 1 M de glicina en TBS, para neutralizar los grupos glutaraldehído libres reactivos en los estromas.

Preparación de eritrocitos formalinizados

Los eritrocitos se formalizaron según la técnica de Fragkiadakis (2000). Se colectó sangre de conejo por decapitación. Los eritrocitos fueron lavados extensivamente con una solución 0.9 % de NaCl. Posteriormente se preparó una solución de 25 mL de formalina (formaldehído al 37 %) y se ajustó a pH 5.0 usando un amortiguador de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.0. La solución se dializó utilizando una membrana con un corte molecular de 12500 contra una suspensión de 100 mL de eritrocitos de conejo (20 % v/v en el amortiguador de fosfatos 50 mM, conteniendo 150 mM de NaCl) en agitación durante 12 h, a 4 °C. Después se perforó la membrana con una aguja con el fin de que el fomaldehído fluyera rápidamente y fijara a los eritrocitos por 36 h, a 4 °C. Después de la fijación, los eritrocitos se precipitaron (15000 g, 5 min, 4 °C) y se lavaron extensivamente con NaCl al 0.9 %. Para unir los grupos aldehído libres presentes en la superficie de las células, los eritrocitos se suspendieron (20 % v/v) en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.5, 150 mM NaCl y 2 % de albúmina de suero bovino y se incubaron en agitación por 24 h a 4 °C. Finalmente los eritrocitos se precipitaron (15000 g, 5 min, 4°C), se lavaron extensivamente con NaCl 0.9 % y se guardaron a 4 °C en presencia de 0.05 % de NaN_3 .

Determinación de la actividad hemaglutinante

La actividad de lectina se determinó mediante eritroaglutinación de células de conejo formalinizadas según la técnica de Fragkiadakis (2000), como se describió anteriormente. Para medir la actividad de la lectina se empleó la técnica de la aglutinación con la mínima concentración de lectina presente en el medio. Para ello, se utilizaron placas de microtitulación con fondo en forma de “U”. En las placas se colocaron 50 μL de amortiguador TBS-Ca y en el primer pozo se puso 50 μL de las fracciones de interés. Posteriormente se realizaron diluciones sucesivas 1:2 a lo largo de las filas de la placa. Finalmente se añadieron 50 μL de una solución de eritrocitos formalinizados de conejo al 10 % (w/v) y las muestras se observaron bajo el microscopio después de 20 minutos. Las

muestras se compararon con un control positivo en el que se colocó aglutinina de germen de trigo. Como control negativo se realizó el mismo ensayo sin presencia de muestra de proteína. Estos ensayos de actividad se realizaron usando diversos aditivos (CaCl_2 , NaCl , MgCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 , PEG, glucosa, EDTA, glicerol, sorbitol y manitol) y varias temperaturas (4 °C, 18 °C, 25 °C y 30 °C).

Cuantificación de proteína

Se utilizó el método de Smith *et al.* (1985), el cual emplea el reactivo BCA Protein Assay Reagent (PIERCE), que es muy sensible en la determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína en soluciones acuosas. Este sistema de reactivos combina la reacción de grupos peptídicos adyacentes de proteínas con Cu^{+2} en un medio alcalino (produciendo Cu^{+1}), con un reactivo altamente selectivo y sensible de detección para Cu^{+1} llamado ácido bicinónico (BCA). Este reactivo es estable y compatible con detergentes iónicos y no iónicos. El color púrpura del producto de la reacción es formado por la interacción de dos moléculas de BCA con un ion cuproso (Cu^{+1}), soluble en agua y que exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm.

La cantidad de proteína contenida en la muestra se determinó interpolando el dato de absorbancia en una curva tipo elaborada con estándares de albúmina de bovino a diferentes concentraciones.

Curva de calibración

Para el análisis de las muestras y la construcción de la curva de calibración (Figura 7), se siguió el protocolo de PIERCE. Se colocaron 50 μL de diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (estándar) en tubos. Como blanco se utilizó TBS.

Se adicionó a cada tubo 1 mL del reactivo que contiene al BCA. Se mezcló e incubó por 30 min a 60°C. Se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 562 nm.

Para la cuantificación de las proteínas de interés, se realizó la misma metodología, reemplazando los estándares por las muestras.

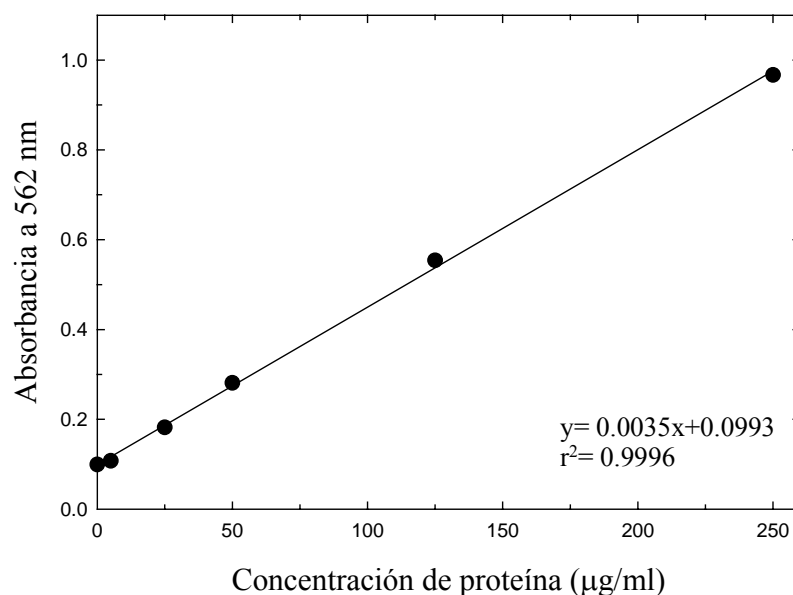


Figura 7. Curva de calibración de proteína utilizando el método de BCA a 60 °C y albúmina de suero de bovino como estándar.

Espectro de absorción UV-visible

Con el fin de conocer el espectro de absorción de la proteína, se colocó una muestra con una concentración de 2 mg/mL en una cubeta de cuarzo y se realizó un barrido de longitud de onda desde 200 nm a 800 nm, usando un espectrofotómetro modelo TU-1901 de Beijing Purkinje General Instrument.

Estabilidad de la proteína

Con el fin de evitar la pérdida de la conformación nativa y por ende el de la función de la lectina se probaron diversas condiciones de temperatura y aditivos con el fin de favorecer su estabilidad. Estas condiciones incluyeron concentraciones 2 mM de varias sales de iones monovalentes y divalentes (CaCl_2 , NaCl , MgCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2) y otros aditivos como PEG, glucosa, EDTA, glicerol, sorbitol y manitol, todos al 2 %. Las condiciones de temperatura fueron 4 °C, 18 °C, 25 °C y 30 °C. También se realizaron pruebas con dos amortiguadores (TBS y fosfatos) a un mismo valor de pH. El efecto de estas variables se observó midiendo la actividad hemaglutinante como parámetro relacionado estrechamente a la estabilidad

estructural de la proteína. En todas las pruebas de actividad hemaglutinante se utilizó una concentración de proteína de 0.2 mg/mL.

Cuantificación de carbohidratos totales en la muestra de proteína

Para conocer el contenido de carbohidratos de la muestra se utilizó el método colorimétrico presentado por Dubois *et al.* (1956). Se utilizaron curvas de calibración con soluciones de D-xilosa y de D-glucosa. Se utilizó una longitud de onda de 480 nm para cuantificar pentosas y de 490 nm para cuantificar hexosas. La muestra utilizada tenía una concentración de 2 mg/mL. El contenido de carbohidratos se expresó como porcentaje de la masa de la proteína, determinada experimentalmente.

Se colocaron 2 mL de la muestra en un tubo y se adicionó 0.05 mL de fenol al 80 %. Después se añadieron directamente a la solución 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se dejó reposar los tubos por 10 min y después se agitaron y se incubaron por 15 min, a 27 °C. Se leyó la absorbancia a 490 nm para cuantificar hexosas y a 480 nm para pentosas. Los blancos se prepararon sustituyendo la muestra por amortiguador TBS. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Le técnica aprovecha la reacción que sufren los azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados con grupos reductores libres o potencialmente libres con fenol y ácido sulfúrico concentrado. Esta reacción es sensible y da lugar a un color anaranjado amarillento estable. El método permite determinar concentraciones de azúcar y sustancias inferiores a 1×10^{-6} M.

Identificación del ligando

Los carbohidratos que tienen el papel de ligandos fueron identificados por una inhibición de actividad hemaglutinante. Con este motivo se utilizaron placas de micropozos con fondo en "U", a las cuales se les colocaron 25 µL de TBS-Ca, en los que se realizaron diluciones sucesivas de soluciones de diversos carbohidratos. Se añadieron 25 µL de proteína con una concentración de 0.2 mg/mL. Se mantuvo la placa en agitación durante 30 minutos a 4°C y posteriormente se añadieron 24 µL de solución de eritrocitos formalinizados de conejo al 2 %. Se dejó reposar la prueba y se observó bajo un microscopio estereoscópico, después de

24 horas. Como control positivo se realizó la prueba sin los carbohidratos. Los carbohidratos utilizados se observan en la tabla 2.

Tabla 2. Lista de sacáridos y glicoconjugados usados para la prueba de inhibición de hemaglutinación causada por la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*.[×]

Mono-sacáridos	Disacáridos	Trisacáridos	Polioles	Ácidos	Polisacáridos	GA G	Glicoproteína
D-Arabinosa	Celobiosa		D-Arabinitol	NANA	Inulina	HA	Mucina submaxilar bovina
D-Xilosa	Laminaribiosa		D-Manitol	NAM	Laminarina		
D-Glucosa	Sacarosa	Rafinosa	D-Sorbitol	D-glucurónico	Amilopectina		
D-Manosa	Trehalosa				CMC		
D-Galactosa	α -Lactosa				Fucoidana		
GlcNAc					Carragena ν		
GalNAc					Carragena κ		
D-Fructosa					Carragena λ		
α -L-ramnosa					Agarosa		
α -L-fucosa					Almidón		
Salicina					Xilano		
					Pectina		
					Quitosana		

[×] Las concentraciones más elevadas utilizadas fueron de 500 mM para mono, di y trisacáridos, polioles y ácidos y 5 mg mL⁻¹ para otros sacáridos y glicoconjugados.

Estudios electroforéticos

Para tener un conocimiento sobre la pureza y la masa relativa de la molécula, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE). La técnica de SDS-PAGE tiene la ventaja de separar las proteínas en función de su masa molecular. El uso de SDS permite la disociación de proteínas oligomerizadas mediante interacciones electrostáticas. El uso de agentes reductores como ditioneitol (DTT) o mercaptoetanol permite la ruptura de interacciones covalentes a través de puentes disulfuro intra o intermoleculares.

El SDS-PAGE se llevó a cabo en un equipo automatizado Phast-System (Pharmacia), siguiendo los protocolos establecidos en el manual del equipo y basados en el protocolo de Laemmli (1970). Se utilizó un Phastgel homogéneo de 12.5 (Pharmacia) y SDS-buffer strips (Pharmacia). Se aplicaron 5 μL de la muestra con una concentración de 2 mg mL^{-1} en un amortiguador Tris-HCl. La muestra se mezcló en una relación 1:1 con amortiguador de carga con y sin agente reductor. El gel se tiñó con el colorante Brilliant Blue G-25 (Pharmacia), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. También se utilizó la tinción con reactivo de Schiff para observar si estaba glicosilada.

Con el fin de determinar el punto isoeléctrico de la proteína se realizó una electroforesis de enfoque isoeléctrico en un gel de poliacrilamida al 10 %. En esta técnica se establece electroquímicamente un gradiente de pH en un gel de poliacrilamida que contiene anfóteras, entre un ánodo y un cátodo. Estos estudios se realizaron en un sistema de electroforesis automatizado PHAST-SYSTEM (Pharmacia). Se aplicaron 5 μL de la muestra con una concentración de 2 mg mL^{-1} en un IEF Phastgel con un gradiente de pH de 3 a 9 (Pharmacia). El proceso se siguió de acuerdo al protocolo del fabricante. Se utilizaron como marcadores los provistos por el fabricante. El gel se tiñó con el colorante Brilliant Blue G-25 (Pharmacia), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Estudios de espectrometría de masas MALDI-TOF

Para una determinación más precisa de la masa molecular y corroborar la pureza de la proteína purificada se utilizó la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF, usando un espectrómetro modelo Omniflex (Brüker Daltonics). La muestra (100 $\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$) se

mezcló en una relación 1:6 con una solución de la matriz de ácido sinapínico disuelto en 30 % acetonitrilo conteniendo 1 % de ácido trifluoroacético. Un microlitro de esta mezcla se depositó en el portamuestras y se dejó secar con el fin de que se formaran cristales.

En la técnica de MALDI un haz de láser pulsado incide en una muestra sólida y vaporiza e ioniza los compuestos. Las proteínas se mezclan con una matriz cristalizada, la cual es bombardeada con el láser. La matriz se ioniza, se suelta de la superficie y transfiere energía a la proteína cristalina, lo que causa su ionización y separación de la superficie.

Los espectros son relativamente simples, conteniendo sólo un pico mayor que corresponde al ión molecular cargado monovalentemente y en algunos casos se generan iones divalentes de la proteína. Para proteínas oligoméricas el pico mayor normalmente es el del monómero con picos menores para los oligómeros.

Estudios mediante dispersión dinámica de luz

Para estudiar el comportamiento de la lectina en solución, así como su estado de agregación y polidispersidad, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la proteína. Para estos estudios se utilizó una muestra de proteína con una concentración de 0.8 mg/mL, en un amortiguador TBS-Ca. Se evaluó el efecto de la temperatura (4 - 40 °C) en una muestra de proteína en amortiguador. El equipo utilizado para la medición fue un DynaPro-801 TC (Protein Solutions) con una longitud de onda del láser de 8414 Å con un ángulo de incidencia de 90 °. Para efectos de cálculo, se utilizó un índice de refracción del solvente de 1.333. Las correlaciones se realizaron mediante el software Dynamics versión 5.24.02, utilizando una curva estándar de proteínas globulares para convertir los radios moleculares a masa. El factor de radio hidrodinámico utilizado fue de 1.549.

Las técnicas de DLS son extremadamente sensibles a la presencia de pequeñas cantidades de agregados. La técnica presenta la ventaja de no ser destructiva y de dar información sobre el tamaño, la masa y la carga de una muestra de proteína. El estudio involucra la medición de la dispersión, la cual es una función del peso molecular y la concentración de la molécula en el solvente.

Debido a que la luz es coherente y monocromática, es posible observar fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad de la dispersidad usando un fotomultiplicador

como detector. Estas fluctuaciones provienen del hecho de que las partículas son suficientemente pequeñas para no estar sujetas a movimientos brownianos. La interferencia constructiva y destructiva de la dispersión de luz por partículas vecinas dentro de la zona iluminada, da origen a la fluctuación de la intensidad, que proviene del movimiento de las partículas y da información acerca de su movimiento. El análisis de la dependencia en el tiempo de la fluctuación de la intensidad puede dar información del coeficiente de difusión de las partículas, del cual, a través de la ecuación de Stokes Einstein y conociendo la viscosidad del medio, permite calcular el radio hidrodinámico de las partículas.

La ecuación de Stokes Einstein establece que el coeficiente de difusión es

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d}$$

Donde η es la viscosidad del diluyente, T es la temperatura, k_B es la constante de Boltzmann y d es el diámetro esférico de la partícula.

Estudios mediante dicroísmo circular

Con el fin de conocer el contenido de estructura secundaria y eventualmente tener una aproximación del grupo de la estructura terciaria de la lectina purificada, así como las modificaciones estructurales en el contenido de estructura secundaria, originados por la interacción con su ligando, se empleó la técnica de espectrofotometría de dicroísmo circular (CD), utilizando para las mediciones un espectropolarímetro Jasco J-720. Mediante esta técnica se observó el efecto de la temperatura en el contenido de estructura secundaria así como la modificación estructural provocada por la unión a laminaribiosa.

Para los análisis realizados por esta técnica se utilizó una muestra de lectina de la hemolinfa de *M. crenulata* con una concentración de 0.353 mg mL⁻¹ disuelta en un amortiguador de baja fuerza iónica (Tris-HCl 10 mM pH 6.5, 10 mM NaCl, 1 mM) y con barridos de longitud de onda entre 184-260 nm. Los experimentos realizados con laminaribiosa se efectuaron a 25 °C usando concentraciones de 0 – 5 μM. La muestra sin ligando fue analizada desde 5 a 30 °C con incrementos de 5 °C. El equipo fue calibrado con ácido canforsulfónico y se utilizó una celda rectangular con una longitud óptica de 0.1 cm. Se utilizaron como blancos amortiguadores con la misma concentración de laminaribiosa, para

cada una de los experimentos realizados. Los resultados se analizaron mediante los métodos de Hennessey y Johnson y de Kabsch Sander para el análisis sin ligando y con el método de Hennessey y Johnson para el estudio con laminaribiosa. Estos métodos están contenidos en el software Dicroprot 2000 1.0.4 (Deleage, 2000).

Estudios de calorimetría de titulación isotérmica

Con el fin de determinar los parámetros termodinámicos que rigen la interacción entre la lectina y el ligando que presentó la mayor interacción con la proteína (laminaribiosa), se llevó a cabo un experimento de calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

Para el estudio preliminar que se presenta, se escogió analizar la interacción con laminaribiosa, dada su importancia biológica que radica en que este tipo de glucanos estimulan la respuesta de defensa de muchos invertebrados. Estos experimentos se realizaron en un equipo VP-ITC (Microcal). Se utilizó una concentración de 11.692 mM de ligando en la jeringa para titular la muestra contenida en la celda, que contenía una concentración de proteína de 0.325 mM. Se realizaron 30 inyecciones (puntos de titulación), siendo la primera de 1 μL , mientras que las subsecuentes fueron de 4 μL . Las inyecciones se realizaron con un espaciado de 300 s. El experimento se llevó a cabo a una temperatura de 25 °C. Se realizó un experimento control en ausencia de la proteína, el cual fue restado del experimento de la titulación de la proteína. Los datos se integraron y analizaron con el software Microcal Origin versión 5.0 SR2.

La técnica de calorimetría de ITC es una forma de determinar directamente los parámetros termodinámicos de unión entre la lectina y su ligando. Un experimento típico se lleva a cabo por la adición en pasos de uno de los reactivos en la celda de reacción que contiene al otro reactivo. La reacción química creada por cada inyección puede liberar o absorber una cierta cantidad de calor (q_i) proporcional a la cantidad de ligando que se une a la proteína en una inyección particular ($v \times L_i$) y a la entalpía de unión (ΔH) para la reacción:

$$q_i = v \times \Delta H \times \Delta L_i$$

donde v es el volumen de la celda de reacción y ΔL_i es el incremento en la concentración del ligando unido después de la i inyección (Leavitt y Freire, 2001).

El instrumento utilizado opera con el principio de compensación de calor, por lo que la respuesta instrumental es la cantidad de potencia ($\mu\text{cal s}^{-1}$) necesaria para mantener constante la diferencia de temperatura entre la celda de reacción y una celda de referencia.

El gráfico obtenido es una serie de picos que representan la cantidad de calor liberado y absorbido por mol de ligando inyectado. Cada inyección se grafica como función de la concentración molar del ligando total y de la concentración total de la macromolécula, para generar una isoterma de unión. El calor después de cada inyección se obtiene calculando el área debajo de cada pico. Ya que la cantidad de proteína no unida disminuye después de cada inyección sucesiva, la magnitud de los picos se vuelve progresivamente más pequeña, hasta que se da una saturación completa.

Se hace un experimento inyectando únicamente amortiguador que genera picos correspondientes a la dilución o a efectos mecánicos que deben ser sustraídos de todos los picos de inyección antes del análisis. El área corregida de cada pico está dada por la ecuación indicada anteriormente para q_i , que se usa para el análisis de los datos. La cantidad ΔL_i es la diferencia entre la concentración de ligando unido entre la i inyección y la $i-1$ inyección y su forma funcional depende del modelo específico de unión.

La ITC es la única técnica que permite la determinación simultánea de los parámetros termodinámicos de unión K_a , ΔG , ΔH , $T\Delta S$ y n (número de sitios de unión por monómero de la macromolécula) en un solo experimento.

Cristalización

Una de las técnicas más importantes por las que conocemos las estructuras de moléculas es la difracción de rayos X. En la práctica se involucra la medición de patrones de difracción creados por la dispersión de rayos X de una red cristalina.

Sin embargo, no puede haber este tipo de estudios si no se dispone de un cristal adecuado. La obtención de los cristales a la fecha es, en general, un procedimiento de ensayo y error donde la proteína forma sólidos ordenados.

Para cristalizar la lectina purificada en este trabajo, se colocaron pruebas de cristalización utilizando cajas Limbro, mediante el método de difusión de vapor en su modalidad de gota suspendida (Figura 9). 5 μL de la proteína en amortiguador TBS (6.2 mg mL^{-1}) se

mezclaron con 5 μL de cada una de las soluciones contenidas en el Cristal Clear 1 de Hampton Research en portaobjetos siliconizados. El volumen de la solución en el reservorio fue de 300 μL y las pruebas se colocaron inicialmente a 4 °C durante 24 h y posteriormente fueron trasladadas a 18 °C y se observaron bajo un microscopio estereoscópico con polarizador. Todos los experimentos realizados en este trabajo fueron hechos por triplicado.

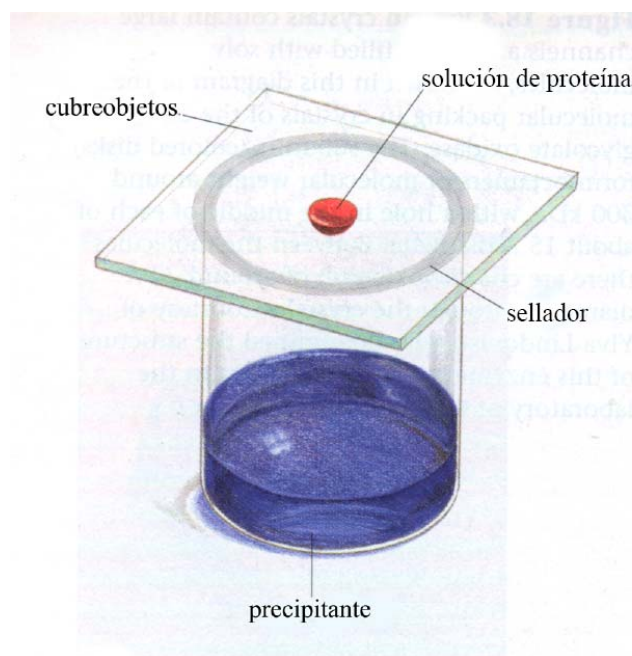


Figura 9. Prueba de cristalización con la técnica de difusión de vapor en gota colgante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y purificación

La lectina de la hemolinfa de *M. crenulata* se purificó como se explicó en la metodología. La figura 10 muestra el perfil cromatográfico de la elusión con un gradiente escalonado de NaCl. Al realizar los ensayos de actividad de eritroaglutinación de todas las fracciones, se observó que la fracción III, eluida con 1.0 M de NaCl fue la única en presentar actividad aglutinante. Puede notarse, sin embargo, que existen otras proteínas que se unen a los eritrocitos, sin que se traten de hemaglutininas. Entre estas proteínas se pueden encontrar sialidasas que degradan algunos glicoconjugados de las membranas de eritrocitos.

La repurificación de esta fracción, con estromas de eritrocitos y eluyendo inicialmente a pH 5.5 y posteriormente a pH 7.5 produjo respectivamente dos fracciones con actividad.

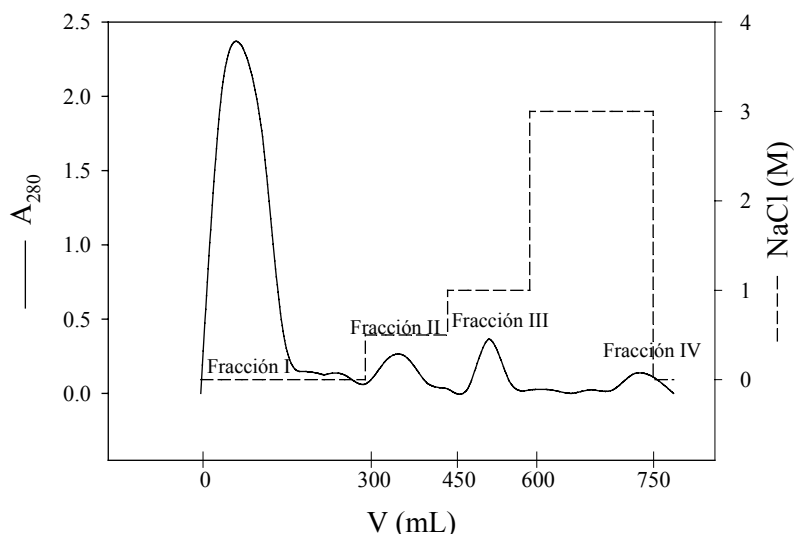


Figura 10. Cromatograma de purificación de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*. La purificación se realizó por pasos, variando la concentración de NaCl en el medio. La fracción con actividad es la denominada como Fracción III..

Masa molecular y punto isoeléctrico

La fracción eluida a pH 7.5 (F7.5) se cargó en un gel de SDS-PAGE, y migró como una sola banda por debajo del marcador de 66 kDa. La fracción eluida a pH 5.5 también migró

como una sola banda por debajo del marcador de 45 kDa, la cual no se muestra en la figura 11, ya que se determinó continuar trabajando con la fracción F7.5, debido a que esta fracción se encontraba pura después de realizar este sencillo método de purificación. La masa relativa calculada por regresión lineal fue de 62 kDa.

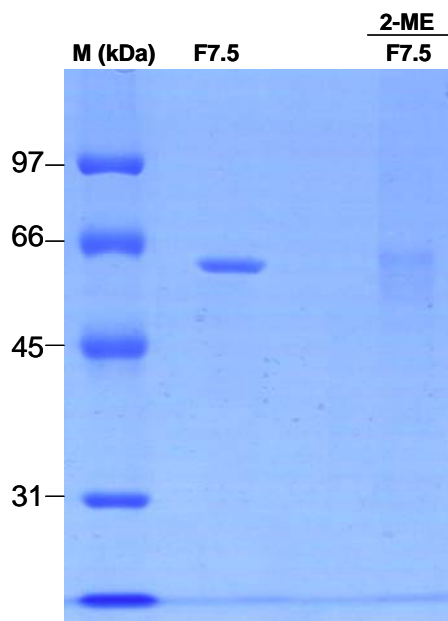


Figura 11. SDS-PAGE de la lectina de la hemolinfa de *Megathura crenulata*. En el carril uno se muestran marcadores de peso molecular con sus masas indicadas en kDa. En el carril tres se encuentra la muestra pura de la lectina y en el carril cinco se encuentra la misma muestra en presencia de mercaptoetanol.

Esta misma fracción, en el gel de IEF migró entre los marcadores de pI de 7.35 y 8.15. El cálculo del valor de pI para esta proteína por regresión lineal dio un valor aproximado de 7.8 (Figura 12).

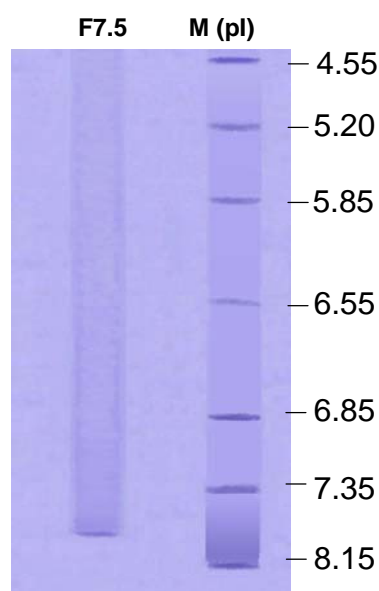


Figura 12. IEF de la muestra lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*. En el carril uno se encuentra la muestra purificada. En el carril tres se encuentran marcadores de punto isoeléctrico con sus pI indicados.

La determinación de masa por MALDI-TOF dio un pico ensanchado con un máximo alrededor de 100 kDa (Figura 13). Este tipo de señal es observado generalmente en proteínas con un alto contenido de carbohidratos. La masa determinada por espectrometría de masas corresponde al doble de la masa observada por SDS-PAGE para la proteína de interés. En SDS-PAGE, el detergente rompe las interacciones electrostáticas que podrían existir en moléculas oligomerizadas. Los resultados de la determinación de la masa molecular por espectrometría, sugieren en principio que la lectina se encuentra como un homodímero, razón por la cual se observó una única banda en SDS-PAGE y en el gel de IEF. Este hecho es importante para la valencia de la proteína, la cual podría unir más de un

glicótopo y por lo tanto llevar a cabo funciones biológicamente importantes como la aglutinación de patógenos.

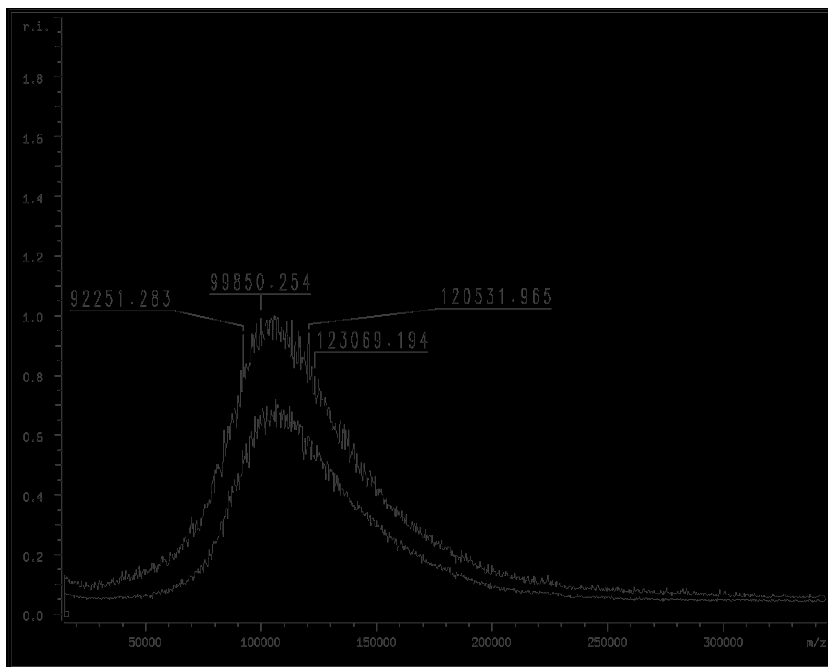


Figura 13. Espectro de masas de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata* obtenido mediante un sistema MALDI-TOF.

La masa hallada de esta lectina, en su estado monomérico se encuentra en el intervalo de las lectinas tipo C que reconocen β -1,3-glucanos, como las lectinas de la cercaria de *Diplostomum pseudospathaceum*, que tienen masas moleculares de alrededor de 22-24 kDa (Mikeš y Horák, 2001) y otras mayores como la lectina hexamérica del suero de *Blaberus discoidalis* (Chen *et al.*, 1999) con subunidades de 80-82 kDa. Una excepción ha sido la lectina del plasma de *Locusta migratoria* que tiene una masa de 260 kDa, la cual ha sido la lectina de este tipo de mayor tamaño reportada a la fecha (Duvic, 1998).

Espectro de absorción de luz UV-visible

El análisis de barrido de longitud de onda para la fracción F7.5 por espectrometría UV-visible produjo un espectro con un único máximo de absorción a 273 nm (Figura 14).

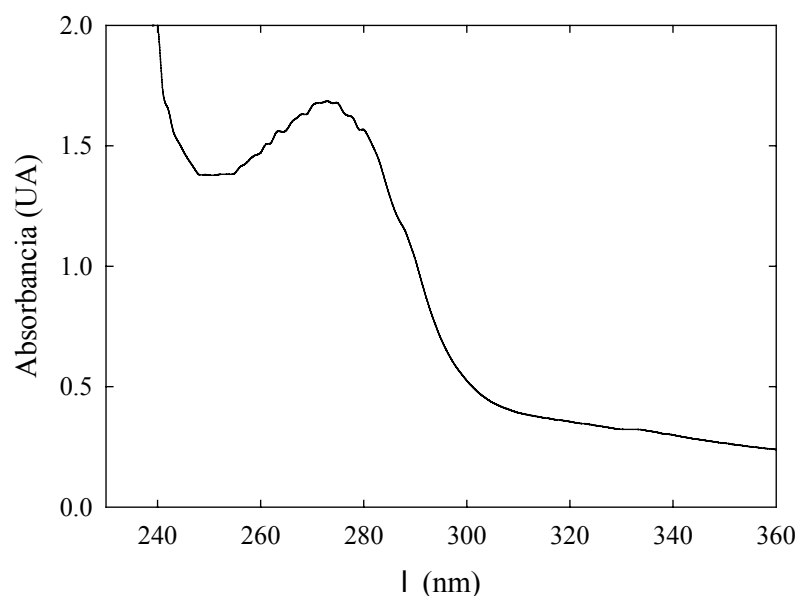


Figura 14. Espectro de absorción de luz de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*

Los máximos de absorción para las proteínas son observados alrededor de 280 nm, valor correspondiente a las absorciones de los aminoácidos aromáticos. Este resultado también nos descarta la existencia de hemocianina, como impureza de nuestra purificación, ya que la hemocianina, proteína abundante en la hemolinfa, presenta un máximo de absorción a 340 nm (Solomon *et al.*, 1994).

Determinación de la actividad y rendimiento de la purificación

Tabla 3. Tabla de purificación de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Actividad total (U*)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Suero	100	31998	632.5	51	100	1
Elución por fuerza iónica	40	1782	9.9	180	1.6	3.5
F7.5	3	252	1.2	210	0.2	4.2

* Una unidad de actividad es definida como el inverso de la máxima dilución en que se aprecia actividad hemaglutinante

La actividad hemaglutinante de la proteína de la fracción F7.5 fue de 210 U mg⁻¹. Este valor está dentro del intervalo de las actividades reportadas con los mismos parámetros para la lectina tipo C que reconoce β-1,3-glucanos del trématodo *Diplostomum pseudospathaceum*, que es de 16 – 1600 U mg⁻¹ (Mikeš y Horák, 2001). Se han reportado valores para lectinas de este tipo en otros invertebrados, sobre todo artrópodos, pero no se han medido en los mismos parámetros (Chen *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2004; Duvic y Berlín, 1998). Hasta el momento no se han reportado valores de actividad para lectinas de este tipo en moluscos, pero una lectina de tipo C purificada de la hemolinfa de *Aplysia* sp. tiene una actividad en un intervalo de 4-256 U mg⁻¹ (Gilboa-Garber y Wu, 2001). Los intervalos de actividad hemaglutinante se debe a que el valor depende del tipo sanguíneo y de la especie de donde se extrajeron los eritrocitos.

Estas actividades bajas son necesarias para que los organismos puedan utilizar una misma proteína con fines diversos. Una actividad específica baja es necesaria, por ejemplo para poder fácilmente desligar una lectina de una superficie celular y hacer que la proteína realice otras actividades (Varki, 1999).

La tabla 3 muestra los pasos de purificación y el rendimiento obtenido para la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*. A partir de veinte organismos se obtuvo en promedio 100 mL de hemolinfa, la cual se diluyó con amortiguador, como se reporta en la metodología. Cabe hacer notar el bajo rendimiento obtenido para esta lectina (1.6 %), el cual se justifica por el hecho de que estas lectinas son proteínas usadas en el sistema de defensa y son sintetizadas en gran medida como respuesta del organismo hacia patógenos y en estados reproductivos, cuando las lectinas tienen un papel identificando gametos de la misma especie y teniendo participación en el control del tiempo de vida de las células reproductivas (Dong *et al.*, 2004). Por lo tanto un individuo saludable y en estado no reproductivo sintetizará tan sólo una baja cantidad de estas proteínas.

La actividad total de la fracción pura F7.5, comparada con el suero redujo su valor drásticamente debido a que en los cálculos se considera la cantidad total de proteína, sin tener en cuenta únicamente a las lectinas. Con el protocolo establecido para su purificación, se alcanzó un grado de pureza con un factor de purificación de 4.2, en dos pasos, lo cual muestra que se trata de un procedimiento rápido para la purificación de la lectina de la

hemolinfa de *M. crenulata*. La actividad específica para la fracción eluida por fuerza iónica difiere mucho de la obtenida para la fracción F7.5, debido a que en esta fracción eluye también otra proteína con actividad hemaglutinante.

Contenido de carbohidratos

El análisis del contenido de carbohidratos arrojó una proporción de 16 % para pentosas y de 12.5 % para hexosas, con relación a su peso molecular. El contenido de azúcares se evidenció también por un SDS-PAGE teñido con reactivo de Schiff (Figura 15). Este valor de carbohidratos es bajo si se compara con otras glicoproteínas como la mucina submaxilar que contiene alrededor de 57 % de azúcares (Bettelheim *et al.*, 1962), pero alrededor del valor observado para otras lectinas, como la de *Astragalus mongholicus* que contiene un 19.6 % de azúcares (Yan *et al.*, 2005) o la de *Talisia esculenta* con un 18.8% (Freire *et al.*, 2002).

Al comparar el contenido de carbohidratos con lectinas de invertebrados, éste resulta similar al que presenta MrL-I (11%) e incluso superior al contenido de MrL-III (7%), dos lectinas de la hemolinfa de *Macrobrachium rosenbergii* (Pereyra *et al.*, 2004). El contenido de carbohidratos también es similar al de BAA-B (13 %) (Fenton-Navarro *et al.*, 2003), una lectina de *Bunodeopsis antilliensis* y al de la lectina de *Geodia cydonium* (Bretting *et al.*, 1981). En contraste, la lectina de *Branchiostoma lanceolatum* (2.7%) (Mock y Renwranz, 1991), así como la BAA-A (5%) se encuentran entre las lectinas con menor contenido de carbohidratos en invertebrados.

El contenido de carbohidratos en las lectinas podría establecer interacciones intermoleculares, en las que los azúcares expuestos, más que los aminoácidos de la cadena polipeptídica, serían los que establecieran la multimerización o agregación, como lo sugiere Jafari-Aghdam *et al.* (2005). Otra función conocida para los azúcares en las proteínas es la de brindar estabilidad a la estructura terciaria.

F7.5



Figura 15. SDS-PAGE teñido con reactivo de Schiff, en que se observa la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata* (F7.5), identificada como glicoproteína.

Pruebas de estabilidad

La estabilidad de la proteína se probó usando los amortiguadores TBS y PBS 50 mM pH 6.5 y conteniendo 150 mM de NaCl. La proteína en estas dos condiciones se dejó durante 24 h a 4 °C, periodo después del cual se midió la concentración de proteína como una variable relacionada con la estabilidad. La proteína en TBS mantuvo su solubilidad durante este periodo de tiempo, mientras que la puesta en amortiguador de fosfatos redujo en un 13 % su solubilidad. A partir de estos resultados se seleccionó como amortiguador de trabajo el TBS.

El efecto de la temperatura en la actividad hemaglutinante se observó a 4, 18, 25 y 30 °C (Figura 16). Los resultados de estos ensayos dieron un máximo de actividad a 4 °C y otro menos pronunciado a 25 °C. Este máximo de actividad a 4 °C podría justificarse por el hecho de que, a bajas temperaturas, los movimientos térmicos sean menores. Esta rigidización podría favorecer que los sitios de unión a azúcares se encuentren fijos y la unión se realice más fácilmente. También podría deberse que este organismo habita en aguas con temperaturas bajas y a estas temperaturas la lectina tiene un mejor desempeño en la defensa del organismo. Los estudios de dispersión dinámica de luz, a estas dos temperaturas corroboran el hecho de que a 4 °C la proteína presenta un menor radio hidrodinámico.

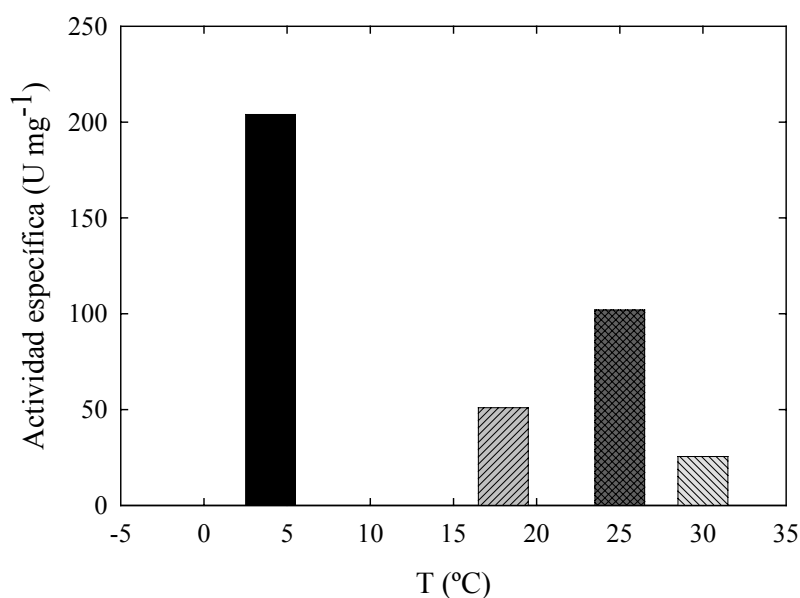


Figura 16. Efecto de la temperatura en la actividad de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*. El título que es el inverso de la máxima dilución que presentó actividad hemaglutinante.

Hubo un efecto de la adición de trehalosa en la actividad eritroaglutinante de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*, que fue evidente con una concentración de 5.96×10^{-5} mM, mientras que se observó un efecto de la adición de PEG 4000 a concentraciones entre 9.75×10^{-4} mM y 1.86×10^{-9} mM.

El efecto de la trehalosa podría ser atribuido a su capacidad como agente estabilizante. Con relación al PEG 4000, éste, al igual que la trehalosa brinda mayor estabilidad a la estructura plegada de las proteínas. Se ha observado que tal capacidad se debe a una elevación y ampliación de la curva de estabilidad de ΔG contra T , aunado a la relación directa que se encontró entre la tensión superficial de las soluciones de trehalosa y de polioles con la estabilidad térmica de las proteínas (Kaushik y Bhat, 2003; Haque *et al.*, 2005).

En general, se han realizado varias investigaciones que demuestran que estas sustancias estabilizan la estructura plegada de los polioles en solución como resultado de una hidratación preferencial más alta del estado desplegado, comparado con el estado nativo (Timasheff y Xie, 2003).

En cuanto a la trehalosa también se ha encontrado que sus excepcionales propiedades también se deben a redes de puentes de hidrógeno que anclan la superficie de la proteína a la matriz circundante, cuya rigidez incrementa por decremento del contenido de agua (Cordone *et al.*, 2005).

Debido a la pérdida gradual de la actividad observada en la proteína purificada, se propuso probar con iones metálicos, polioles y EDTA, cuyo efecto sobre la actividad hemaglutinante puede observarse en la figura 17.

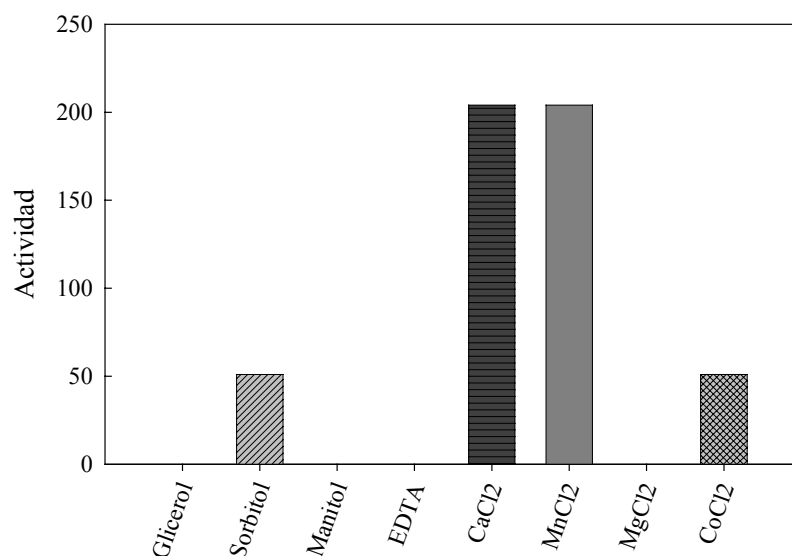


Figura 17. Recuperación de la actividad hemaglutinante de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata* tras añadir varios aditivos. La mezcla es la combinación de los aditivos CaCl₂, MnCl₂, MgCl₂ y CoCl₂.

Se observa que tanto el MnCl₂, como el CaCl₂ fueron los iones metálicos divalentes probados que permitieron recuperar la actividad de la proteína, lo cual demostró que esta lectina es una proteína dependiente de iones divalentes. Estos resultados concuerdan con la amplia documentación que existe sobre las lectinas tipo C, las cuales requieren de iones metálicos divalentes para realizar su función, además de conocerse que las lectinas que unen β -1,3-glucanos también poseen sitios de reconocimiento a manosa (MR).

Identificación de ligandos

Los experimentos realizados utilizando varios azúcares como probables ligandos de la lectina mostraron que la laminaribiosa (Figura 18) y el GlcNAc (Figura 19) presentaron las menores concentraciones inhibitorias de la hemaglutinación, con 88 nM y 2.8 μ M, respectivamente.

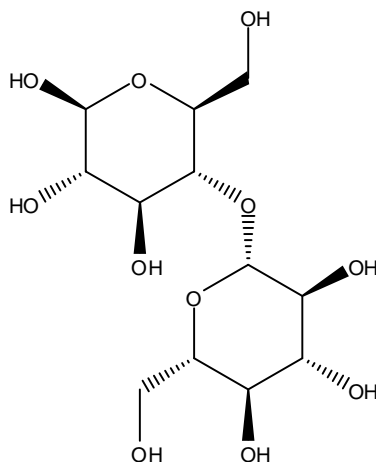


Figura 18. Laminaribiosa

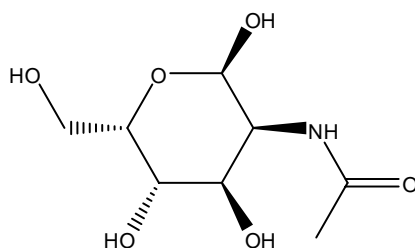


Figura 19. N-Acetil-D-glucosamina

Es importante mencionar que a la fecha sólo se conoce una lectina del género *Musa* (Mo *et al.*, 2001) que une preferencialmente laminaribiosa. Curiosamente, la proteína de la hemolinfa de *M. crenulata*, no fue inhibida por glucosa, unidad de la laminaribiosa, lo cual sugeriría que la forma de unir el azúcar es diferente al de la lectina de *Musa*, que sí es inhibida por glucosa y que presenta un mecanismo único de unión a β -1,3-glucanos.

Otras lectinas halladas en varios invertebrados pueden unir el polisacárido de laminaribiosa, denominado laminarina. Para algunas de ellas se conoce que incrementan la activación de profenoloxidasa en la presencia de su ligando. Tal proceso es similar al que se da en el sistema de complemento en vertebrados y de coagulación sanguínea en vertebrados e invertebrados (Chen *et al.*, 1999).

La laminarina es un polisacárido que se encuentra principalmente en algas, pero también se ha localizado en levaduras patógenas de moluscos (Bachère, 2003). Por lo tanto, es probable que esta lectina desempeñe una función importante. En particular, es probable que

su presencia en la hemolinfa ayude a detectar rápidamente los organismos patógenos y desencadene la respuesta de tipo celular.

La lectina de *Megathura* une además de la laminaribiosa, el azúcar GlcNAc, un derivado de la glucosa presente en los estromas de eritrocitos de conejo.

Estudios mediante DLS

Efecto de la temperatura en el comportamiento de agregación de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*

El efecto de la temperatura en la masa molecular de la proteína y en la polidispersidad de la misma se reportan en la tabla 4.

Tabla 4. Efecto de la temperatura en la masa molecular y la polidispersidad de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*. Se reportan $\bar{x} \pm S$. * indica una temperatura alcanzada después del calentamiento a 40 °C.

Temperatura (°C)	Masa molecular (kDa)	Polidispersidad (nm)
4	3203.875 ± 718.388	7.761 ± 3.535
10	5730.154 ± 3964.651	7.583 ± 3.501
15	13532.940 ± 7925.248	9.894 ± 3.018
18	19044.000 ± 4060.871	13.136 ± 3.086
20	17155.570 ± 5969.507	13.658 ± 4.264
25	20946.150 ± 7924.863	13.566 ± 2.493
30	25458.460 ± 20902.610	16.070 ± 4.325
40	54044.620 ± 26600.620	21.085 ± 5.812
18*	14719.200 ± 14174.060	9.802 ± 1.441
4*	4732.833 ± 877.069	6.702 ± 1.848

El análisis de varianza demostró un efecto significativo de la temperatura en la masa molecular ($p < 0.05$). Se observa que, a partir de una población homogénea, con una pequeña varianza y con una masa molecular relativamente baja, comienzan a formarse nuevas poblaciones con masas superiores que a su vez incrementan su número poblacional. Es interesante mencionar que, incluso a 4 °C, con el tamaño más pequeño de partículas, éstas presentan masas moleculares de un orden mayor al del dímero. Hay que recordar, sin embargo que la masa molecular reportada por el DLS no es exacta, sino que se obtuvo a través de una ecuación que relaciona el radio hidrodinámico con la masa mediante una

ecuación generalizada (Wilson, 2003). Además el análisis es poco efectivo en el caso de glicoproteínas, como la estudiada, ya que los carbohidratos altamente móviles localizados en la superficie de la proteína dificultan la medición, otorgando valores de masa muy altos. Sin embargo, es posible observar tendencias del comportamiento de las partículas de proteína. El efecto de la temperatura en el incremento del tamaño de partícula es visible incluso al aumentar la temperatura a 10 °C, ya que la población de menor tamaño disminuye y comienza a formarse una nueva, comportándose como una población claramente bimodal. Esta segunda población aumenta a medida que se incrementa la temperatura. Sin embargo, a partir de los 25 °C esta población vuelve a disminuir formándose una nueva media con una masa molecular más elevada, mientras que a 30 °C y 40 °C, la población incrementa con masas más elevadas, observando el máximo valor de masa molecular a 40 °C y desviaciones más altas, siendo una población poco homogénea. No obstante este proceso es reversible. Como claramente se puede observar en la tabla, los valores de masa molecular prácticamente regresaron a los observados a 4 °C, después de incrementarse la temperatura.

El incremento en masa correspondiente a un aumento de temperatura es un comportamiento observado en varias proteínas (Kudou *et al.*, 2005). Responde a un proceso que sigue la proteína, a partir de un estado nativo a uno parcialmente desplegado, el cual permite la interacción de las cadenas polipeptídicas (Shin *et al.*, 2002; Kudou *et al.*, 2005). Según menciona Kudou (2005) existen dos teorías sobre el modo en que se lleva tal proceso de agregación: la primera menciona su origen por una asociación inespecífica por interacciones hidrofóbicas y la segunda hace alusión a interacciones intermoleculares específicas, tal como ha sido propuesto por Hammaström y sus colaboradores (1999). Una mejor comprensión de la forma en que se lleva a cabo la agregación y la forma en que la alta agregación disminuye, como sucede en el caso de la lectina estudiada, permitiría conocer mejor los procesos de desagregación y renaturalización de proteínas como es el caso de cuerpos de inclusión en proteínas recombinantes (Speed, 1996) o aquellas que originan enfermedades, como los casos del Alzheimer y otras amiloidosis.

El análisis de varianza también demostró un efecto significativo ($p < 0.05$) de la temperatura en la polidispersidad. Este cambio puede observarse en la tabla 4, con una tendencia a aumentar el valor de la polidispersidad al incrementar la temperatura. Pero

estos cambios fueron significativos únicamente a la temperatura a 18 °C y a 40 °C. Es importante decir que el incremento en polidispersidad sólo puede tomarse como significativo si se tiene en cuenta como una proporción del tamaño de las partículas medidas. Es decir que para una partícula pequeña, una polidispersidad de cierto tamaño puede parecer muy grande, si ésta representa una proporción muy alta del tamaño de las partículas medidas, mientras que la misma medida puede ser insignificante si se trata de partículas grandes que se están analizando. Por lo tanto el incremento en polidispersidad determinado para esta proteína no puede ser tomado en cuenta como claramente significativo.

Estudios mediante dicroísmo circular

Contenido de estructura secundaria

El espectro de dicroísmo circular para la muestra pura se observa en la figura 20. La deconvolución de los datos arrojó un contenido de estructura secundaria mostrado en la tabla 5.

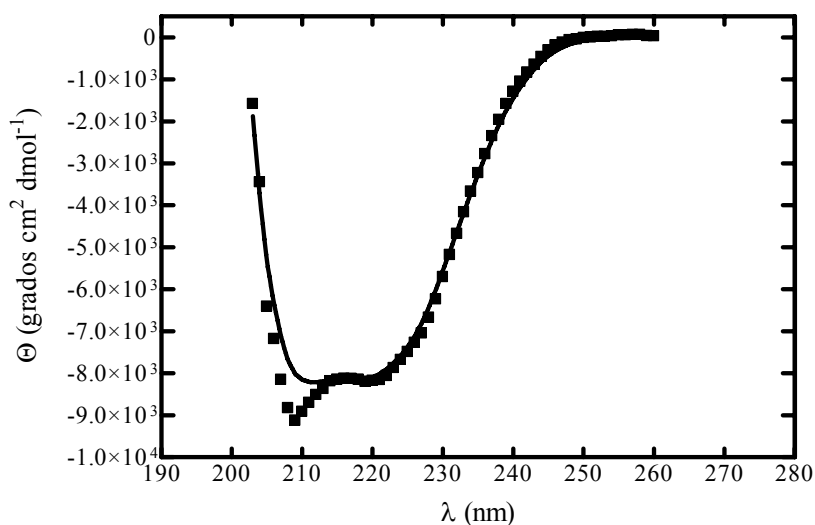


Figura 20. Espectro de dicroísmo circular de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*. Se observan los datos obtenidos experimentalmente y una curva teórica

Tabla 5. Análisis del contenido de estructura secundaria de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata* mediante diferentes métodos

Método	Hélice α	Hoja β	Otros
Hennessey y Johnson	0.251	0.110	0.592
Kabsch y Sander	0.240	0.152	0.558

El análisis de la proteína muestra un alto contenido de hélice alfa. El contenido de estructura secundaria fue evaluado utilizando tres métodos de análisis. El estudio marca una diferencia con el contenido de estructura secundaria de la lectina de *Musa acuminata*, la cual presenta únicamente hojas beta (Meagher *et al.*, 2005), siendo esta última, como se recordará, la única otra lectina conocida cuyo ligando preferido es la laminaribiosa.

Varias lectinas provenientes de animales presentan un alto contenido de hélice alfa. Por ejemplo, la lectina CEL-I, presenta un mayor contenido de estructura en hélice, además de también unir GlcNAc (Sugawara *et al.*, 2004).

Efecto de la temperatura en el contenido de estructura secundaria

El efecto de varias temperaturas en el espectro de dicroísmo circular de la lectina se observa en la figura 21, mientras que su respectivo análisis se presenta en la tabla 6. El análisis efectuado permitió establecer que las temperaturas evaluadas no tuvieron un efecto significativo en el contenido de estructura secundaria de esta lectina. Esto podría justificarse debido al contenido de carbohidratos, los cuales, se sabe, ayudan a la termoestabilidad de las proteínas. Además las temperaturas, escogidas para poder ser relacionadas con la actividad hemaglutinante evaluada y los estudios de DLS, son bajas y se esperarían cambios a temperaturas mayores.

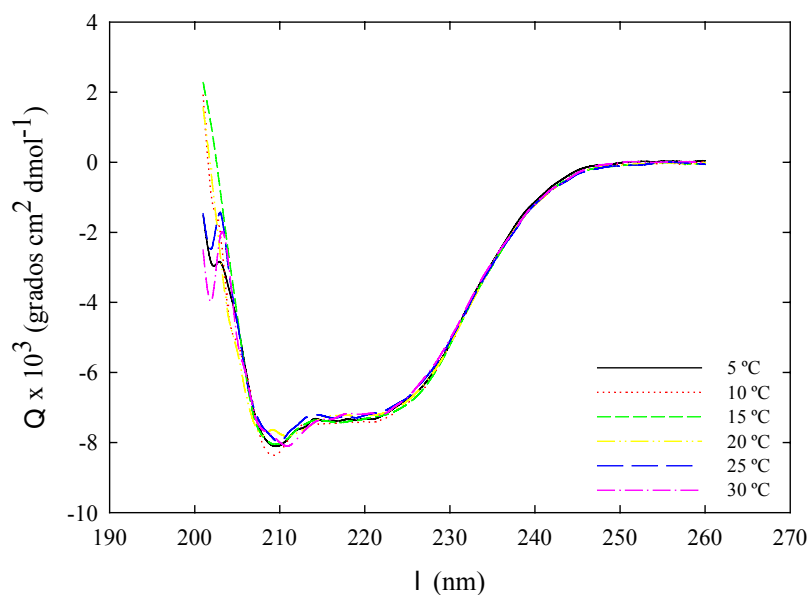


Figura 21. Efecto de la temperatura en el espectro de dicroísmo circular de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*.

Tabla 6. Análisis del cambio en el contenido de estructura secundaria obtenido de los espectros de dicroísmo circular de la lectina de *M. crenulata* como efecto de la temperatura

Temperatura (°C)	Hélice α	Hoja β	Otros
5	0.262	0.109	0.553
10	0.297	0.090	0.563
20	0.292	0.077	0.556
25	0.240	0.075	0.632
30	0.229	0.131	0.554

Aún así, después de analizar la gráfica se detectó que se llevó a cabo un cambio en la longitud de 209 nm. Se graficó la elipticidad molar (Θ) en esa longitud como función de la temperatura, que se muestra en la figura 22.

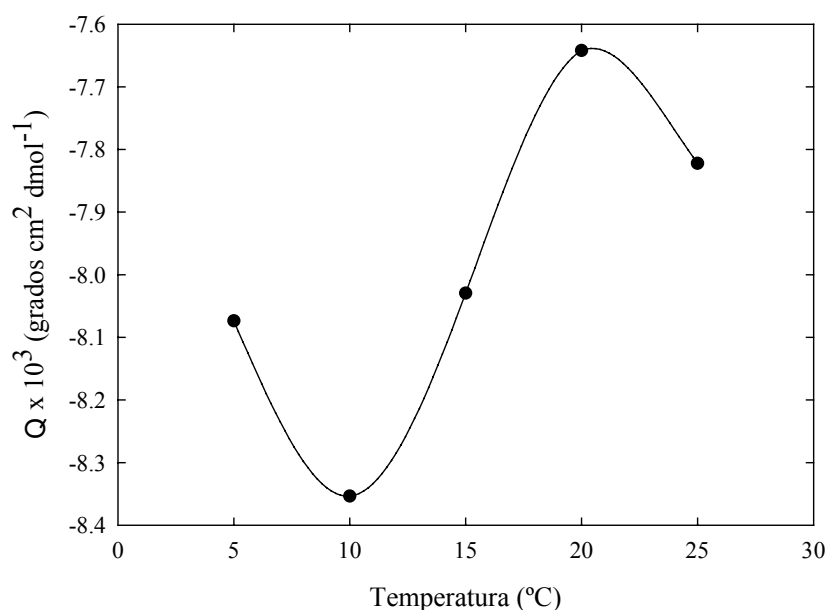


Figura 22. Efecto de la temperatura en la elipticidad molar media a 209 nm de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*.

Esta longitud de onda corresponde una transición $\pi \rightarrow \pi^*$, típica de los péptidos, que se polariza aproximadamente a lo largo de la dirección N-O, aunque la transición bipolar está rotada 9° hacia la dirección del enlace C-N (Figura 23). Es típico que las hélices alfa presenten una elipticidad molar media negativa cercana a 209 nm (Woody, 1994).

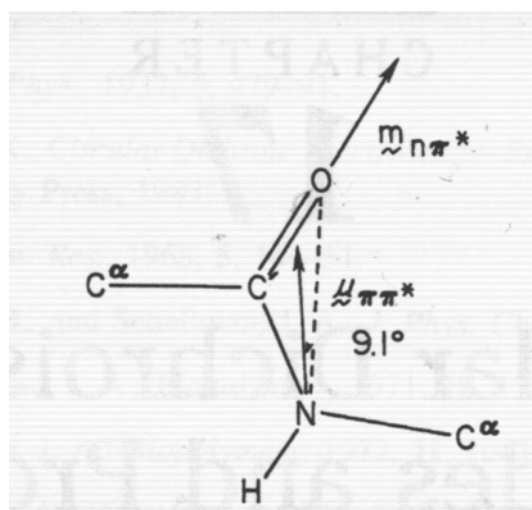


Figura 23. Direcciones y ángulos de rotación de los momentos de transición del dipolo magnético $n \rightarrow \pi$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ en el grupo peptídico (Woody, 1994).

El comportamiento del espectro de dicroísmo circular de esta proteína al ser sometida a incrementos de temperatura es diferente al de muchas otras proteínas, ya que éstas incrementan su contenido en hojas beta (Kuwajima, 1995). Se ha demostrado que en diversas proteínas, al incrementar la temperatura disminuye la entalpía de la transición hélice-asa y por lo tanto el contenido de hélice disminuye (Richardson y Makhatadze, 2004). Este proceso, como se mencionó anteriormente, también influye para permitir el incremento en la masa molecular de las partículas de proteína por agregación, ya que el desplegamiento parcial de la proteína permite mayor número de interacciones entre las cadenas polipeptídicas. Esto se debe a que exponen aminoácidos hidrofóbicos, los cuales tienen poca preferencia por el ambiente acuoso del medio y tienden a interactuar entre ellos. Además, se ha observado que en muchas de las proteínas que presentan una agregación como respuesta a una elevación de la temperatura, incrementan también su contenido en hoja beta, tal como los agregados tipo priones beta amiloides (Petty, Adalsteinsson y Decatur, 2005). Este comportamiento lo lleva a cabo inicialmente la proteína bajo estudio, al igual que lo hacen otras lectinas que se agregan (Pereyra *et al.*, 2004).

Sin embargo, en la última parte del estudio se observó un incremento en el contenido en hélice, aunque el tamaño de partícula fuese más grande, como fue corroborado por DLS. Este incremento en la proporción de hélice alfa y aún así incrementar el tamaño de los agregados ha sido observado ya en otros procesos de agregación, incluidos algunos procesos de tipo aberrante (Kunjithapatham *et al.*, 2005).

Particularmente, en el caso de esta lectina, es importante recordar que la lectina presenta dos temperaturas de mayor actividad hemaglutinante respecto de la temperatura. La segunda mayor actividad se presentó a la temperatura de 25 °C. Esta presenta un alto grado de oligomerización a tal temperatura, pero las proporciones de hélice alfa y hoja beta son similares a cuando la proteína se encuentra a 5 °C, cerca de los 4 °C en que se demostró su mayor actividad hemaglutinante. Tal hecho sugiere una renaturalización parcial después de pasar una temperatura crítica que había desestabilizado la estructura nativa de la proteína. Como se verá más adelante, parece que la proteína en estudio requiere de un alto contenido en alfa hélices para llevar a cabo su función normalmente, mientras que si disminuye su

proporción en esta estructura secundaria, también disminuye su capacidad de unir a sus ligandos.

Efecto de la adición de laminaribiosa en el contenido de estructura secundaria

El efecto de la adición de laminaribiosa en el espectro de dicroísmo circular de la proteína puede observarse en la figura 24. Como puede apreciarse en esa figura, sólo existe un cambio significativo con la adición de la primera concentración del ligando, con respecto al espectro de la proteína sin ligando. Las adiciones sucesivas del ligando no mostraron cambios respecto a la primera concentración de laminaribiosa.

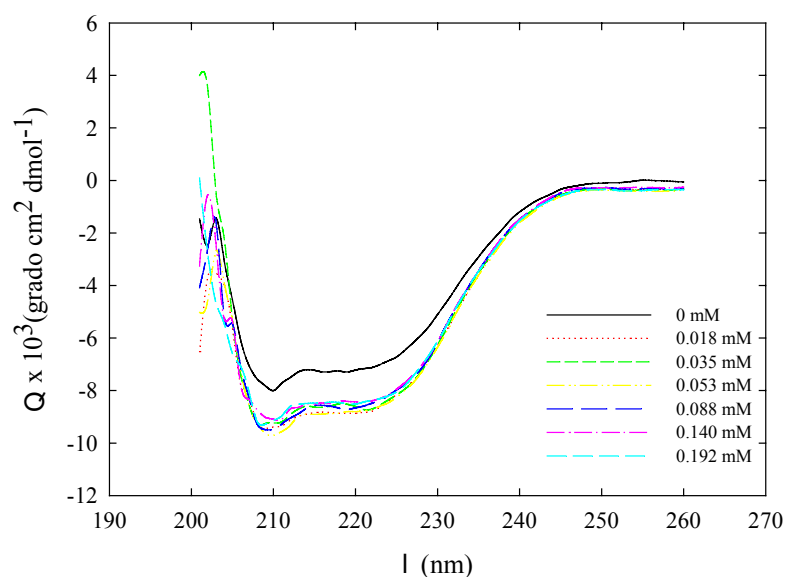


Figura 24. Efecto de la concentración de laminaribiosa en el espectro de dicroísmo circular de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*.

El análisis del contenido de estructura secundaria se muestra en la tabla 6. Este análisis corrobora el hecho de que sólo existe un cambio significativo con la primera concentración del ligando, con el cual se incrementa levemente el contenido de hélices.

Tabla 6. Análisis del cambio en el contenido de estructura secundaria obtenido de los espectros de dicroísmo circular de la lectina de *M. crenulata* como efecto de la concentración de laminaribiosa

[laminaribiosa] (μM)	Hélice α	Hoja β	Otros
0	0.240	0.075	0.632
0.018	0.293	0.062	0.627
0.035	0.299	0.105	0.508
0.053	0.289	0.076	0.620
0.088	0.279	0.099	0.608
0.140	0.288	0.065	0.612
0.192	0.279	0.095	0.569

Con la adición de varias concentraciones de laminaribiosa, el cambio observado en la lectina purificada es completamente diferente del comportamiento que presenta la lectina de *Musa acuminata*, que muestra un contenido de estructura secundaria básicamente formado por hojas beta conectadas por horquillas (Figura 25). Se ha demostrado para esta proteína que su estructura le permite unir en una forma única los sacáridos β -1,3 de la laminaribiosa. Debido al hecho poco común de que se dé la unión a laminaribiosa, puede sugerirse que la forma en que la lectina de *M. crenulata* une laminaribiosa es completamente diferente a como lo hace la lectina de *M. acuminata*.

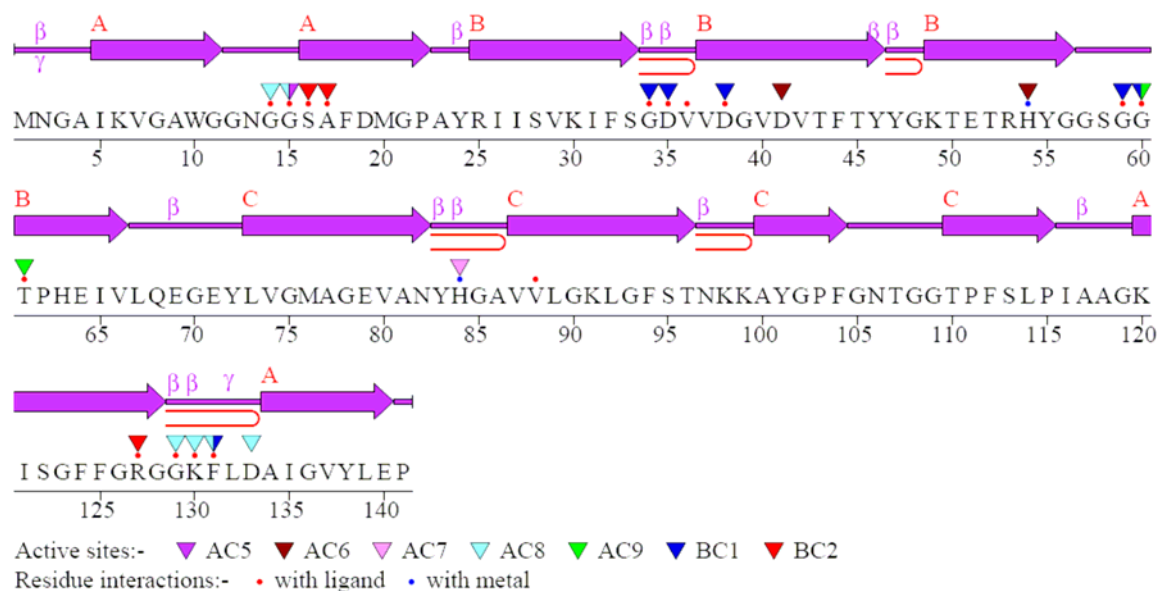


Figura 25. Estructura secundaria de la lectina de *Musa acuminata* (PDB ID 2BN0).

Estudios de Calorimetría de Titulación Isotérmica

La figura 26 muestra la isoterma obtenida en el análisis efectuado en el calorímetro de titulación isotérmica para la titulación de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata* con laminaribiosa. Se decidió hacer el estudio con este ligando dada la importancia biológica de la interacción. Se ha reportado que el polisacárido de laminaribiosa, la laminarina, es uno de los β -1,3-glucanos que con mayor avidez unen los receptores tanto en vertebrados como en invertebrados, sólo después del escleroglucano y el esquizofilano (Schepetkin *et al.*, 2006).

Después de restar el blanco correspondiente a los calores de dilución de la laminaribiosa en el amortiguador, se integraron los datos mediante el software Origin (Figura 27). El modelo que mejor se ajustó a los datos fue el de dos sitios secuenciales. Los datos calculados para las variables termodinámicas se reportan en la tabla 7.

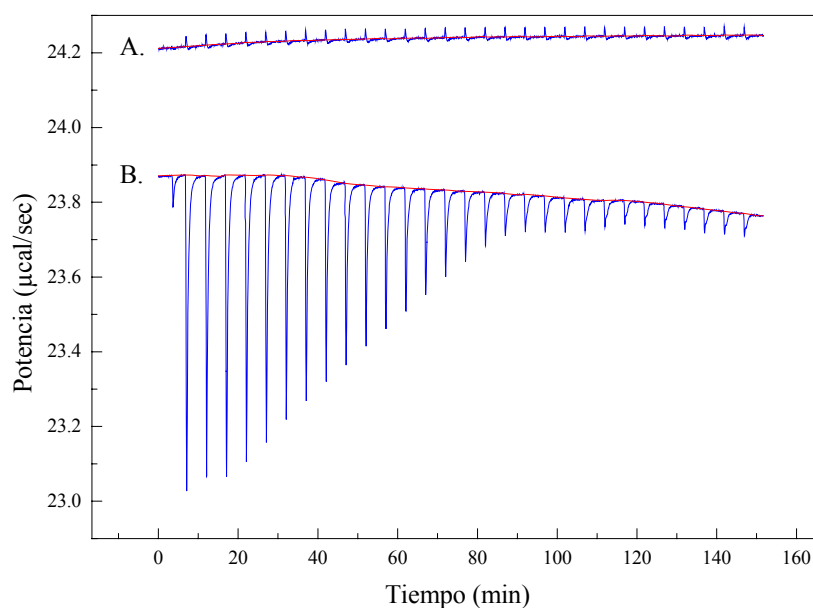


Figura 26. Datos de salida del calorímetro de titulación isotérmica para la titulación de la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata* con laminaribiosa (B.) y los calores de dilución de la solución del ligando (A.).

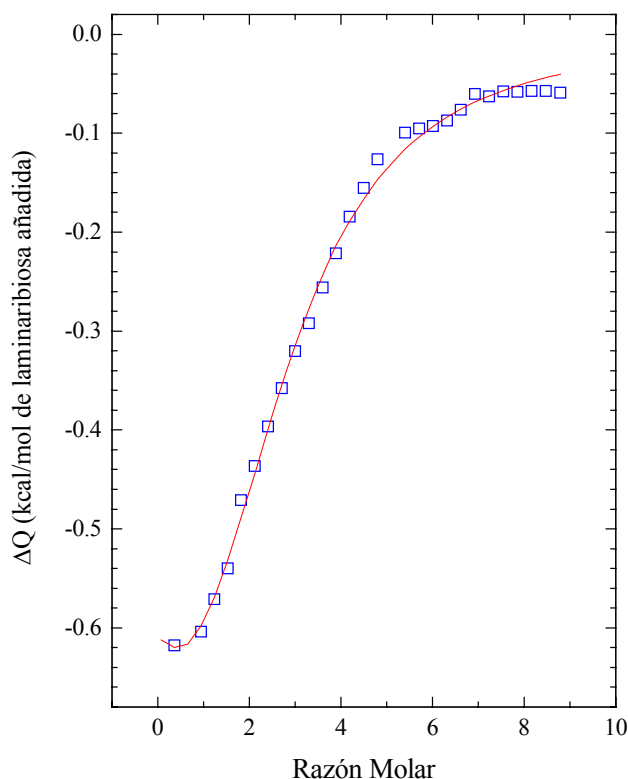


Figura 27. Isotherma de calorimetría de titulación isotérmica de los datos integrados de la figura 27. Los datos fueron ajustados usando el software Origin para un modelo de dos sitios secuenciales

Tabla 7. Variables termodinámicas de la interacción entre la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata* y el ligando laminaribiosa, calculadas por calorimetría de titulación isotérmica.

χ^2	112.984
K_1	$1.222 \times 10^4 \pm 309 \text{ M}^{-1}$
ΔH_1	$-1052 \pm 114.1 \text{ cal mol}^{-1}$
ΔS_1	$15.17 \text{ cal } ^\circ\text{C mol}^{-1}$
ΔG_1	$-5572.66 \text{ cal mol}^{-1}$
K_2	$5672 \pm 412.8 \text{ M}^{-1}$
ΔH_2	$-1431 \pm 144.5 \text{ cal mol}^{-1}$
ΔS_2	$12.38 \text{ cal } ^\circ\text{C mol}^{-1}$
ΔG_2	$-5120.2 \text{ cal mol}^{-1}$

El modelo ajustó con una χ^2 de 112.984. Para el primer sitio la constante de unión K_1 fue de $1.222 \times 10^4 \pm 309 \text{ M}^{-1}$, misma que es dos órdenes de magnitud más elevada que la constante de unión a laminaribiosa evaluada para el único sitio de unión de la lectina de *M. acuminata* ($9.73 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$), siendo por lo tanto la lectina bajo estudio, la proteína de este tipo con la mayor afinidad a laminaribiosa de la que se tiene noticia, superando en gran medida a la lectina vegetal que pertenece a la familia de las jacalinas (Goldstein *et al.*, 2001). La entalpía para el primer sitio ΔH_1 fue $-1052 \pm 114.1 \text{ cal mol}^{-1}$ y su entropía ΔS_1 fue de $15.17 \text{ cal } ^\circ\text{C mol}^{-1}$, por lo que el proceso se favorece tanto entálpica como entrópicamente. La energía libre de Gibbs ΔG_1 , evaluada a partir de los datos anteriores y de la temperatura, fue de $-5572.66 \text{ cal mol}^{-1}$. El valor negativo de este término refleja una reacción espontánea para el primer sitio de unión.

Para el segundo sitio, la constante K_2 fue de $5672 \pm 412.8 \text{ M}^{-1}$, un término menor al presentado por K_1 . Esto señala una cooperatividad negativa. Este tipo de cooperatividad es fácilmente detectado, ya que existen dos diferentes fases durante la reacción: una unión fuerte en el primer sitio y otra débil en el segundo. Aún cuando esta constante es menor a la presente en el primer sitio, es también mayor a la evaluada para la lectina de *M. acuminata*. La entalpía para este sitio ΔH_2 fue de $-1431 \pm 144.5 \text{ cal mol}^{-1}$ y la entropía ΔS_2 tuvo un valor de $12.38 \text{ cal } ^\circ\text{C mol}^{-1}$, que señalan un proceso favorecido tanto entálpica como entrópicamente. La energía libre de Gibbs ΔG_2 calculada para este sitio fue de $-5120.2 \text{ cal mol}^{-1}$ que también evidencia una reacción que se lleva a cabo espontáneamente.

Los valores de entalpías reflejan, en ambos casos y en primera instancia, la fuerza de las interacciones del ligando con la proteína, trátase de interacciones tipo van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o puentes salinos y en menor grado a la relación que existe con el solvente, como lo mencionan Leavitt y Freire (2001). Estos autores también mencionan que el cambio en entropía refleja principalmente dos contribuciones: los cambios en la energía de solvatación y los cambios en la entropía conformacional. Al momento de la unión, ocurre una pérdida de solubilidad, se libera agua y se observa un aumento en la entropía del solvente, particularmente importante para grupos hidrofóbicos. Tanto los grupos en el ligando como en la proteína pierden libertad conformacional, resultando en un cambio negativo en la entropía conformacional. Aún así, los términos referentes a la disolución del ligando fueron minimizados al haberse restado el

blanco resultante de los calores de dilución del ligando exclusivamente en el amortiguador de los datos del experimento.

El hecho de que se presenten dos sitios de interacción puede relacionarse con la probable dimerización de la proteína en solución, observada al realizar el experimento de espectrometría de masas. Este hecho sugiere que se encuentra un sitio de interacción en cada uno de las unidades del dímero. Tal como menciona Lee (1992), esta dimerización se da favoreciendo, en este caso, la bivalencia de la lectina, lo que le permite interactuar en diversas instancias biológicas, por ejemplo, la aglutinación de levaduras patógenas. El hecho de que ambos sitios parezcan diferentes puede deberse a los pequeños cambios en estructura que presenta la proteína al unir el ligando y a otras modificaciones de la conformación tridimensional de la proteína, las cuales seguramente sufre el dímero como tal, después de haber interactuado en el sitio de una sus unidades.

Cristalización

Las condiciones iniciales de cristalización encontradas al utilizar el kit Cristal Clear 1 de Hampton Research se muestran en la tabla 8. En estas condiciones se encontraron microcristales, los cuales con modificaciones tales como una mayor concentración de proteína y una condición que promueva una formación más lenta, permitirá el crecimiento de cristales que, en un momento serán óptimos para su difracción y posterior análisis de la estructura tridimensional de la proteína estudiada en la presente tesis.

Tabla 8. Condiciones de cristalización iniciales para la lectina de la hemolinfa de *M. crenulata*

Sal	Amortiguador	pH	Agente precipitante
Citrato de trisodio dihidratado 0.2 M	Tris hidrocloreuro 0.1 M	8.5	PEG 400 30 % v/v
Sulfato de amonio 0.2M	Acetato de sodio trihidratado 0.1 M	4.6	PEG 4000 25 % w/v
Acetato de amonio 0.2 M	Citrato de trisodio trihidratado 0.1 M	5.6	2-metil-2,4-pentanodiol 30 % v/v
Citrato de trisodio dihidratado 0.2 M	HEPES sodio 0.1 M	7.5	Isopropanol 20 %
Acetato de sodio trihidratado 0.2 M	Cacodilato de sodio 0.1 M	6.5	PEG 8000 30 % w/v
			Formato de sodio 4M
	HEPES sodio 0.1 M	7.5	Isopropanol 10 %, PEG 4000 20 %
Acetato de calcio hidratado 0.2 M	Cacodilato de sodio 0.1 M	6.5	PEG 8000 18 % v/v

Es notable que en cuatro condiciones el agente precipitante sea PEG, aditivo que también tuvo un efecto significativo en la actividad hemaglutinante de la lectina. Estos hechos sugieren que el PEG al interactuar con el agua circundante a la proteína y competir con ésta por el disolvente, permite diferentes estados de interacción entre las cadenas polipeptídicas. Al realizar esta acción, también permite una agregación ordenada de los polipéptidos, la cual conlleva a la formación de cristales, o, en este caso, de microcristales. Por otra parte, la acción de solventes orgánicos, al desestabilizar parcialmente a las proteínas provoca la interacción intercadena de sus zonas hidrofílicas.

CONCLUSIONES

La lectina con mayor actividad hemaglutinante hacia eritrocitos de conejo presente en el pleurotomárido *Megathura crenulata* se encuentra en la hemolinfa del organismo, en forma libre. El hecho de que se una a glicoconjugados de las membranas de eritrocitos de conejo, permite su fácil purificación por medio de afinidad a estromas de eritrocitos glutaraldehizados de conejo en dos pasos.

Gracias a los estudios realizados de esta proteína, pudimos encontrar las siguientes características:

- Se trata de una lectina dimérica de tipo C, con una masa de aproximadamente 100 kDa para el dímero, calculada por espectrometría de masas y una masa molecular observada para los monómeros por SDS-PAGE de 62 kDa. El pI de la proteína, determinada en un gel de IEF es de 7.8.
- Esta lectina presenta afinidad a dos ligandos, laminaribiosa y GlcNAc. Su ligando principal, la laminaribiosa, la convierte en la segunda lectina reportada con tal especificidad.

La unión a laminaribiosa, esto es β -1,3 glucanos, tiene una gran importancia biológica, ya que éstos estimulan la respuesta inmune tanto en invertebrados como en vertebrados y existe una conservación del fenómeno a lo largo del espectro evolutivo. En particular se puede relacionar el fenómeno estudiado con otras lectinas de tipo C con sitio de reconocimiento MR que unen laminarina.

- La mayor actividad de la proteína se da en presencia de manganeso y calcio y a una temperatura óptima de 4 °C, similar a la presente en el ambiente del organismo. Además existe un aumento en la actividad hemaglutinante de la proteína debido a la adición de los aditivos PEG y trehalosa a muy bajas concentraciones.
- La proteína varía su contenido de estructura secundaria al aumentar la temperatura, incrementando ligeramente su contenido en hélices alfa, siendo este fenómeno poco común en proteínas y que la hace un miembro de los llamados agregados en hélice alfa.

- La interacción con su ligando laminaribiosa provoca un cambio en el contenido de estructura, aumentando específicamente el contenido de hélices alfa, contrariamente a lo realizado por la lectina de *Musa acuminata*.
- Los estudios por ITC mostraron que la lectina posee dos sitios de unión, los cuales en interacción con la laminaribiosa responden a un modelo secuencial, siendo un caso de cooperatividad negativa en que la primera constante de unión es mayor a la segunda. El proceso completo es exotérmico y se lleva a cabo espontáneamente, favorecido tanto entrópica como entálpicamente. Las constantes de unión de los dos sitios de la lectina fueron mayores al encontrado para la lectina de *M. acuminata*. Este hecho, aunado al cambio en contenido de estructura secundaria al unir el ligando, indica que la forma de interaccionar con el carbohidrato podría ser diferente a la llevada a cabo por la lectina de *M. acuminata*.
- Se han obtenido microcristales en varias condiciones, mismas que deben ser modificadas para poder obtener cristales adecuados para difractar. Resultó claro que el PEG tiene un efecto importante para modificar y aumentar la agregación de la proteína, ya que fue constante en varias pruebas de cristalización. También se repitió el efecto de solventes orgánicos para permitir la agregación lenta y ordenada de la proteína.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, R. T. 1974. *American seashells*. 2a. ed., Van Nostrand Reinhold Company. Nueva York. 663 págs.

Bettelheim, F., Hashimoto, Y., Pignan, W. 1969. Light-scattering studies of bovine submaxillary mucin. *Biochimica et biophysica acta*. 63: 235.

Bachère, E. 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture*. 227: 427-438.

Blundell, C., Mahoney, D., Almond, A., Deangelis, P., Teriete, J., Kahman, P., Pickford, A., Campbell, I., Day, A. 2003. The link module from ovulation- and inflammation- associated protein Tsg-6 changes conformation on hyaluronan binding. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 49261-49270.

Böggwald, J., Johnson, E., Seljelid, R. 1982. The cytotoxic effect of mouse macrophages stimulated in vitro by a β -1,3-glucan from yeast cell walls. *Scandinavian Journal of Immunology*. 15: 297-304.

Bretting, H., Phillips, S. G., Klumpart, H. J., Kabat, E. A. 1981. A mitogenic lactose-binding lectin from the sponge *Geodia cydonium*. *Journal of immunology*. 127: 1652-1658.

Brewer, C. F. 1996. Multivalent lectin-carbohydrate cross-linking interactions. *Chemtracts of Biochemistry and Molecular Biology*. 6: 165-179.

Chen, C., Rowley, A., Newton, R. P., Ratcliffe, N. A. 1999. Identification, purification and properties of a β -1,3-glucan-specific lectin from the serum of the cockroach, *Blaberus discoidalis* which is implicated in immune defence reactions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 122: 309-319.

Cominetti, M. R., Marques, M. R. F., Lorenzini, D. M., Löfgren, S. E., Daffre, S., Barracco, M. A. 2002. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Developmental y comparative immunology*. 26: 715-721.

Cordone, L., Cottone, G., Giuffrida, S., Palazzo, G., Venturoli, G., Viappiani, C. 2005. Internal dynamics and protein-matrix coupling in trehalose-coated proteins. *Biochimica et biophysica acta – proteins y proteomics*. 1749: (252-281).

Decker, J. M., Elmholt, A., Muchmore, A. V. 1981. Spontaneous cytotoxicity mediated by invertebrate mononuclear cells toward normal and malignant vertebrate targets: Inhibition by defined mono- and disaccharides. *Cellular Immunology*. 59: 161- 170.

Diluzio, N. R., Williams, D. L., McNamee, R. B., Edwards, B. F., Kitahama, A. 1979. Comparative tumor-inhibitory and antibacterial activity of soluble and particulate glucan. *International Journal of Cancerology*. 24: 773-779.

Dong, C.-H., Yang, S.-T., Yang, Z.-A., Zhang, L., Gui, J.-F. 2004. A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocyte maturation and egg fertilization in fish. *Developmental Biology*. 265: 341-354.

Drickamer, K. 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *Journal of biological chemistry*. 264: 9557-9560.

Drickamer, K., Taylor, M. E. 1993. Biology of animal lectins. *Annual review of cell biology*. 9: 237-264.

Duvic, B., Brehélin, M. 1998. Two major proteins from locust plasma are involved in coagulation and are specifically precipitated by laminarin, a β -1,3-glucan. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28: 959-967.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*. 28: 350-356.

Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Reece, G. N., Becker, J. W., Waxdal, M. W., Wang, J. M. 1972. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 69: 2580-2584.

Ey, P. L., Jenkin, C. R. 1982. Molecular basis of self and non-self recognition among the invertebrates. En: Cohen, N., Sigel, M. M. (eds.), *The reticuloendothelial system*. Vol. 3. Plenum. Nueva York. Pág. 321.

Fenton-Navarro, B., Arreguín-L, B., García-Hernández, E. H., Aguilar, M. B., Rodríguez-A, C., Arreguín-Espinosa, R. 2003. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antilliensis*. *Toxicon*. 42: 525-532.

Fock, W. L., Chen, C. L., Lam, T. J., Sin, Y. M. 2001. Roles of an endogenous serum lectin in the immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus) against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 11: 101-113.

Fragkiadakis, G. A. 2000. Isolation of lectins from hemolymph of decapod crustaceans by adsorption on formalinized erythrocytes. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 44: 109-114.

Franco-Fraguas, L., Batista-Viera, F., Carlsson, J. 2003. Isolation of a beta-galactoside-binding lectin from cat liver. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*. 36 (4): 447-457.

Franco-Fraguas, L., Plá, A., Ferreira, F., Massaldi, H., Suárez, N., Batista-Viera, F. 2003. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *Journal of chromatography B*. 790 (1-2): 365: 372.

Freire, M. G. M., Gome, V. M., Corsini, R. E., Machado, O. L. T., Simone, S. G. S., Novelo, J. C., Marangoni, S., Macedo, M. L. R. 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant physiology and biochemistry*. 40: 61-68.

Gilboa-Garber, N., Wu, A. M. 2001. Binding properties and applications of *Aplysia* gonad lectin. En: Wu, A. M. (ed.), *The molecular immunology of complex carbohydrates*. Vol. 2. Plenum. Nueva York. 109-140.

Goldstein, I. J., Winter, H. C., Mo, H., Misaki, A., Van Damme, E. J. M, Peumans, W. J. 2001. Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin. II. Binding groups of laminaribiose oligosaccharides and β -glucans containing β 1,6-glucosyl end groups. *European journal of biochemistry*. 268: 2616-2619.

Gupta, D., Brewer, C. F. 1994. Homogeneous aggregation of the 14-kDa β -galactoside specific vertebrate lectin complex with asialofetuin in mixed systems. *Biochemistry*. 33: 5526-5530.

- Hammarström, S., Kabat, E. A. 1964. Purification and characterization of a blood group reactive haemagglutinin from the snail *Helix pomatia* and a study of its combining site. *Biochemistry*. 8: 2696.
- Hammarström, P., Persson, M., Freskgård, P. O., Mårtesson, L. G., Andersson, D., Jonsson, D. H., Carlsson, U. 1999. Structural mapping of an aggregation nucleation site in a molten globule intermediate. *The journal of biological chemistry*. 274: 32897-32903.
- Hamelryck, T. W., Moore, J. G., Chrispeels, M. J., Loris, R., Wyns, L. 2000. The role of weak protein-protein interactions in multivalent lectin-carbohydrate binding: crystal structure of cross-linked FRIL. *Journal of molecular biology*. 299: 875-883.
- Haque, I., Singh, R., Moosavi-Movahedi, A. A., Ahmad, F. 2005. Effect of polyol osmolytes on ΔG_D , the Gibbs energy of stabilisation of proteins at different pH values. *Biophysical chemistry*. 117: 1-12.
- Hardman, K. D., Ainsworth, C. F. 1972. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry*. 11: 4910-4919.
- Hatakeyama, T., Matsuo, N., Aoyagi, H., Sugawara, H., Uchida, T., Kurisu, G., Kusunoki, N. 2002. Crystallization and preliminary crystallographic study of an invertebrate C-type lectin CEL-I, from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. *Acta Crystallographica D Biological Crystallography*. 58: 143-144.
- Hatakeyama, T., Shiba, K., Matsuo, N., Fujimoto, T., Oda, T., Sugawara, J., Aoyagi, H. 2004. Characterization of recombinant CEL-I, a GalNAc-specific C-type lectin, expressed in *Escherichia coli* using an artificial synthetic gene. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*. 135: 101-107.
- Heldin, C. H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 80: 213-223.
- Itshitsuka, R., Kojima, K., Utsumi, H., Ogawa, H., Matsumoto, I. 1998. Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V, VI. *The journal of biological chemistry*. 273: 9935-9941.
- Jafari-Aghdam, J., Khajeh, K., Ranjbar, B., Nemat-Gorgani, M. 2005. Deglycosylation of glucoamylase from *Aspergillus niger*: Effects on structure, activity and stability. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1750 (1): 61-68

Jiang, H., Ma, C., Lu, Z.-Q., Kanost, M. R. 2004. β -1,3-glucan recognition protein-2 (β GRP-2) from *Manduca sexta*: an acute-phase protein that binds β -1,3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34: 89-100.

Kaushik, J. K., Bhat, R. 2003. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? *The journal of biological chemistry*. 278: 25458-26465.

Kocourek, J., Horejsi, V. 1983. A note on the recent discussion on the definition of the term "lectin". En: Bog-Hansen, T. C. Y Spengler, G. A. (eds.) *Lectins. Biology, biochemistry, clinical biochemistry*. Vol. 3. DeGruyter, Berlín/Nueva York. Págs. 3-6.

Kornfeld, S. 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annual review of biochemistry*. 61: 307-330.

Kudou, M., Shiraki, K., Takagi, M. 2005. Stretched-exponential analysis of heat-induced aggregation of apo-concanavlin A. *The protein journal*. 24 (3): 193-199.

Kuwajima, K. 1995. Circular dichroism. En: B. A. Shirley. *Methods in molecular biology*. Vol. 40: *Protein stability and folding: theory and practice*. Humana Press, Totowa. 115-227.

Kunjithapatham, R., Oliva, F. Y., Doshi, U., Pérez, M., Ávila, J., Muñoz, V. 2005. Role for the α -helix in aberrant protein aggregation. *Biochemistry*. 44: 149-156.

Leavitt, S., Freire, E. 2001. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current opinion in structural biology*. 11: 560-566.

Lee, Y. C. 1992. Biochemistry of carbohydrate-protein interaction. *The FASEB journal*. 6: 3193-3200.

Lisgarten, J. N., Pitts, J. E., Palmer, R. A., Reynolds, C. D., Dao-Thi, M. H., Van Driessche, E., Beeckmans, S. 1999. Crystallization of *Helix pomatia* agglutinin (HPA), a protein from the edible snail. *Acta Crystallographica D Biological Crystallography*. 55: 1903-1905.

Lobsanov, Y. D., Gitt, M. A., Leffler, H., Barondes, S. H., Rini, J. M. 1993. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 27034-27038.

Loris, R. 2002. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1572: 198-208.

McEver, R. P., Moore, K. L., Cummings, R. D. 1995. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *The journal of biological chemistry*. 270: 11025-11028.

McGreal, E., Miller, J. L., Gordon, S. 2005. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Current Opinion in Immunology*. 17: 18-24.

Meagher, J. L., Winter, H. C., Ezell, P., Goldstein, I. J., Stuckey, J. A. 2005. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. *Glycobiology*. 15: 1033-1042.

Mikeš, L., Horák, P. 2001. A protein with lectin activity in penetration glands of *Diplostomum pseudospathaceum* cercariae. *International Journal for Parasitology*. 31: 245-252.

Mo, H., Winter, H. C., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Misaki, A., Goldstein, I. J. 2001. Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin. I. Novel recognition of internal α 1,3-linked glucosyl residues. *European journal of biochemistry*. 268: 2609-2615.

Mock, A., Renwratnz, L. 1991. Isolation and characterization of a lectin from the cephalochordate *Branchiostoma lanceolatum* (Pallas). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 99: 699-707.

Müller, W. E. G., Zahn, R. K., Kurelec, B., Lucu, C., Müller, I., Friese, U., Uhlenbruck, G. 1981. Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. *Journal of bacteriology*. 145: 548

Müller, W. E. G., Maidhof, A., Zahn, R. K., Conrad, J., Rose, T., Stafanovich, P., Müller, I., Friese, U., Uhlenbruck, G. 1984. Biochemical basis for the symbiotic relationship *Didemnum-Prochloron* (Prochlorophyta). *Biology of the Cell*. 5: 381.

Nakamura, T., Morita, T., Iwanaga, S. 1986. Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in *Limulus* hemocytes-isolation and characteristics. *European Journal of Biochemistry*. 154: 515-521.

Ochoa, J.-L., Kristiansen, T. 1978. Stroma as affinity adsorbent for non-inhibitable lectins. *FEBS letters*. 90: 145-148.

Pearce, S., Newton, R. A., Nair, S. V., Raftos, D. A. 2001. Humoral opsonins of the tunicate *Pyura stolonifera*. *Developmental and comparative immunology*. 25: 377-385

Pereyra, A., Zenteno, R., Vázquez, L., Martínez-Cairo, S., Rodríguez, A., Mendoza-Hernández, G., Zenteno, E., Agundis, C. 2004. Characterization of lectin aggregates in the hemolymph of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Biochimica et biophysica acta*. 1673: 122-130.

Petty, S. A., Adalsteinsson, T., Decatur, S. M. 2005. Correlations among morphology, β -sheet stability, and molecular structure in prion peptide aggregates. *Biochemistry*. 44: 4720-4726.

Renwrantz, L., Mohr, W. 1978. Opsonising effect of serum and albumin gland extracts on the elimination of human erythrocytes from the circulation of *Helix pomatia*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 31: 164-171.

Renwrantz, L., Stahmer, A. 1983. Opsonizing properties of an isolated haemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules on the surface of haemocytes from *Mytilus edulis*. *Journal of comparative physiology*. 149: 535-546.

Richardson, J. M., Makhatadze, G. I. 2004. Temperature dependence of the thermodynamics of helix-coil transition. *Journal of molecular biology*. 335: 1029-1037.

Rini, J. M. 1995. Lectin structure. *Annual Review of Biophysical Structure*. 24: 551-577.

Santos, A. F. S., Argolo, A. C. C., Coelho, L. C. B. B., Paiva, P. M. G. 2005. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water research*. 39 (6): 975-980.

Schetkin, I. A., Quinn, M. T. 2006. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. 6: 317-333.

Schwarz, F. P., Misquith, S., Surolija, A. 1996. Effect of substituent on the thermodynamics of D-glucopyranoside binding to concanavalin A, pea (*Pisum sativum*) lectin and lentil (*Lens culinaris*) lectin. *The biochemical journal*. 316: 123-129.

Sharon, N. 1993. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends in biochemical sciences*. 18: 221-226

Shin, I., Wachtel, E., Roth, E., Bon, C., Silman, I., Weiner, L. 2002. Thermal denaturation of *Bungarus fasciatus* acetylcholinesterase: is aggregation a driving force in protein unfolding. *Protein science*. 11: 2022-2032.

Shrive, A. K., Metcalfe, A. M., Cartwright, J. R., Greenhough, T. K. 1999. C-reactive protein and SAP-like pentraxin are both present in *Limulus polyphemus* haemolymph: crystal structure of *Limulus* SAP. *Journal of molecular biology*. 290:997-1008.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 150: 76-85.

Solomon, E., Tuzek, F., Root, D., Brown, C. 1994. Spectroscopy of binuclear dioxygen complexes. *Chemical Reviews*. 94: 827-856.

Speed, M. A., Wang, D. I., King, J. 1996. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. *Nature biotechnology*. 14: 1283-1287.

Su, J., Song, L., Xu, W., Wu, L., Li, H., Xiang, J. 2004. cDNA cloning and mRNA expression of the lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein gene from scallop *Chlamys farreri*. *Aquaculture*. 239: 69-80.

Sugawara, H., Kusunoki, M., Kurisu, G., Fujimoto, T., Aoyagi, H., Hatakeyama, T. 2004. Characteristic recognition of *N*-acetylgalactosamine by an invertebrate C-type lectin, CEL-I, revealed by X-ray crystallographic analysis. *The journal of biological chemistry*. 279: 45219-45225.

Timasheff, S. N., Xie, G., 2003. Preferential interactions of urea with lysozyme and their linkage to protein denaturation. *Biophysical chemistry*. 105 (2-3): 421-448.

Uchida, T., Yamasaki, T., Eto, S., Sugawara, H., Kurisu, G., Nakagawa, A., Kusunoki, M., Hatakeyama, T. 2004. Crystal structure of the hemolytic lectin CEL-III isolated from the

marine invertebrate *Cucumaria echinata*. *The journal of biological chemistry*. 279: 37133-37141.

Uhlenbruck, G., Steinhausen, G. 1977. Tridacnins: symbiosis-profit or defence-purpose? *Developmental and comparative immunology*. 1: 183

Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*. 191: 13-21.

Varki, A. 1997. Sialic acid as ligands in recognition phenomena. *FASEB journal*. 11: 248-255.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (eds.). 1999. *Essentials of Glycobiology*. The Consortium of Glycobiology Editors. La Jolla. 653 págs.

Vasta, G. R. 1987. Serum and hemocyte-associated lectins of the oyster *Crassostrea virginica*. En: Bøg-Hansen, T. C, van Driessche, E. (eds.) *Lectins*. Walter de Gruyter, Nueva York. Pág. 677.

Weis, W. I. y Drickamer, K. 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*. 65: 441-473.

Wilson, W. W. 2003. Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth—a practical approach. *Journal of structural biology*. 142: 56-65.

Woody, R. W. 1994. Circular dichroism of peptides and proteins. En: K. Nakanishi, N. Berova, R. Woody. *Circular dichroism principles and applications*. 473-496.

Wootton, E. C., Dyrinda, E. A., Ratcliffe, N. A. 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor shell (*Ensis siliqua*). *Fish y Shellfish Immunology*. 15: 195-210.

Yan, Q., Jiang, Z., Yang, S., Deng, W., Han, L. 2005. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus*. *Archives of biochemistry and biophysics*. 442: 72-81.

Yu, X.-Q., Tracy, M. E., Ling, E., Scholz, F. R., Trenczek, T. 2005. A novel C-type lectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 35: 285-295.

Zenteno, E., Ochoa, J. L., Montaña, L. F., Debray, H., Montreuil. 1991. *Machaerocereus eruca* cactus isolectins. Purification and characterization