



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**ESTUDIOS FÍSICOQUÍMICOS Y ESTRUCTURALES DE LA
INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA Y
PROTEÍNA-LIGANDO
DE UNA LECTINA DEL MEJILLÓN *Mytilus edulis***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U Í M I C A

P R E S E N T A:

CLAUDIA BERNAL CORTES

ASESOR DE TESIS: DRA ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2007



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

AT'N: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 19 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estudios Físicoquímicos y Estructurales de la Interacción Proteína-Proteína
y Proteína-Ligando de una Lectina del Mejillón Mytilus edulis.

que presenta la pasante: Claudia Bernal Cortes
con número de cuenta: 9106503-0 para obtener el TITULO de:
Química

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 05 de Julio de 2006

PRESIDENTE	<u>I. Q. Guadalupe Franco Rodríguez</u>	
VOCAL	<u>Q. Arcadia Hernández Beltrán</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Alejandra Hernández Santoyo</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Virginia Benítez Solís</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Dra. Ma. del Rosario Moya Hernández</u>	

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, en el laboratorio de Bioquímica 4 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a la Dra Alejandra Hernández por permitirme trabajar en su proyecto.

Se agradece el gran apoyo brindado a la Dra Deyanira Fuentes Silva, al Biólogo Adrián Quintero y a la Q.A Lourdes Ruiz.

DEDICATORIAS

A mis padres Raquel Cortes y Ricardo Bernal con mucho amor por darme la vida, inculcarme siempre la idea de salir adelante y dejarme crecer en libertad, por todo el esfuerzo y cariño brindado. Los quiero y los admiro.

A mis hermanos Guadalupe, Nancy, Ricardo y Alan por demostrarme siempre amor y respeto para lo que soy y lo que hago. Por estar a mi lado siempre. Los quiero mucho.

A mi tía Adela por todas esas muestras de cariño y confianza.

A mis amigos de CCH Pancho, San Juan y Moy.

A mis amigos Rafael, Jorge, Ernesto, Cesar, David, Morcno, Lucy, Tere, Rosa, Lidia, Jose Luis Claudio.

A el amor de mi vida Pedro Bernal

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, sin lugar a dudas a Dios por permitirme ser, por estar siempre presente en cada instante de mi vida, por tomarme de la mano cuando tropiezo y por rodearme siempre de gente que me ama y por dejarme concluir esta etapa tan importante en mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de su comunidad, por ser siempre mi orgullo y porque en ella he vivido la parte más feliz de mi vida.

Al CCH Naucalpan por hacer de mí un ser independiente y con criterio.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por darme una profesión, por su excelente formación y porque ahí encontré a mis mejores amigos.

A la profesora Guadalupe Sevilla por su excelente calidad humana y todo su apoyo.

Al profesor Antonio López de física I por su inagotable fe en los alumnos.

A don Memo por su amabilidad y ayuda en todo momento.

A la Dra Gilda por demostrarme que sí se puede que hay que tener confianza en uno mismo.

A Pedro B por llegar a mi vida y llenarme de amor, por ser mi mayor inspiración, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ser un apoyo incondicional, por dejarme ser parte de tu vida. Porque gracias tí he logrado ser una mejor persona y sobre todo por hacerme tan feliz. Te amo.

A Rafa porque has sido un verdadero amigo en todo momento por todos los momentos compartidos, por dejarme conocerte y descubrir la maravillosa persona que eres.

A Ernesto, Moreno, David y Cesar por su amistad y su paciencia y apoyo durante la carrera, por dejarme ser parte de la misma historia.

A Rosa, Tere, Lucy por su valiosa amistad todos los momentos inigualables que compartimos.

A Jorge por enseñarme a tener confianza en mi capacidad y a no rendirme, por todos esos jalones de oreja, gracias amigo.

A las Químicas 26 Araceli, Cristina y Alejandra por su amistad y por esas veladas tan divertidas.

A todas aquellas personas que compartieron el aula conmigo y dejaron huella en mi vida.

A mis compañeros del Instituto de Química Deyanira, Lulú, Adrián, Azucena por su amistad y esas tardes de café.

GRACIAS

CONTENIDO	PAGINAS
<i>Resumen</i>	i
<i>Abreviaturas</i>	ii
<i>Objetivos</i>	iii
<i>Introducción</i>	iv
 CAPITULO 1	
1.Generalidades	1
1.1 Historia de las lectinas	2
1.2 Clasificación de las lectinas	3
 CAPITULO 2	
2. Antecedentes	4
2.1 Interacciones proteína-proteína	4
2.2 Agregación patógena	5
2.3 Mecanismos de agregación	7
2.4 Interacciones lectina -ligando	8
2.4.1 N- y O glicanos	8
2.4.2 Lectina GAG	9
2.5 Propiedades multivalentes de las lectinas para unir carbohidratos	9
2.5.1 Entrecruzamiento tipo I	10
2.5.2 Entrecruzamiento tipo II	10
2.6 Lectinas en invertebrados marinos	11
2.7 Descripción del mejillón <i>Mytilus edulis</i>	12
 CAPITULO 3	
3. Metodología	14
3.1 Material biológico	14
3.2 Extracción	14
3.3 Preparación de estromas	14
3.4 Preparación de eritrocitos de conejo formalinizados ECF	15
3.5 Pruebas de actividad aglutinante	15
3.6 Cuantificación de la lectina	16
3.6.1 Curva de Calibración	16
3.7 Purificación de la lectina	17
3.8 Caracterización de la lectina	18
3.8.1 Determinación del peso molecular	18
3.8.1.1 Electroforesis SDS-PAGE	19
3.8.1.2 Espectrometría de masas	19
3.8.2 Determinación del punto isoelectrico	19

CONTENIDO	PAGINAS
3.8.3 Pruebas de estabilidad	19
3.8.3.1 Efecto de aditivos	20
3.8.3.2 Pruebas de congelación	20
3.8.3.3 Pruebas de solubilidad	20
3.8.4 Pruebas de inhibición	21
3.8.5 Estudios de dispersion dinamica de luz DLS	21
3.8.6 Estudios conformacionales, técnicas de Dicroísmo circular DC	22
3.8.7 Estudios de calorimetría ITC	24
3.8.8 Cristalización de la lectina	25
CAPITULO 4	
4.1 Resultados	27
4.1 Purificación	27
4.2 Caracterización	28
4.2.1 Determinación del peso molecular	28
4.2.1.1 Electroforesis SDS PAGE	28
4.2.1.2 Espectro de masas	29
4.2.2 Punto isoelectrico	30
4.2.3 Pruebas de estabilidad	31
4.2.3.1 Efecto de diferentes aditivos en la actividad de la lectina	31
4.2.3.2 Efecto de diferentes aditivos en la solubilidad de la lectina	31
4.2.3.3 Pruebas de congelación	33
4.2.3.4 Pruebas de solubilidad a altas concentraciones	34
4.2.4 Efecto de la temperatura en la actividad de la lectina	36
4.2.5 Pruebas de inhibición	37
4.2.6 Estudios de dispersión dinámica de luz	38
4.2.6.1 Efecto del pH	38
4.2.6.2 Efecto de la temperatura	39
4.2.6.3 Efecto de la adición de rafinosa	41
4.2.6.4 Efecto de la adición de glicerol	42
4.2.6.5 Efecto de la adición de rafinosa en presencia de glicerol	43
4.2.7 Estudios conformacionales y de estructura secundaria por DC	44
4.2.7.1 Efecto de la temperatura	45
4.2.7.1.1 Efecto de la temperatura a 209nm y 226 nm	47

CONTENIDO	PAGINAS
4.2.7.2 Efecto de la adición de glicerol	47
4.2.7.2.1 Efecto de la adición de glicerol a 220 nm y 226nm	49
4.2.7.3 Efecto de la adición de rafinosa	49
4.2.7.2.1 Efecto de la adición de rafinosa a 209 nm	50
4.2.8 Estudios de calorimetría por ITC	51
4.2.9 Cristalización de la lectina pura	52
 CAPITULO 5	
5. Análisis de resultados	53
5.1 Determinación del peso molecular	53
5.2 Determinación del punto isoeléctrico	54
5.3 Pruebas de estabilidad	54
5.4 Efecto de la temperatura en la actividad.	56
5.5 Pruebas de inhibición	56
5.6 Estudios de dispersión dinámica de luz	57
5.6.1 Efecto del pH	57
5.6.2 Efecto de la temperatura	57
5.6.3 Efecto del ligando	58
5.6.4 Efecto del glicerol	58
5.6.5 Efecto del ligando en presencia de glicerol	59
5.7 Estudios conformacionales y de estructura secundaria	59
5.7.1 Efecto de la temperatura	60
5.7.2 Efecto del glicerol	60
5.7.3 Efecto del ligando	61
5.8 Estudios de calorimetria ITC	61
5.9 Cristalización de la lectina pura	63
Conclusiones	64
Referencias	66

RESUMEN

En este trabajo se logró aislar y purificar una lectina del extracto del mejillón *Mytilus edulis*, utilizando estromas glutaraldehizados de eritrocitos de conejo como soporte. La lectina mostró afinidad por la Rafinosa siendo su actividad la más alta reportada a la fecha para lectinas que unen éste azúcar, con un punto isoeléctrico de 9.43 y una masa de 6450 Da. Se encontró que la lectina es estable en presencia de 200 mM de NaCl, 10 mM de Glucosa y 1% de Glicerol. En esta condición se puede congelar a la proteína sin perder la actividad. Además es posible concentrarla sin que ésta precipite o pierda su actividad como ocurre en ausencia de dichos aditivos.

Mediante estudios de dispersión dinámica de luz se determinó que la lectina tiene una fuerte tendencia a interaccionar con ella misma, formando grandes agregados. Estos agregados son dependientes de la temperatura, encontrando el menor estado de agregación y polidispersidad a 5 °C. Por técnicas de dicroísmo circular, se determinó que la estructura secundaria predominante es la hoja beta. Además se determinó que el aumento de temperatura ocasiona cambios conformacionales, sin embargo, esta lectina es altamente resistente a la temperatura y no llega a la desnaturalización aún a 95 °C. La interacción con su ligando (Rafinosa) también ocasiona cambios conformacionales debido que es necesario un cambio conformacional para que se lleve a cabo el entrecruzamiento con dicho ligando.

Los estudios de calorimetría de titulación isotérmica revelaron que la lectina tiene tres sitios de unión ajustándose a un modelo matemático secuencial, el cual sugiere que la lectina presenta un reacomodo molecular para tener disponible un sitio de unión y poder unir así otra molécula de Rafinosa. Los valores de las constantes de unión fueron mayores que los reportados a la fecha para otras lectinas.

Se encontraron las condiciones óptimas para obtener cristales de la lectina, sólo resta mejorar la calidad de los mismos para posteriores estudios de difracción de rayos X que permitan obtener su estructura tridimensional.

ABREVIATURAS

Å: Ámstrong	mM: milimolar
BSA: Albúmina de suero de bovino	mOsM: miliosmolar
CRD: Dominio de reconocimiento al carbohidrato	MBL: Lectina que se une a manosa
ConA: Concanavalina A	MBP: Lectina que se une a manano
CD: Dicroísmo circular	n: Estequiometría de reacción.
DLS: Dispersión dinámica de luz	NK: asesino natural (natural killer)
DTT: Ditiotreitól	nm: nanómetros
ECF: Eritrocitos de conejo formalinizados	PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
EDTA: Acido etilendiamino tetracético	PBS: Amortiguador de fosfatos salino
ESL: Método de cuantificación de proteína, exacto, sensible y de baja interferencia	pI: Punto isoelectrico
g: Fuerza centrífuga relativa	ΔS: Entropía
GAG: Glicosaminoglicano	SDS: Dodecil sulfato de sodio
GlcNAc: N-acetil-D-glucosamina	Tris: Tris (hidroximetil) amino-metano
ΔH: Entalpía	TSG-6: Gen estimulado – 6 del Factor de necrosis de tumor
Ig: Inmunoglobulina Ig	U: Unidad de actividad
ITC: Calorimetría de titulación isotérmica	UV: Ultravioleta
Kb: Constante de unión	μL: microlitros
kDa: Kilodaltones	μmol: micromoles
λ: Longitud de onda	
LME: Lectina de <i>Mytilus edulis</i>	
MALDI-TOF: Espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistidas por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo.	

OBJETIVO GENERAL:

- Estudiar fisicoquímica y estructuralmente la interacción proteína-proteína y proteína-ligando de una lectina del mejillón, *Mytilus edulis*

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Purificar una lectina presente en el extracto del mejillón *Mytilus edulis*.
- Realizar estudios de estabilidad de la proteína pura mediante la adición de diferentes compuestos.
- Estudiar la interacción proteína-proteína de la lectina pura en solución a diferentes condiciones de temperatura, concentración y pH así como la interacción con su ligando y diferentes aditivos, mediante técnicas de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).
- Realizar estudios conformacionales de la lectina, sola y en presencia de aditivos y su ligando por técnicas de Dicroísmo Circular (CD).
- Determinar las constantes de unión de la lectina con su ligando en diferentes condiciones utilizando técnicas de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).
- Realizar pruebas de cristalización para futuros estudios cristalográficos.

INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas de origen no inmune que tienen la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas.¹ Todas las lectinas conocidas tienen dos o más centros de unión para los azúcares lo cual explica su capacidad para aglutinar, es decir, establecer enlaces cruzados con los eritrocitos y otras células. Primeramente forman estos enlaces con los azúcares específicos y de forma secundaria a una molécula glicosilada.² Se han encontrado en plantas, animales vertebrados e invertebrados y microorganismos. Su importancia radica en sus propiedades biológicas como la aglutinación de eritrocitos y otras células como linfocitos, células sexuales, plaquetas y bacterias, aglutinación de virus, inducción de mitosis y otras. Además, permiten realizar estudios que involucran la proliferación de linfocitos con el fin de evaluar la producción de citoquinas y la expresión de sus receptores en pacientes con enfermedades tales como SIDA, tuberculosis y la leishmaniosis, entre otras. También permiten caracterizar algunos aspectos de la respuesta inmune, estudiar la interacción de virus como el de la hepatitis B y el VIH para conocer su susceptibilidad, es posible analizar las funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células ocasionadas por algunas drogas y se pueden detectar anomalías cromosómicas.

Se sabe que la interacción de las lectinas con células se puede inhibir en presencia de azúcares ya que las lectinas tienen capacidad de reconocer patrones de oligosacáridos presentes en las superficies celulares siendo por ello sondas que pueden ser utilizadas como marcadores en estudios de la membrana plasmática. Se utilizan además en la detección de transformaciones celulares malignas, debido a la aglutinación preferencial que muestran por estas células transformadas. Así, el estudio de las lectinas nos brinda información valiosa acerca del cáncer y su detección.¹

Las lectinas en invertebrados han sido muy poco estudiadas y se cuenta con muy poca información sobre todo fisicoquímica y estructural. En moluscos se piensa que funcionan como su sistema de defensa y en algunas ocasiones para evitar el congelamiento de los mismos. En el presente estudio se trabajó con una lectina aislada del mejillón *Mytilus edulis*, y se analizaron sus interacciones proteína-proteína y proteína-ligando, esto desde un punto de bioquímico, fisicoquímico y estructural.

1. GENERALIDADES

Las lectinas son glicoproteínas de origen no inmune y no enzimático que tienen la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Contienen al menos dos sitios de unión, de ahí que puedan enlazarse en primer lugar a un azúcar específico y en forma secundaria a una molécula glicosilada.¹ Las lectinas, en particular, se unen a carbohidratos y no despliegan actividad enzimática hacia los azúcares que reconocen, ni alteran en algún modo su estructura covalente.² 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 proteicas no relacionadas.

Las lectinas poseen propiedades que convierten a esta clase de proteínas en herramientas muy útiles en los laboratorios biológicos, debido a ello se utilizan en numerosas investigaciones que incluyen: estudio de la estructura de las membranas, detección de transformaciones malignas, purificación de glicoconjugados, estudios citogenéticos, ensayos histoquímicos, enzimáticos y en la determinación de grupos sanguíneos.

1.1. HISTORIA DE LAS LECTINAS

El estudio de las lectinas fue iniciado por Stillmark en 1888 al describir la hemaglutinación provocada por extractos de semillas de castor (*Ricinus communis*). A la proteína responsable de la aglutinación de los eritrocitos la llamó Ricina.^{1,3,4} Posteriormente, S. W. Mitchell describió la coagulación de la sangre como una indicación de la actividad de una lectina del veneno de víbora. A partir de entonces se han reportado diversos artículos acerca de las propiedades de las proteínas llamadas lectinas. Fue hasta 1898 que se introdujo el término hemaglutinina por M. Elfstrand para describir a proteínas de plantas que aglutinaban eritrocitos.³ Hasta entonces sólo se conocía la propiedad aglutinante de las lectinas y en 1913, se comenzó a purificarlas utilizando células y en 1919 se obtuvo el primer cristal de una lectina, la Conavalina A (ConA).³ Cinco años después se descubrieron lectinas virales y a finales de los 30's se detectó una lectina específica para un grupo sanguíneo, pero sólo hasta 1952 se pudo descubrir la naturaleza de los carbohidratos presentes en los grupos sanguíneos, esto gracias a las lectinas. La primera lectina animal

específica para el grupo A se encontró en la almeja *Saxidomus* sp. y posteriormente se reportaron lectinas anti-A en el caracol *Helix pomatia* y especies relacionadas.⁴

A pesar de que se conocía la valiosa propiedad de estas proteínas, el término “lectina” que describía a proteínas que se unen a carbohidratos se introdujo en 1954. En 1972 G.M Edelman y colaboradores determinaron la secuencia y la estructura tridimensional de una lectina, la concanavalina A.⁵ En 1974, Stockert describió una aglutinina de eritrocitos humanos encontrada en el hígado de conejo siendo esta la primera lectina identificada en un mamífero y receptora de asialoglicoproteínas³. La primera estructura de una lectina de origen animal fue resuelta por Lobsanov y colaboradores.³

En 1988 Drickamer reunió todas las estructuras primarias de lectinas que se conocían a la fecha y estableció una clasificación con base en dicha estructura.⁶

1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS LECTINAS

Las semejanzas en estructura primaria de las lectinas animales permitió clasificarlas en dos grupos principales las Tipo C y las Tipo S.³ Ambas familias tienen un dominio de aproximadamente 120 residuos de aminoácidos, aunque los dominios del tipo-C y tipo-S difieren completamente entre sí. Hoy en día la percepción es diferente porque existen muchas lectinas calcio dependientes y que no están definidas dentro de la secuencia primaria tipo C, y lectinas tipo S (comúnmente conocidas como galectinas) que no son sulfidril dependientes.

Las lectinas tipo-C pueden ser clasificadas en subgrupos dependiendo de su gen estructural y la naturaleza de sus dominios adicionales:^{6,7}

Hialectinas.

Receptores de asialoglicoproteínas.

Colectinas.

Selectinas.

Grupo de receptores transmembranales de NK.

Receptor manosa de macrófagos.

- Lectinas simples (dominio único).

Sin embargo se han encontrado lectinas que no presentan en su totalidad una estructura para clasificarlas como C o S a estas se les nombra como Tipo N: ^{6,7}

- Tipo-I inmunoglobulinas que reconocen carbohidratos
 - Tipo-P (receptores fosfomanosil)
 - Pentraxinas su organización estructural es pentamérica consistente y parece tener un papel probable en la respuesta inmune.
 - Lectinas del huevo.
 - Calreticulina y calnexinas
 - ERGIC-53 y VIP-36
 - Discoidinas
 - Aglutininas de la anguila (fuclectinas)
 - Lectinas anexinas
 - Ficolinas
 - Taquilectinas 5^a y 5B
 - Aglutininas de Limas flavus
- } Tipo fibrinógeno

Existen otras lectinas que no pertenecen a una familia estructural conocida, pero que frecuentemente pertenecen a familias bien establecidas, que incluyen a otros miembros que no se unen a sacáridos, como es el caso de las listadas abajo. ^{6,7}

- Amfoterinas
- CD1 1b/CD18(CR3)[integrinas]
- CEL-III (de *Cucumaria echinata*)
- Factor H complemento
- Taquilectina-1/taquilectina P
- Taquilectina-2 isolectinas
- Taquilectina-3
- Trombospondina
- Citoquinas.

2. ANTECEDENTES

2.1. INTERACCIONES PROTEÍNA- PROTEÍNA.

Las proteínas en los sistemas biológicos raramente actúan en forma aislada por lo que se unen con a otras biomoléculas para dar las respuestas celulares específicas. Estas biomoléculas son a menudo otras proteínas, y un número sorprendente de estas asociaciones proteína-proteína intervienen en diversas reacciones en cascada.⁸ Las interacciones proteína-proteína afectan todos los procesos en una célula. Se ha propuesto que se conectan todas las proteínas en una célula dada a través de una red extensa donde las interacciones no covalentes están continuamente uniéndose y dissociándose. Esas fuerzas que son responsables de tales interacciones incluyen las fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y los efectos hidrófobos. Se cree que los efectos hidrófobos manejan las interacciones proteína-proteína mientras los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas gobiernan la especificidad de la interfase. Normalmente se excluye el agua de la región del contacto.⁸ Hay ciertas condiciones que favorecen la agregación como, altas concentraciones de la proteína, secuencia de aminoácidos, pH, temperatura, fuerza iónica, la presencia de solutos (desnaturalizantes como la urea,), y la presencia de chaperonas.⁹

La asociación de proteínas consigo mismas para formar dímeros y oligómeros de orden superior es un fenómeno muy común. Los estudios estructurales y biofísicos muestran que la dimerización de las proteínas o la oligomerización son factores importantes en la regulación de proteínas como las enzimas en su forma más simple, la oligomerización funciona como un mecanismo general que puede depender de la concentración de la proteína. Un aumento en la concentración de la proteína sobre el umbral de la oligomerización puede ser el estímulo para la activación de la enzima; de manera semejante, la desactivación de la enzima aplicará cuando los niveles celulares de la enzima se disminuyan. Además de responder a la concentración de la proteína, hay muchas maneras más complejas en que la dimerización se usa para regular la actividad de la enzima. Los fenómenos de dimerización y oligomerización pueden conferir varias ventajas

estructurales y funcionales diferentes a las proteínas, incluyendo el mejoramiento de la estabilidad, control de la accesibilidad y especificidad de sitios activos.⁸ (figura 2.1)



Figura 2.1. Procesos de oligomerización mediante el acoplamiento a chaperonas

2.2. AGREGACIÓN PATÓGENA

La agregación es un fenómeno común en las proteínas en solución, que frecuentemente altera sus propiedades bioquímicas y biofísicas normales. La agregación de proteínas es responsable de la formación de cuerpos de inclusión en las células bacterianas, la pérdida de estabilidad de la proteína y de las patologías observadas por la oligomerización anormal de varias proteínas.¹⁰

Un proceso de agregación de la proteína que causa acumulación intracelular o extracelular, depósitos de proteína insoluble causa muchas enfermedades neurodegenerativas importantes asociadas con el envejecimiento.¹¹

El reconocimiento de que la agregación de proteínas juega un papel prominente en la patogénesis de las patologías importantes como las enfermedades de Alzheimer's y el mal de Parkinson incitó a la comunidad científica para enfocar su atención en el mecanismo

molecular de agregación de la proteína. Muchas proteínas con las funciones sofisticadas pueden agregarse consigo mismas porque su plegamiento es complicado y los contactos intermoleculares anormales pueden predominar encima de las interacciones intramoleculares normales.¹¹

La agregación de la proteína es un evento negativo en la naturaleza y generalmente representa un fracaso en el logro del arreglo espacial correcto (estado plegado) necesario en una proteína funcional. Cuando una proteína no alcanza hacer el pliegue correcto, adquiere la estructura anormal o anormalmente persiste en un estado intermedio que normalmente debe visitar temporalmente a lo largo de la senda plegadura.¹⁰

En estos estados la proteína expone anormalmente grandes áreas no-polares que representan los sitios sumamente sensibles a la creación de interacciones hidrofóbicas intermoleculares con otros que no pliegan apropiadamente las moléculas. Para las proteínas muy largas, en los disolventes acuosos, miles de interacciones no covalentes se exigen para crear una fuerza adecuada para preservar la estructura tridimensional. Es notorio todo lo que representa para la proteína mantener su estructura y función manteniendo el estado plegado. Se han observado dos tipos de fenómenos de agregación, ordenada que consiste en la formación de placas amiloides y desordenada con la formación de cuerpos de inclusión o depósitos amorfos. Esta agregación está regida por fuerzas que no se han especificado aun.¹⁰ (figura 2.2)

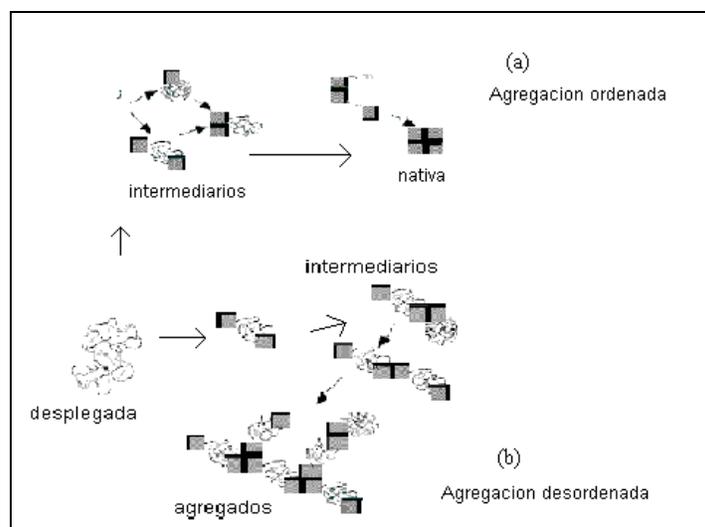


Figura 2.2 Esquema de una agregación ordenada (a) y (b) una agregación desordenada causante de enfermedades.^{10,11}

Se sabe que varias enfermedades presentan fenómenos de agregación, estas incluyen la formación de placas amiloides por citar algunas tenemos Alzheimer, encefalopatías espongiiformes bovino (mal de las vacas locas), mal de Parkinson. Entre las enfermedades en donde se han observado cuerpos de inclusión (depósitos amorfos) esta las cataratas.¹²

2.3. MECANISMOS DE AGREGACIÓN

Uversky¹¹ ha propuesto un modelo en el cual el primer paso de fibrilización es la transformación de una proteína nativa o desplegada a través de un intermediario parcialmente desplegado¹¹ Figura 2.1. La exposición de superficies hidrófobas lleva a la formación del intermediario produciendo oligómeros solubles o a la formación de fibras (placas amiloides) Figura 2.4, o vía un núcleo crítico produciendo agregados amorfos. (Figura 2.3).^{11,12}

El estado parcialmente plegado es promovido por interacciones de repulsión carga-carga, cambios en el pH o aumento de la temperatura.¹¹

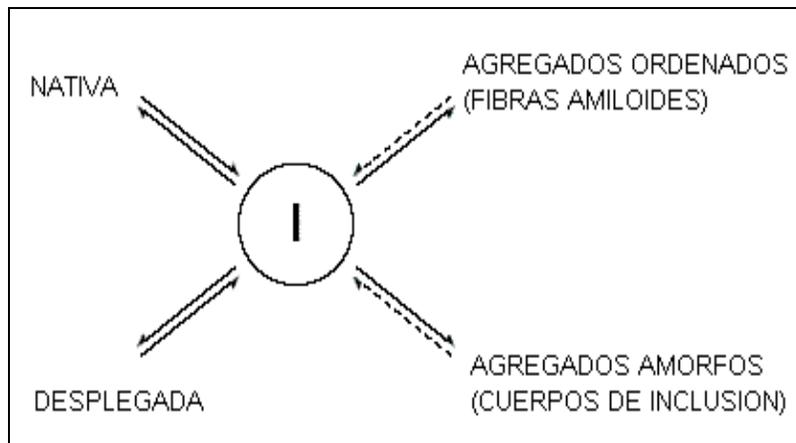


Figura 2.3 Esquema general de una agregación causante de enfermedades. Modelo propuesto por Uvensky¹¹

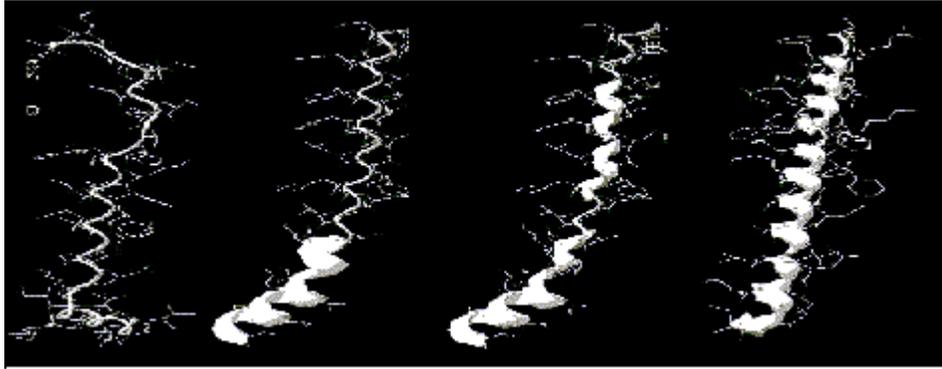


Figura 2.4 Proceso de fibrilización en placas amiloides

2.4. INTERACCIONES LECTINA-LIGANDO

Estudios de rayos X de estructuras cristalinas de varias lectinas de animales y plantas, demuestran sus estructuras oligoméricas. Como resultado, la unión de lectinas lleva al entrecruzamiento y agregación específica de glicoproteínas y glicolípidos en la superficie celular. En muchos casos esas interacciones resultan tener efectos en la transducción de señales como mitogénesis, regulación del crecimiento celular de neuroblastomas e inducción de apoptosis en células humanas activadas¹³

Las interacciones lectina-ligando pueden ser divididas en dos grupos generales: aquellas que involucran N- y O-glicanos, las cuales han sido muy estudiadas¹⁴, y aquellas que involucran cadenas GAG (la mayoría mediadas por arreglos ordenados de contactos de carga superficial).

2.4.1. N- Y O-GLICANOS

Los sitios de unión son de relativamente baja afinidad y se encuentran en huecos poco profundos de la superficie de las proteínas. 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 de Van der Waals de la cara hidrofóbica de los anillos de monosacáridos contra las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos y a través de iones divalentes. Finalmente, la región de contacto real entre el sacárido y el polipéptido involucra típicamente a uno de los tres residuos de monosacárido. Como

consecuencia de ello, estos sitios de unión de las lectinas tienden a ser de relativamente baja afinidad, pero de gran especificidad. La habilidad de los sitios de baja afinidad para mediar interacciones biológicamente relevantes en el sistema intacto, al parecer requiere de multivalencia.^{15, 16}

2.4.2. LECTINA-GAG

Sobre estos se han realizado un menor número de estudios. Sin embargo, recientemente se han resuelto estructuras que han revelado varias características sobre estas interacciones, si bien, no se comprenden bien algunas especificidades, como en el caso de la interacción anexina-GAG. Una de las estructuras que más ha revelado bases estructurales 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 azúcar¹⁷, A diferencia las lectinas animales que unen N- y O-glicanos, que tienden a reconocer aspectos terminales específicos de cadenas de azúcares acomodándolos en huecos de unión someros pero relativamente bien definidos, las interacciones proteína-GAG parecen involucrar 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 pocas estudios estructurales realizados, las cuales podrían reflejar tan sólo particularidades de ciertas interacciones. Se hace evidente que es necesario que se conozcan fundamentos de otros ejemplos de interacción de este tipo para que se puedan establecer puntos que cumplan la mayoría de interacciones lectina-GAG y que sean equivalentes a los datos que se tienen para las interacciones de tipo lectina-N- y O-glicanos.¹⁸.

2.5. PROPIEDADES MULTIVALENTES DE LAS LECTINAS PARA UNIR CARBOHIDRATOS.

Las lectinas son proteínas multivalentes que unen carbohidratos y se han encontrado extensamente en la naturaleza, dentro de las lectinas animales están las galectinas han sido implicadas en el control del crecimiento celular en la metástasis y regulación de la

apoptosis, cada vez hay mas evidencia de que sus propiedades multivalentes son importantes para su papel biológico.¹³

Recientes estudios estructurales de lectinas multivalentes y complejos de entrecruzamientos lectina-carbohidrato han proporcionado una visión de la naturaleza de esas interacciones. En general, dos tipos de entrecruzamiento se han observado y designado como tipo I y tipo II.^{19,20}

2.5.1. ENTRECruzAMIENTO TIPO I

En los complejos tipo I, una lectina divalente forma un entrecruzamiento con un carbohidrato monovalente en una dimensión. Estos complejos a menudo son solubles y poseen un alto grado de polimorfismo debido a su flexibilidad. Cada complejo puede acomodar más de un tipo de lectina divalente o carbohidrato monovalente^{19,20}, (figura 2.5).



Figura 2.5 Esquema de un entrecruzamiento de tipo I

2.5.2. ENTRECruzAMIENTO TIPO II

Al entrecruzamiento entre lectinas y carbohidratos multivalentes de los cuales una de dos moléculas posee una valencia mayor a dos es designado como tipo II. El entrecruzamiento puede darse entre una lectina tetravalente y un carbohidrato divalente. Esas altas interacciones multivalentes conducen a menudo a la formación de complejos entrecruzados en dos o tres dimensiones, los cuales pueden precipitar en solución, pudiendo existir como complejos desordenados u ordenados en bloques.^{19,20} (figura 2.6)

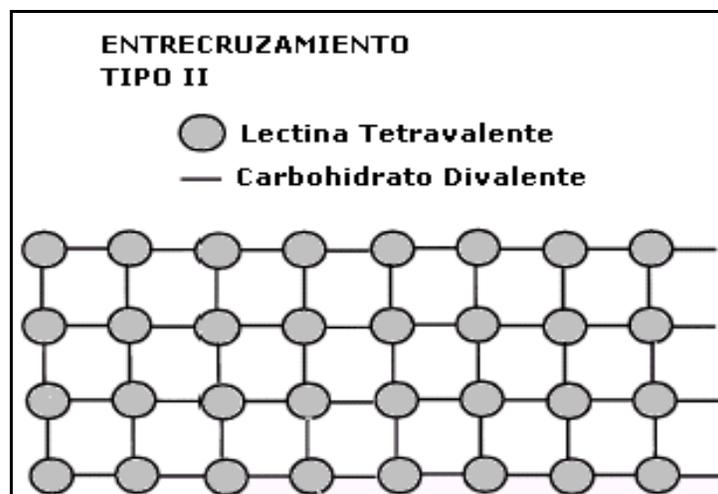


Figura 2.6 Esquema general de un entrecruzamiento de tipo II

2.6. LECTINAS EN INVERTEBRADOS MARINOS

Se han resuelto ya varias estructuras tridimensionales en invertebrados tales como la estructura de la SAP de *Limulus polyphemus*²¹ la Tachylectina-2 de *Tachypleus tridentatus*²², la CEL-I de *Cucumaria echinata*²³, la CEL-III de *Cucumaria echinata*²⁴. Sin embargo la información acerca de sus funciones es muy limitada. La mayoría de las lectinas encontradas en estos organismos se sabe pertenecen a la familia del tipo C aunque difieren de las lectinas de vertebrados de la misma familia, ya que las lectinas de tipo C en invertebrados marinos suelen contener varios dominios funcionales distintos.

Cada CRD (domino receptor a carbohidratos) tiene un sitio que se une a carbohidratos, muchos de los cuales tienen especificidad hacia la galactosa o N-acetylgalactosamina²⁵ Las lectinas en los invertebrados marinos se cree actúan como factores humorales en el mecanismo de la defensa, al igual que las inmunoglobulinas en vertebrados en donde hay una activación de los fagocitos por la aglutinación de células ajenas que provocan las lectinas o el aumento de la producción de lectina en fluidos corporales después de la inyección de sustancias extrañas. Las lectinas de los invertebrados marinos reconocen carbohidratos de la superficie celular de bacterias y tal vez estén involucradas proteínas de la familia de las inmunoglobulinas. El receptor glicosilado del fagocito permite la unión del complejo a través de una lectina en la membrana citoplasmática promoviendo así la fagocitosis^{25,26}. Como ya se mencionó se han estudiado ya varias lectinas encontradas en

invertebrados marinos en donde se ha observado actividad hemolítica tal es el caso de la del cangrejo herradura cuya afinidad apunta hacia el ácido siálico y la del pepino de mar *Cucumaria echinata*²³ con afinidad por galactosa. Después de unirse a las cadenas específicas del carbohidrato en la superficie del eritrocito, estas lectinas dañan la membrana de la célula, conduciendo la lisis de la célula.²⁷

La defensa interna en los moluscos está mediada por un sistema innato que involucra tanto componentes celulares como humorales. Los primeros incluyen la fagocitosis y la encapsulación con la subsecuente destrucción del patógeno vía actividad enzimática y liberación de metabolitos de oxígeno, mientras que los segundos incluyen opsoninas y péptidos antimicrobianos. En los invertebrados las proteínas que intervienen en el proceso de opsonización son las lectinas.

Estas lectinas pueden desempeñar un papel importante contra infecciones bacterianas o los enemigos naturales²². Sin embargo no se conoce mucho al respecto, no se tiene la certeza de la función de las lectinas en los invertebrados y en el caso de los moluscos sus estructuras son prácticamente desconocidas, únicamente se ha logrado cristalizar la lectina del *Hélix pomatia*, aunque sin una buena difracción que permitiera resolver su estructura.²⁸

La actividad de la lectina de *Mytilus edulis*²⁹ es la mas alta reportada a la fecha. Esto podría deberse en primer lugar a que la unión con su ligando sea secuencial, transformando así el sitio de unión permitiendo una mayor afinidad por el ligando y en segundo lugar a que sus fenómenos de agregación realicen un reacomodo de las moléculas exponiendo un mayor numero de sitios de unión y así tener una mayor especificidad.

2.7. DESCRIPCIÓN DEL MEJILLÓN *MYTILUS EDULIS*

Los mejillones (figura 2.7) son moluscos bivalvos que viven fijos a las rocas desde la zona intermareal hasta los 10 m de profundidad y que pueden quedar al descubierto durante la marea baja, ocupando el mismo nivel de los "balanos" y las "lapas", con quienes compiten por el espacio. Es una especie típicamente filtradora, su crecimiento es rápido, y alcanzan de 5 a 12 cm de longitud pudiendo llegar a 20 cm en algunas especies, dependiendo de la

cantidad de alimento disponible y de las condiciones ambientales que regulan su metabolismo, lo cual se aprovecha para cultivarlos. Son especies cosmopolitas que viven en aguas tropicales y templadas; en las costas occidentales de México abundan el "mejillón común" (*Mytilus edulis*) y el de California (*Mytilus californianus*). La concha de los mejillones está formada por dos valvas iguales de forma triangular, puntiaguda en un extremo y redondeada en el otro. La superficie de la concha es lisa, marcándose únicamente las líneas de crecimiento; su color es negro azulado; su parte interna es nacarada y de color violáceo.³⁰



Phylum: Mollusca

Clase: Bivalvia

Orden: Mytiloidea

Suborden: Anisomyaria

Superfamilia: Mytilacea

Familia: Mytilidae

Subfamilia: Mytilinae

Género y especie: *Mytilus edulis*

Nombre común: Mejillón

Figura 2.7. Clasificación sistemática del mejillón *M. edulis*.

3. METODOLOGÍA

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron moluscos bivalvos pertenecientes al género *Mytilus* provenientes de Baja California. (Figura 2.7)

3.2. EXTRACCIÓN

Para evitar la desnaturalización de la proteína todos los pasos de la purificación se realizaron a 4 °C. Se utilizaron los organismos completos separados de sus conchas. Se homogenizaron utilizando un homogenizador de tejidos Polytron PT-MR 2100 en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, una vez homogenizado se centrifugó a 22,000 g durante 40 min en una centrífuga BECKMAN Modelo J2-21 y se retiró el tejido. El sobrenadante se guardó a 4 °C hasta su utilización.

3.3. PREPARACIÓN DE LOS ESTROMAS

Para la preparación de los estromas se siguió la técnica derivada de la presentada por Zenteno³¹ originalmente desarrollada por Ochoa y Kristiansen.³² Se colectó sangre de conejo en solución de Alseverg y se centrifugó a 1000 g durante 20 min. Se realizaron 3 lavados en amortiguador de fosfatos isotónico (310 mOsM, pH 7.4). Posteriormente se centrifugaron a 4000 g por 20 min decantando el amortiguador. Posteriormente, las células se suspendieron en amortiguador hipotónico(20 mOsM, pH 7.4) en una proporción de 1:15 para provocar la hemólisis. Después se centrifugaron a 20 000 g durante 40 min, se realizaron 3 lavados con amortiguador hipotónico o PBS y se liofilizaron.

Del liofilizado se tomaron 52 mg y se resuspendieron en 23 mL de PBS. Se mezclaron con 2.5 mL de solución de glutaraldehído al 25% ajustando el pH a 7.2 con solución de NaOH 2M. Se incubaron por 16 h a 20 °C y el material polimerizado se lavó con PBS extensivamente. Después se incubó con 25 mL de PBS con 1M de Glicina durante toda la noche para neutralizar los grupos glutaraldehído libres. Antes de utilizar los estromas, estos se lavaron con PBS.

3.4. PREPARACIÓN DE LOS ERITROCITOS DE CONEJO FORMALINIZADOS (ECF)

Los eritrocitos de conejo formalinizados se prepararon según la técnica de Fragkiadakis.³³ Se colectó sangre por vena o punción cardiaca y se realizaron lavados con NaCl al 0.9% a 1000 g durante 20 min. A 25 mL de formalina (formaldehído al 37%) se les ajustó el pH a 5.0 con amortiguador de fosfatos 0.7 M, pH 7.0. Se introdujeron en una membrana de diálisis llenándola en dos terceras partes. Dicha membrana se sumergió en una proporción de 20% v/v en 100 ml de solución de amortiguador de fosfatos 50mm pH 7.4 que contiene 150mM de NaCl, se dejó en agitación suave durante 12 horas y a 4°C, transcurrido el tiempo se perforó la membrana para liberar el formaldehído y fijar los eritrocitos por 36 horas con agitación suave a 4°C. Después de la fijación los ECF se precipitaron por centrifugación a 1000 g durante 20 min y se hacen lavados extensivos con NaCl al 0.9%. Posteriormente para unir los grupos aldehídos libres presentes en la superficie celular los ECF se suspendieron 20% v/v en 100 ml de solución de amortiguador de fosfatos 50mm pH 7.4 que contiene 150mM de NaCl y 2% de albúmina de suero bovino y se incubaron por 24 horas a 4°C con agitación suave. Finalmente los ECF se precipitaron por centrifugación a 1000 rpm durante 20 minutos y se hacen lavados extensivos con NaCl al 0.9%, para formar una solución al 20% de ECF los cuales se guardaron a 4°C en presencia de 0.055 de azida de sodio.³³

3.5. PRUEBAS DE ACTIVIDAD AGLUTINANTE

En esta técnica se observó la aglutinación de eritrocitos de conejo formalizados, se colocaron en placas de microtitulación (fondo cóncavo) 50 µL de amortiguador de fosfatos 50mM pH 7.4; 50µL de proteína y se hicieron diluciones seriadas (50µL) y 50µL de eritrocitos al 10%. Se utilizó como blanco el amortiguador. Esta prueba se realizó al extracto y a la proteína pura. Se incubaron a temperatura ambiente por hora y media y se evaluó la actividad aglutinante a simple vista y a través del microscopio.

3.6. CUANTIFICACIÓN DE LA LECTINA

Se utilizó el método del ESL (Exact, Sensitive, Low interference). Este método es una optimización del procedimiento descrito por Matsushita,³⁴ el que utiliza una reacción parecida a la de biuret donde el Cu^{+2} está inicialmente acomplejado con la proteína en un medio alcalino. El contenido de proteína es después determinado midiendo la absorbancia del complejo Cu^+ -bathocuproine el cual se forma en exceso de Cu^{+2} no quelado por la proteína. El exceso de Cu^{+2} es reducido a Cu^+ con ácido ascórbico formando un complejo coloreado con bathocuproine. La señal es inversamente proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos, en contraste con otros métodos de cuantificación los cuales son afectados por las cadenas laterales de los aminoácidos. Por lo tanto, la variación proteína-proteína es muy baja. Este método permite detectar de 20 a 800 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.

3.6.1. CURVA DE CALIBRACIÓN

Para la cuantificación de proteína en las muestras y la elaboración de la curva de calibración se utilizó el kit y se siguió el protocolo de Roche.³⁴ Dicha curva se hizo por triplicado.

- Los reactivos A y B deben estar a temperatura ambiente antes de usarse.
- Adicionar 100 μl del reactivo A al tubo de reacción, posteriormente adicionar 50 μl de la muestra o estándar, mezclar e incubar por lo menos 5 min.
- Adicionar 1000 μl del reactivo B mezclar y tomar la lectura a 485 nm a los 30 segundos.
- Repetir el mismo procedimiento para los diferentes estándares y muestras.

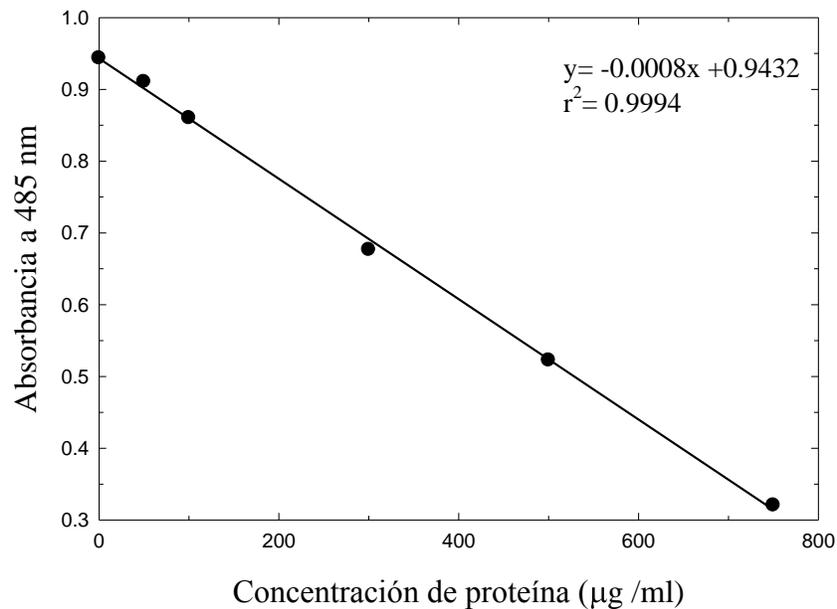


Figura 3.1 Curva de calibración de proteína utilizando el método de ESL y albúmina de suero de bovino como estándar.

3.7. PURIFICACIÓN DE LA LECTINA DE *M. EDULIS*

Para la purificación de la lectina se utilizaron estromas de conejo preparados como se mencionó en el inciso 3.3. Estos estromas son reconocidos por la lectina, por lo que se utilizaron para lograr la purificación de la misma de un solo paso. El extracto se dejó interactuar 5 h con los estromas para permitir la unión de la lectina, posteriormente se centrifugó a 22,000 g por 40 min, el sobrenadante se eliminó y los estromas con la lectina unida se lavaron con el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 para retirar las proteínas que no se unen. Después se realizaron 3 lavados con amortiguador de fosfatos pH 6.0, seguido de uno con una solución de azida de sodio al 0.05% y por último con amortiguador de fosfatos a pH 2.0. Esta última fracción se dializó con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, 10mM de Glucosa, 200 mM de NaCl y 1% de Glicerol. Se determinó la pureza mediante técnicas electroforéticas y de espectrometría de masas donde solo se observó una proteína purificada. (Figuras 4.2 y 4.3).

3.8. CARACTERIZACIÓN DE LA LECTINA DE *M. EDULIS*

3.8.1. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

Con el fin de tener un valor confiable, el peso molecular de la lectina purificada se determinó por dos métodos: electroforesis y espectrometría de masas.

3.8.1.1. ELECTROFORÉISIS SDS-PAGE

La técnica de SDS-PAGE separa a las proteínas basándose principalmente en sus pesos moleculares, teniendo la ventaja de romper proteínas complejas, compuestas de más de una subunidad y de hacer que el polipéptido monomérico migre de acuerdo a su peso molecular.

En las separaciones con electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, la migración esta determinada no por la carga eléctrica intrínseca de los polipéptidos sino por su peso molecular. El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas envolviendo su cadena hidrofóbica alrededor del polipéptido. Para la mayoría de las proteínas el SDS se une a una razón aproximada de 1.4 g / g de proteína, confiriendo una carga negativa neta al polipéptido en proporción con su longitud. El SDS también rompe puentes de hidrógeno, bloquea interacciones hidrofóbicas y despliega sustancialmente las moléculas de proteína minimizando las diferencias en forma molecular por eliminación de sus estructuras secundarias y terciarias.

Las proteínas pueden ser totalmente desplegadas cuando se emplea un agente reductor tal como el β -mercaptoetanol, el cual puede romper puentes disulfuro entre residuos cisteína. Los polipéptidos desnaturalizados por SDS y reducidos son cadenas flexibles con carga negativa uniforme por unidad de longitud. Por lo tanto debido a que el peso molecular es una función lineal de la longitud de la cadena del péptido, en los geles de electroforesis las proteínas se separan por su peso molecular.³⁵

El peso molecular de la proteína pura se determinó por electroforesis en microgeles homogéneos de SDS-poliacrilamida al 12.5 %, siguiendo el protocolo de Pharmacia y el sistema PhastSystem. Para determinar la masa molecular, se utilizaron patrones con masas moleculares conocidas.³⁵

3.8.1.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

En la técnica de MALDI TOF, un haz de láser pulsado golpea una muestra sólida calentándola y vaporizándola, ionizando así los compuestos con una mínima descomposición. Las proteínas se mezclan con una matriz que absorbe el calor del haz de láser. La muestra de proteína se seca junto con la matriz. La mayoría de las proteínas forma cristales y el láser se dirige hacia los cristales o agregados individuales. 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.

Para determinar la masa molecular de la proteína y establecer su pureza se utilizó la técnica de espectrometría de masas llamada espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistidas por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) de Bruker-Daltonics. Para esto la proteína se mezcló con ácido α -ciano-4-hidroxicinámico disuelto en una solución de 30 % acetonitrilo, 70 % agua y 0.1 % ácido trifluoroacético. Una pequeña gota de esta solución (1 μ L) se dejó secar a vacío hasta que cristalizó. Posteriormente se analizó mediante la incidencia de un láser de 337.1 nm y con una aceleración de voltaje de 19 kV en modo lineal.

3.8.2. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO (PI)

Se utilizaron microgeles homogéneos con un gradiente de pH de 3-9 en un equipo de electroforesis automatizado PHAST SYSTEMS de Pharmacia; utilizando patrones proteínas con pI conocido.³⁵

3.8.3. PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Durante el proceso de extracción y de preparación de la lectina de *M. edulis* para su purificación, se observó que la proteína tenía una fuerte tendencia a agregarse, perder la actividad e incluso precipitar, por lo que fue necesario encontrar las condiciones en que la lectina se mantuviera estable. Por esto, se realizaron diversas pruebas en las que se evaluó el efecto de diferentes condiciones y aditivos en la estabilidad.

3.8.3.1. EFECTOS DE ADITIVOS

Se utilizaron volúmenes de 700 μ L de proteína en solución con una concentración de 0.445 mg/mL y se adicionaron a cada una de las muestras cada uno de los aditivos a probar (Tabla 3-1) y se dejaron interactuar durante una semana. Transcurrido ese tiempo se probó su actividad y se midió la absorbancia a cada una de las muestras.

Tabla 3.1. Concentración de los aditivos utilizados en las pruebas de estabilidad de la lectina de *M edulis*

Aditivo	Concentración (mM)	Aditivo	Concentración (%)
EDTA	5	Manitol	0.5%
NaCl	200	Sorbitol	0.5%
DTT	1	Trealosa	0.5%
CaCl ₂	1	Glicerol	1.0%
Cisteína	5		
Glucosa	10		

3.8.3.2. PRUEBAS DE CONGELACIÓN

Se utilizaron volúmenes de 1 mL de proteína con concentración 0.445 mg/mL, se colocaron en congelación cuatro muestras en presencia de 200mM de NaCl, 10mM de Glucosa, 1% de glicerol respectivamente y la ultima con la mezcla de los tres aditivos. Durante una semana.

3.8.3.3. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Se utilizaron dos muestras de 1.5 ml de la proteína con una concentración de 0.351 mg/ml, en donde se probó el efecto del isopropanol y el glicerol en la solubilidad y posteriormente se cuantificaron las muestras. Se pusieron a concentrar dos muestras de 50ml presencia de glicerol e isopropanol respectivamente después se probó su actividad.

3.8.4. PRUEBAS DE INHIBICIÓN

En esta técnica se buscó un carbohidrato que inhibiera la actividad aglutinante de la proteína. Se colocaron en las placas de microtitulación (fondo cóncavo) 25 μ L del amortiguador de fosfatos pH 7.4 50 mM; 25, 50, 75, y 100 μ L del carbohidrato realizando diluciones de 50 μ L respectivamente; se le adicionaron 25 μ L de la proteína, se dejaron reposar por 30 min y finalmente se agregaron 25 μ L de eritrocitos.

Se utilizó un blanco positivo y un blanco negativo, el blanco positivo fue la proteína con los eritrocitos (aglutinación) y el blanco negativo el amortiguador de fosfatos. El resultado se expreso como la concentración mínima necesaria del carbohidrato para inhibir la actividad de la lectina.

3.8.5. ESTUDIOS DE DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

En este estudio se evaluó el comportamiento en solución y la conducta de agregación provocada por interacciones proteína-proteína, de la lectina de *M. edulis*, mediante el seguimiento de los cambios en polidispersidad y en el peso molecular con respecto a factores como son el pH, temperatura, concentración de la proteína y el efecto de diferentes aditivos. Se utilizó el equipo de Dispersión Dinámica de Luz “DynaPro-801” (protein solutions.Co) y el paquete computacional Dynamics. La lectina pura (400 μ L de concentración 1mg/ml), se inyectaron a través de filtros Anotop 10 de 0.2 μ m (Whatman) en el equipo mencionado.

Las partículas en solución se desplazan debido a movimientos brownianos. Esta movilidad está relacionada con el coeficiente de difusión y éste con el radio de la partícula. Iluminando la partícula con un rayo láser, la intensidad de la luz dispersada a un ángulo dado puede ser seguida en el tiempo. Como la partícula se mueve, la señal medida fluctuará. Midiendo las fluctuaciones y el camino en el cual ellas cambian, el coeficiente de difusión de las partículas y, a partir de éste, el radio de la partícula pueden ser determinados con la ecuación de Stokes-Einstein. La dispersión dinámica de la luz (DDL) es una técnica que permite medir el coeficiente de difusión traslacional (D_T) de una molécula o agregados en solución. La dispersión de luz monocromática causada por las

partículas en movimiento presentará fluctuaciones en su intensidad debido al movimiento browniano de las moléculas o agregados en solución.³⁶

El análisis del decaimiento de la función de autocorrelación esto es, una medición de las fluctuaciones de la intensidad en función del tiempo correspondiente a la señal de la intensidad dispersada, proporcionará información cuantitativa acerca del comportamiento en solución de los agregados moleculares. D_T se relaciona con el radio hidrodinámico (R_H) a través de la ecuación de Stokes-Einstein :

$$D_T = k_B T / 6\pi\eta R_H$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann, η es la viscosidad de la solución, T es la temperatura absoluta y R_H el radio hidrodinámico^{37,38}

Además, es posible determinar el peso molecular por medio de la ecuación de Mark Houwink $D_T = A_0 M^{\nu}$ Ésta considera la relación directamente proporcional del coeficiente de difusión traslacional con el peso molecular M , elevado a una potencia específica. Así, la constante de proporcionalidad que surge de esta ecuación toma en cuenta las propiedades del disolvente y se representa por A_0 . Esta ecuación requiere de una estimación adecuada del factor de estructura (ν), que para el caso particular de proteínas esféricas tiene un valor de 0.33 y se aplica también a modelos cuasi-esféricos³⁶.

De esta manera, con técnicas de DDL es posible determinar: el coeficiente de difusión, el radio hidrodinámico, el peso molecular y la polidispersidad (pureza) de la proteína.

3.8.6. ESTUDIOS CONFORMACIONALES Y DE ESTRUCTURA SECUNDARIA POR TÉCNICAS DE DICROÍSMO CIRCULAR.

La estructura secundaria de la lectina pura se determinó por su espectro de dicroísmo circular (CD). Dichos espectros se obtuvieron a 18 °C en un espectropolarímetro JASCO J-700, el cual se calibró con ácido (+)-10-canforsulfónico.⁴² Los experimentos se realizaron en una celda de 1 mm para la región del ultravioleta (UV) lejano (184-260 nm). La elipticidad por residuo medio $[\theta]$, se calculó utilizando una masa molecular de 110 g mol⁻¹ por residuo. Los espectros se analizaron por medio del programa de deconvolución, Hennessey-Johnson⁴³ esto con el fin de estimar el contenido de estructura secundaria de las

enzimas purificadas. Las muestras puras con una concentración de 0.2mg/mL fueron dializadas contra amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4 con 5mM de Glucosa y 10mM de NaCl. Cada muestra se analizó por triplicado. Se evaluó como influye en su estructura la temperatura, la adición de su ligando y la adición de glicerol.

La aplicación de la espectroscopía de dicroísmo circular (CD), en la determinación de la estructura secundaria de proteínas, se basa en la quiralidad de los aminoácidos que la conforman. Esta técnica utiliza las propiedades de la luz polarizada formada por dos componentes polarizados circulares, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud^{39,40}. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra, induce un desfase y un cambio de magnitud en ambos componentes circularmente polarizados de la luz. Estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse. La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda incidente, pudiéndose obtener un espectro de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda (λ).^{39,40}

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm), de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptofano, tirosina, y fenilalanina. La asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno ya que los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula. Los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína y las señales obtenidas son extremadamente sensibles a los cambios en la misma.^{39,40}

Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces peptídicos que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de

estructura secundaria presente, es decir, del porcentaje de residuos (figura 4.3) que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices alfa, hojas beta, giros y lazos).^{39,41}

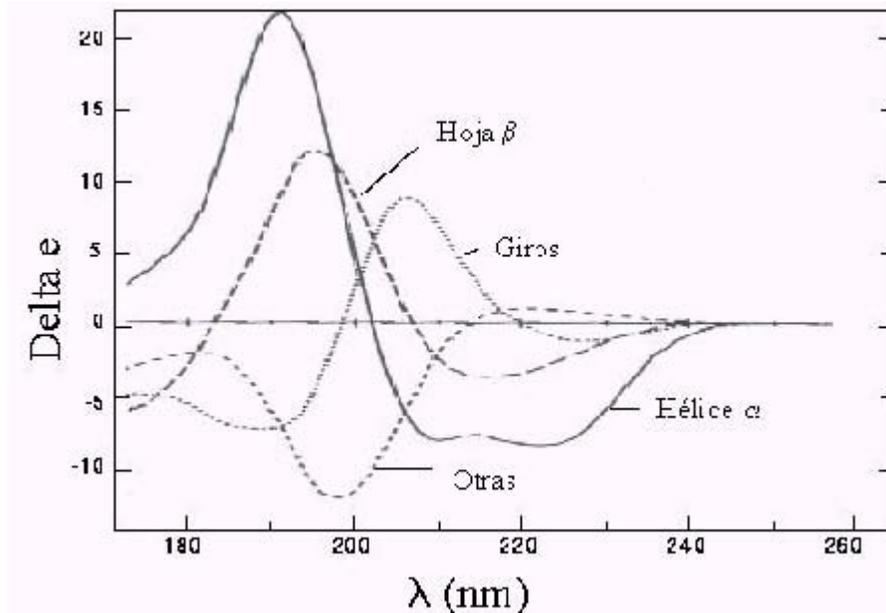


Figura 3.3 Espectros característicos de cada una de las contribuciones a la estructura secundaria, alfa hélice, hoja beta giros y otros (azar)

3.8.7. TERMODINÁMICA DE UNIÓN

La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica termodinámica que mide una reacción química iniciada por la adición de un ligando, convirtiéndose en el método más valioso para la caracterización de las interacciones biomoleculares. Cuando las sustancias se unen se genera o absorbe calor. La medición de este calor permite determinar correctamente las constantes de unión (K_B), la estequiometría de reacción (n), entalpía (ΔH) y entropía (ΔS), por lo que provee un perfil termodinámico completo de la interacción molecular en un simple experimento. Los parámetros de unión se determinan por un análisis lineal de mínimos cuadrados de la isoterma.

En los experimentos de ITC una jeringa contiene el ligando, la solución es titulada en una celda que contiene a la macromolécula en solución a temperatura constante (Figura 3.4)

Cuando el ligando es inyectado en la celda los dos materiales interactúan y entonces se libera o absorbe calor directamente proporcional a la cantidad de sitios de unión.⁴⁴

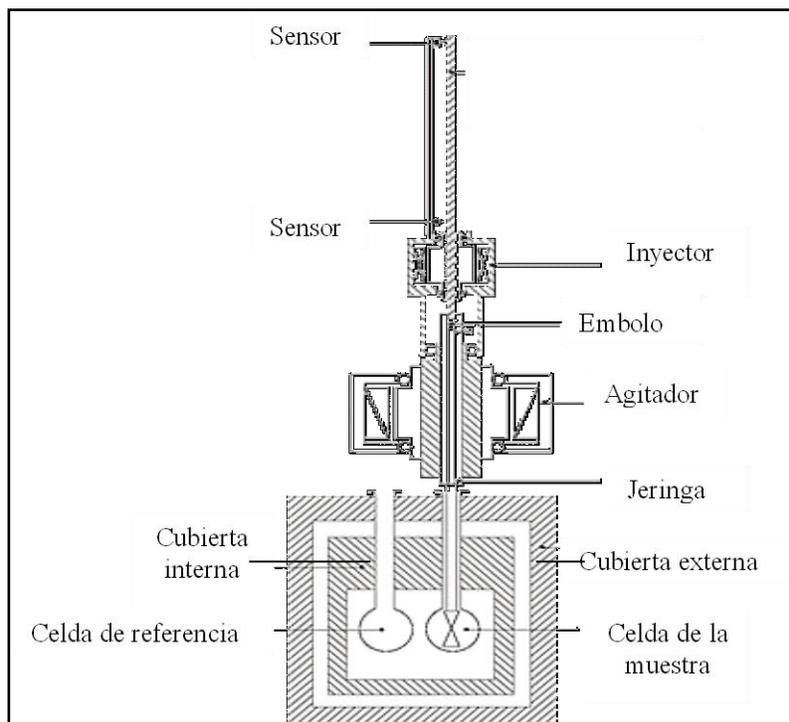


Figura 3.4 Diagrama de las celdas y jeringa del ITC. La jeringa esta en agitación durante el experimento. El émbolo es controlado por la computadora e inyecta volúmenes precisos de ligando.

La aplicación de ITC es variada y algunos ejemplos donde se utiliza son: interacciones entre proteínas con macromoléculas y ligandos; proteína-proteína, proteína –péptido, ácido nucleico-ligando (fármaco), proteína-ácido nucleico; metales unidos a moléculas, receptor - ligando; papel del agua en sistemas biológicos; interacciones hormona-receptor, enzima-sustrato, anticuerpo-antígeno; carbohidratos unidos a macromoléculas, etc.

3.8.8. CRISTALIZACIÓN DE LA LECTINA DE *M. EDULIS*

Para el análisis estructural por rayos X se requiere que la molécula sea cristalizada en forma adecuada para la obtención de datos.

Para inducir la cristalización es necesario llevar muy lentamente el sistema soluto-disolvente a un estado de solubilidad mínima y así alcanzar un grado limitado de supersaturación. Para lograr esto es necesario considerar todas las variables que afectan la cristalización como son: concentración de la proteína, temperatura, pH, fuerza iónica, aditivos específicos y agentes precipitantes.⁴⁵

El método de difusión de vapor es el más popular y ha demostrado ser el más útil para el estudio de numerosas condiciones con cantidades mínimas de proteína. Existen dos técnicas que utilizan la difusión de vapor: la de la “gota asentada” y la de la “gota suspendida”. Esta última se utilizó para intentar la cristalización de la lectina de *M. edulis*. La concentración de proteína fue de 4.0 mg/mL. Se colocaron gotas de 10 μ L de los cuales 5.0 μ L corresponderán a la proteína y 5.0 μ L al agente precipitante. Además, se colocaron 400 mL del agente precipitante en el receptáculo inferior, con el fin de aumentar el tiempo para que se alcance la saturación. Estas pruebas se colocaron a 4.0 °C, en cámaras de temperatura controlada. Los agentes precipitantes utilizados fueron los presentes en el kit 1 y 2 de Hampton Research. Estas condiciones pueden modificarse a fin de optimizarlas y lograr obtener cristales apropiados para los estudios de difracción de rayos X.

4. RESULTADOS

4.1 PURIFICACIÓN

Se purificó la lectina de *M. edulis* de un solo paso utilizando estromas de eritrocitos de conejo^{31,32} siguiendo el protocolo descrito en la metodología. La pureza de la muestra se evaluó por electroforesis SDS-PAGE y espectrometría de masas observando una fracción única (Figuras 4.2 y 4.3). Como se muestra en la Tabla 4.1, se obtuvieron 34.11 mg de la proteína pura a partir 25 organismos, logrando un factor de purificación de 1561 veces.

Tabla 4-1 Tabla de purificación de la lectina de *M. edulis*. Para la determinación del rendimiento se utilizaron 25 organismos maduros.

Paso de Purificación	Volumen (ml)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U /mg) ¹	Actividad Total	Factor de Purificación	Rendimiento (%)
Extracto	1000	32642	4015.56	131075909.5	1	100
Fracción Pura	168	34.11	2461	83963.076	1561.11	0.1

U* (Título): el recíproco de la más alta dilución que presentó actividad.

Actividad Específica: actividad de la proteína / mg.

Actividad Total: actividad específica * mg totales

Se corrió un espectro de absorción de 210 a 540 nm para determinar si la proteína pura presentaba un espectro de absorción típico (Figura 4.1). Presenta un pico característico a 280 nm.

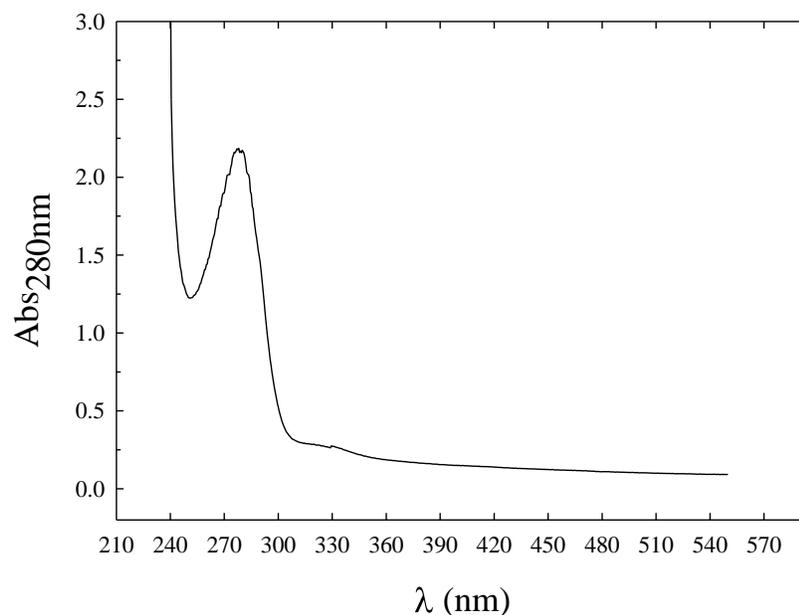


Figura 4.1 Espectro de absorbancia de 210nm a 570nm con un pico característico a proteínas a 280 nm de la lectina de *M. edulis*

4.2 CARACTERIZACIÓN

4.2.1 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

4.2.1.1 ELECTROFORESIS SDS-PAGE

En la Figura 4.2 se puede observar el patrón electroforético de la lectina de *M. edulis*. Los carriles 4 y 8 corresponden a los marcadores de peso molecular conocido: péptidos de mioglobina de caballo 16949 Da, 14404 Da, 10700 Da, 8159 Da, 6214 Da. y los carriles 5 y 6 a la muestra pura. Después de realizar la regresión lineal graficando la distancia de migración contra el logaritmo del peso molecular, se obtuvo un peso de 6742 Da.

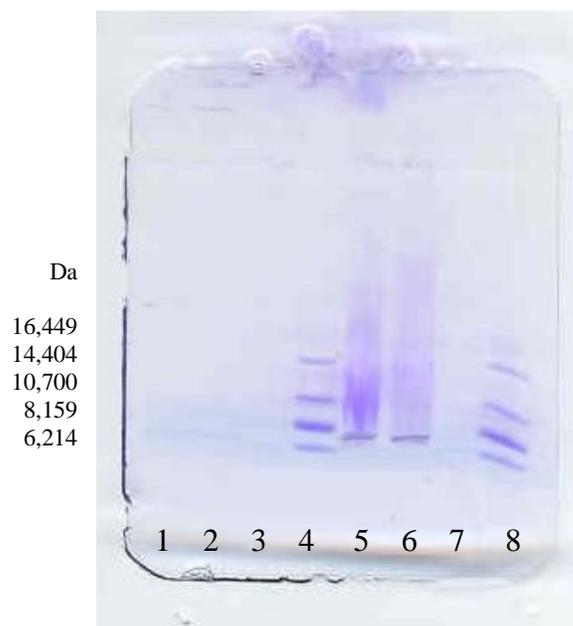


Figura 4.2. Electroforésis SDS-PAGE de la lectina de *M. edulis*. Los carriles 4 y 8 corresponden a los marcadores de peso molecular conocido y los carriles 5 y 6 a la lectina pura.

4.2.1.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para corroborar el peso de la lectina pura, se recurrió a una técnica más sensible: la espectrometría de masas, con la cuál se obtuvo una masa de 6450 Da, como se puede observar en la Figura 4.3. En esta misma figura se puede observar la forma dimérica de la lectina.

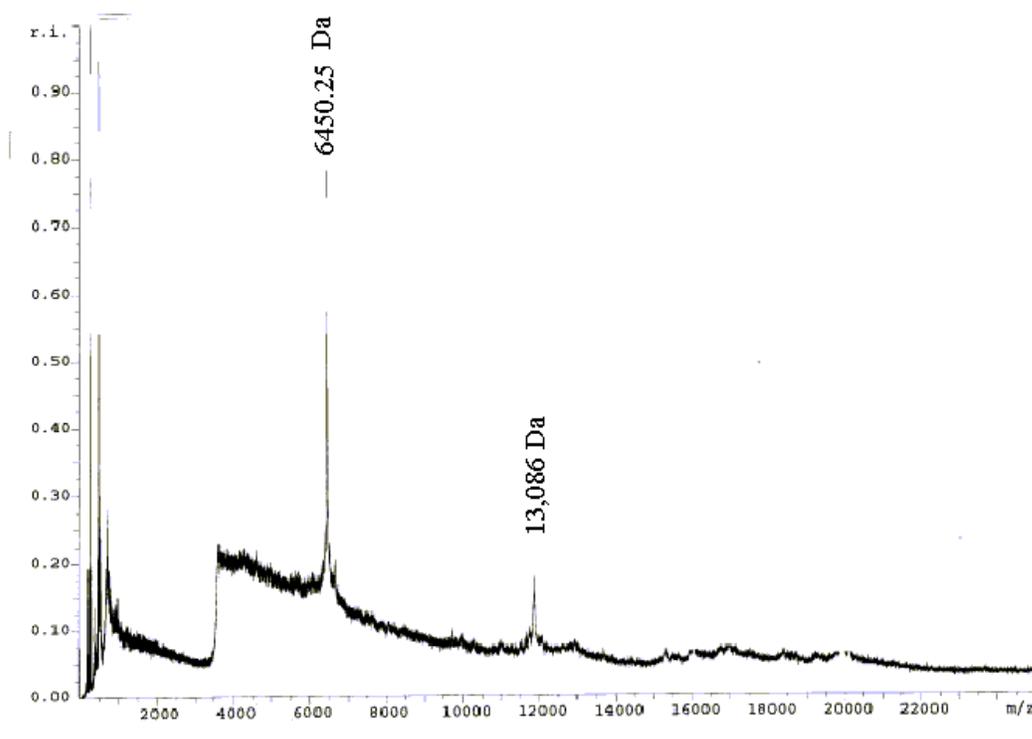


Figura 4.3. Espectro de masas de la lectina de *M. edulis*

4.2.2 DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO

La electrofóresis por enfoque isoeléctrico de la lectina de *M. edulis* mostró una banda única con un valor aproximado de pI de 9.45, como se puede observar en la Figura 4.4. En esta figura, los carriles 1 y 5 corresponden a los marcadores de peso molecular conocido: Amiloglucosidasa con un pI de 3.5; inhibidor de tripsina, 4.55; β -lactoglobulina A, 5.20; anhidrasa carbónica B de bovino, 5.85; anhidrasa carbónica B de humano, 6.55; banda ácida de la mioglobina de caballo, 6.85; banda básica de la mioglobina de caballo, 7.35; banda ácida de lectina de lenteja, 8.15; banda media de la lectina de lenteja, 8.45 y tripsinógeno, 9.30. Los carriles 3 y 4 corresponden a la proteína pura.

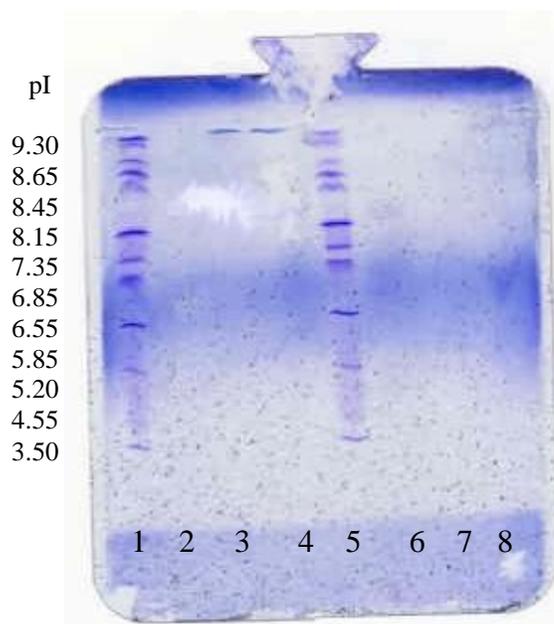


Figura 4.4. Enfoque isoelectrico de la lectina de *M. edulis*. Los carriles 1 y 5 corresponden a los marcadores de punto isoelectrico conocido y 3 y 4 a la muestra pura.

4.2.3. PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Debido a que la proteína pura se precipitaba en poco tiempo, lo que impedía poder caracterizarla, se realizaron pruebas para encontrar una condición en que la proteína se mantuviera estable y poder así trabajar con ella.

4.2.3.1. EFECTO DE DIFERENTES ADITIVOS EN LA ACTIVIDAD DE LA LECTINA

Se probó el efecto que tenían diversos aditivos en la actividad de la lectina pura de *M. edulis*. Para esto, se le adicionó a 700µl de proteína activa cada uno de los aditivos y se

dejo interactuar durante una semana; transcurrido ese tiempo, se hicieron pruebas de actividad y se cuantificaron las muestras.

Se encontró que con el paso del tiempo la proteína que contenía DTT había perdido su actividad. Por otro lado las que contenían CaCl_2 y Cisteína se mantenían activas. Las muestras que contenían sorbitol, manitol, trealosa y glicerol seguían activas en mayor proporción que las anteriores, pero en el caso de las muestras que contenían NaCl y Glucosa mostraron el mayor nivel de actividad. lo cual indica que dichos aditivos la ayudan a mantener su actividad. Las concentraciones utilizadas de estos aditivos se muestran en la tabla 3-1 En la siguiente grafica se puede observar el efecto de cada uno de los aditivos sobre la actividad. (Figura 4.5)

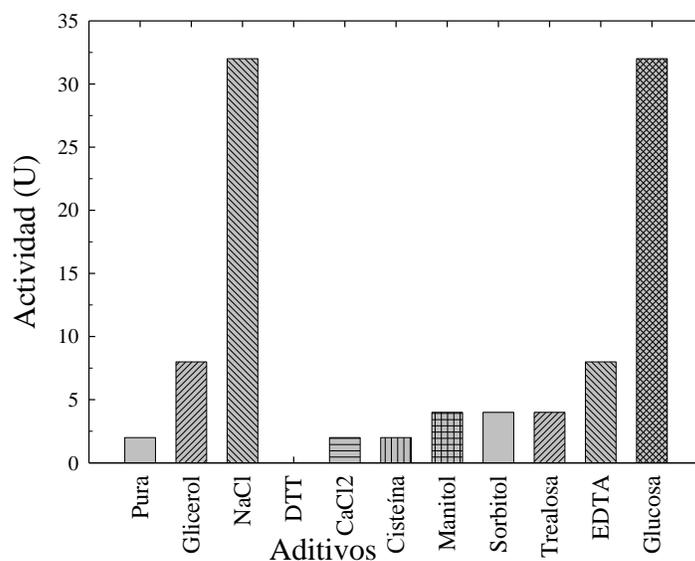


Figura 4.5 Efecto de aditivos en la actividad de la lectina de *M. edulis*. La muestra fue la misma en todos los casos, con el mismo tiempo de incubación de una semana. U (título) recíproco de la más alta dilución que presentó actividad

4.2.3.2. EFECTO DE DIFERENTES ADITIVOS EN LA SOLUBILIDAD DE LA LECTINA

Al cuantificar la proteína total en las muestras mencionadas en el apartado anterior, se observó que la glucosa, NaCl y glicerol favorecieron la solubilidad de la proteína, impidiendo la precipitación de la misma, por lo que la concentración total fue mayor, mientras que en las demás condiciones se observó una disminución de la concentración de proteína, esto debido a que esta empezó a precipitarse. (Figura 4.6)

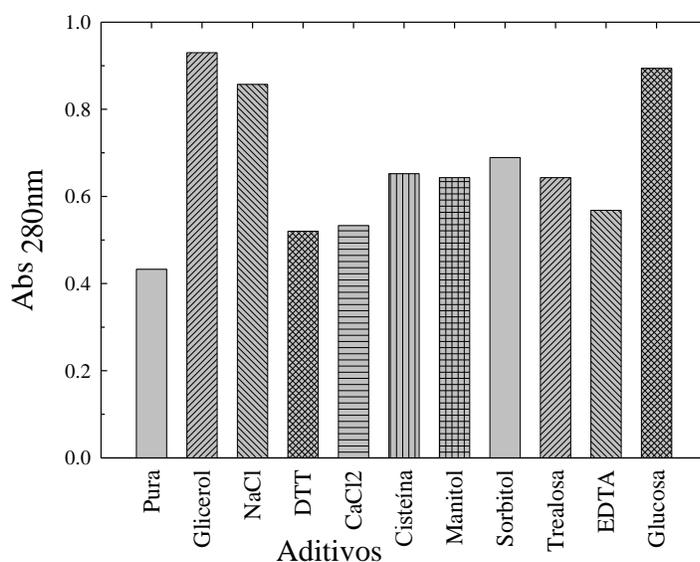


Figura 4.6 Efecto de aditivos en solubilidad de la lectina de *M. edulis*

4.2.3.3. PRUEBAS DE CONGELACIÓN

Una vez encontradas las condiciones óptimas de estabilidad se incubaron dichas muestras en congelación (-25°C) y se observó que la proteína sin ningún aditivo pierde por completo la actividad y en lo que respecta a las que tenían glucosa, glicerol y NaCl se mantuvieron activas pero dicha actividad disminuyó considerablemente. Esto nos indica que la proteína

se puede congelar en presencia de glicerol, glucosa y NaCl pero su actividad disminuirá en un 30%. Cabe señalar que con la mezcla de los tres aditivos antes mencionados, se logra una actividad de casi el doble como se observa en la Figura 4.7.

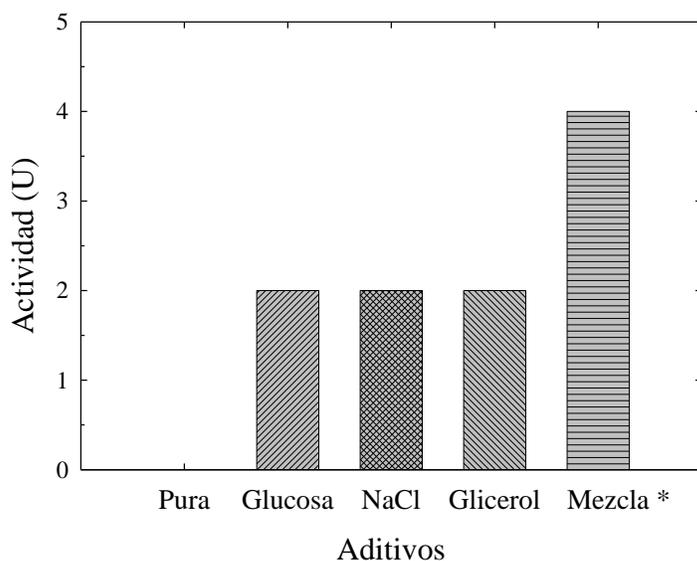


Figura 4.7 Efecto de aditivos como agentes crioprotectores La muestra fue la misma en todos los casos, con el mismo tiempo de incubación de una semana. U (título) recíproco de la más alta dilución que presentó actividad. Mezcla*: se probó la mezcla de NaCl, Glucosa y Glicerol.

4.2.3.4 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD A ALTAS CONCENTRACIONES

Pese a que se habían encontrado condiciones en donde la proteína se mantenía estable es decir, mas soluble y activa, aún se tenía el problema de que al concentrarla demasiado se precipitaba, por lo tanto se hicieron pruebas en donde se probaron dos aditivos isopropanol y glicerol para intentar concentrarlas. En las Figuras 4.8 y 4.9 se observa que con 2.5% v/v en ambos casos, encontramos el máximo de solubilidad y por ende nos permite lograr una concentración mayor de la proteína, aspecto vital para los posteriores estudios.

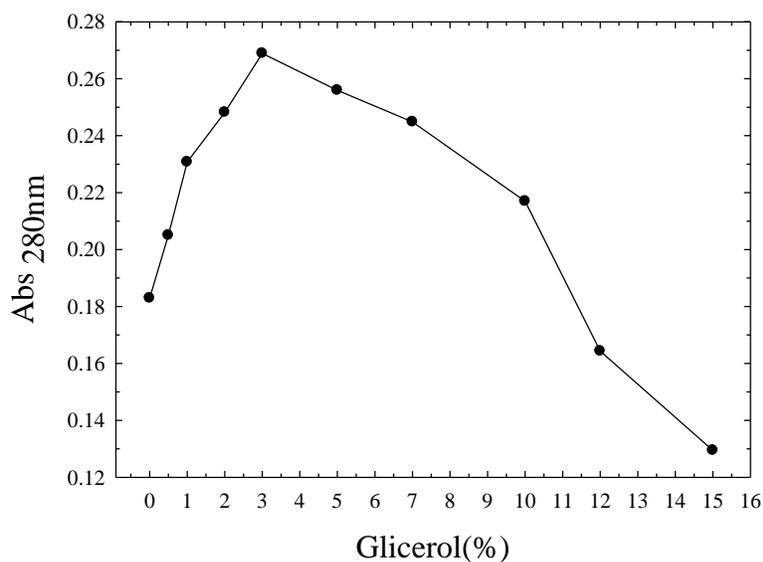


Figura 4.8 Efecto del Glicerol en la solubilidad de la lectina de *M. edulis*

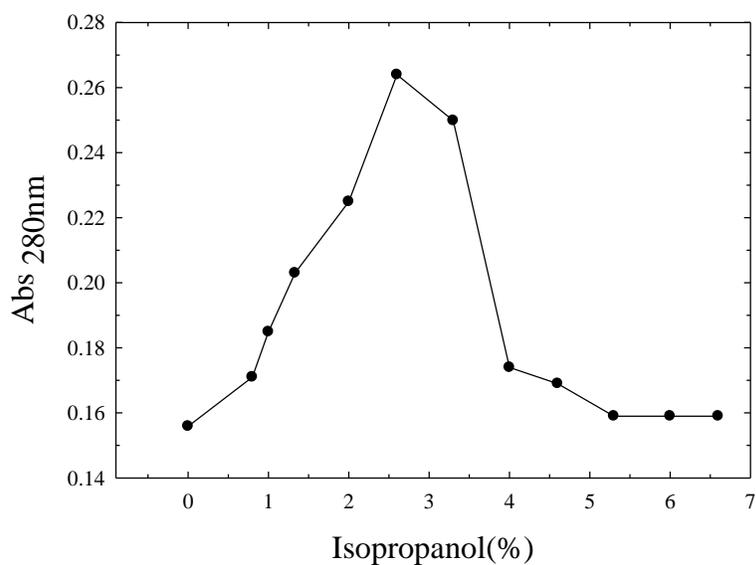


Figura 4.9 Efecto del Isopropanol en la solubilidad de la lectina de *M. edulis*

Utilizando los óptimos de concentración de glicerol y de isopropanol (2.5%) se concentraron dos muestras que tenían una concentración inicial de 0.17 mg/mL. Al

terminar de concentrar se cuantificó y midió la actividad de ambas muestras. Se observó que en presencia de isopropanol se podía lograr una mayor concentración de proteína, sin embargo era menos activa. Por el contrario en la muestra concentrada con glicerol la actividad aumentaba al aumentar la concentración de proteína (Figura 4.10).

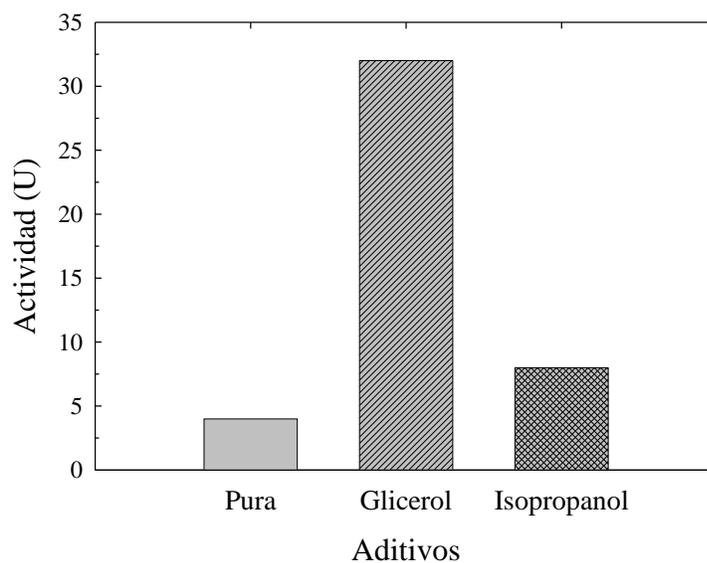


Figura 4.10 Efecto en la actividad al concentrar con en presencia de Glicerol y de Isopropanol. U (título) recíproco de la más alta dilución que presentó actividad

4.2.4 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD DE LA LECTINA DE *M. EDULIS*

Con el fin de evaluar el efecto de la temperatura en la actividad de la lectina de *M. edulis*, se realizaron pruebas de actividad aglutinante a 5, 18, 25 y 30 °C. Como se observa en la Figura 4.11 a 30 °C se obtiene la mayor actividad.

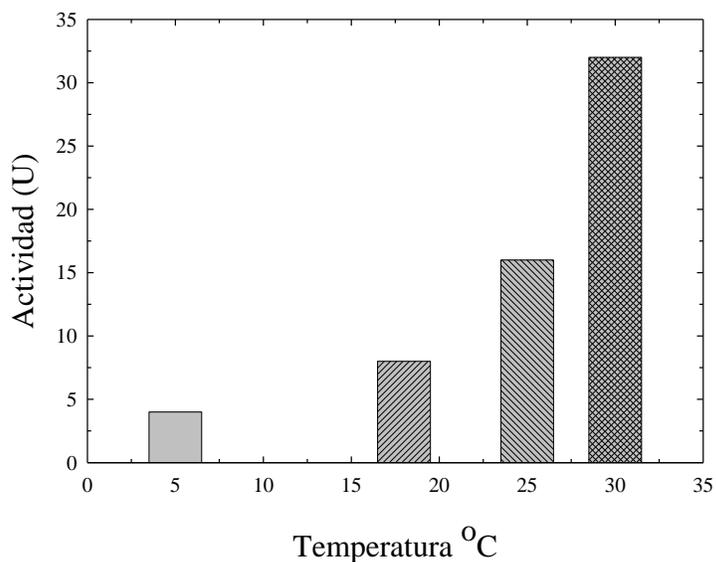


Figura 4.11 Efecto de la temperatura en la actividad de la lectina *M. edulis*. U (título): recíproco de la más alta dilución que presentó actividad.

4.2.5 PRUEBAS DE INHIBICIÓN

Las pruebas de inhibición nos permitieron conocer el carbohidrato que reconoce la lectina en estudio. En la tabla siguiente se observa que la lectina reconoce a carbohidratos como: D-(+)-galactosa, N-acetil-D-galactosamina y rafinosa, sin embargo resultó ser más afín a la rafinosa ya que con una concentración mínima de 40.186mM logró inhibir a la proteína. (Ver tabla 4-2)

Tabla 4-2 Carbohidratos utilizados en la prueba de inhibición, de la lectina de *Mytilus edulis*.

Carbohidratos	Concentración Mínima Inhibitoria (mM)	Carbohidratos	Concentración Mínima Inhibitoria (mM)
Sacarosa	ND*	N-acetil-galactosamina	206
Carboximetilcelulosa	ND*	D-manosa	ND*
Celobiosa	ND*	Ácido glucoronico	ND*
L-lactosa	ND*	Rafinosa	40.186
(+)xilosa	ND*	Agar	ND*
Quitosano	ND*	D-(+)-galactosa,	206

ND* : a las concentraciones estudiadas no se observó inhibición. Se observa que el carbohidrato que resultó más afín fue la Rafinosa con la menor concentración inhibitoria.

4.2.6. ESTUDIOS DE DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

Para conocer el comportamiento de la proteína en solución y su conducta de agregación (interacción proteína-proteína o proteína-ligando), se evaluaron diversas variables que pudieran afectar su comportamiento lo cuál se vería reflejado en un incremento en su peso molecular por la formación de monómeros, dímeros o grandes oligómeros.

4.2.6.1. EFECTO DEL pH

En la Figura 4.12 se puede observar que en valores de pH entre 7 y 8 se presentan los valores más bajos de agregación, incrementándose nuevamente conforme se aumenta el pH. En el caso de la polidispersidad figura 4.13 se observa que esta disminuye conforme se aumenta el pH hasta un punto cercano a 7 a partir de cual empieza a incrementarse hasta alcanzar valores muy altos que indican una alta polidispersidad provocada por la presencia de diferentes especies moleculares en la solución.

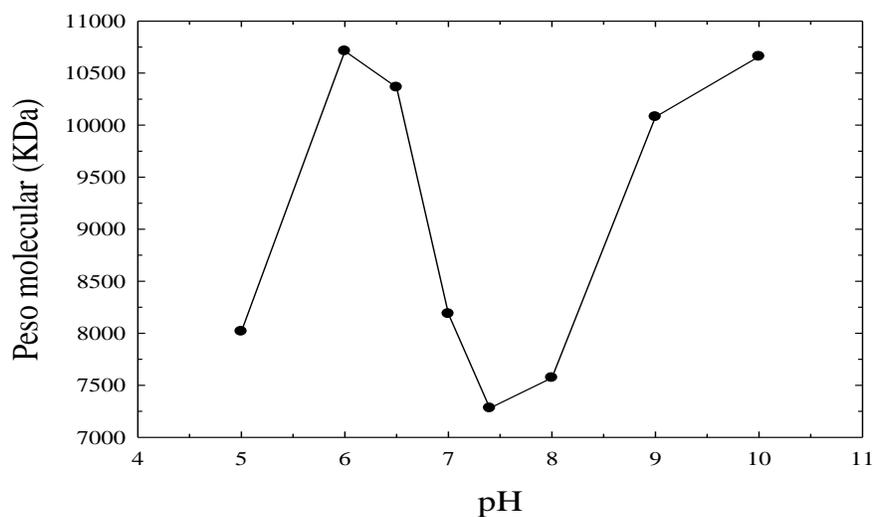


Figura 4.12 Efecto del pH en la agregación de la lectina de *M. edulis*

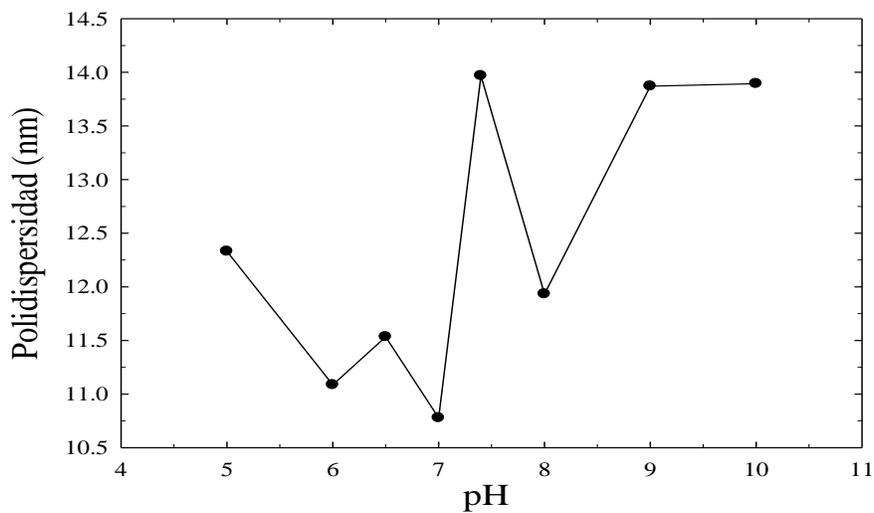


Figura 4.13 Efecto del pH en la polidispersidad la lectina de *M. edulis*

4.2.6.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Se trabajó con una concentración de muestra de 0.24 mg/ml y un volumen de 400µl. En la Figura 4.14 se puede observar que la lectina de *M. edulis* es muy sensible a este parámetro, incrementando su estado de agregación conforme se incrementa la temperatura, mostrando

el valor más bajo a 5 °C. La polidispersidad figura 4.15 mostró un comportamiento similar, incrementándose conforme se incrementaba la temperatura.

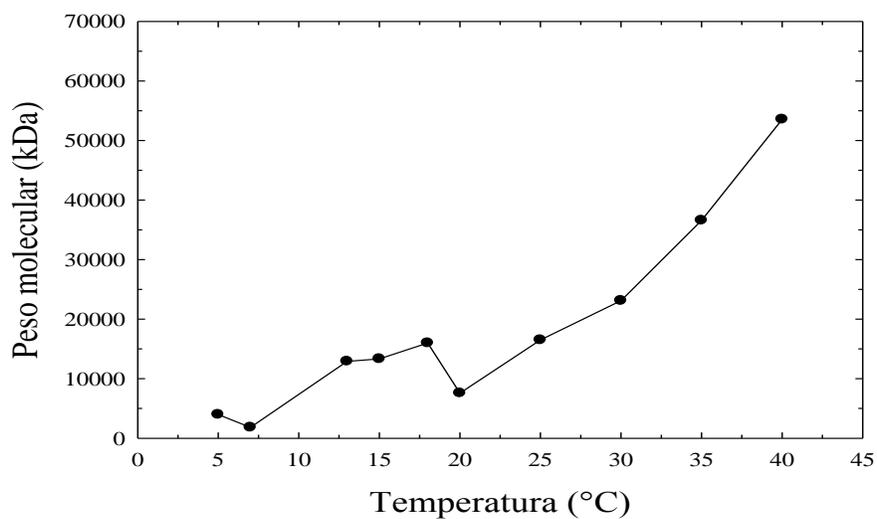


Figura 4.14 Efecto de la temperatura en la agregación de la lectina de *M. edulis*

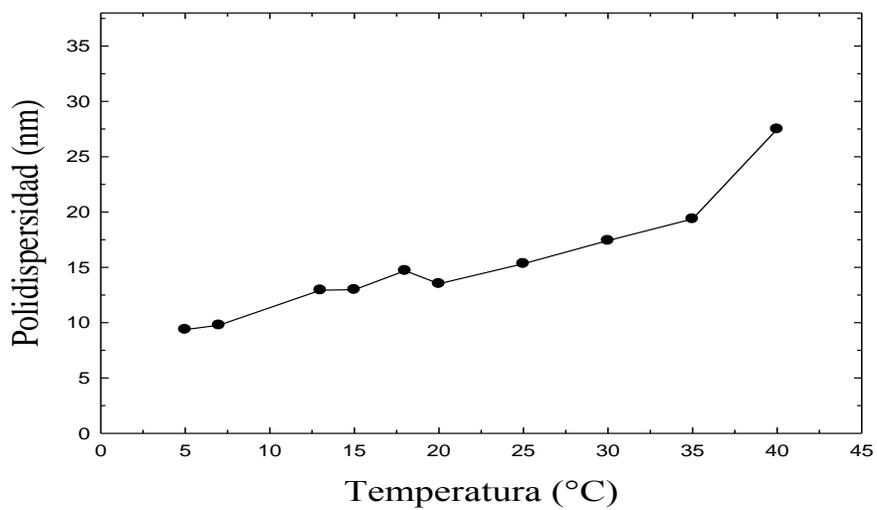


Figura 4.15 Efecto de la temperatura en la polidispersidad de la lectina de *M. edulis*

4.2.6.3. EFECTO DE LA ADICIÓN DE RAFINOSA

Para estudiar la interacción proteína ligando, se adicionó Rafinosa a la lectina pura de *M. edulis*. Esta provocó cambios en la agregación y polidispersidad de la proteína sin mostrar una tendencia definida. Figura 4.16 y 4.17.

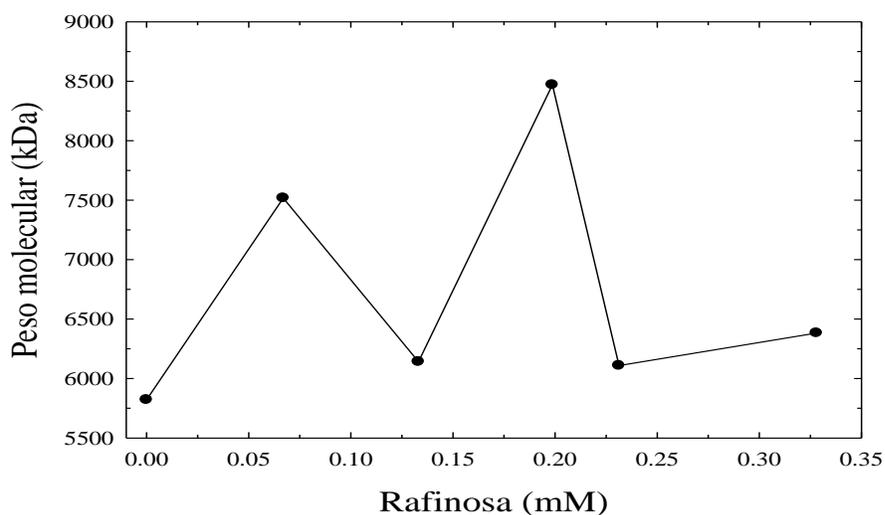


Figura 4.16 Efecto de la adición de Rafinosa en la agregación de la lectina de *M. edulis*

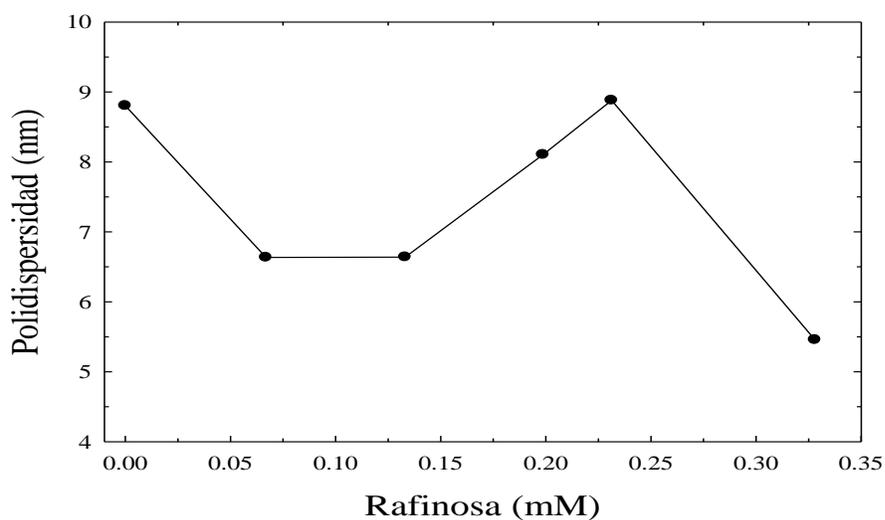


Figura 4.17 Efecto de la adición de Rafinosa en la Polidispersidad de la lectina de *M. edulis*.

4.2.6.4. EFECTO DE LA ADICIÓN DE GLICEROL

El efecto de la adición de glicerol a la lectina fue notable como se observa en la Figura 4.18. Aquí se aprecia que conforme se aumenta la concentración de glicerol, aumenta la agregación y polidispersidad de la proteína figura 4.19

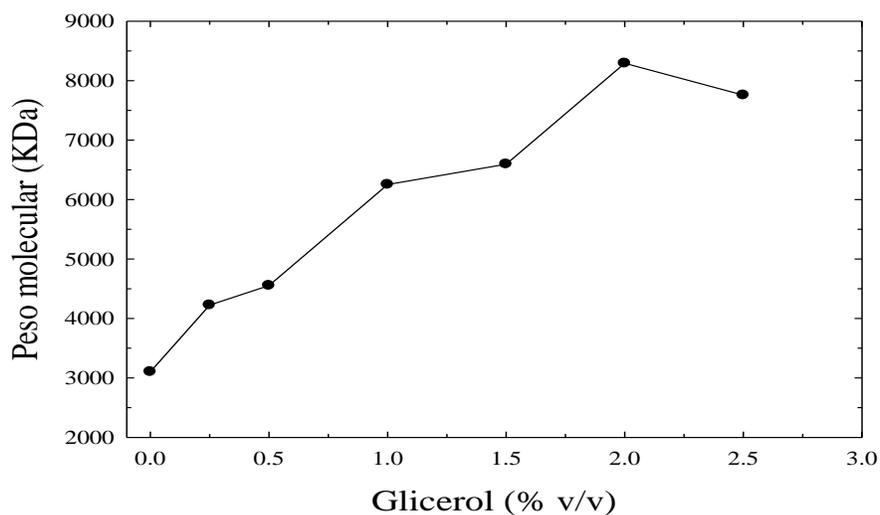


Figura 4.18 Efecto de la adición de Glicerol en la agregación de la lectina de *M edulis*

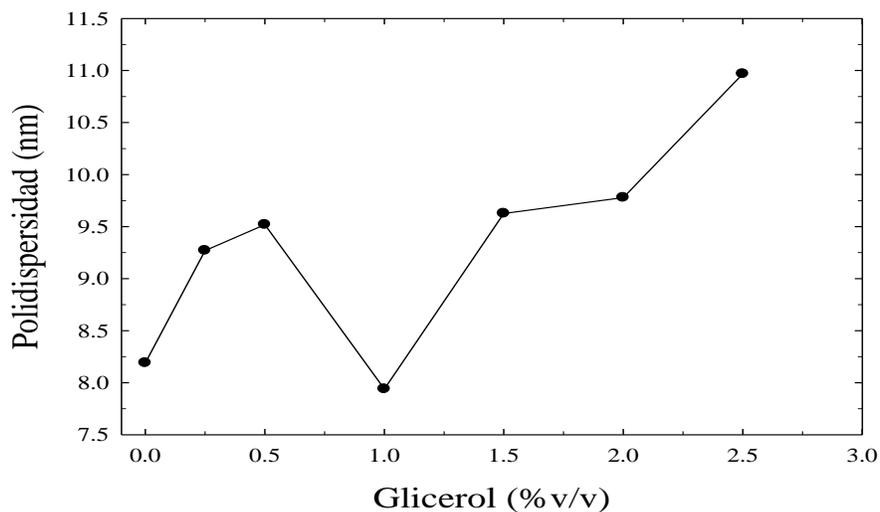


Figura 4.19 Efecto de la adición de Glicerol en la Polidispersidad de la lectina de *M edulis*

4.2.6.5. EFECTO DE LA ADICIÓN DE RAFINOSA (PROTEÍNA CON GLICEROL)

Debido a que se había observado que el glicerol era el aditivo más apropiado para mantener la estabilidad y actividad de la lectina pura, se probó nuevamente el efecto de la adición de rafinosa en la agregación de la lectina pero ahora en presencia de glicerol ya que así se realizarían los estudios posteriores, los cuales requieren concentraciones mayores de proteína y sólo en presencia de este aditivo lograríamos alcanzarla.

En las figura 4.20 y 4.21 se observa que en presencia de rafinosa se incrementa la agregación, empezando a disminuir a concentraciones por arriba de 2 mM, mientras que la polidispersidad tiende a disminuir conforme se incrementa la concentración de Rafinosa.

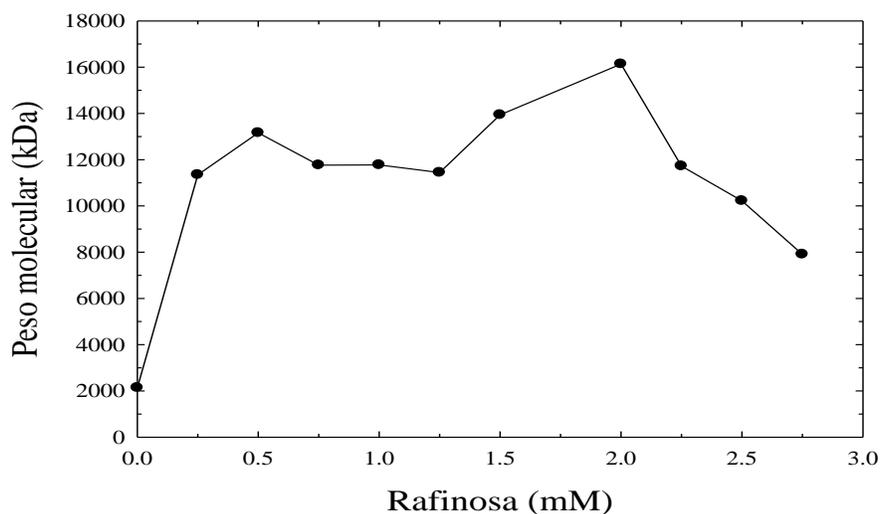


Figura 4.20 Efecto de la adición de Rafinosa en presencia de Glicerol en la agregación de la lectina de *M edulis*.

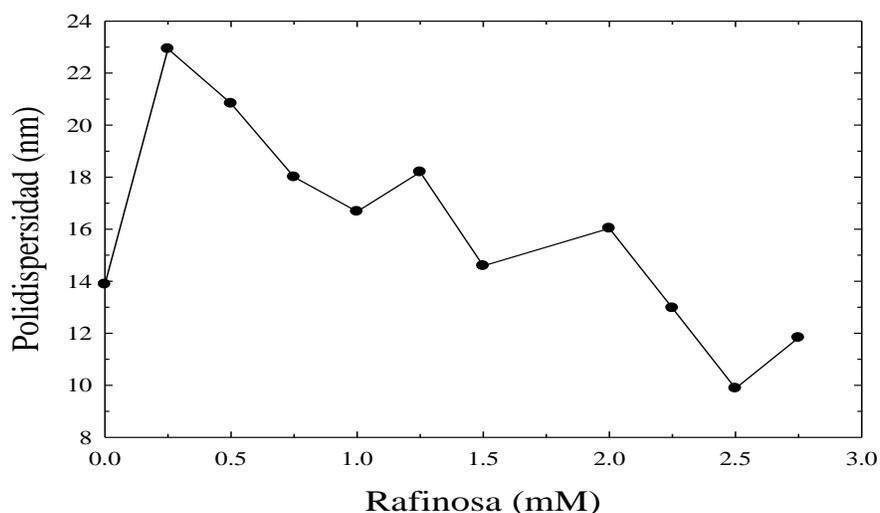


Figura 4.21 Efecto de la adición de Rafinosa en presencia de Glicerol en la Polidispersidad de la lectina de *M. edulis*

4.2.7. ESTUDIOS CONFORMACIONALES Y DE ESTRUCTURA SECUNDARIA POR TÉCNICAS DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

Para conocer la conformación y estructura secundaria de la lectina purificada se obtuvieron los espectros de la proteína sola y se evaluaron variables como el efecto de la temperatura, adición de su ligando y la adición de glicerol para conocer si había algún cambio conformacional o en el contenido de estructura secundaria. Para determinar el contenido de estructura secundaria, los espectros fueron analizados con el programa de desconvolución de Hennessey-Johnson⁴³. En la figura 4.22 se muestra el espectro de la lectina de *M. edulis* el cuál presenta características típicas de una proteína con alto contenido de hoja beta, lo que se comprueba al hacer la desconvolución de dicho espectro con el algoritmo antes mencionado (Tabla 4.3).

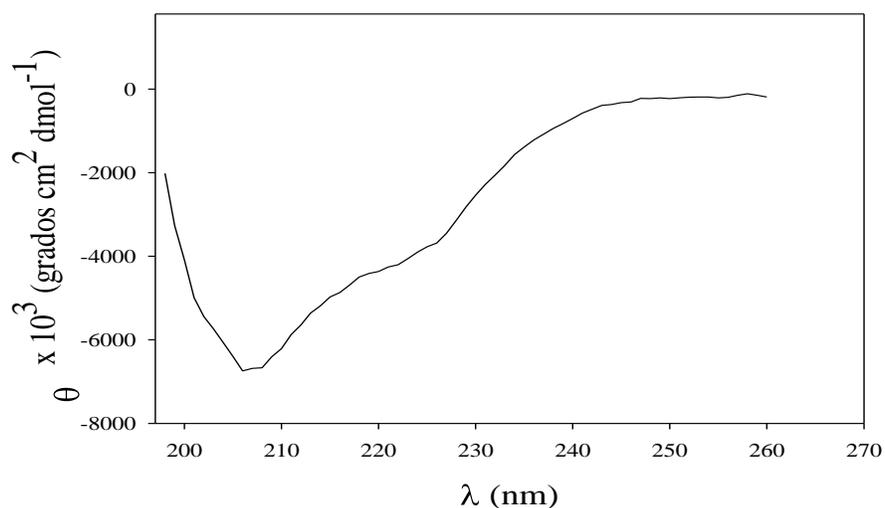


Figura 4.22 Espectro de dicroísmo circular de la lectina de *M. edulis*

Tabla 4.-3 Contenido de estructura secundaria de la lectina de *M edulis* .Método Hennessey-Jonhson

	Alfa-hélice	Hoja-beta	Otros
Proteína sola	0.109	0.346	0.535

4.2.7.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA

En la figura 4.23 se observa el efecto que tiene la temperatura en la conformación de la lectina purificada. En esta se puede observar que la lectina sufre cambios conformacionales al aumentar la temperatura. También se observa que al pasar los 40 °C ya no hay cambios manteniendose estable, sin llegar a desnaturalizarse aún a 90 °C. En la Tabla 4.4 se puede observar como el contenido de hélice alfa disminuye conforme se incrementa la temperatura y el de hoja beta aumenta.

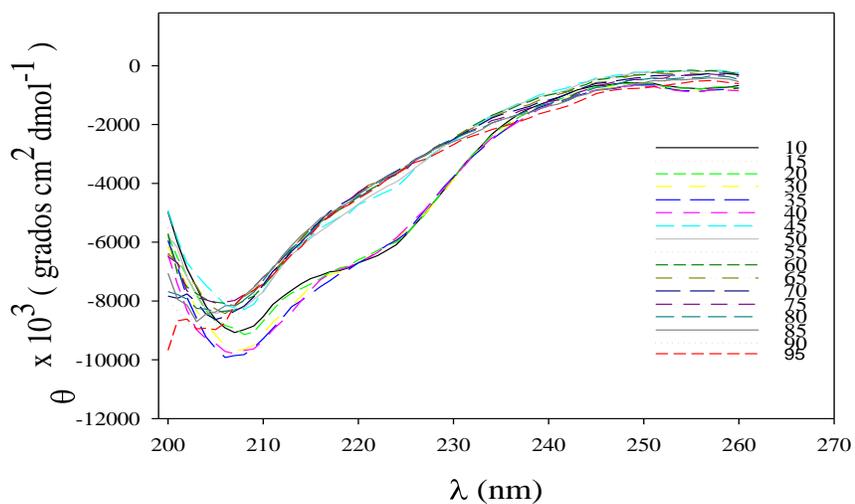


Figura 4.23 Efecto de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) en la estructura secundaria de la lectina de *M. edulis*

Tabla 4-4 Contenido de estructura secundaria de la lectina de *M. edulis*.

Método Hennessey-Johnson

Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Alfa - hélice	Hoja - beta	Otros	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Alfa - hélice	Hoja - beta	Otros
10	0.173	0.257	0.559	60	0.144	0.301	0.554
15	0.180	0.246	0.564	65	0.144	0.301	0.554
20	0.175	0.255	0.573	70	0.144	0.303	0.583
30	0.170	0.264	0.571	75	0.146	0.299	0.56
35	0.211	0.188	0.594	80	0.153	0.304	0.558
40	0.206	0.173	0.607	85	0.147	0.294	0.57
45	0.147	0.298	0.525	90	0.146	0.298	0.566
50	0.149	0.298	0.55	95	0.155	0.273	0.566
55	0.144	0.301	0.554	-	-	-	-

4.2.7.1.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA A 209 nm y 220 nm

Con el fin de observar con mayor detalle el cambio que sufre la lectina en su conformación y estructura secundaria se graficó la elipticidad molar media contra la temperatura a las dos longitudes de onda, en donde se observaron los cambios más notables (209 y 220 nm). La Figura 4.24 muestra como existe un cambio conforme se aumenta la temperatura hasta un punto (45°C) en donde ya no existe cambio alguno..

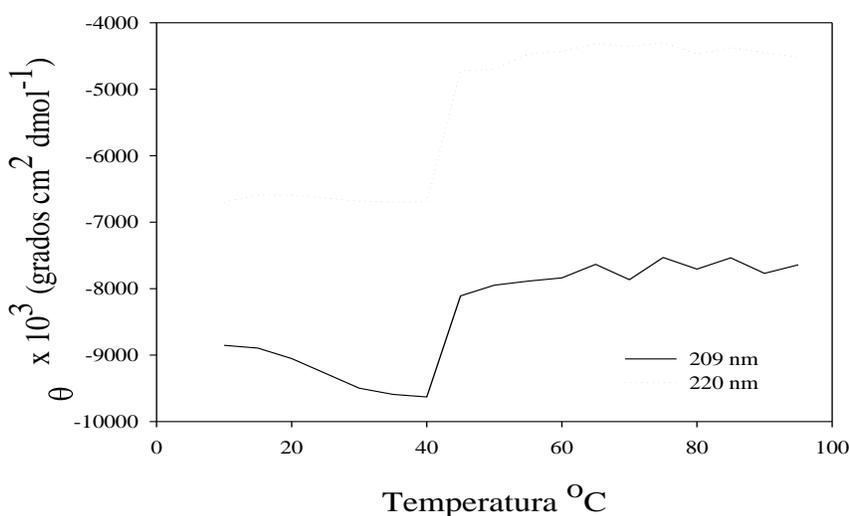


Figura 4.24 Efecto de la temperatura (°C) en la estructura secundaria de la lectina de *M. edulis* observada en dos longitudes de onda a 209 nm y 220 nm.

4.2.7.2. EFECTO DE LA ADICIÓN DE GLICEROL

En la Figura 4.25 observamos que la adición progresiva de glicerol sólo produce un cambio inicial en la conformación después del cual ya no sufre cambios la proteína. Lo mismo ocurre con el contenido de estructura secundaria (Tabla 4.5)

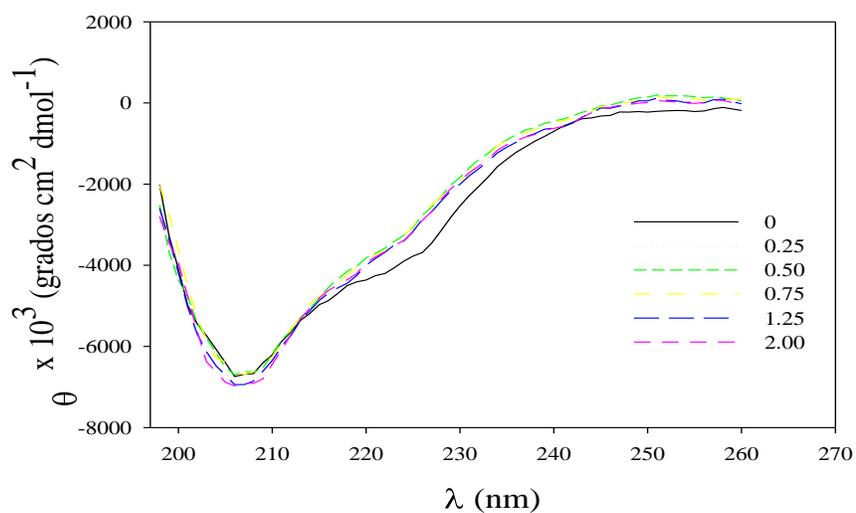


Figura 4.25 Efecto de la adición de Glicerol % (v/v) en la Estructura Secundaria en la lectina de *M. edulis*

Tabla 4-5 Contenido de Estructura Secundaria de la lectina de *M. edulis* Método Hennessey-Johnson

Glicerol (%)	Alfa-hélice	Hoja-beta	Otros
0	0.109	0.346	0.535
0.25	0.097	0.360	0.547
0.75	0.101	0.364	0.546
1.25	0.111	0.346	0.539
2.0	0.105	0.358	0.538

4.2.7.2.1 EFECTO DE LA ADICIÓN DE GLICEROL (220 y 226 nm)

Se graficó la elipticidad molar media contra la concentración de glicerol a las dos longitudes de onda donde se observaron los efectos mayores (220 y 226 nm). En esta figura se observa nuevamente que sólo existe un cambio conformacional inicial y posteriormente la proteína se mantiene estable (Figura 4.26)

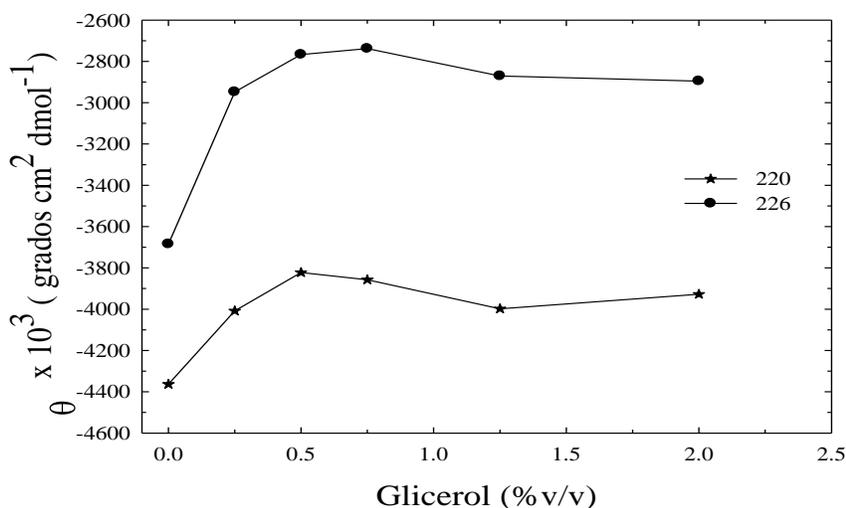


Figura 4.26 Efecto de la adición de glicerol en la estructura secundaria de la lectina de *M. edulis* a 220nm y 226 nm

4.2.7.3. EFECTO DE LA ADICIÓN DE RAFINOSA

En la Figura 4.27 se observa un cambio conformacional en la lectina de *M. edulis*, provocada por la adición de la rafinosa. En esta figura se observan básicamente dos transiciones, una con la adición de 0.040 mM de rafinosa y después otra al adicionar 0.080 mM a partir de la cuál se mantiene estable. En la Tabla 4.6 se aprecia una disminución del contenido de hélice alfa y un aumento de la hoja beta.

Tabla 4-6 Contenido de Estructura Secundaria de la lectina de *M. edulis* Método Hennessey-Johnson

Rafinosa (mM)	Alfa-hélice	Hoja-beta	Otros
0	0.238	0.154	0.590
0.040	0.199	0.228	0.603
0.080	0.187	0.246	0.616
0.121	0.193	0.240	0.614
0.161	0.192	0.240	0.600

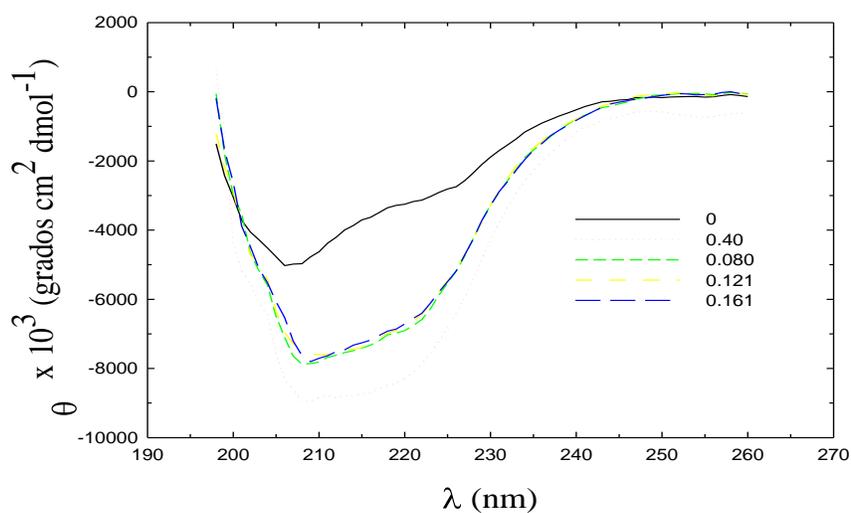


Figura 4.27 Efecto de la adición de Rafinosa (μM) en la estructura secundaria de la lectina de *M. edulis*

4.2.7.3.1 EFECTO DE LA ADICION DE RAFINOSA A 209 NM

Se graficó a una longitud de onda de 209 nm observando que al igual que con los otros aditivos, hay un cambio inicial único después del cual ya no hay cambios significativos en la conformación de la proteína (Figura 4.28).

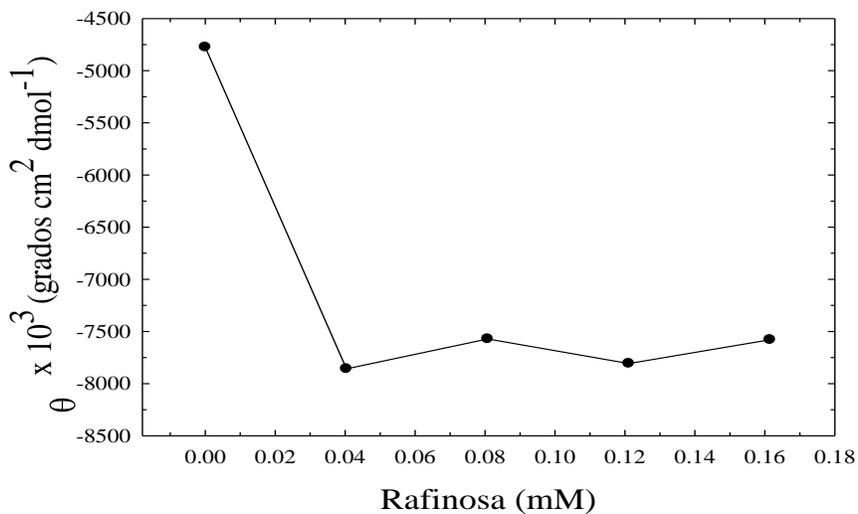


Figura 4.28 Efecto de la adición del ligando en la estructura secundaria a 209 nm de la lectina de *M. edulis*

4.2.8 ESTUDIOS TERMODINÁMICOS

Se realizaron estudios de calorimetría de titulación isotérmica (CTI) usando como ligando a la rafinosa, ya que fue el carbohidrato mas afín a la lectina según lo revelaron las pruebas de inhibición.

Después de restar el blanco correspondiente a los calores de dilución de la rafinosa en el amortiguador, se integraron los datos mediante el paquete computacional Origin, como se observa en la Figura 4.29. Los valores termodinámicos se muestran en la Tabla 4.7 Estos estudios revelaron que el modelo de tres sitios secuenciales fue el que mejor se ajustó a los datos $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ $T = 25^{\circ}\text{C}$

Tabla 5.7 Valores termodinámicos de la reacción calorimétrica de la lectina de *M edulis*

Constantes de unión (M^{-1})	ΔH ($\text{Cal}/\text{mol}^{-1}$)	ΔS ($\text{Cal}/^{\circ}\text{K}/\text{mol}^{-1}$)	ΔG ($\text{cal}/\text{mol}^{-1}$)
K_1 5357.0	-1093	13.46	-5104.08
K_2 95.24	14700	57.78	-2518.44
K_3 140.0	-108300	-347.3	-2901

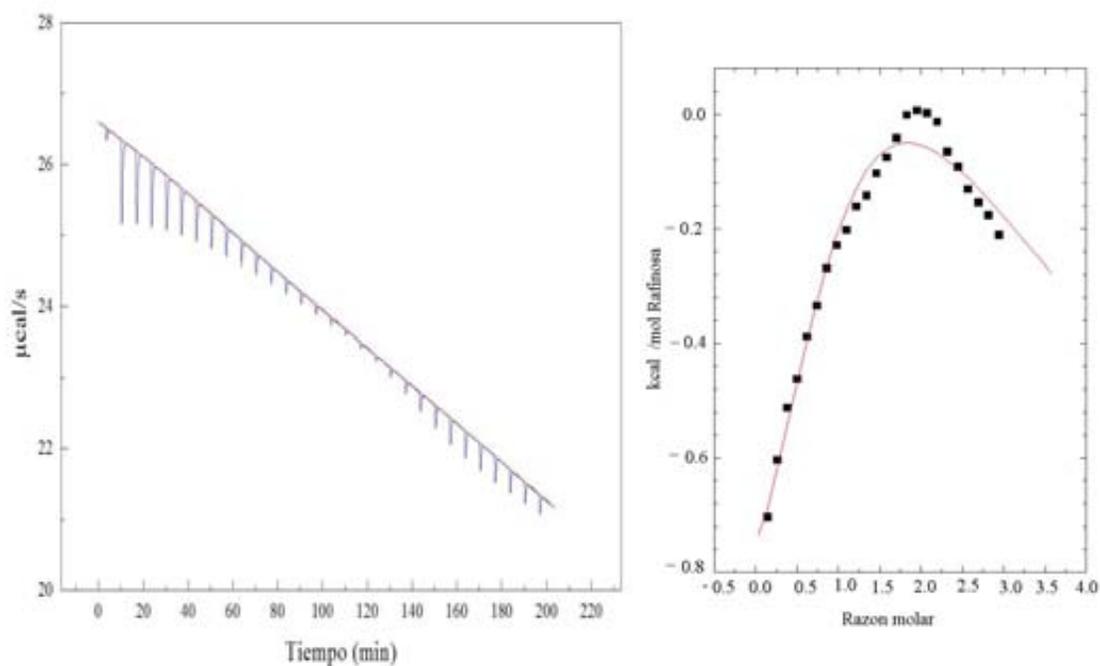


Figura 4.29 Termograma de la Titulación de la lectina de *Mytilus edulis*

4.2.9 CRISTALIZACIÓN DE LA LECTINA PURA

Se encontraron las condiciones apropiadas para obtener cristales de la lectina de *M. edulis* estos cristales aún son pequeños y resta incrementar el tamaño de los mismos para poder realizar posteriores estudios de difracción de rayos X con el fin de obtener la estructura tridimensional de la lectina. En la Tabla 4.8 se muestran las condiciones en las que se obtuvieron cristales.

Tabla 4.8. Condiciones de cristalización iniciales de la lectina de *M. edulis*.

SAL	AMORTIGUADOR	PH	AGENTE PRECIPITANTE
ninguna	0.1 m HEPES-Na	7.5	10%v/v isopropanol, 20%p/v PEG 4000
-	-	-	30%p/v PEG 1500
Sulfato de zinc heptahidratado 0.01M	0.1M MES	6.5	25%v/v PEG monometil éter 550
Cloruro de cesio 0.05 M	0.1 MES	6.5	30%v/v jefamina M- 600

5. ANALISIS DE RESULTADOS

Existen estudios de lectinas de diversas fuentes que han aportado valiosa información acerca de su función y estructura. Sin embargo, en lo que respecta a lectinas de fuentes marinas la información es escasa y de moluscos marinos aún más. De hecho, sobre estos últimos, no se tienen estructuras resueltas y su función no ha sido claramente establecida. No obstante, en invertebrados los cuales carecen de un sistema inmune, se piensa que utilizan a las lectinas para defenderse de los ataques de patógenos. Con la intención de aportar información sobre lectinas de fuentes marinas, se purificó y caracterizó una lectina del molusco marino *Mytilus edulis*. La purificación de la lectina se logró de un solo paso utilizando estromas de conejo^{31,32} obteniendo 34.11 mg a partir 25 organismos. En la tabla 4.1 se puede observar que es una lectina con una actividad específica muy alta, incluso es la mayor reportada a la fecha para lectinas que reconocen rafinosa como es el caso de la lectina de *Crotaria Pallida*⁴⁶ que es 100 veces menor y la lectina del mejillón *Crenomytilus grayanus* que es 60 veces menor.⁴⁷

5.1. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

El análisis del peso molecular de la lectina purificada mostró una banda única que corresponde con un peso de 6742 Da (Figura 4.2). Para corroborar dicho valor se realizó un estudio por MALDI-TOF obteniendo un valor de 6450 Da (Figura 4.3). La diferencia entre estos valores puede deberse a que en los estudios electroforéticos se requiere de una concentración de proteína muy grande para poder ver las bandas por lo que se le adicionó glicerol para lograr dicha concentración y este puede afectar el corrimiento. Por otro lado en la espectrometría de masas se requieren de concentraciones del orden pico molar.

El valor de peso molecular obtenido para esta lectina, la sitúa entre las mas pequeñas reportadas hasta la fecha aislada de invertebrados marinos. Otras lectinas aisladas de moluscos son la de *A. áulica*⁴⁸ con un peso de 15000 Da y la del mejillón *C. Grayanus*⁴⁷ con 18000 Da. También se han aislado de otras fuentes marinas, tal es el caso de lectinas, como la de *Gracilaria ornata*⁴⁹ con 17000 Da y la lectina de *Vidalia obtusiloba*⁵⁰ con 15000 Da.

5.2. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO

El análisis del punto isoeléctrico de la lectina purificada mostró una banda con valor que corresponde a un pI de 9.45 (Figura 4.4), lo cual indica que esta proteína es altamente básica; razón por la cual se observó una menor solubilidad al mantener esta muestra en un amortiguador de pH 9 y 10, ya que están cercanos al pI de la muestra.

Valores altamente básicos de PI se han reportado para la lectina *cepaea hortensis*⁵¹ con un pI de 8.7. *haliclona cratera*⁵² con un pI de 8.6.

5.3. PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Varios compuestos de pesos moleculares bajos se sabe que estabilizan la estructura de las proteínas contra la desnaturalización térmica y química a los que se les conoce como chaperones químicos. Estos pueden influir en la exactitud con que la proteína se pliega estabilizando dicha estructura plegada.⁵³

Al purificar a la lectina de *M. edulis* se observó que era muy inestable y en periodos muy cortos de tiempo se perdía su actividad y precipitaba, además no se le podía concentrar ni congelar porque se perdía por completo su actividad. Es por esto que se realizaron diversas pruebas con el fin de poder mantenerla estable y así continuar con los subsecuentes estudios. En estos estudios encontramos que la condición óptima de estabilidad y actividad se obtenía al adicionar 200 mM de NaCl, 10 mM de glucosa y 1% de glicerol (Figuras 4.5 a 4.7). Esto puede explicarse por el hecho de que las sales tienen diversos efectos importantes en las propiedades de las proteínas. Estos pueden surgir de la unión de iones a sitios específicos en la proteína o bien por efectos que incluyen la protección de cargas en la superficie de la cadena lateral y el cambio en el grado de hidratación de la proteína. Los efectos de las sales en la estabilidad de la proteína dependen de la naturaleza del anión y catión. Los aniones fuertemente hidratados tales como el sulfato y fosfato y los cationes débilmente hidratados como el amonio y potasio son los mejores estabilizantes. La presencia de iones podría ser de importancia para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional.⁵⁴ A bajas concentraciones de sal, la solubilidad de la proteína

aumenta, fenómeno conocido como “salting in”. Sin embargo, a medida que la concentración de la sal aumenta, implica que haya menos moléculas de agua disponibles para solvatar a la proteína. Esto causa la exposición de zonas hidrofóbicas en la superficie proteica, las cuales interactúan entre si formando agregados que precipitan, este fenómeno se conoce como “salting out”.^{55,56}

En el caso del glicerol, este es un agente crioprotector es decir evita que la superficie inmediata a la proteína se congele evitando así su desnaturalización. El glicerol produce una reducción en el número y tamaño de cavidades en la estructura de la proteína en donde se colocan las moléculas de agua evitando así que se formen los puentes de hidrógeno con el agua y se logre congelar en su totalidad. Además, Se sabe que al igual que otros polioles, el glicerol ayuda a mantener la estabilidad en la proteína, debido a una hidratación preferencial, favorece la exclusión de moléculas de disolvente de la superficie de la proteína creando la tendencia a reducirla sin producir cambios conformacionales.⁵⁷ Estudios sugieren que el glicerol refuerza la estabilidad de la proteína disminuyendo el área de la superficie accesible al solvente.^{58,59}

Por otro lado, diversos estudios indican que el uso de azúcares es de gran ayuda en la estabilidad de las proteínas. Estos ayudan a retener la actividad de varias enzimas en solución, así como para mantener proteínas en estado de desecación. Se ha observado que tal capacidad se debe a una elevación y ampliación de la curva de estabilidad de ΔG contra T , además de que se ha encontrado una correlación de la tensión superficial de las soluciones de trealosa con la estabilidad térmica de las proteínas^{60,61,62} También se ha encontrado que las propiedades de los azúcares para mantener estable a una proteína se deben a las redes de puentes de hidrógeno que forman y que anclan la superficie de la proteína a la matriz circundante, cuya rigidez incrementa por decremento del contenido de agua.

5.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD DE LA LECTINA DE *M. EDULIS*

La temperatura resultó ser un parámetro muy importante en la estabilidad y actividad de la lectina de *M. edulis* como se observa en la Figura 4.11. Se determinó que la mayor actividad aglutinante se obtiene a 30 °C, siendo la menor a 4°C.

Se sabe que la actividad esta estrechamente relacionada con la temperatura, ya que al haber una mayor movimiento de moléculas por este efecto es mayor la interacción, en general la temperatura puede provocar el agrupamiento de complejos funcionales.⁶³ Para otras lectinas reportadas su máximo de actividad ha sido 40 °C para *K pelamis*⁶⁴ y entre 10 y 20 °C para *Ruditapes philippinarum*⁶⁵

6.5. PRUEBAS DE INHIBICIÓN

Con el fin de determinar los azúcares que reconoce la lectina de *M. edulis* se realizaron las pruebas de inhibición utilizando diferentes carbohidratos (Tabla 4.2) encontrando que reconoce N-Acetil-galactosamina, galactosa y rafinosa, siendo este último el más afín con una concentración mínima inhibitoria de 40.18 mM. Otra lectinas afines a rafinosa como la de *Crotalaria pallida*⁴⁶ presenta una concentración mínima inhibitoria de 25 mM, la de *Crotalaria juncea*⁴⁶ de 5.6 mM, *Crenomytilus grayanus*⁴⁷ con 1.8 mM.

Se sabe que las interacciones proteína-ligando involucran N- y O-glicanos, en donde los sitios de unión son de baja afinidad y se encuentran en cavidades poco profundas de la superficie proteica.¹⁴ Esta selectividad se da primordialmente a través de puentes de hidrógeno que involucran los grupos hidroxilos de los carbohidratos y por interacción hidrofóbica de los anillos de los monosacáridos con las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos. La avidez de estos sitios de baja afinidad requiere de una multivalencia.¹⁵

La estructura de la rafinosa permite formar puentes de hidrógeno entre los grupos (OH) y la proteína actuando como donadores o aceptores, de ahí que puedan unirse.⁶⁶

6.6. ESTUDIOS DE DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

Con el fin de estudiar el comportamiento en solución y las interacciones proteína-proteína y proteína-ligando de la lectina de *M. edulis* se realizaron estudios de dispersión dinámica de luz evaluando el efecto de factores como: temperatura, pH, concentración de glicerol y efecto de la adición de su ligando (rafinosa). El efecto se siguió a través de las variaciones observadas en el peso molecular y la polidispersidad. La polidispersidad nos indica cuantas especies están presentes en la solución de proteína, siendo una solución monodispersa cuando sólo una especie se encuentra presente (un solo peso molecular). Observamos que esta proteína tiene fuertes tendencias a interactuar con ella misma (agregarse) formando diferentes estados de oligomerización presumiblemente como un mecanismo de regulación de su actividad.

5.6.1 EFECTO DEL pH

En la Figura 4.12 se observa que el pH tiene una fuerte influencia en el comportamiento de la proteína. Se observa que a valores bajos de pH, la proteína se agrega considerablemente hasta un pH entre 6.5 y 8 en donde la agregación disminuye notablemente. Después de estos valores de pH, la proteína empieza a agregarse nuevamente, esto debido a que nos acercamos a su pI donde la proteína es menos soluble. Es importante notar que la polidispersidad figura 4.13 disminuye conforme se aumenta el pH hasta un valor de 7 a partir del cual aumenta. Esto nos dice que a valores de pH bajos, la proteína se agrega pero de una manera homogénea sin formar una gran variedad de especies (agregados de diferentes tamaños). Sin embargo, a pH's arriba de 7 la agregación es más desordenada.

5.6.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Como habíamos observado en los puntos anteriores, la temperatura resultó ser un parámetro de vital importancia en la estabilidad y actividad de la proteína pura. En la Figura 4.14 observamos que además es vital para aumentar las interacciones proteína-proteína reflejadas en un cambio en el peso molecular provocado por la formación de diferentes

oligómeros. Observamos que a bajas temperaturas la proteína está menos agregada y menos polidispersa figura 4.15. Se ha observado que la agregación es favorecida por factores como pH y temperatura, creándose condiciones en donde la proteína ya no esta estable debido a que pueden provocar la formación de complejos no funcionales.⁶⁷ Sin embargo, en algunos casos la oligomerización la lleva a cabo para estabilizarse o regular su actividad, mediante la formación de complejos funcionales. Es importante notar que a la temperatura de mayor actividad (30°C) la proteína se encuentra fuertemente agregada, lo cuál indica que la proteína requiere formar oligómeros muy grandes para así poder cumplir con su actividad. Recientemente se han reportado algunos estudios donde mencionan que los fenómenos de oligomerización pueden constituir un mecanismo de regulación de la actividad.^{7,63} Este comportamiento también ha sido explicado por medio de la teoría del agrupamiento molecular en donde al oligomerizar las moléculas éstas proporcionan una mayor estabilidad al agregado, y también se regula la actividad, por medio de mecanismos de plegamiento y desplegamiento, ya que al abrirse la molécula deja expuesta los sitios catalíticos, para que se lleve a cabo la actividad.^{7,63}

5.6.3 EFECTO DE LA ADICION DEL LIGANDO

Como se observa en las Figuras 4.16 y 4.17, la adición de rafinosa provoca cambios en el estado de agregación de la lectina, reflejado como cambios en el peso molecular y en la polidispersidad, sin embargo, no se observa una tendencia definida. Esto puede deberse a que más bien está provocando cambios conformacionales y no tanto en el estado de agregación lo que se comprueba adelante con los estudios de dicroísmo circular.

5.6.4 EFECTO DEL GLICEROL

En la Figuras 4.18 y 4.19 se observa que la adición de glicerol tiene un efecto notable en las interacciones proteína-proteína de la lectina pura provocando cambios en la agregación y la polidispersidad de la misma. Se observa que al aumentar la concentración de este aditivo, aumenta la agregación y polidispersidad de la solución de proteína. Relacionando este efecto con los resultados mostrados en la Figura 4.8 observamos que el glicerol a bajas

concentraciones aumenta la solubilidad de la proteína, pero a concentraciones altas provoca una disminución de la solubilidad de la proteína

5.6.5 EFECTO DEL LIGANDO EN PRESENCIA DE GLICEROL

Debido a que se observó que el glicerol mantenía estable a la lectina pura y que esta se podía concentrar en presencia del mismo, factor de suma importancia para los posteriores estudios, se evaluó el efecto del ligando en presencia de glicerol (Figuras 4.20 y 4.21). Al adicionar el ligando aumenta la agregación de la proteína con la primera adición, pero después se estabiliza, para posteriormente a elevadas concentraciones empezar a desagregarla.. En cuanto a la polidispersidad observamos que esta aumenta de igual manera que el peso molecular con la primera inyección, pero después esta disminuye con la adición de la rafinosa. Esto nos indica que la rafinosa provoca que la proteína oligomerize, esto como un mecanismo de control de la actividad de unión sin embargo los oligómeros son más homogéneos, esto debido a que es el tamaño ideal para que se lleve a cabo la unión de la lectina con su ligando. Por otro lado, nos dimos cuenta que el glicerol si permite la interacción entre el ligando y la proteína al mantenerla en cierto grado de oligomerización en donde es mas funcional y no interfiere ni en la unión ni en la inhibición de la misma.

5.7. ESTUDIOS CONFORMACIONALES Y DE ESTRUCTURA SECUNDARIA (CD)

Los estudios de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano nos permitieron conocer el tipo de estructura secundaria que predomina en esta proteína y los efectos que pueden tener diferentes factores en su conformación

En el espectro de dicroísmo circular de la proteína sola (Figura 4.22, Tabla 4.3) observamos que predomina la hoja beta característico de algunos invertebrados marinos como: *tachipleus tridentatus*,⁶⁸ y *polyandrocarpa misakiensis*.⁶⁹ Además, se ha observado que

diversas proteínas que tienden a agregarse presentan este tipo de estructura de manera predominante.

5.7.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Al analizar el efecto que tenía la temperatura en la conformación y contenido de estructura secundaria de la lectina de *M. edulis* observamos en general que el contenido de hoja beta se incrementa y disminuye la hélice alfa (Figura 4.23, Tabla 4.4), esto podría deberse a que la estructura se va abriendo por efecto térmico provocando una nueva alineación de modo que su conformación va cambiando, sin embargo, en ningún momento se llegó a la desnaturalización de la proteína, por lo que observamos que se trata de una proteína altamente resistente a dicho parámetro. Además observamos que los principales cambios conformacionales se dan en los primeros cambios de temperatura sin observarse cambios a partir de los 40 °C (Figura 4.24) al menos a nivel conformación.

Además cabe mencionar que el experimento se realizó con una muestra que contenía 1% de glicerol. Se ha observado que el glicerol confiere una alta resistencia a la temperatura manteniéndola estable, ya que la envuelve compactando su estructura⁷⁰ los resultados nos sugieren que se une a la proteína por puentes de hidrogeno con lo cuál disminuye la temperatura interior de la misma protegiéndola así de la desnaturalización⁷¹

5.7.2 EFECTO DEL GLICEROL

En la Figura 4.25, observamos que la adición progresiva de glicerol no produce ningún cambio en la estructura secundaria de la proteína, debido a que sólo le confiere estabilidad a la proteína sin producir cambios ni estructurales⁵⁸ (Tabla 4.5). Sin embargo a nivel conformacional, produce un cambio único inicial con la primera adición (0.25%) de glicerol manteniéndose posteriormente estable, este debe ser el motivo por el cual se presenta la mayor actividad en presencia de este aditivo. Esto es, el glicerol permite que la proteína se acomode de tal forma que produce una solución menos polidispersa, manteniendo el estado de oligomerización adecuado para que la proteína pueda cumplir con su función de unión al ligando además de darle estabilidad a la misma.

5.7.3 EFECTO DE LA ADICION DEL LIGANDO (RAFINOSA)

En la Figura 4.27 se observa que la adición del ligando (rafinosa) a la lectina le produce notables cambios conformacionales esto debido a que la proteína requiere modificar su conformación a una óptima para poder unir dicho ligando. Cada vez que se adiciona ligando la proteína cambia para poder unir la siguiente molécula de ligando hasta que llega a su saturación, de ahí que como se verá adelante, la lectina muestra una unión secuencial en donde se requiere unir una molécula de ligando antes de poder unir la siguiente, esto debido probablemente a que se requiere que ocurra un cambio conformacional que permita dicha unión. Por otro lado, al interaccionar la lectina con la rafinosa, no sólo se producen cambios conformacionales sino también en el contenido de estructura secundaria (Tabla 5.6), disminuyendo el contenido de hélices α y aumentando el contenido de hojas beta. Investigaciones recientes, han mostrado la existencia de la interacción entre rafinosa con proteínas; tal es el caso de la hemoglobina, que al interaccionar con este azúcar forma entrecruzamiento que hace que modifique su función. El entrecruzamiento reduce el sistema vasoconstrictor y disminuye el CO presente inducido por modificación estructural de la hemoglobina. La rafinosa también reduce el grado de oxidación del NO y contribuye a reducir la vasoactividad de la hemoglobina.⁷²

5.8. ESTUDIOS TERMODINÁMICOS

En el estudio de calorimetría de titulación isotérmica (Figura 4.29), el modelo que se ajustó mejor fue el de tres sitios secuenciales, los cuales son de naturaleza exotérmica. Esto indica que al darse la unión de la lectina con el ligando lo hace liberando calor. Los valores de las constantes de unión disminuyen en el orden $K_1 > K_2 < K_3$, (Tabla 4.7). Es importante señalar que es la primer lectina con afinidad a rafinosa a la que se le realiza un estudio de este tipo. Para el primer sitio la constante de unión K_1 fue de 5357 M^{-1} mayor que la K_2 lo que habla de una cooperatividad negativa. Los valores de las constantes muestran que la lectina de *M. edulis* para ocupar el primer sitio de unión se encuentra ávida por el ligando lo cual hace que la K_1 sea mayor. La K_2 reflejaría el hecho de que al estar ocupado el primer sitio por este azúcar, podría impedir estéricamente la unión al segundo sitio. El valor de K_3

mayor a K_2 , indica la unión secuencial la cual se hace de manera cooperativa. En este tipo de unión las moléculas se reacomodan para dejar mas disponible el sitio de unión y así unir mas ligando, de modo que aumenta la afinidad (aumento en el valor de K) con lo cual se dice que la cooperatividad es positiva.^{73,74}

La entalpía para el primer sitio ΔH_1 fue $-1093 \text{ cal mol}^{-1}$, por lo que se puede hablar de un proceso exotérmico. La entropía para el primer sitio ΔS_1 fue de $13.46 \text{ cal } ^\circ\text{K mol}^{-1}$, por lo que puede hablarse de un proceso en el que el orden aumenta, mientras que la energía libre de Gibbs ΔG_1 , evaluada a partir de los datos anteriores y de la temperatura, fue de $-5104.08 \text{ cal mol}^{-1}$. La negatividad de este término señala una interacción que ocurre de forma espontánea. Se trata de una reacción conducida entálpicamente.

Para el segundo sitio, la constante K_2 fue de 95.24 M^{-1} , un valor menor al presentado por K_1 . Esto señala una cooperatividad negativa. Este tipo de cooperatividad es más fácilmente detectado, ya que existen dos diferentes fases durante la reacción: una unión fuerte en el primer sitio y otra débil en el segundo. La entalpía para este sitio ΔH_2 fue de $14700 \text{ cal mol}^{-1}$, por lo que, se trata de una interacción endotérmica, mientras que la entropía ΔS_2 tuvo un valor de $57.78 \text{ cal } ^\circ\text{C mol}^{-1}$, mismo que también señala que el proceso disminuye del desorden en el universo. La energía libre de Gibbs ΔG_2 calculada para este sitio fue de $-2518.44 \text{ cal mol}^{-1}$ que, es mayor que para el primer sitio, también evidencia una reacción que se lleva a cabo espontáneamente y que también es conducida entálpicamente. En el caso del tercer sitio, la constante K_3 fue de 140 M^{-1} , un término menor al presentado por K_1 pero mayor que K_2 . Esto señala una cooperatividad positiva. La entalpía para este sitio ΔH_3 fue de $-108300 \text{ cal mol}^{-1}$, por lo que, se trata de una interacción exotérmica, mientras que la entropía ΔS_3 tuvo un valor de $-347.3 \text{ cal } ^\circ\text{K mol}^{-1}$, mismo que también señala que el proceso aumenta el desorden. La energía libre de Gibbs ΔG_3 calculada para este sitio fue de $-2901.00 \text{ cal mol}^{-1}$, también evidencia una reacción que se lleva a cabo espontáneamente y que también es conducida entálpicamente.

El valor de entalpía refleja en ambos casos, en primera instancia, la fuerza de las interacciones del ligando con la proteína, trátase de interacciones de 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 Freire⁷⁸. También se menciona que el cambio en entropía refleja principalmente dos contribuciones: los cambios en la energía

de solvatación y los cambios en 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. También algunos 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.

5.9. CRISTALIZACIÓN DE LA LECTINA DE *M. edulis*

De las pruebas de cristalización montadas con la técnica de la gota colgante, se obtuvieron diferentes condiciones en donde se observaron cristales, aunque estos aún son muy pequeños (Tabla 4.8). Esto es debido a los fuertes procesos de agregación que presenta la proteína que provocan que la saturación sea muy rápida y se formen precipitados amorfos o cristales muy pequeños. En el caso de dos de los cristales obtenidos, ya se realizaron pruebas de difracción de rayos X con el fin de verificar que estos correspondan a la proteína y no a alguna sal, mostrando ser proteína, sin embargo difractaron a 4 Å de resolución por lo que es necesario incrementar el tamaño de los mismos y mejorar la calidad con el fin de obtener una resolución mayor. Sin embargo, en los estudios cristalográficos uno de los aspectos más difíciles de lograr es la obtención de la condición adecuada para el crecimiento de cristales y en el presente estudio esto ya fue logrado, sólo falta mejorar la calidad de los mismos. Dicha mejora puede lograrse haciendo que el crecimiento sea más lento ya sea disminuyendo la velocidad de la difusión, lo cuál puede controlarse mediante la adición de aceites y disminuyendo la concentración del agente precipitante. También se tiene que incrementar la concentración de la proteína para lograr cristales más grandes. Es notable que en las diferentes condiciones hay un agente que predomina, el polietilenglicol (PEG), ya que incluso la Jefamina, es una variante de un PEG. Este reactivo al igual que el glicerol es un poliol que ayuda a mantener la estabilidad en la proteína debido a una hidratación preferencial. Favorece la exclusión de moléculas de disolvente de la superficie de la proteína creando la tendencia a reducirla sin producir cambios conformacionales.⁵⁷

6. CONCLUSIONES

- Se logró aislar y purificar una lectina del extracto del mejillón *Mytilus edulis*, por afinidad utilizando estromas glutaraldehízados de eritrocitos de conejo. La lectina mostró ser una proteína altamente activa, que tiene afinidad por la rafinosa.
- La determinación del punto isoelectrico de la lectina, mostró una proteína básica de con un pI de 9.43
- El peso molecular de la lectina fue de 6450 Da que la sitúa como la lectina de invertebrados mas pequeña reportada a la fecha.
- La condición de mayor estabilidad se obtuvo usando un amortiguador de fosfatos pH 7.4 y 200 mM de NaCl, 10 mM de glucosa y 1% de glicerol, en esta condición conservaba su actividad y se mantenía más soluble. La temperatura de mayor actividad aglutinante en esta condición de estabilidad fue a 30 °C
- Mediante estudios de Dispersión Dinámica de Luz se determinó que la lectina tiende a agregarse con el aumento de la temperatura teniendo el menor estado de agregación y polidispersidad a 5°C. Además tiene una fuerte influencia del pH, presentando la menor agregación a valores de pH entre 6.5 y 8. Por otro lado, el glicerol aumenta su agregación llevando a la proteína a un estado de oligomerización óptimo para poder cumplir con su función de manera adecuada. La Rafinosa también provoca cambio en el comportamiento en solución de la lectina modificando su estado de oligomerización como un mecanismo de control de su actividad.
- Por técnicas de difracción circular, se observó que la estructura secundaria que predomina es la hoja beta. Además el aumento de temperatura ocasiona cambios conformacionales, siendo altamente resistente a la temperatura lo cuál podría sugerir la presencia de puentes disulfuro, por otro lado la adición de glicerol le

proporciona estabilidad contra los cambios de temperatura.. La interacción con su ligando ocasiona también cambios conformacionales debido que es necesario un cambio conformacional para que se lleve a cabo el entrecruzamiento con la rafinosa

- Los estudios de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) revelaron que la lectina tiene tres sitios de unión ajustándose a un modelo matemático secuencial, el cual sugiere que la lectina presenta un reacomodo molecular para hacer disponible un sitio de unión y poder unir así otra molécula de rafinosa. Cabe señalar que es la primera lectina que une rafinosa a la que se le realiza un estudio de esta naturaleza.
- Se encontraron 3 condiciones donde se obtuvieron cristales apropiados para posteriores estudios de difracción de rayos X, en dos de ellas ya se realizaron estudios de difracción de rayos X y se comprobó que se trata de proteína.

REFERENCIAS

1. Hernández, D. P., Martín, G. O., Rodríguez de Pablos, V. Y. y Ganem, B. F. A. (1999) Aplicaciones de las lectinas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. **15**, 91-95 .
2. Kocourek, J; Horejsi, V , (1983), A note on the Recent discussion on the definition of the term “lectin”. *Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. **3**, 3-6.
3. Kilpatrick David C. (2002) Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572:187-197.
4. Rüdiger H, Siebert H-C, Solís D., Jimenez-Barbero, J., Romero, A., Lieth, C-W., Diaz-Maurino, T. y Gabius, H-J. (2000) Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Current Medicinal Chemistry*. **7** , 389-416.
5. Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Reece, G. N., Becker, J. W., Waxdal, M. W. y Wang, J. M. (1972) The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **69**, 2580-2584.
6. Drickamer, K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *Journal of Biological Chemistry*. **263**, 9557-9560.
7. Milton, A. P. (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Current Opinion in Structural Biology*. **10**, 34-39.
8. Neelan J. Marianayagam, Margaret Sunde and Jacqueline M. Matthews, (2004) The power of two: protein dimerization in biology. *TRENDS in Biochemical Sciences* **29**
9. Charlotte S. Jørgensen¹, L. Rebekka Ryder¹, Anne Steinø¹, Peter Højrup², Jesper Hansen², N. Helena Beyer Niels H. H. Heegaard³ and Gunnar Houen¹, (2003), Dimerization and oligomerization of the chaperone calreticulin. *Eur. Journal. Biochemistry* **270**, 4140–4148.
10. Neer A, Jayanti P, Aleksey L, Olutayo O, Stacy R.A. Hansonb, Jean B. Smithb, George B. Benedek, U , (1998) Oligomerization and phase separation in globular protein solutions. *Biophysical Chemistry* **75** , 213-227
11. Stoppini, M, Andreola A, Foresti G, Bellotti V, (2004) , Neurodegenerative diseases caused by protein aggregation: a phenomenon at the borderline between molecular evolution and ageing . *Pharmacological Research* **50**. 419–431
12. Fink A.L . (1998)., Review Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid.

13. Brewer C. Fred (2002), Review Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochimica et Biophysica* **1572**, 255– 262
14. Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (1999). Essentials of Glycobiology. *The Consortium of Glycobiology* Editors. 653 .
15. Rini, J.M. (1995) Lectin structure. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. **24**, 551–577.
16. Weis, W. I. y Drickamer, K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*. **65**, 441-473.
17. Itshitsuka, R; Kojima, Utsuni, H; Ogawa H Matsumoto, I ,(1998), Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V, VI. *The Journal of Biological Chemistry Acta*. **1572**, 187-197.
18. 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**, 492641-49270.
19. Brewer, C.F. (1996), Multivalent lectin – carbohydrate cross-linking interactions, *Chem abstracts, Biochem. Mol. Biol.* **6**, 165– 179.
20. Brewer, C.F. (1997) , Cross-linking activities of galectins and other multivalent lectins, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **9** 155–165. cells mediated by galectin-1, *Nature* **378** 736–739.
21. Shrive, A. K., Metcalfe, A. M., Cartwright, J. R. y 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.
22. Beisel, H.G., Kawabata, S-I., Iwanaga, S., Huber, R. y Bode. W. (1999) Tachylectin-2: crystal structure of a specific GlcNAc/GalNAc-binding lectin involved in the innate immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. *The Journal of the European Molecular Biology Organization*. **18**, 2313-2322.
23. Hatakeyama, T., Matsuo, N., Aoyagi, H., Sugawara, H., Uchida, T., Kurisu, G. y 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.
24. Uchida, T., Yamasaki, T., Eto, S., Sugawara, H., Kurisu, G., Nakagawa, A., Kusunoki, M. y Hatakeyama, T. (2004) Crystal structure of the hemolytic lectin CEL-III isolated from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*: implications of domain structure for its

- membrane pore-formation mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**, 37133-37141.
25. Du Pasquier, L. (2001) The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **129B**, 1-15.
26. Yakovleva, N.V., Samoilovick, M. P. y Gorbushin, A. M. (2001) The diversity of strategies of defense from pathogens in molluscs. *Journal Evolutionary Biochemistry and Physiology*. **37**, 258-367.
27. Hatakeyama, T., Nagatomo, H. y Yamasaki, N. (1995) Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. *Journal of Biological Chemistry*. **270**, 3560-3564.
- 28.- Lisgarten, J. N., Pitts, J. E., Palmer, R. A., Reynolds, C. D., Dao-Thi, M. H., Van Driessche, E. y Beeckmans, S. (1999) Crystallization of *Helix pomatia* agglutinin (HPA), a protein from the edible snail. *Acta crystallographica D biological crystallography*. **55**, 1903-1905.
29. Viñas C, M, (2005). Caracterización Físicoquímica y Estructural de una lectina del Mejillón *Mytilus edulis*. Tesis de Licenciatura, FES Zaragoza,
30. Cifuentes Lemus, J.L., Torres G. P. y Frías M. M. [libro en línea] El océano y sus recursos. Creado (2003), [Fecha de consulta: 15-Febrero-2004], [Organización: Omega http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/087/htm/sec_13.htm
31. Zenteno, E, Ochoa J.L, Montaña L.F, Debray H, Montrevil. (1991), *Machaeroceros eruca cactus* isolectins, purification and characterization, *Plant science*, **75**, 11-19
32. Ochoa J. L , Kristiansen T, (1978) Stroma: as an affinity adsorbent for non-inhibitable lectins, *Institute of Biochemistry*, volume 90.
33. 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
34. Matsushita M, Irino T, Komoda T, Sakagishi Y. (1993) Determination of proteins by a reverse biuret method combined with the copper-bathocuproine chelate reaction. *Clin Chim Acta*, **216**, 103-111.
35. Bollag, D.M. y Edelstein, S.J. (1991) Protein methods. Library of Congress. Wiley-Liss. New York. 227 págs.
36. Jena, SS, Bohidar, HB.(1993), Determination of absolute polydispersity and molecular weight polymers from dynamic light scattering. *J. chem. Phys*, **99**, 673-381.

37. Bishop, J.B, Martin, J.C, Rosenblum, W.M.(1991), A light scattering method for qualitatively monitoring aggregation rates in macromolecular systems. *J Crystal Growth* **110**, 167-170.
38. Mushol, M, Rosenberger, F. (1995), Interactions in undersaturated and supersaturated lysozyme solutions: Static and dynamic light scattering results. *J. Chem. Phys.* **103**, 10424-10432.
39. Greenfield, N. (1996), Computer circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry* **8**, 4108.
40. Johnson, W.C (1990). Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* **7**, 205-214.
41. Kelly, S. y Price, N. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et biophysica acta.* **1338**, 161-185.
42. Cassim, J.Y y Young, j.T. (1969), A computerized calibration of the circular dichrometer. *Biochemistry*, **8**, 1947-1951.
43. Hennessey, J.P y Johnson, W.C, (1981), Information content in the circular dichroism of proteins, *Biochemistry* **20**, 1085-1094.
44. Dam, T. K y Brewer, C. F. (2002) Thermodynamic Studies of Lectin-Carbohydrate Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. *Chemical Reviews.* **102**, 387-429.
45. Mc Pherson, A. (1999) Crystallization of biological macromolecules. *Cold Spring Harbor Laboratory.* **12**, 327-337
46. Evandro J.L. Regoa,1, Daniela D. de Carvalhob,1, Sergio Marangonib, Benedito de Oliveira, José C. Novello, (2002) , Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox) *Phytochemistry* **60**, 441-446
47. Belogortseva, N.I., Molchanova, V. I., Kurika, A.V., Skobun, A.S. y Glazkova, V.E. (1998) Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* .*Comparative Biochemistry and Physiology.* **119C** , 45-50.
48. Biswas, C., Sinha, D. y Mandal, C. (2000) Investigation on interaction of Achatinin, a 9-O-acetyl sialic acid-binding lectin, with lipopolysaccharide in the innate immunity of *Achatina fulica* snails. *Molecular immunology.* **37**, 745-754
49. Yáskara F, Monteiro M.L, Castelo Melo L.M, Das Neves R.C, Almeida F.E, Macedo de Melo D, Barbosa G.T y Barros Benavides N.M. (2005), Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil

Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae), *Biochimica et Biophysica*, 1724, 137-145.

50. Melo F; Norma M.B. Benevides; Pereira M G; Márjory L. Holanda; Mendez F N.P. s; Stélio R.M. Oliveira; Ana L.P. Freitas; Luana M.C.M. Silva (2004) Purification and partial characterisation of a lectin from the red marine alga *Vidalia obtusiloba* C. Agardh, *Revista Brasileira de Botanica*, 27, 263-279.

51. Gerlach, D, Schlott B, Zähringer U, Karl-Hermann Schmidt. (2005) N -acetyl-D D-galactosamine/N -acetyl-D D-glucosamine –recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E.coli*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43, 223 –232

52. Pajic, I., Kljajic, Z., Dogovic, N., Sladic, D., Juranic, Z. y Gasic, M. J. (2002) A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. *Comparative biochemistry and physiology*. 132C, 213-221.

53. Chunxue B, Biwersi J, Verkman A.S. y Matthey M. A., (1999) A Mouse Model to Test the in vivo Efficacy of Chemical Chaperones, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 40, 39–45.

54. Welch WJ, Brown CR (1996) Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones* 1, 109 –115.

55. Cerasolia E, Sharon M. Kelly R. Cogginsa, J.A Laphornb, D. T. Clarke, N C. Pricea, (2003) Effects of salts on the function and conformational stability of shikimate kinase, *Biochimica et Biophysica Acta* 1648, 43– 54

56. Arakawa T, Timasheff S.N., (1984) Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cations: balance between hydration and salt binding, *Biochemistry* 23, 5912–5923.

57. Scopes R.K., (1994), Separation by precipitation, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer 2, 71– 101.

58. Farnum M, Zukoski C, (2003), Effect of Glycerol on the Interactions and Solubility of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor, *Biophysical Journal* 76, 2716–2726
Biophysical Journal 85 3279–3285 3279

59. Oliveira, A C, Gaspar L.P, Da Poian, A.T, and Silva J.L (1994), Effect the glycerol in protein interior, *Journal Molecular Biology* 240, 184-187

60. Cicerone M.T, Soles C.L. (2004), Fast Dynamics and Stabilization of Proteins: Binary Glasses of Trehalose and Glycerol, *Biophysical Journal* 86, 3836–3845

61. Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1982). Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*, 21, 6536–6544.
62. Jai K. Kaushik y Rajiv Bhat, (2003), Why Is Trehalose an Exceptional Protein Stabilizer?, an analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose, *The Journal of Biological Chemistry* 278., 26458–26465
63. Hall, D. y Milton, A. P. (2003) Macromolecular crowding: quantitative and semiquantitative successes, quantitative changes. *Biochimica et biophysica acta*. 1649, 127-139
64. Jung, W-K., Park, P-J. y Kim, S-K. (2003) Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 35, 255-265.
65. Bulgakov, A., Kyung, I Park, Kwang-Sik, Kyoung C.H, Lim, Moonjae C. (2004), Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum*, *Fish & Shellfish Immunology* 16, 487
66. Berman, H. M. (1970) The crystal structure of a trisaccharide, raffinose pentahydrate. *Acta crystallographica*. 26, 290-297.
67. Moradian, J, Oldak, Leung W., y Fincham A. G., (1998) Temperature and pH-Dependent Supramolecular Self-Assembly of Amelogenin Molecules: A Dynamic Light-Scattering Analysis. *Journal of Structural Biology* 122, 320–327.
68. Beisel, H.G., Kawabata, S-I., Iwanaga, S., Huber, R. y Bode. W. (1999) Tachylectin-2: crystal structure of a specific GlcNAc/GalNAc-binding lectin involved in the innate immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. *The journal of the European Molecular Biology Organization*. 18, 2313-2322.
69. Poget, S.F., Legge, G.B., Proctor, M.R., Butler, P.J.G., Bycroft M. y William, R.L. (1999) The structure of a tunicate C-type lectin from *Polyandrocarpa misakiensis* complexed with D-galactose. *Journal of molecular biology*. 290, 867-879..
70. Stefan K. Baier, Eric A. Decker, D., McClements J, (2004), Impact of glycerol on thermostability and heat-induced gelation of bovine serum albumin, *Food Hydrocolloids* 18 91–100
71. Militello V, Vetri V, Leone M, (2003) , Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin , *Biophysical Chemistry* 105 133-141
72. Lieberthal W, Fuhro R, Freedman J, Toolan, G, Loscalzo J, Valeri R, (1999) o-raffinose cross-linking markedly reduces systemic and renal vasoconstrictor effects of unmodified

human hemoglobin1. The journal of pharmacology and experimental therapeutics. 288, 1278-1287.

73. Dam, T.K y Brewer, C.F. (2002) Thermodynamic Studies of Lectin- Carbohydrate Interactions by Isothermal Tritation Calorimetry. Chemical Reviews. 102, 387-429.

74. Lee, Y. C. (1992) Biochemistry of carbohydrate-protein interaction. Journal of the Federation of American Societies for experimental biology. 6, 3193-3200.

75. Damian L , Fournier D, Winterhalter M y Paquereau L (2005), Determination of thermodynamic parameters of Xerocomus chrysenteron lectin interactions with N-acetylgalactosamine and Thomsen-Friedenreich antigen by isothermal titration calorimetry, Biochemistry 6, 11

76. Gallego del Sol F, Gomez J, Hoos S, Nagano, C Benildo S. Cavada A., England y Calvete J, (2005), Energetics of 5-bromo-4-chloro-3-indolylo-D-mannose binding to the Parkia platycephala seed lectin and its use for MAD phasing, Crystallizations Communications 61, 326-331.

77. Nabil Ali Mohammed Sultan, Musti J. Swamy, (2005), Energetics of carbohydrate binding to Momordica charantia (bitter gourd) lectin: An isothermal titration calorimetric study, Biochemistry and Biophysics 437, 115-125.