



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“TENSIÓN SUPERFICIAL DINÁMICA Y CINÉTICA DE ADSORCIÓN DE
LA
TRIOSAFOFATO ISOMERASA DE TRES ESPECIES”**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
Q. ADRIANA LOZOYA COLINAS**

**TUTOR: DR. MIGUEL ANTONIO COSTAS BASÍN
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

MÉXICO, D. F., NOVIEMBRE 2013



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
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Dr. Miguel Costas por su tiempo, dedicación y asesoría en el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Armando Gómez Puyou y a Beatriz Aguirre por su apoyo, préstamo de equipos y material, asesoría y aportaciones al proyecto.

A los miembros del jurado por su inversión de tiempo para leer este trabajo y por sus comentarios.

A todos los compañeros del laboratorio, familia y amigos.

Al CONACyT por la beca otorgada para financiar los estudios de maestría (No. de becario: 409526).

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM) IN112813 por otorgar los recursos para realizar esta investigación.

Al Posgrado en Ciencias Químicas, a la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi mamá, a mi papá y a mis amigos

Jurado asignado

Integrantes del jurado

Presidente	Dr. Milton Thadeu García Medeiros de Oliveira	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Alejandra Hernández Santoyo	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. José Campos Terán	UAM-Cuajimalpa
Secretario	Dr. Luis Fernando Olguín Conteras	Facultad de Química, UNAM

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Biofisiocoquímica, Departamento de Fisiocoquímica, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México.

Q. Adriana Lozoya Colinas
Sustentante

Dr. Miguel Antonio Costas Basín
Asesor

Los resultados de este trabajo se presentaron en:

XXIX Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Bioquímica, Oaxaca, Oaxaca, 2012.

3rd USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Protein Folding, Dynamics and Function, Guanajuato, Guanajuato, 2013.

Cuarto Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Guanajuato, Guanajuato, 2013.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Tensión superficial.....	3
1.2. Proteínas en la superficie.....	5
1.3. Triosafosfato isomerasa	7
2. Objetivos.....	12
3. Materiales y métodos.....	13
3.1. Preparación de disoluciones de triosa fosfato isomerasa	13
3.2. Tensión superficial dinámica.....	14
3.3. Fluorescencia.....	17
4. Tratamiento de datos.....	18
4.1. Cálculo de coeficientes de difusión.....	18
4.2. Ajuste de los datos de tensión superficial dinámica a un modelo de adsorción-reorientación en la superficie	21
4.3. Fluorescencia.....	27
5. Resultados y discusión.....	29
5.1. Tensión superficial dinámica.....	29
5.1.1. Triosafosfato isomerasas.....	29
5.1.2. Triosafosfato isomerasas en presencia de urea.....	33
5.1.2.1. Determinación por fluorescencia de la fracción desplegada de Triosafosfato isomerasa.....	33

5.1.2.2. Tensión dinámica en presencia de urea.....	34
5.2. Determinación de presión superficial, concentración superficial y coeficientes de difusión.....	39
5.3. Ajuste al modelo de adsorción-reorientación en la superficie.....	43
5.4. Posibles determinantes microscópicos del comportamiento superficial.....	51
6. Conclusiones.....	55
7. Sugerencias para trabajo futuro.....	56
8. Apéndice 1.....	57
9. Apéndice 2.....	61
10. Apéndice 3.....	63
11. Referencias.....	64

1. Introducción

Las enfermedades parasitarias constituyen un problema de salud pública muy importante. Para la mayoría de ellas, no existen tratamientos eficaces. Algunas de estas enfermedades causadas por protozoarios son el mal de Chagas causada por el *Trypanosoma cruzi* presente en América, y el mal del sueño causada por el *Trypanosoma brucei* presente en África. Estos parásitos son inoculados al cuerpo humano por la picadura de insectos o, en algunos pocos casos, por transfusión sanguínea [World Health Organization].

Dada la necesidad de desarrollar fármacos que tengan una acción eficaz contra estos parásitos, diversas líneas de investigación han surgido, buscando formas de atacarlos y eliminarlos del cuerpo humano. Un nicho de investigación en este sentido ha sido la posibilidad de bloquear alguno de los ciclos bioquímicos vitales de dichos organismos para eliminarlo, frenando así el desarrollo de la enfermedad en el individuo infectado.

Una opción que se tiene es la de bloquear el proceso de glucólisis en estos organismos, evitando la producción de ATP, y llevando así a un colapso de los procesos vitales bajo condiciones anaerobias. Los organismos que sufren dicha interrupción bioquímica son mortalmente afectados, dado que la glucólisis es su única vía para obtener energía

[Chávez-Cárdenas, 2005]. De este modo, se puede llegar a una alternativa para tratar enfermedades causadas por este tipo de parásitos.

Para bloquear la glucólisis de los parásitos es necesario elegir una proteína blanco u objetivo. Una de las enzimas cruciales que participan en el proceso de glucólisis es la Triosafosfato isomerasa (TIM). Por esta razón, la TIM ha sido elegida como proteína blanco. Esta enzima está presente tanto en humanos como en los tripanosomas, por lo que es importante que se busque especificidad hacia la TIM de los tripanosomas (TcTIM, TbTIM) y que no se afecte de manera considerable la TIM humana (HsTIM). Para lograr especificidades tan altas, es necesario conocer lo más profundamente posible a estas tres proteínas en todos sus aspectos. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo es evaluar si hay diferencias en el comportamiento de la proteína al encontrarse en la interfase líquido/aire al medir la tensión superficial, tanto en su forma nativa como en presencia de un desnaturizante como la urea. La TIM, como todas las proteínas, tiene una naturaleza dual hidrofóbica-hidrofílica debido a los residuos de aminoácidos polares y no polares por los que está formada. Esta naturaleza dual, hace que las proteínas se concentren en las interfases como agua-aire y agua-aceite, lo cual hace posible su caracterización al medir la tensión superficial.

Al estar en una interfase líquido/aire, es posible que las proteínas cambien su conformación, orientando los grupos polares hacia la fase polar y los grupos no polares hacia la otra fase (aire), lo cual disminuye la tensión interfacial, actuando así como un tensoactivo. El modelaje de los datos de tensión superficial podrá entonces proporcionar información fisicoquímica sobre algunas diferencias entre la proteína de las tres especies (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, y *Homo sapiens*), así como su caracterización para el proceso de adsorción a la interfase.

1.1. Tensión superficial

En función de la perspectiva desde la cual se desee abordar, existen diferentes formas de definir la tensión superficial. Una de ellas se refiere a una energía libre por unidad de área o una fuerza por unidad de longitud [Adamson, 1997], y sus unidades son N/m, J/m², o dinas/cm. También se puede definir desde el punto de vista termodinámico como el trabajo requerido para aumentar el área de una superficie de forma isotérmica y reversible. Desde el punto de vista molecular, la tensión superficial existe debido a que en un líquido existen fuerzas de atracción de corto alcance entre las moléculas. En el seno del líquido, estas fuerzas actúan en todas direcciones, compensándose unas con otras, mientras que en la superficie, estas fuerzas de atracción no están balanceadas, haciendo que se sientan atraídas por las moléculas que están en el seno del líquido (figura 1.1).

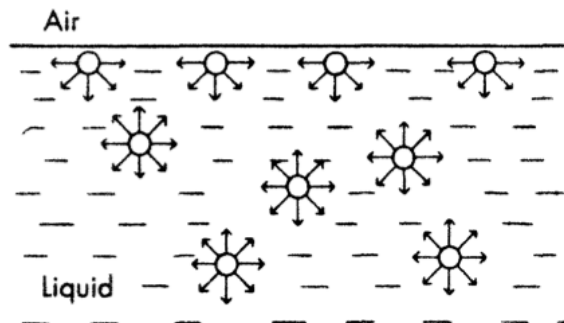


Figura 1.1. Fuerzas de atracción entre moléculas en un líquido. Tomado de [Shaw, 1992].

Las interacciones intermoleculares responsables de dicha tensión superficial pueden ser interacciones electrostáticas, de van der Waals (dipolo-dipolo, ion dipolo, etc.) o puentes de hidrógeno. De hecho, la alta tensión superficial del agua (72.8 mN/m) es precisamente debida a los puentes de hidrógeno que se forman entre las moléculas [Shaw, 1992].

Existen diferentes métodos para determinar la tensión superficial, los cuales pueden ser estáticos o dinámicos. Los métodos estáticos se emplean cuando el sistema llega al equilibrio de inmediato, y no hay una variación de la tensión superficial respecto al tiempo. Por otro lado, con los métodos dinámicos, puede medirse la tensión de sistemas que tardan en llegar al equilibrio, por lo tanto la tensión superficial varía en función del tiempo. Dependiendo de la ventana de tiempo dentro de la cual nos interese hacer las mediciones se pueden usar diferentes métodos, por ejemplo, el método de máxima presión de burbuja se puede usar para intervalos de tiempo de 0.001 a 100 segundos, mientras que el de gota pendiente se puede usar tanto para periodos de tiempo cortos como para tiempos largos, desde fracciones de segundo hasta horas [Eastoe, 2000]. Para este trabajo en particular, se midió la tensión superficial dinámica empleando el método de gota pendiente, debido a que el proceso observado tarda mucho tiempo en llegar al equilibrio (las mediciones duraron varias horas).

Cuando se crea una superficie fresca de una disolución con un tensoactivo, hay pocas moléculas de tensoactivo en la interfase líquido/aire, por lo cual la tensión superficial inicial es igual a la del disolvente puro. Con el tiempo, las moléculas que se encuentran en el seno de la disolución comienzan a migrar hacia la región interfacial para adsorberse en la superficie. Este proceso hace que la tensión superficial vaya disminuyendo, hasta que se alcanza el equilibrio, cuando los flujos de adsorción y desorción se vuelven iguales [Eastoe, 2000; Ravera, 1993].

Existen dos modelos principales para la migración y adsorción de moléculas a la interfase:

1. Modelo controlado por difusión: se considera que el paso limitante es la difusión del seno del líquido a la superficie, y la adsorción a la superficie es inmediata. La descripción se basa en la ecuación propuesta por Ward y Tordai [Ward, 1946] (ver sección 4.1)
2. Modelo controlado por adsorción (o mixto): en este caso, el paso limitante es la adsorción a la interfase. Se considera que la difusión es rápida en comparación con la adsorción, de tal forma que el proceso es controlado cinéticamente o por una

barrera. Esto puede deberse a varios factores, como pueden ser: la presencia de una barrera de energía potencial de adsorción, que la molécula debe tener una orientación adecuada para adsorberse, que haya espacio suficiente para su adsorción en la superficie, etc. Se dice que este modelo es mixto porque se consideran la difusión y la adsorción de las moléculas a la superficie. El modelo más común también se basa en la ecuación de Ward y Tordai, pero introduce un coeficiente de difusión aparente, el cual considera la energía de activación requerida para la adsorción en una relación que sigue la ecuación de Arrhenius:

$$D_{ap} = D \exp\left(-\frac{2\varepsilon_a}{RT}\right) \quad (1.1)$$

Donde D_{ap} es el coeficiente de difusión aparente, D es el coeficiente de difusión, ε_a es la energía de activación, que representa la barrera energética que se debe vencer para que ocurra la adsorción y RT es el producto entre la constante universal de los gases y temperatura [Ravera, 1993; Eastoe, 2000; Fainerman, 2001].

1.2. Proteínas en la superficie

Cada proteína es diferente, y sus propiedades están determinadas por distintos factores, como la cadena de aminoácidos por la que está formada, su estructura tridimensional, estabilidad conformacional, carga, dimensiones, etc. También el medio en el cual se encuentre la proteína influye sobre su comportamiento y funcionalidad, por lo que es importante la naturaleza del disolvente, el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la presencia de interfases [Magdassi, 1996].

Las proteínas generalmente son anfífilas, ya que están formadas de porciones polares y no polares en su estructura. Es por esto que tienen actividad superficial; sin embargo, ésta depende también de otros factores, como pueden ser:

- El tamaño de la proteína, debido al número de puntos de contacto que pueda tener con la superficie.
- La carga y su distribución en la proteína, debido a las posibles repulsiones o atracciones electrostáticas entre las moléculas adsorbidas o a la carga que pueda tener la superficie donde se adsorben. Es común que exista una mayor adsorción cerca del punto isoeléctrico.
- Su estructura, ya que diferentes proteínas poseen diferentes flexibilidades.
- La cadena polipeptídica, porque varía la naturaleza anfipática de la proteína al haber variaciones en los residuos polares y no polares que la conforman. Se espera que con una mayor hidrofobicidad de la proteína ésta presente mayor actividad superficial [Magdassi, 1991; Magdassi, 1996].

La importancia y posibles aplicaciones que las proteínas tienen relacionadas con interfases son muy variadas en sistemas biológicos, así como en la industria de los alimentos, la industria farmacéutica y la cosmética.

Por ejemplo, la leche es una emulsión que existe de manera natural, compuesta de partículas de grasa rodeadas por caseína, entre otros componentes que estabilizan la emulsión [Magdassi, 1991]. Las lipasas son enzimas que funcionan en interfases lípido-agua en micelas, liposomas, emulsiones, etc., y son importantes en la absorción de grasas durante la digestión de alimentos [Matsumura, 2001].

En la industria de los alimentos algunas proteínas de la leche de vaca, como la β -lactoglobulina, son usadas como ingredientes importantes en la formación y estabilización de espumas y emulsiones. En estos casos, las proteínas se adsorben rápidamente a la interfase formada entre las burbujas de aire y el líquido, o entre las gotas de aceite y agua, evitando que el sistema se desestabilice. Dada su alta actividad superficial, las proteínas se pueden adsorber a una gran variedad de superficies, desde membranas lipídicas en organismos vivos, hasta las tuberías usadas en plantas procesadoras de alimentos [Dickinson, 1999].

Otro ejemplo de la importancia que tienen las proteínas y su actividad superficial en un sistema biológico, es en las lágrimas, en las cuales una tensión superficial baja y una viscosidad no Newtoniana son esenciales para la estabilidad de éstas y para la lubricación adecuada de la superficie ocular. Una de las principales proteínas involucradas en proporcionar estas características, es la lipocalina, que es una de las más abundantes en las lágrimas y se une con gran facilidad a lípidos, lo cual determina la tensión superficial de las lágrimas [Millar, 2006].

En este trabajo se estudió el comportamiento en la interfase líquido/aire de la triosafosfato isomerasa de tres especies. A continuación se proporciona información general de esta proteína.

1.3. Triosafosfato isomerasa

La triosa fosfato isomerasa (número EC 5.3.1.1. en el sistema internacional de clasificación) es una proteína que cataliza la isomerización reversible entre gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), lo cual corresponde al quinto paso en el proceso de glucólisis (figura 1.2) [Stryer, 1988]. Es considerada una enzima muy eficiente, ya que la reacción que cataliza es tan rápida que está controlada por la difusión del sustrato. Debido a esta gran eficiencia, se considera que los dos reactivos se encuentran en equilibrio ($K=[GAP]/[DHAP]=4.73 \times 10^{-2}$); sin embargo, como GAP es consumido en el proceso de glucólisis, se favorece la formación de este producto [Voet, 1995].

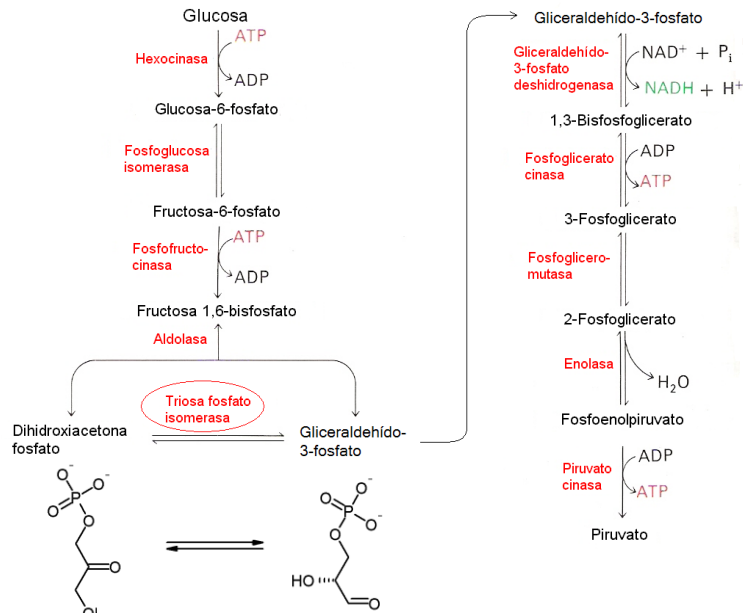


Figura 1.2. La triosafosfato isomerasa participa en el quinto paso de la glucólisis (diagrama tomado de [Stryer, 1988])

La estructura de esta proteína para la mayoría de las especies es un homodímero (excepto para *Pyrococcus woesei* y *Methanothermus fervidus*, que son homotetrámeros), es decir, que está constituida por dos unidades monoméricas iguales compuestas de alrededor de 250 residuos de aminoácidos y con una masa aproximada de 27.4 kDa. Cada monómero tiene su propio sitio activo, y la proteína sólo presenta actividad cuando las dos unidades monoméricas se encuentran unidas, aunque el sitio activo no forma parte de la intercara o zona de contacto entre los monómeros [Chávez-Cárdenas, 2005].

Esta proteína fue la primera en ser descrita con una estructura característica en cada monómero de barril alfa/beta, o barril TIM. Esta estructura se caracteriza por tener intercaladas 8 hélices alfa y 8 hebras beta, que forman una estructura tridimensional de un barril, donde las 8 hebras beta paralelas se localizan dentro de la estructura y están rodeadas por las hélices alfa (figura 1.3) [Petsko, 2004; Maldonado, 1998; Wierenga, 1991]. Hay muchas otras proteínas que contienen este tipo de estructura, como la aldolasa, enolasa y piruvato cinasa, etc. por lo que es un tipo de estructura bastante común entre las proteínas [Voet, 1995].

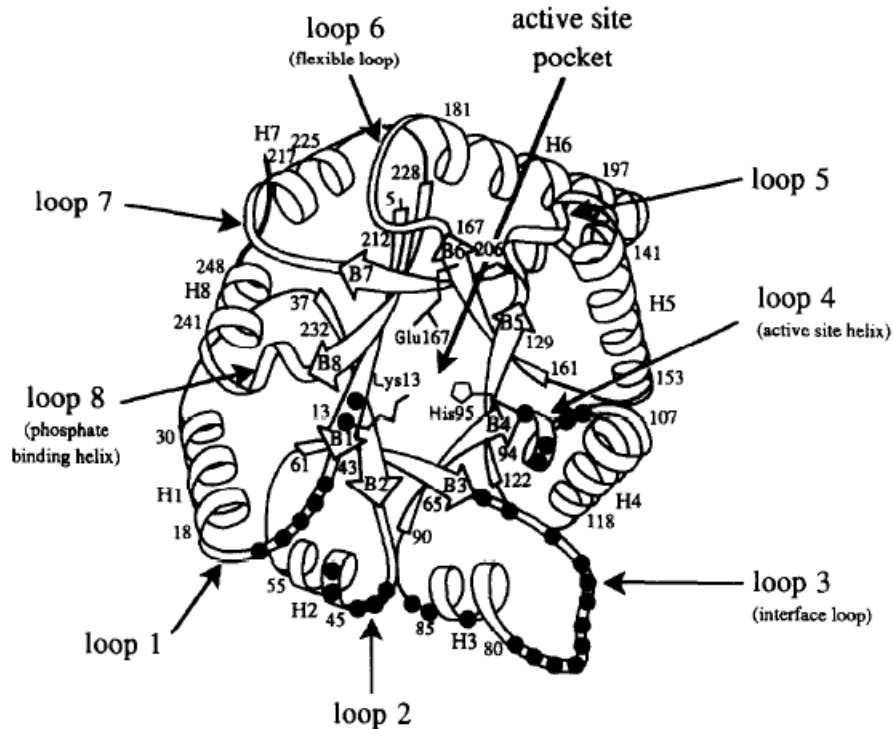


Figura 1.3. Diagrama de una subunidad de la triosafosfato isomerasa donde se ilustra la estructura de barril alfa/beta. Imagen tomada de [Weirenga, 1991].

Aunque se trate de una misma proteína (es decir que cumple una misma función) y tener la misma estructura (barril alfa/beta), para el caso de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), *Trypanosoma brucei* (TbTIM) y *Homo sapiens* (HsTIM) se han encontrado comportamientos diferentes al realizar pruebas por ejemplo de desnaturalización por temperatura [Costas, 2009], o al evaluar su actividad en función de su concentración, como se muestra en la figura 1.4. En este último caso, cuando la proteína está como dímero presenta 100% de actividad, y hay que diluir mucho para poder llegar a obtener monómeros inactivos. Además, HsTIM es la que presenta una interacción más fuerte entre los monómeros en comparación con TbTIM y TcTIM, ya que hay que diluir mucho más para que la enzima se disocie y pierda su actividad.

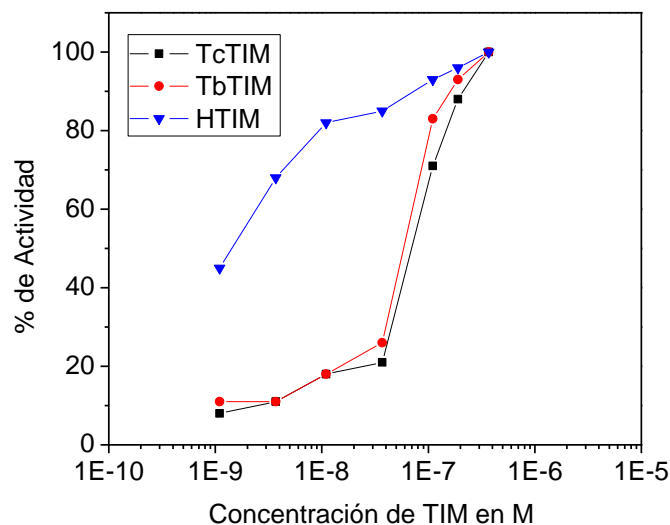


Figura 1.4. Actividad en función de la concentración de TIM de diferentes especies (cortesía del Dr. Armando Gómez Puyou del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM). La actividad fue determinada por métodos ya reportados [Garza-Ramos, 1996].

Entre TbTIM y TcTIM existe una identidad en la secuencia de aminoácidos de 74%, es decir, que coinciden 185 de los 250 residuos que forman la cadena de cada monómero, y del 26% restante, se tienen 30 cambios conservativos. Por otro lado, si comparamos cualquiera de éstas con HsTIM, se tiene una identidad de alrededor de 50% (48% entre TcTIM y HsTIM y 50% entre TbTIM y HsTIM), pero sigue siendo bastante alta, lo cual se puede observar en la alineación de la secuencia de aminoácidos mostrada en las figuras 1.5 y 1.6 [Chávez-Cárdenas, 2005].

Entre otras cosas, se ha encontrado que TcTIM y TbTIM tienen un patrón de plegamiento similar, con presencia de intermediarios, al desnaturalizar y renaturalizarse con cloruro de guanidinio, mientras que en el caso de la urea, la HsTIM sigue un proceso de dos estados en su replegamiento [Mainfroid, 1996; Vázquez-Contreras, 2004].

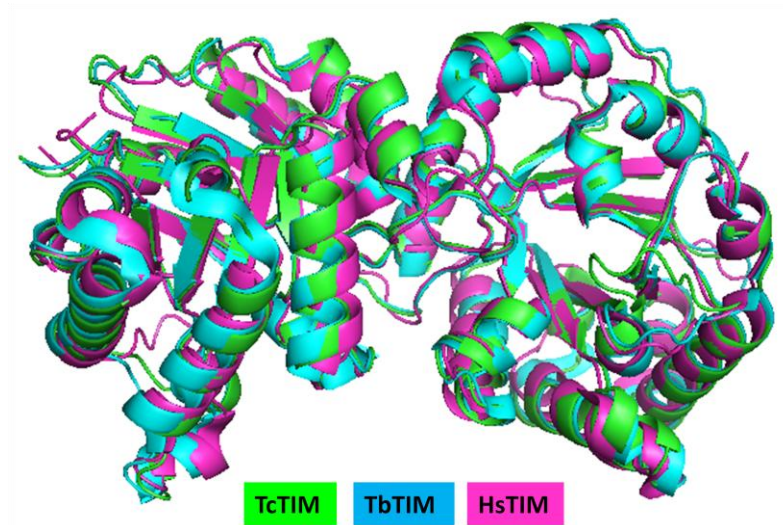


Figura 1.5. Sobreposición de las estructuras tridimensionales de TcTIM, TbTIM y HsTIM

TcTIM	---SKPQPIAAANWKCNGSESLLVPLIE TLNAA TFD HDVQC VV APTFLHI
TbTIM	--M SKPQPIAAANWKCNGS QOSLSELIDLFNSTSI NDVQC VVAS TFVHL
HsTIM	GSAPSRKFFVGGNWKMN GRKQSLGELICTLNAA KVPADTEV VCAPPTAYI
	.. : .. : *** ** : . * ** : * : : .. * : * * .. : :
TcTIM	P MTKAR LT NPKE QIAAQN AITRSGAFTGEVSLQILKDY GISW VVLGH SER
TbTIM	A MTKER LS HPKE VIAAQN AIAKSGAFTGEVSLPILKDF GVN WIVLGH SER
HsTIM	D FARQK LD PKIAVAAQ NCY KVTNGAFTGEISP GM IKDCGATWVVLGH SER
	:: : :* * : . . *****:* : ** * . : *****
TcTIM	R LYYGETNEIVA EKVAQ CAAGFHVIVCVGETNEERE AG R TA AVVLTQ LA
TbTIM	R AYYGETNEIVA DKVAA VASGF M VIACIGETIQERE SG R TA VVLTQ IA
HsTIM	R HVFGESDELIGQKVAH AL AEGLGVIACIGEKLDERE AG I TEK VVFEQ TK
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
TcTIM	A V AQ KL SK EAW SR VV IAYEPV WAIGTGK VAT PQQAQ EV HELLRR W VRSKL
TbTIM	A I AK KLK AD WAK V V IAYEPV WAIGTGK VAT PQQAQ EA HALIR SW VSSKI
HsTIM	V I AD NVK--D SK VV LAYEPV WAIGTGK TAT PQQAQ EV HEKLRG WL KSNV
	.. * : : . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
TcTIM	G T D I AAQ L R I LYGGS V TAKNARTLYQMR D ING FLVGGAS LKPEF VE IIEA
TbTIM	G AD VAGEL R I LYGGS VNGKNARTLYQQR D VNG FLVGGAS LKPEF VD IIEA
HsTIM	SD A V AQ STR I I YGGSV T GATCKELASQ P D VD G FLVGGAS LKPEF VD IINA
	. : * . * : * : * : * : . . . : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
TcTIM	TK
TbTIM	IQ
HsTIM	KQ
	.. :

Figura 1.6. Alineación de la secuencia de aminoácidos de TcTIM, TbTIM y HsTIM. Marcados en azul los residuos que coinciden en dos de las tres proteínas y en gris aquellos que coinciden para las tres. Esta alineación de la secuencia se obtuvo utilizando la herramienta de alineación Clustal W2.

2. Objetivos

Objetivo General

Caracterizar la cinética de adsorción a la interfase líquido/aire de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), *Trypanosoma brucei* (TbTIM) y *Homo sapiens* (HsTIM).

Objetivos particulares

- Medir la adsorción de TcTIM, TbTIM y HsTIM en la interfase líquido/aire utilizando el método de gota pendiente.
- Observar si hay cambio en la tensión superficial dinámica de las proteínas en ausencia y presencia del desnaturizante químico urea en diferentes concentraciones.
- Ajustar los resultados experimentales a un modelo que caracterice a los procesos de difusión y adsorción de las tres proteínas en la interfase líquido/aire.
- Evaluar qué factores pueden ser los causantes de las diferencias en el comportamiento superficial de la proteína para las tres especies.

3. Materiales y métodos

3.1. Preparación de disoluciones de triosa fosfato isomerasa

La expresión y purificación de las triosafosfato isomerasas se llevó a cabo de acuerdo con métodos ya reportados [Borchert, 1993; Ostoa, 1997]. Estas proteínas fueron donadas por el Dr. Armando Gomez Puyou, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Para preparar las diluciones, se partió de una solución concentrada de la proteína, la cual se encontraba en una solución amortiguadora de trietanolamina (TEA) 100 mM y ácido etilendiamintetraacético (EDTA) 10 mM con un pH de 7.4. Se tomaron alícuotas y se diluyeron en la misma solución amortiguadora para llegar a las concentraciones de 0.01, 0.1 y 0.4 mg/mL (3.65×10^{-7} , 3.65×10^{-6} y 1.46×10^{-5} M, respectivamente). El agua que se utilizó para la solución amortiguadora fue destilada y desionizada, y tenía una resistividad de 18 m Ω .

Para el caso de las mediciones en presencia de urea, primero se preparó una disolución de urea de concentración aproximadamente 8 M en el amortiguador de TEA. Posteriormente esta solución se hizo pasar por una columna con resina de intercambio iónico (tanto aniónico como catiónico) *Bio-Rad AG 501-X8 (D)* para eliminar impurezas y se determinó la concentración final de urea midiendo el índice de refracción, y empleando la relación:

$$C = 117.66*(n_{\text{muestra}}-n_{\text{buffer}}) + 29.753*(n_{\text{muestra}}-n_{\text{buffer}})^2 + 185.56*(n_{\text{muestra}}-n_{\text{buffer}})^3$$

Donde n_{muestra} representa el índice de refracción de la disolución con urea, determinado con el refractómetro, y n_{buffer} representa el índice de refracción del amortiguador [Urea calculator]. El índice de refracción se midió a temperatura ambiente con un refractómetro de Abbe, marca Carl Zeiss, modelo A.

Finalmente se tomaron alícuotas de la disolución de proteína y de la disolución de urea para hacer las diluciones con las concentraciones finales deseadas de proteína y urea. Éstas se dejaron incubar media hora a temperatura ambiente antes de iniciar las mediciones de tensión superficial.

En los casos en que se empleó urea con concentraciones mayores o iguales a 7 M, se siguió el mismo procedimiento, presentándose el problema de que la concentración de urea disminuía después de filtrarla a valores menores de los esperados. Es por esto que después de filtrar y determinar concentración de urea, se agregó la cantidad de urea faltante necesaria para llegar a la concentración deseada, y nuevamente se comprobó su concentración midiendo el índice de refracción. En estos casos, para asegurar la desnaturalización total de la proteína se dejó en incubación por un día.

3.2. Tensión superficial dinámica

Para la determinación de la tensión superficial, se utilizó la técnica de gota pendiente, la cual consiste en suspender una gota del líquido de interés en la punta de un capilar. Con una cámara acoplada al equipo se toma una foto del perfil de la gota formada (figura 3.1). Este perfil está determinado por dos fuerzas: por un lado la fuerza de gravedad, que jala la gota hacia abajo; y por otro lado la tensión superficial, que trata de darle una forma esférica a la gota para disminuir su superficie. El cambio en la curvatura de la gota es una medida del equilibrio entre estas dos fuerzas, el cual se puede describir por la ecuación de

Young-Laplace para casos no esféricos en un campo gravitatorio (ecuación 3.1) [manual Dataphysics; Adamson, 1997; Viades-Trejo, 2007].

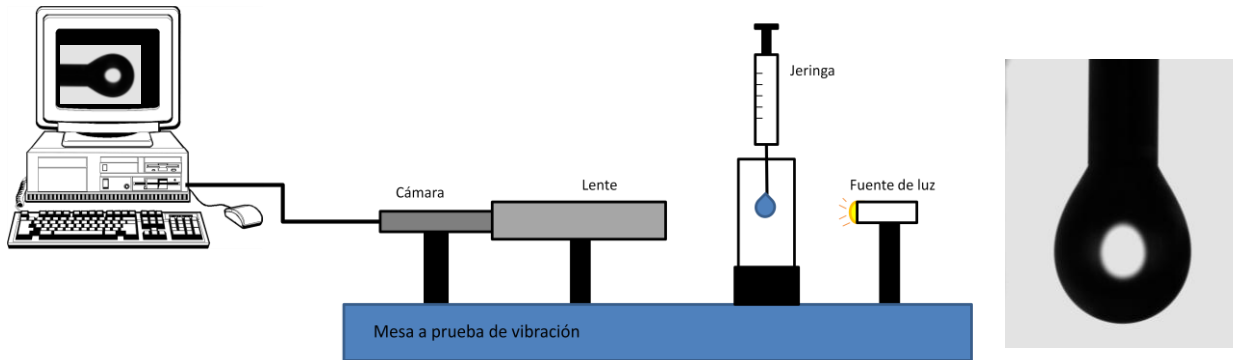


Figura 3.1. Diagrama del tensiómetro de gota pendiente utilizado y perfil de una gota como se observa en el equipo.

La ecuación de Young-Laplace relaciona la tensión superficial con la curvatura y la diferencia de presiones entre dos fases fluidas. Para una superficie no esférica en presencia de un campo externo como la gravedad, esta relación está dada por:

$$\Delta P = \sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \frac{2\sigma}{R_0} + \Delta \rho g z \quad (3.1)$$

Donde ΔP es la diferencia de presiones, σ la tensión superficial, R_1 y R_2 son los radios máximos de curvatura requeridos para describir una superficie no esférica, R_0 es el radio de curvatura de una esfera en el ápice, $\Delta \rho$ es la diferencia de densidades entre las dos fases fluidas ($\rho_{\text{agua}} = 0.9982 \text{ g/cm}^3$, $\rho_{\text{aire}} = 0.00129 \text{ g/cm}^3$), g es la aceleración de la gravedad, y z es la altura medida desde el plano de referencia (figura 3.2).

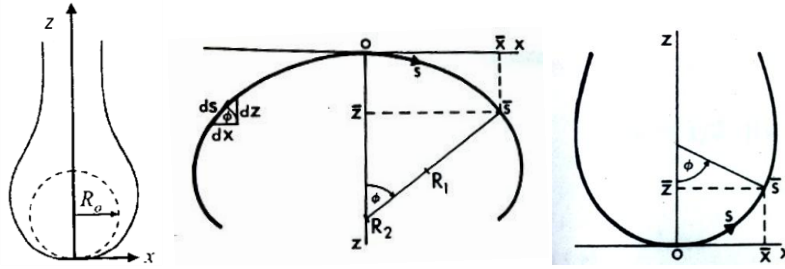


Figura 3.2. Diagrama del perfil de una gota.

Esta ecuación se puede representar como un sistema de ecuaciones diferenciales de primer orden usando como referencia la figura 3.2:

$$\frac{dX}{dS} = \cos \phi \quad (3.2)$$

$$\frac{dZ}{dS} = \sin \phi \quad (3.3)$$

$$\frac{d\phi}{ds} = 2 + \beta z - \frac{\sin \phi}{x} \quad (3.4)$$

Donde $\beta = \frac{\Delta\rho g R_0^2}{\sigma}$, y las coordenadas s , x y z están normalizadas: $S=s/R_0$, $X=s/R_0$, $Z=z/R_0$.

El perfil completo de la gota se puede definir por integración simultánea de este conjunto de ecuaciones (3.2, 3.3 y 3.4) y las condiciones a la frontera $x(0) = z(0) = \phi(0)$ [Rotenberg, 1983; Touhami, 1996; Viades-Trejo, 2007]. Esta determinación la realiza el software del equipo de manera automática.

Para llevar a cabo las mediciones de tensión superficial, se lavaron la jeringa y su punta varias veces con etanol y con agua destilada y desionizada; posteriormente se enjuagó con la disolución amortiguadora y finalmente se llenó con la solución de proteína por medir. Una vez colocada la jeringa con la disolución en el tensiómetro, se dejó dentro del compartimento por aproximadamente 20 minutos hasta que se alcanzó el equilibrio

térmico (20° C). Se desecharon las primeras 2 o 3 gotas y al suspender la gota con la que se iba a trabajar, se inició la medición.

El volumen de la gota en todos los casos, fue de aproximadamente 20 μ L. Se tomaron 2.5 fotos por segundo durante los primeros 5 minutos y una foto por minuto el tiempo restante. Todas las mediciones se realizaron al menos por duplicado, a una temperatura de 20°C, y duraron aproximadamente 3 horas. No fue posible dejar la gota suspendida por más tiempo debido a que se presenta evaporación de la misma.

3.3. Fluorescencia

Para evaluar el grado de desplegamiento de la proteína por la presencia de urea, se realizaron mediciones de fluorescencia después de 0.5, 24 y 48 horas de haber preparado las disoluciones. Esta técnica se puede usar para ver el desplegamiento de las proteínas debido a la fluorescencia intrínseca que tienen los grupos aromáticos de algunos residuos de aminoácidos. De hecho, los residuos de triptofano son muy sensibles a cambios estructurales de la proteína, y aunque los cambios se producen de forma local, se toman como indicadores de pérdida de estructura global de la proteína [Shirley, 1995].

Para llevar a cabo estas mediciones, se prepararon disoluciones de proteína a 50 μ g/mL con concentraciones de urea entre 0 y 8 M. Se utilizó un fluorómetro Shimadzu modelo DR-15; la longitud de onda aplicada para la excitación fue de 280 nm, y la medición de la intensidad de emisión se hizo entre los 300 y 450 nm. Se dejaron incubar las muestras media hora antes de hacer la primera medición. Posteriormente, se volvió a medir la fluorescencia después de 24 y 48 horas.

Tratamiento de datos

4.1. Cálculo del coeficiente de difusión

Para poder evaluar si el proceso de adsorción está sólo controlado por difusión se decidió estimar el coeficiente de difusión a distintas concentraciones de proteína a partir de los datos obtenidos. Para esto, primero fue necesario calcular la presión en la superficie (Π , ver figura 4.1), la cual está determinada por la diferencia en la tensión superficial del disolvente puro (σ_0) y de la disolución con proteína (σ):

$$\Pi(t) = \sigma_0 - \sigma(t) \quad (4.1)$$

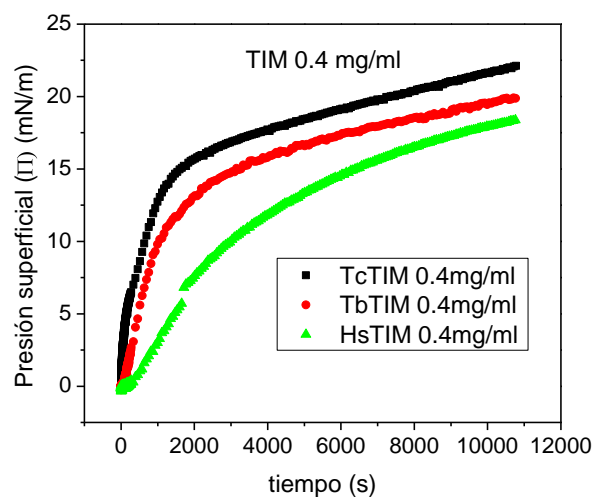


Figura 4.1. Ejemplo de presión superficial (Π) de TcTIM, TbTIM y HsTIM 0.4mg/ml en función del tiempo.

En este trabajo, σ_0 se determinó a partir del promedio de los valores obtenidos de tensión superficial dinámica de la disolución amortiguadora sin proteína y de ésta con urea, ya que en ausencia de proteína, la tensión no varía respecto al tiempo, como se observa en el ejemplo de la figura 4.2.

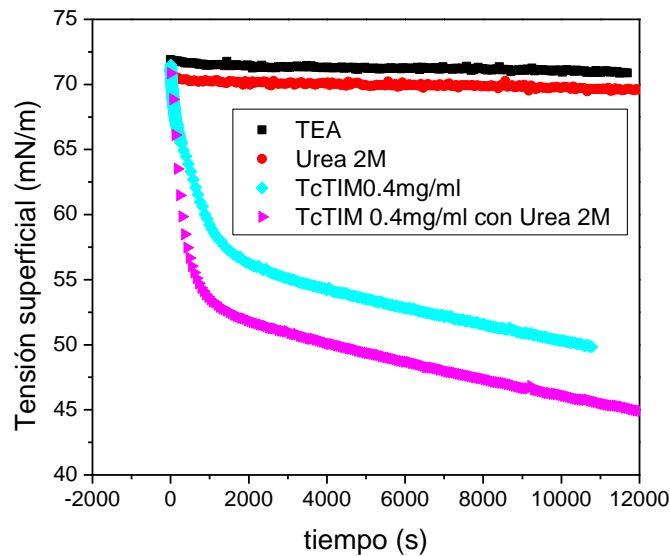


Figura 4.2. Ejemplo de tensión superficial dinámica (σ) de solución amortiguadora de TEA, solución amortiguadora con urea 2M y de TcTIM 0.4mg/ml en solución amortiguadora y con urea 2M.

Posteriormente, con la ecuación de estado relacionada con la ecuación de adsorción de Gibbs, considerando la ley de Henry (en la cual no se contemplan interacciones entre las moléculas), se calculó la concentración superficial en la gota (Γ , mg de proteína/m²), [Adamson, 1997; Joos, 1999; Eastoe, 2000] utilizando la ecuación análoga a la del gas ideal:

$$\Gamma(t) = \frac{\Pi}{RT} \quad (4.2)$$

Finalmente, el coeficiente de difusión se determinó a partir de la relación de Ward-Tordai tomando la simplificación para tiempos cortos, donde se asume que el proceso está

controlado por difusión. Esta ecuación fue propuesta por Ward y Tordai en 1946, en la cual se considera la difusión de las partículas del seno de la disolución a la superficie y de la superficie al seno de la disolución cuando la superficie se empieza a saturar. En este modelo, se plantea que al inicio, cuando se acaba de formar la superficie, ésta se encuentra vacía de tensoactivo. Entonces es más probable que se adsorban todas las partículas que llegan a la interfase debido a que hay un gran número de sitios vacíos. Conforme se va saturando la interfase, va decreciendo la probabilidad de que las partículas encuentren un sitio vacío, por lo cual se debe considerar la difusión de estas partículas que se encuentran en la superficie hacia el seno de la disolución. Conociendo la concentración en la sub-superficie, se pueden aplicar las ecuaciones de difusión de Fick, con lo cual se obtuvo la ecuación, conocida como la ecuación de Ward y Tordai [Eastoe, 1996; Ward, 1946]:

$$\Gamma(t) = 2C_0\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} - 2\sqrt{\frac{D}{\pi}} \int_0^{\sqrt{t}} C_s d(\sqrt{t-\theta}) \quad (4.3)$$

Donde D es el coeficiente de difusión, y C_0 y C_s se refieren a la concentración en el bulto y en la sub-superficie respectivamente y θ es una constante de la integral. Esta integral no puede ser resuelta como tal, pero sí se han obtenido resoluciones numéricas. A tiempos cortos ($t \rightarrow 0$), se puede considerar que sólo existe difusión del seno del líquido hacia la superficie, por lo cual se puede eliminar el segundo término de la ecuación, quedando:

$$\Gamma(t) = 2C_0\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad (4.4)$$

De acuerdo con la ecuación 4.4, al graficar los valores de concentración en la superficie (Γ) en función de la raíz del tiempo debe observarse una tendencia lineal (para periodos

cortos de tiempo). Así, puede hacerse un ajuste lineal para determinar el coeficiente de difusión, como se ejemplifica en la figura 4.3 [Eastoe, 1996; Ward, 1946].

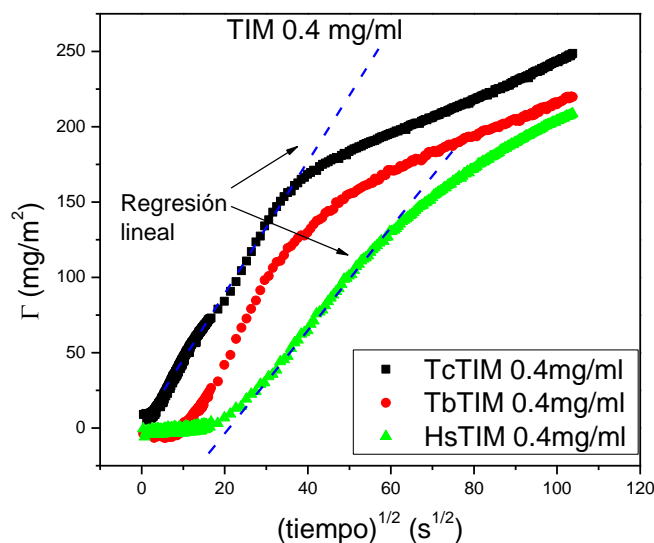


Figura 4.3. Ejemplo de concentración superficial (Γ) de TcTIM, TbTIM y HsTIM 0.4 mg/ml en función de la raíz del tiempo.

4.2. Ajuste de los datos de tensión superficial dinámica a un modelo de adsorción-reorientación en la superficie

Este modelo ha sido propuesto por autores como Serrien y Joos [Serrien, 1992; Joos, 1999], y considera que en la adsorción de la proteína a la superficie hay un proceso controlado por difusión, y que una vez adsorbida la proteína, ocurre una reorientación o modificación estructural de las moléculas en la superficie (Figura 4.4).

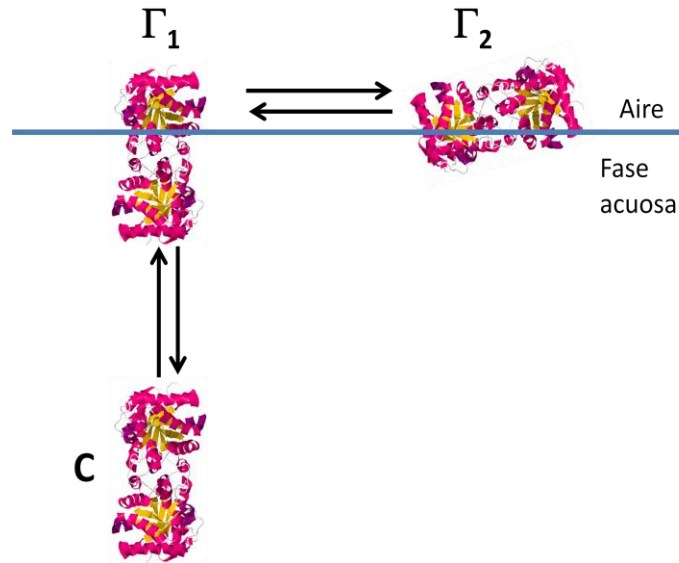


Figura 4.4. Modelo de difusión, adsorción y reorientación en la superficie. C representa la concentración de la proteína en el seno de la disolución, Γ_1 representa la proteína adsorbida a la interfase en su estado nativo, y Γ_2 representa la proteína adsorbida tras haber sufrido un cambio conformacional.

En el caso de proteínas homodiméricas, como las TIMs, es importante considerar que la conformación Γ_2 puede representar a la proteína en varios estados: desnaturalizada como monómero o como dímero, disociada en monómeros (modificaciones estructurales severas), o mantenerse como dímero sin presentar un cambio estructural tan severo. Esto se puede ver con mayor claridad en la representación de la figura 4.5.

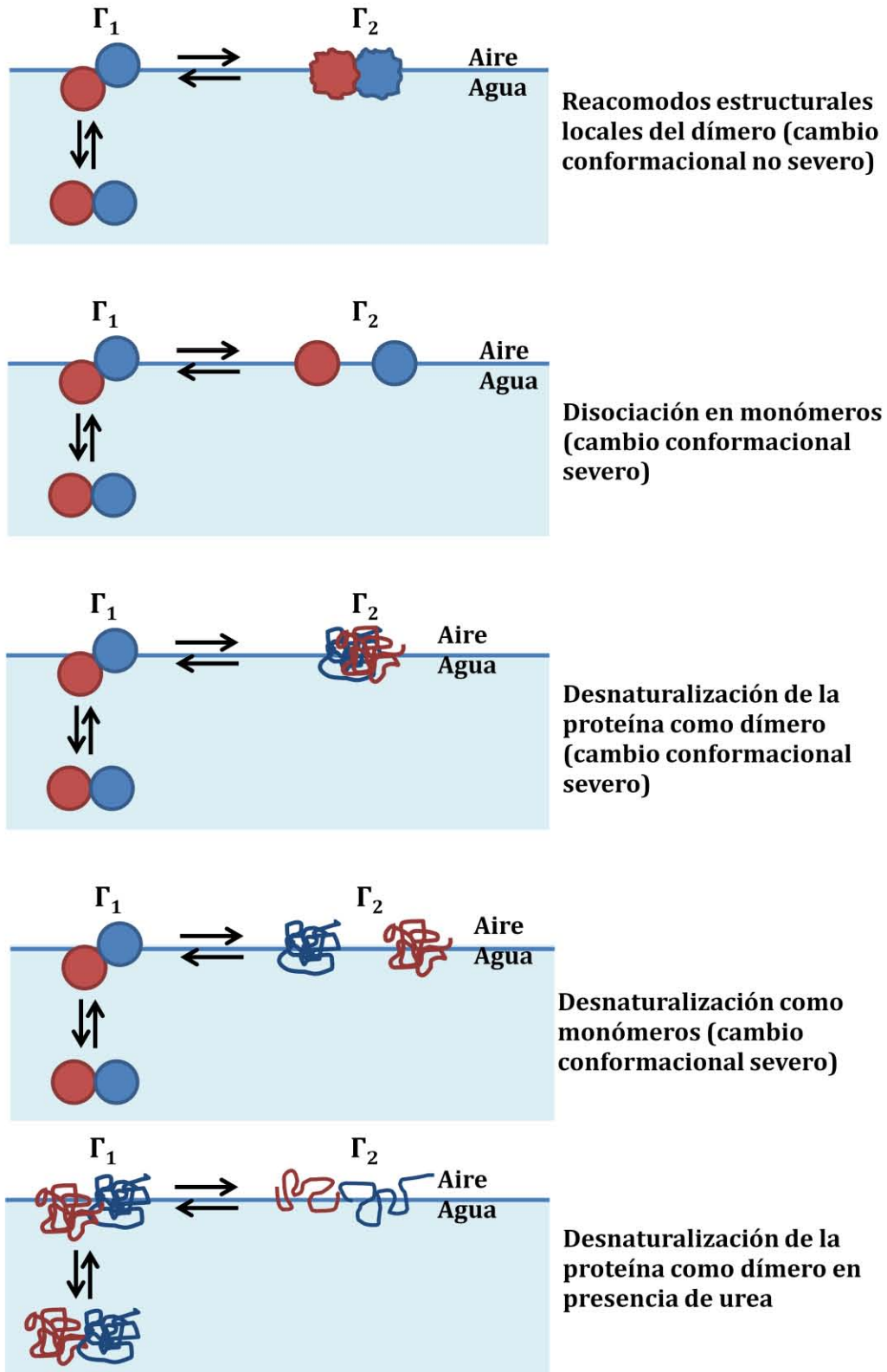


Figura 4.5. Representación gráfica de posibles cambios conformacionales de la proteína en la interfase agua/aire.

En este modelo de adsorción-reorientación propuesto por Serrien [Serrien, 1992], la tensión dinámica está dada por:

$$\sigma(t) = \sigma_{eq} + \left[\alpha \exp\left(-\sqrt{4t/\pi\tau}\right) + \beta \right] \exp(-kt) \quad (4.5)$$

donde se ha supuesto una cinética de primer orden (con constante cinética k) para el proceso de reorientación entre los estados Γ_1 (conformación nativa de la proteína) y Γ_2 (conformación distinta a la nativa de la proteína adsorbida) (figuras 4.4 y 4.5). El parámetro τ es el tiempo de relajación de difusión. La figura 4.6 muestra un ejemplo del ajuste de la ecuación 4.5 a uno de los conjuntos de datos de este trabajo.

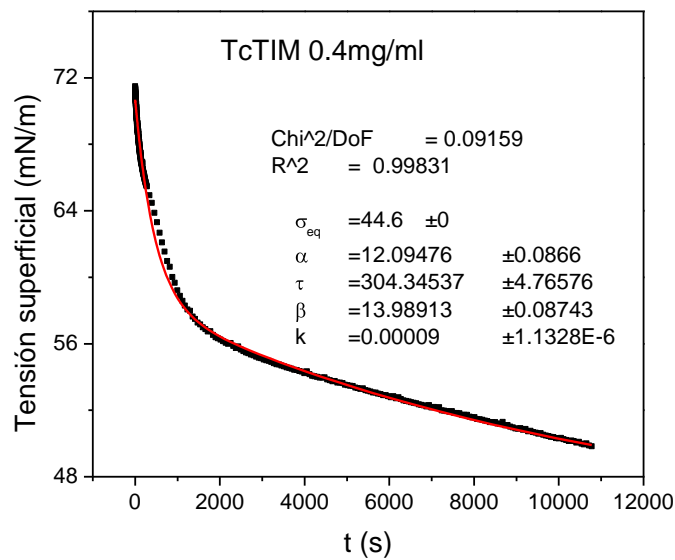


Figura 4.6. Ejemplo de un ajuste, donde los cuadros negros representan los datos experimentales y la línea continua el ajuste a la ecuación 4.5.

En la ecuación 4.5, dadas las condiciones a la frontera ($\sigma_{t \rightarrow 0} = \sigma_0$ y $\sigma_{t \rightarrow \infty} = \sigma_{eq}$), se cumple que $\alpha + \beta = \sigma_0 - \sigma_{eq}$. El descenso total en la tensión ($\sigma_0 - \sigma_{eq}$), tiene dos contribuciones: una parte α , que describe la difusión, y β , que describe el cambio estructural de la partícula adsorbida [Van der Vegt, 1996; Joos, 1999]. Reescribiendo la

ecuación 4.5, se observa que la tensión es la suma resultante de tres componentes (figura 4.7):

$$\sigma(t) = \sigma_{eq} + \left[\alpha \exp\left(-\sqrt{\frac{4t}{\pi\tau}}\right) \exp(-kt) \right] + \beta \exp(-kt) \quad (4.6)$$

El primer término (σ_{eq}) es la tensión superficial al equilibrio; el segundo término,

$$\alpha \exp\left(-\sqrt{\frac{4t}{\pi\tau}}\right) \exp(-kt) \quad (4.7)$$

corresponde a difusión seguida de reorientación en tiempos cortos y

$$\beta \exp(-kt) \quad (4.8)$$

corresponde a la reorientación en la superficie (figura 4.7). Si el proceso es controlado únicamente por difusión, $\beta = 0$ y $k = 0$, y, por lo tanto, $S(t) = S_{eq} + a \exp\left(-\sqrt{\frac{4t}{\pi\tau}}\right)$.

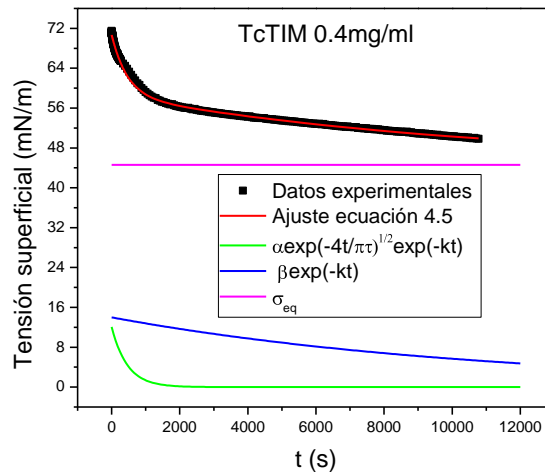


Figura 4.7. Ejemplo de la tensión dinámica $\sigma(t)$, para TcTIM 0.4 mg/ml y sus contribuciones. El ajuste a los datos de $\sigma(t)$ se muestra en rojo, que es resultado de la suma de las líneas verde, azul y rosa.

Para facilitar la discusión de los resultados de este trabajo (en la sección 5), es interesante mostrar el efecto que tienen cada uno de los parámetros del modelo sobre $\sigma(t)$. Esto se ilustra utilizando el ajuste de $\sigma(t)$ para TcTIM 0.4 mg/ml en la figura 4.8.

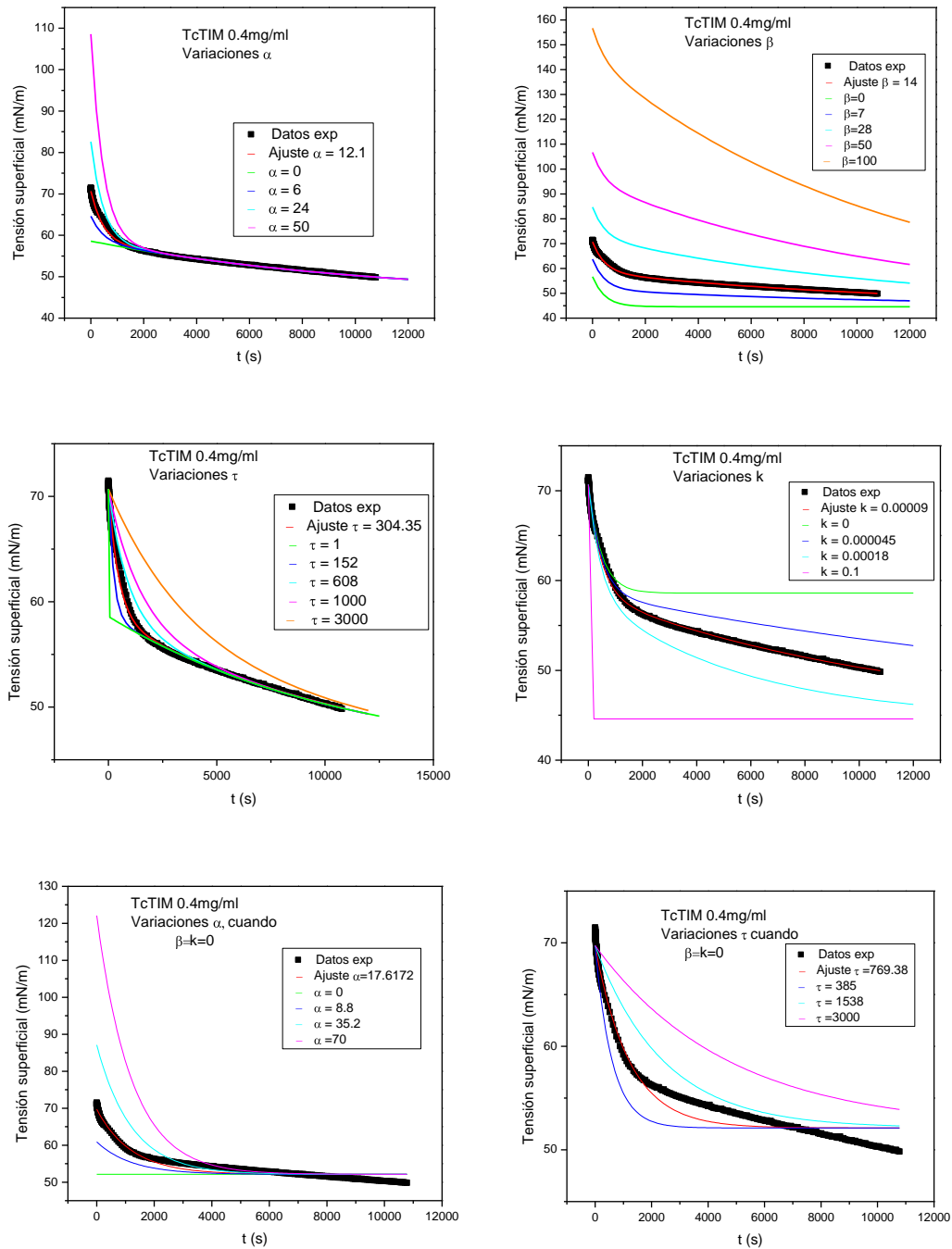


Figura 4.8. Gráficas resultantes de variar cada parámetro del ajuste. Los parámetros utilizados fueron $\sigma_{eq}=44.60$ mN/m, $\alpha = 12.1$ mN/m, $\beta = 14$ mN/m, $\tau = 304.35$ s, k (s^{-1}) = $9 \times 10^{-5} s^{-1}$.

La figura 4.8 muestra que el parámetro α describe la caída de tensión a tiempos cortos; mientras más grande es este valor, la disminución de tensión es más marcada. El

parámetro β , cambia las pendientes de las curvas ($d\sigma/dt$), y al ir aumentando, las curvas se van desplazando hacia valores mayores de tensión. El parámetro τ describe la caída de tensión superficial a tiempos cortos y largos, pero no afecta los valores iniciales ni finales de tensión, sino que solo hace que el cambio de pendientes sea menos drástico al ir aumentando sus valores. Finalmente, k , describe la caída de tensión superficial a tiempos largos (donde ocurre la reorientación).

4.3. Fluorescencia

Como se menciona en la sección 3.3, se realizaron mediciones de la intensidad de emisión de la proteína en longitudes de onda entre los 300 y 450 nm. En la figura 4.9, se muestra un ejemplo de los espectros de fluorescencia con diferentes concentraciones de urea antes de hacer el tratamiento de datos.

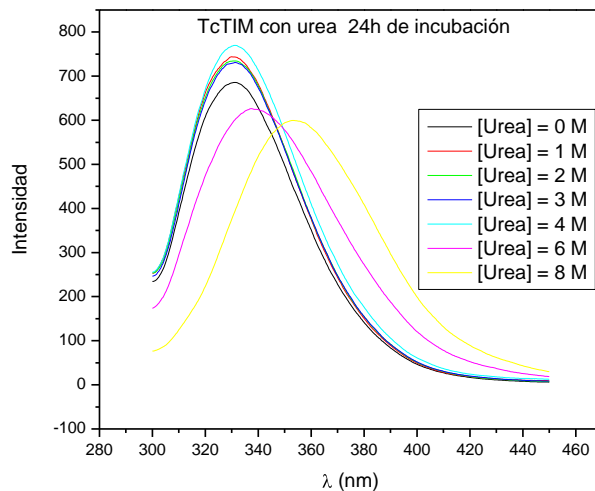


Figura 4.9. Ejemplo de espectro de fluorescencia. TcTIM tras incubación 24 h en urea con concentraciones entre 0 y 8 M.

La fracción desplegada (f_d) se determinó por medio de la ecuación: $f_d = \frac{Y - Y_N}{Y_D - Y_N}$, donde

Y se refiere a la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión, y los subíndices D y N se refieren a la proteína desplegada y en su estado nativo respectivamente. Finalmente, se realizaron las gráficas de la fracción desplegada en función de la concentración de urea (ver figura 4.10).

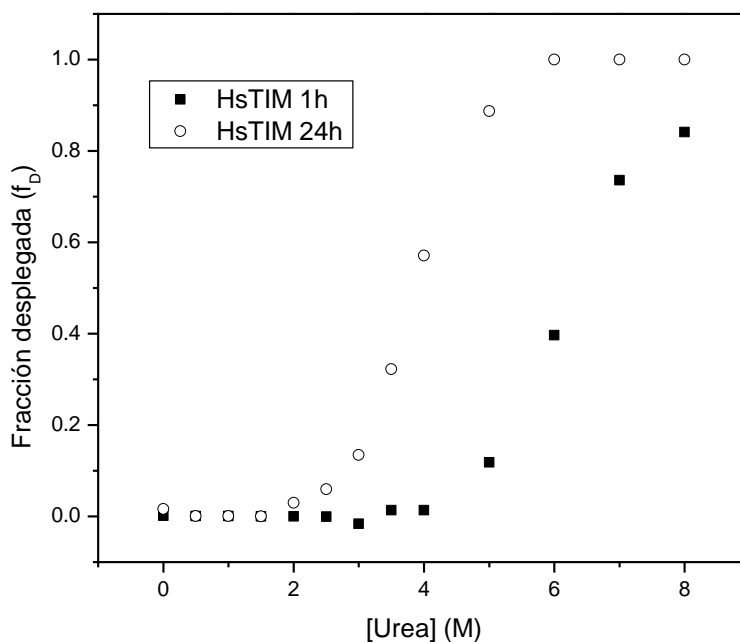


Figura 4.10. Ejemplo la fracción desplegada (f_d) de HsTIM en función de la concentración de urea.

5. Resultados y discusión

5.1. Tensión superficial dinámica

5.1.1. Triosafosfato isomerasas

Se realizaron mediciones de tensión superficial dinámica de la triosafosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), *Trypanosoma brucei* (TbTIM) y *Homo sapiens* (HsTIM) en disolución con concentraciones de 0.01, 0.1 y 0.4 mg/ml (3.65×10^{-7} , 3.65×10^{-6} y 1.46×10^{-5} M) a una temperatura de 20°C. Los resultados se muestran en la figura 5.1. También se midió la disolución amortiguadora sin proteína para verificar que sus componentes (TEA, EDTA) no reducen por sí mismos la tensión superficial de la gota. Esto se puede observar en la figura 5.1, donde los símbolos negros representan los datos experimentales de tensión superficial dinámica obtenidos para el amortiguador sin proteína. La tensión superficial promedio de las disoluciones de amortiguador (sin proteína) se muestra en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Tensión superficial promedio de la disolución amortiguadora (TEA 100 mM y EDTA 10 mM) sin TIM.

Concentración de urea (M)	σ (mN/m)
0	71.95
2	69.88
5	68.67
7	65.08

La figura 5.1 muestra que para una misma especie, la tensión superficial disminuye más al aumentar la concentración de proteína. Así, el cambio en la tensión es mucho mayor a una concentración de 0.4 mg/ml que a 0.1 mg/ml y ésta a su vez disminuye más la tensión en comparación con la concentración de 0.01 mg/ml.

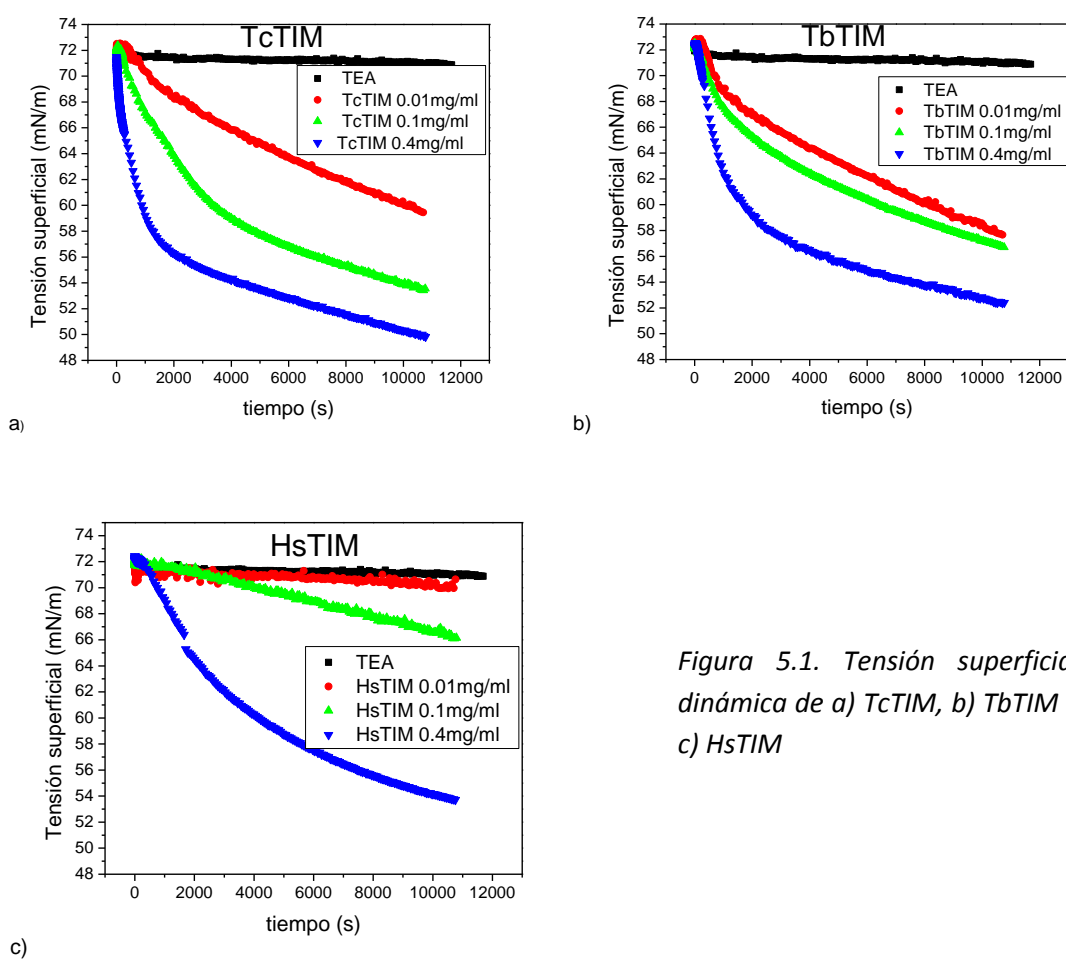


Figura 5.1. Tensión superficial dinámica de a) TcTIM, b) TbTIM y c) HsTIM

Por otro lado, al comparar para una misma concentración a las tres proteínas, como se muestra en la figura 5.2, se observa que a las concentraciones de 0.1 y 0.4 mg/ml, la tensión superficial disminuye más para TcTIM que para TbTIM, mientras que para HsTIM el decremento en la tensión superficial es menor. Para el caso en que la concentración de proteína es de 0.01 mg/ml la tensión decrece muy poco para la proteína de HsTIM, indicando que no hay una adsorción considerable en la superficie de la gota. A esta misma concentración, la tensión baja ligeramente más para TbTIM que para TcTIM, pero la diferencia entre estas dos es muy pequeña (aproximadamente 2 mN/m). Los datos en la figura 5.2 indican claramente que TcTIM y TbTIM tienen una mayor afinidad por la superficie.

Como puede observarse en las figuras 5.1 y 5.2, las gotas se dejaron colgando por tres horas (10 800 segundos) y después de este periodo de tiempo, la tensión continúa disminuyendo. No fue posible medir por periodos más largos debido a que había evaporación (pérdida de más del 10% del volumen total de la gota). Esto indica que el proceso de adsorción de las proteínas a la superficie es muy lento y no llega a un equilibrio verdadero en el intervalo de tiempo medido (3 horas). En la literatura se ha establecido que puede considerarse que el sistema ha llegado al equilibrio cuando el valor absoluto de la pendiente $|\frac{d\sigma}{dt}| \leq 2 \times 10^{-4}$ mN/m·s a tiempos largos [Fainerman, 2010]. Los valores de $\frac{d\sigma}{dt}$ para las tres TIMs se muestran en la Tabla 5.2. Como puede observarse en esta tabla, los sistemas estudiados en este trabajo no cumplen con el criterio mencionado (excepto para HsTIM a 0.01 mg/ml).

5. Resultados y discusión

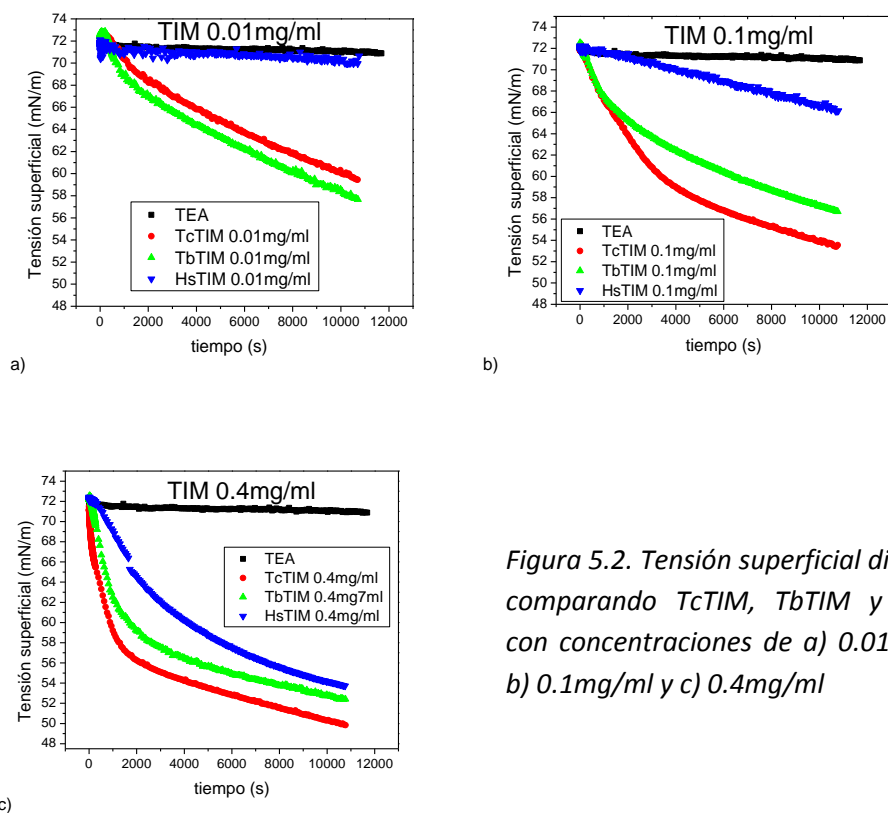


Figura 5.2. Tensión superficial dinámica comparando TcTIM, TbTIM y HsTIM con concentraciones de a) 0.01mg/ml, b) 0.1mg/ml y c) 0.4mg/ml

Tabla 5.2. Valores calculados de $|d\sigma/dt|$ para los últimos 15 minutos de las mediciones de tensión superficial de TIM.

Proteína	Concentración (mg/ml)	$ d\sigma/dt $ (mN/m·s)
TcTIM	0.01	8.47×10^{-4}
	0.1	6.17×10^{-4}
	0.4	6.02×10^{-4}
TbTIM	0.01	8.71×10^{-4}
	0.1	6.77×10^{-4}
	0.4	5.05×10^{-4}
HsTIM	0.01	1.60×10^{-4}
	0.1	5.93×10^{-4}
	0.4	6.13×10^{-4}

5.1.2. Triosafosfato isomerasas en presencia de urea

La urea en bajas concentraciones decrece la temperatura media de la transición (T_m) del estado nativo al desnaturalizado [Costas, 2009]. Se piensa que a estas concentraciones de urea, ésta aumenta la flexibilidad de la proteína, sin llegar a desnaturalizarla, mientras que a altas concentraciones, la desnaturaliza. Así, midiendo la tensión superficial en presencia de urea, podemos acercarnos a conocer el efecto que tienen sobre el comportamiento en la superficie alteraciones ligeras y severas a la estructura.

5.1.2.1. Determinación por fluorescencia de la fracción desplegada de Triosafosfato isomerasa

La fracción desplegada de las proteínas se muestra en la figura 5.3 (calculada como se indicó en la sección 4.3). Se puede observar que para todos los casos, hay una diferencia en el grado de desplegamiento de la proteína fresca y tras incubarla un día con urea, pero ya no hay mayor cambio en su desplegamiento después de 2 días. Con una concentración de urea 2 M, para las tres especies, la proteína se encuentra en su estado nativo, sin importar el tiempo que se haya dejado en incubación. Por otro lado, a 5 M de urea, es una fracción muy pequeña la que se desnaturaliza el mismo día de la preparación, y tras incubarla por 24 horas, hay un desplegamiento mayor, pero sigue siendo menos de la mitad en el caso de TbTIM y TcTIM; sin embargo, hay un mayor desplegamiento en la proteína de humano (alrededor de 90%). De igual manera, tras incubarla 24 horas con urea con concentraciones de 7 M, la proteína para TcTIM y HsTIM tiene más de un 90% de desplegamiento, y en el caso de TbTIM esto sucede cuando la concentración de urea es 8 M. Es por esto que también se hicieron mediciones de tensión superficial bajo estas condiciones (incubación por 24 horas en urea con concentraciones mayores a 7 M).

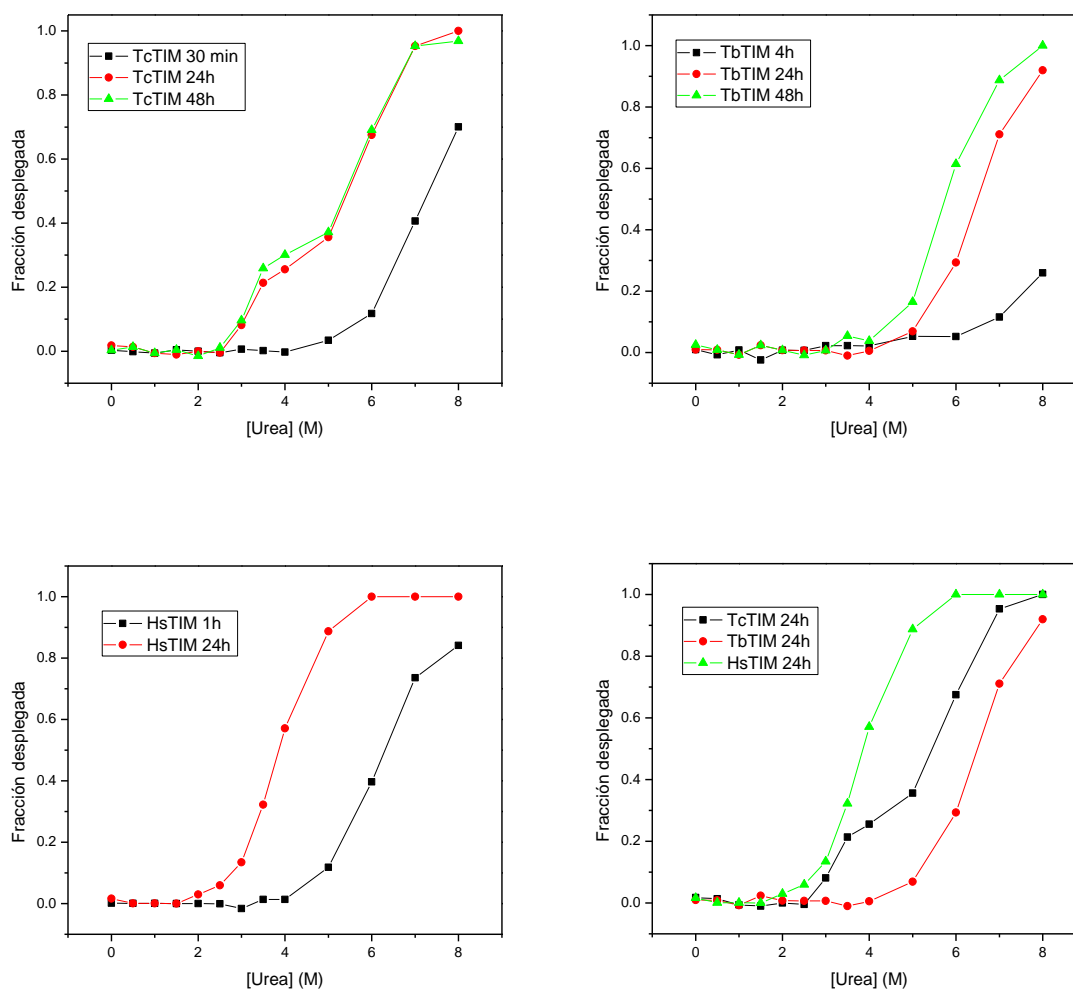


Figura 5.3. Fracción desplegada de las proteínas determinada por fluorescencia en función de la concentración de urea con diferentes tiempos de incubación (los datos de HsTIM fueron proporcionados por el Dr. Armando Gómez Puyou). La concentración de proteína en todos los casos fue de 50 $\mu\text{g/ml}$.

5.1.2.2. Tensión dinámica en presencia de urea

La técnica de fluorescencia es indicativa del estado de la proteína en el seno de la disolución y por lo tanto de la estructura proteica que migra a la superficie. Cuando la

concentración de urea es baja (por ejemplo 2 M) en el seno de la disolución, la proteína se encuentra en su estado nativo, pero es posible que en la superficie se facilite un desplegamiento parcial o total (figura 4.5). Por otra parte, es posible que al estar la proteína parcialmente desplegada (concentraciones intermedias de urea) o totalmente desplegada (concentraciones altas de urea) en el seno de la disolución, se facilite su adsorción a la superficie debido a que hay una mayor exposición de los residuos hidrofóbicos.

Se realizaron mediciones de las TIMs con urea a tres concentraciones: i) 2 M, a la cual la proteína aún no se desnaturaliza, ii) 5 M, a la cual una fracción de la población de proteína se encuentra desplegada, y iii) con urea entre 7 y 8 M tras dejar incubando la disolución un día, es decir, con la proteína casi totalmente desnaturalizada en el seno de la disolución.

En presencia de urea, la tensión superficial disminuyó en comparación con los valores de tensión de la proteína en amortiguador. En la figura 5.4, se puede observar que cuando la concentración de urea es 2 M con un tiempo de incubación de media hora, hay un cambio significativo en la tensión superficial (bajo estas condiciones, la proteína está en su estado nativo en el seno del líquido). Además, al igual que en el caso de la proteína sin urea no se llega a alcanzar el equilibrio verdadero después de 3 horas. Los resultados en la figura 5.4 son consistentes con la idea de que a 2 M de urea, al existir una mayor flexibilidad de la estructura, puede haber una mayor exposición de los grupos hidrofóbicos y por lo tanto una mayor afinidad por la superficie.

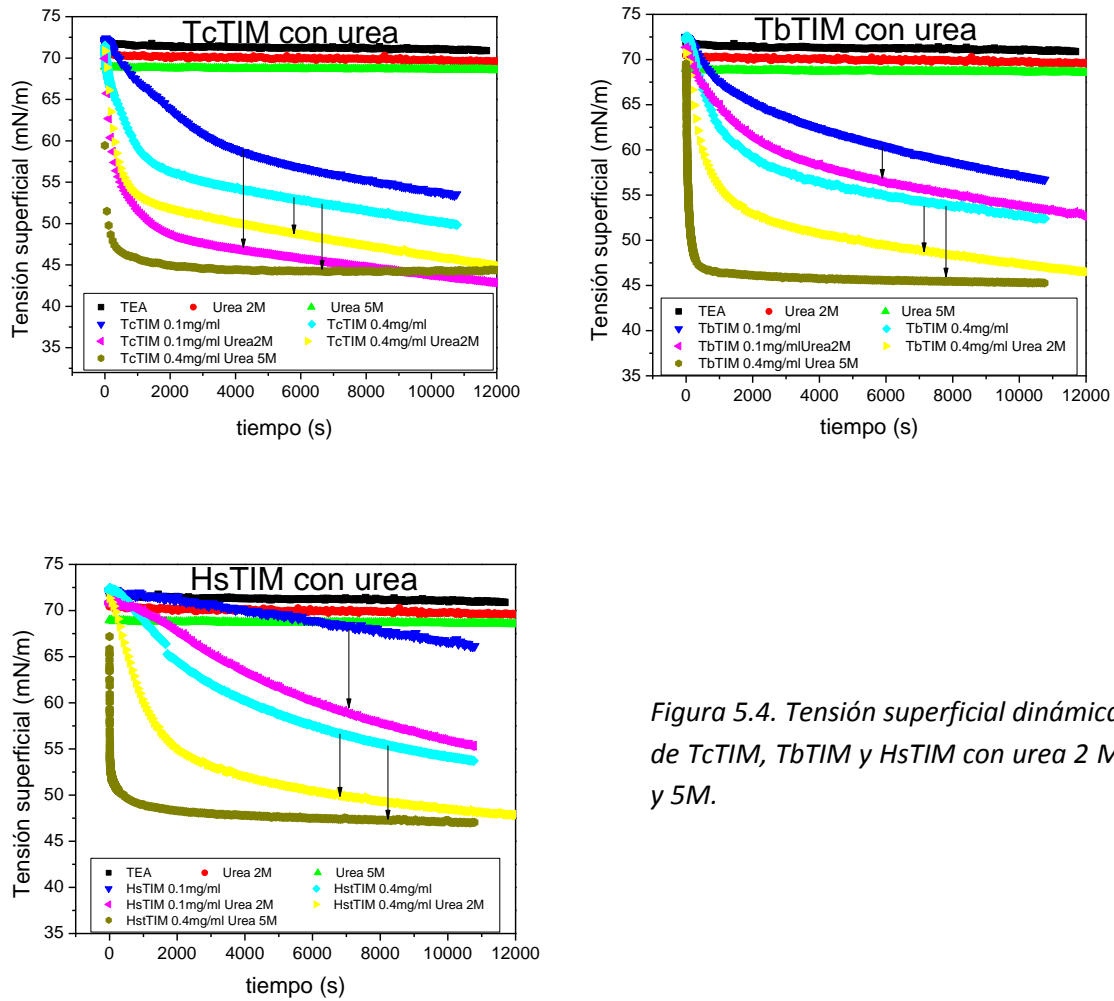


Figura 5.4. Tensión superficial dinámica de TcTIM, TbTIM y HsTIM con urea 2 M y 5M.

También se observa que cuando la concentración de urea es 5 M (30 min de incubación), la caída en la tensión superficial es más drástica a tiempos cortos y luego se mantiene constante, llegando rápidamente al equilibrio en el proceso de adsorción. Esto sucede cuando en el seno de la disolución la fracción de proteína desplegada es muy pequeña (menor al 10%, figura 5.3). Una posible explicación de esta situación es que la fracción de proteínas que están desplegadas, migra a la superficie debido a la exposición de algunos de sus residuos hidrofóbicos, causando así la disminución de la tensión superficial de una manera drástica y saturando la superficie. Con concentraciones mayores a 5 M de urea, después de la primera media hora de medición, la tensión superficial ya no varía mucho,

por lo que se puede considerar que el proceso de adsorción ha llegado al equilibrio, ya que $|d\sigma/dt| < 2 \times 10^{-4}$ mN/m·s (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Comparación de $|d\sigma/dt|$ para TIM en presencia de urea (incubación de 30 min con urea ≤ 5 M, incubación de un día con urea ≥ 7 M).

Proteína	Concentración (mg/ml)	Urea (M)	$ d\sigma/dt $ (mN/m·s)
TcTIM	0.01	0	8.5×10^{-4}
	0.1	0	6.2×10^{-4}
	0.4	0	6.0×10^{-4}
	0.1	2	4.6×10^{-4}
	0.4	2	5.5×10^{-4}
	0.4	5	7.4×10^{-5}
	0.4	7	8.2×10^{-5}
TbTIM	0.01	0	8.7×10^{-4}
	0.1	0	6.8×10^{-4}
	0.4	0	5.0×10^{-4}
	0.1	2	5.1×10^{-4}
	0.4	2	3.6×10^{-4}
	0.4	5	5.8×10^{-5}
	0.4	8	9.2×10^{-5}
HsTIM	0.01	0	1.6×10^{-4}
	0.1	0	5.9×10^{-4}
	0.4	0	6.1×10^{-4}
	0.1	2	9.0×10^{-4}
	0.4	2	2.1×10^{-4}
	0.4	5	1.2×10^{-4}
	0.4	7.5	7.8×10^{-5}

Para poder conocer la tensión de las proteínas desplegadas, se hicieron mediciones en presencia de [Urea] ≥ 7 M y habiendo incubado 24 horas, donde todas las proteínas en el seno de la disolución están desnaturalizadas (figura 5.3). Los resultados se muestran en la figura 5.5, junto con los ya mostrados en la figura 5.4 con 5 M de urea (incubación de media hora).

Los resultados parecen confirmar que la tensión dinámica a 5 M de urea se debe fundamentalmente a la fracción de las proteínas desplegadas, que claramente, tienen mayor afinidad por la superficie. En la figura 5.5, el hecho de que la tensión con 7 M de

urea es mayor en comparación con la tensión cuando la concentración de urea es 5 M [$\sigma(7M_{urea}) > \sigma(5M_{urea})$], puede atribuirse a que en presencia de urea 7 M exista un fenómeno de agregación que se favorece debido a la interacción entre grupos hidrofóbicos de la proteína a tiempos de incubación largos. Esto es consistente con reportes que indican que la disminución en la tensión superficial es menor cuando un tensoactivo actúa con un polímero o con ciclodextrinas formando agregados en el bulto de la disolución [Angelova, 1999; Shrivastava, 2010; Martínez, 2010].

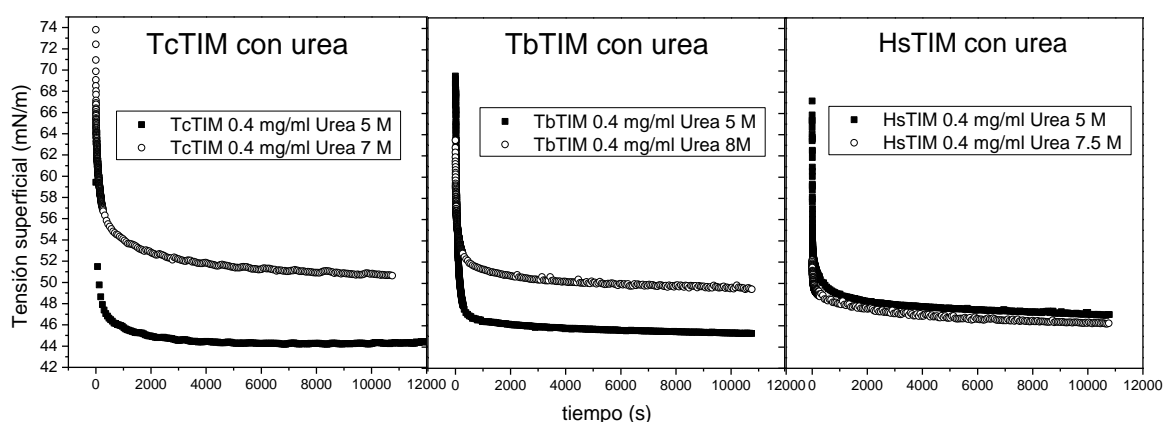


Figura 5.5. Tensión superficial dinámica de TcTIM, TbTIM y HsTIM con urea 5 M (incubación por 0.5 h) y urea con concentración > 7 M (24 h de incubación).

Por último, si se comparan los resultados obtenidos para las tres especies a una misma concentración de proteína (por ejemplo, 0.1 mg/ml) y de urea (2 M), se puede observar que se mantiene la misma tendencia que con la proteína sin urea. Es decir, que TcTIM baja la tensión superficial en mayor proporción, seguido de TbTIM y HsTIM (figura 5.6). En presencia de urea 5 M, el comportamiento es muy similar al de 2 M de urea para las tres proteínas. Entonces, tanto en condiciones nativas como en condiciones desnaturizantes, TcTIM presenta una mayor preferencia por estar en contacto con superficies hidrofóbicas, mientras que HsTIM presenta una menor afinidad por este tipo de superficies.

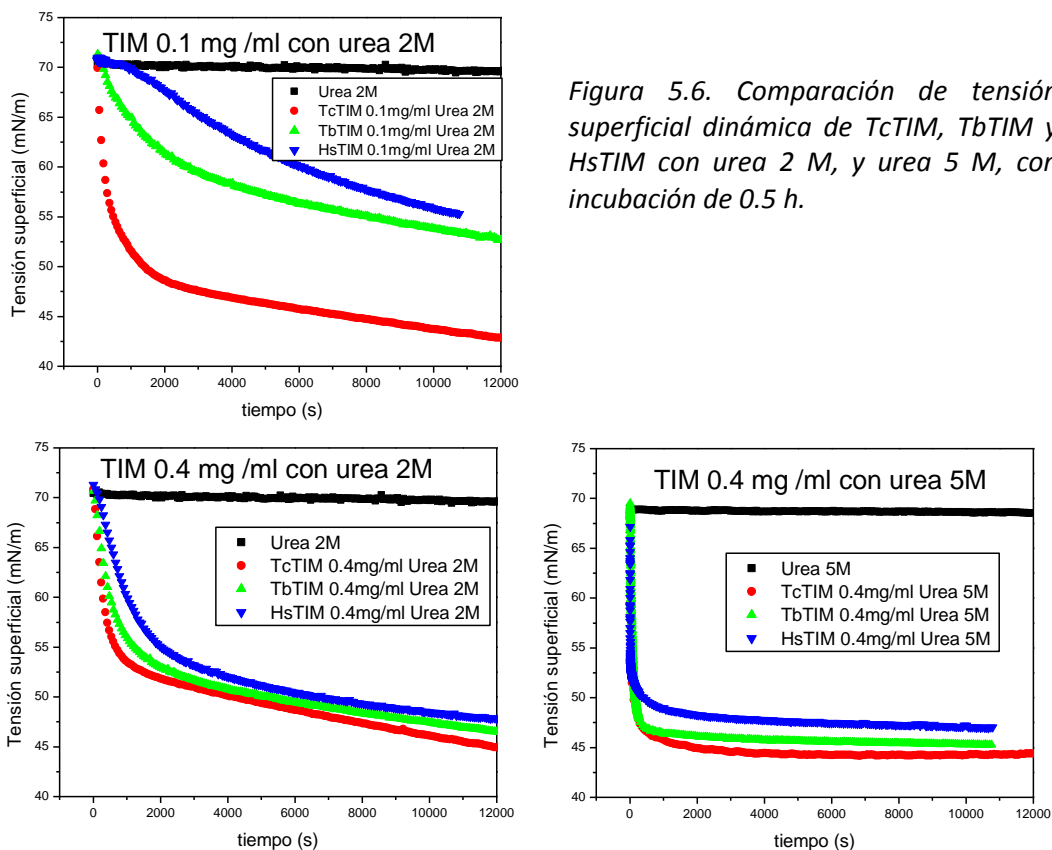


Figura 5.6. Comparación de tensión superficial dinámica de TcTIM, TbTIM y HsTIM con urea 2 M, y urea 5 M, con incubación de 0.5 h.

5.2. Determinación de presión superficial, concentración superficial y coeficientes de difusión

La presión superficial se determinó a partir de la diferencia entre la tensión de la disolución amortiguadora y la de la proteína para cada punto experimental (a un tiempo determinado). Es a través de estas gráficas (figura 5.7) que se puede apreciar mejor el cambio producido en la tensión superficial. Se observa que la presión superficial para la proteína sin urea llega a un valor máximo de 22 mN/m para TcTIM 0.4 mg/ml. Estos valores aumentan en presencia de urea, dado que como hay una mayor disminución de tensión superficial, la diferencia de tensión respecto al disolvente es mayor.

5. Resultados y discusión

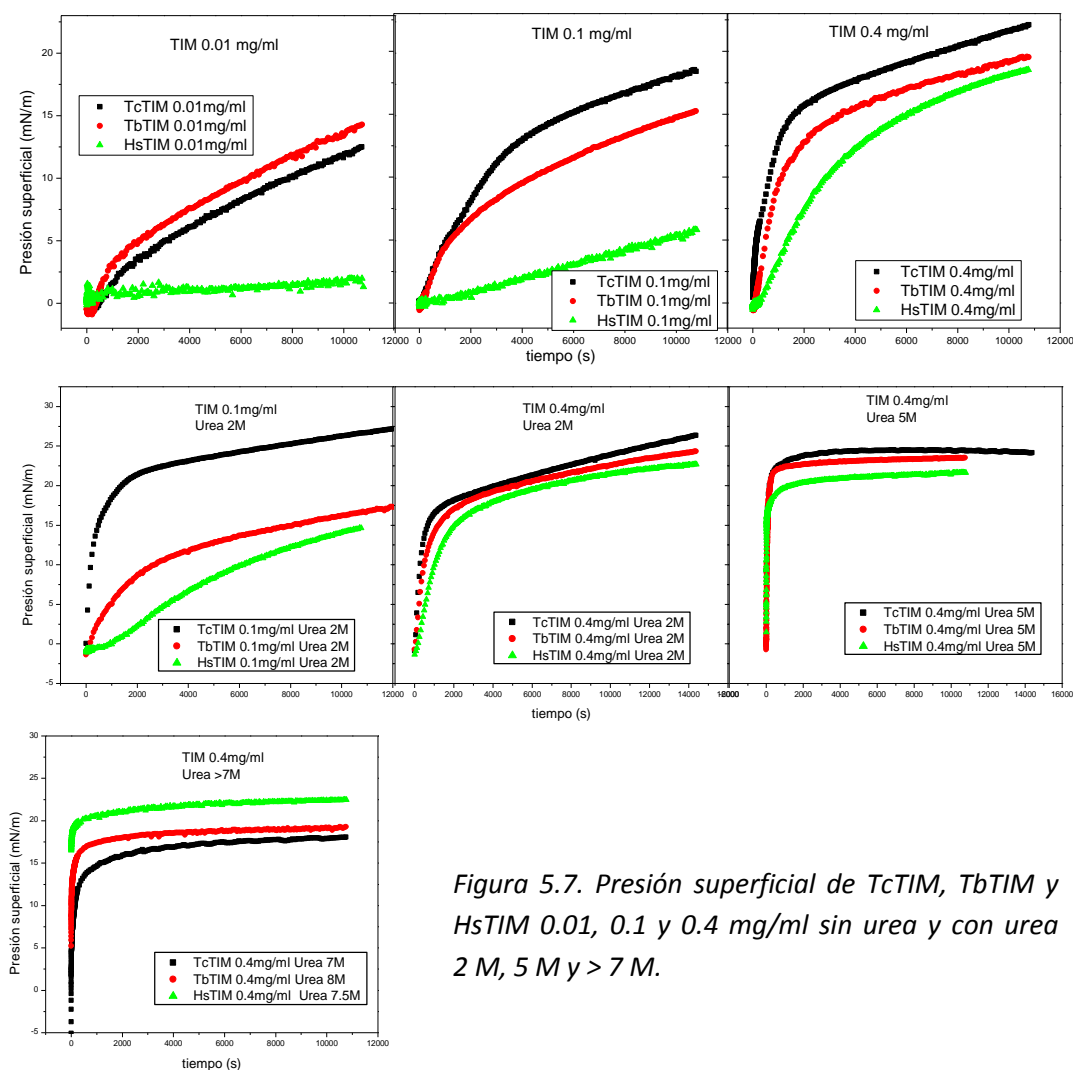


Figura 5.7. Presión superficial de TcTIM, TbTIM y HsTIM 0.01, 0.1 y 0.4 mg/ml sin urea y con urea 2 M, 5 M y > 7 M.

El cálculo de la concentración de proteína en la superficie se hizo considerando la ecuación de adsorción de Gibbs (ecuación 4.2). Es importante recordar que se trata de un modelo ideal en el que no se consideran interacciones entre las moléculas ni cambios estructurales en la superficie. No obstante, se puede usar para obtener una estimación de la concentración superficial [Fainerman, 1998]. En las gráficas mostradas en la figura 5.8, se puede observar que no en todos los casos se incrementa de inmediato la concentración en la superficie sino que, por ejemplo, para HsTIM 0.4 mg/ml, la concentración empieza a crecer a partir de $20 \text{ s}^{1/2}$. Es decir, hay un tiempo de inducción, el cual se refiere al tiempo que tarda la proteína en migrar a la superficie y adsorberse [Yampolskaya, 2006; Eastoe, 2000], por lo cual no se observan cambios significativos en la tensión superficial en ese

periodo de tiempo. Esto al parecer es más evidente en HsTIM, que es la que se adsorbe en menor proporción a la interfase y tarda más tiempo en los procesos de adsorción. En las gráficas de tensión superficial no se observa muy claro este periodo, a menos de que se grafiquen los datos con escala logarítmica de tiempo (se puede ver un ejemplo en la figura 5.9). Este tiempo de inducción disminuye al aumentar la concentración de proteína o de urea.

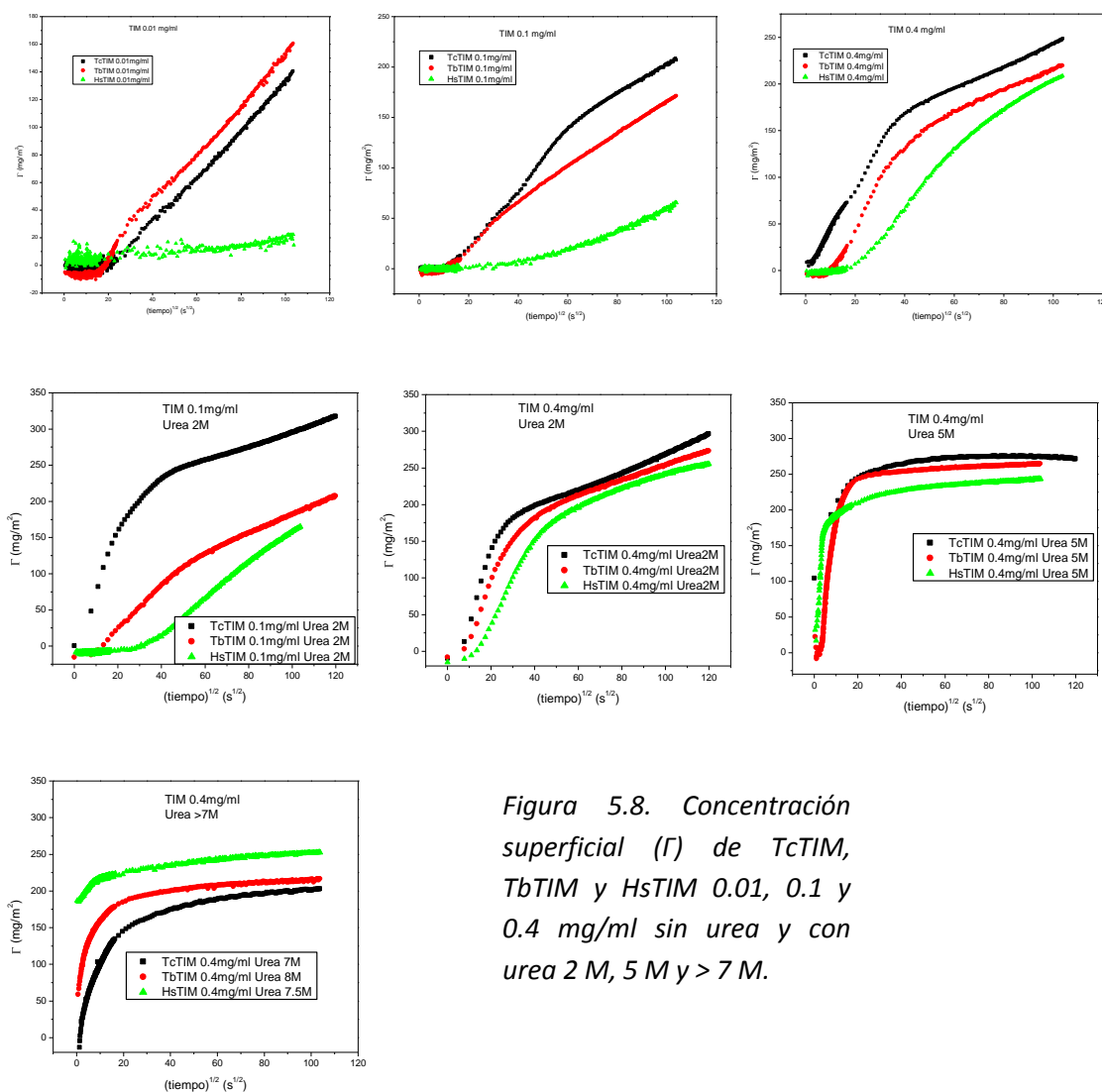


Figura 5.8. Concentración superficial (Γ) de TcTIM, TbTIM y HsTIM 0.01, 0.1 y 0.4 mg/ml sin urea y con urea 2 M, 5 M y > 7 M.

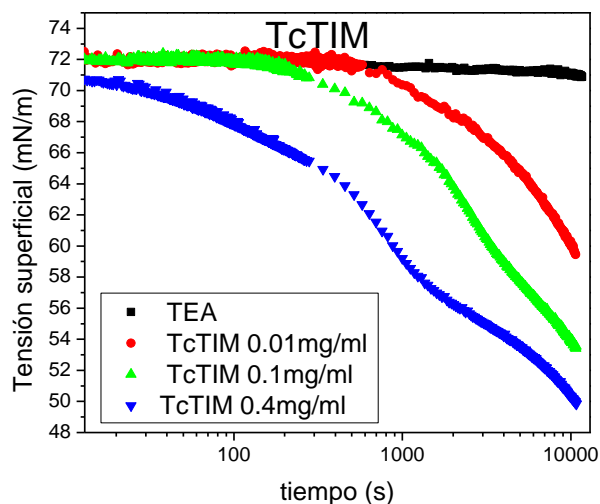


Figura 5.9. Ejemplo de tensión superficial en función del tiempo en escala logarítmica de TcTIM.

Para determinar el coeficiente de difusión (D), se usó la ecuación de Ward-Tordai (ecuación 4.4), en la cual se asume que el proceso está controlado por difusión para periodos cortos de tiempo. Los resultados se muestran en la Tabla 5.4, donde se observa que los coeficientes de difusión en general son del orden de entre 10^{-12} y 10^{-9} m^2/s , lo cual coincide con coeficientes de difusión reportados para otras proteínas [Tyn, 1990]. En general, la proteína HsTIM presenta coeficientes de difusión menores en comparación con TcTIM y TbTIM. Esto es consistente con un tiempo de inducción mayor para HsTIM que para las otras dos proteínas.

Para una misma proteína, el coeficiente de difusión varía en función de su concentración, y éste se decrece al aumentar la concentración de urea. El hecho de que el coeficiente de difusión no se mantenga constante al variar las concentraciones de proteína, indica que posiblemente exista una barrera de adsorción, y que por lo tanto el proceso no sea controlado solamente por difusión como asume la ecuación 4.4. Entonces, los coeficientes de difusión calculados en realidad son coeficientes de difusión aparentes (ecuación 1.1) [Eastoe, 2000]. En general, la difusión de HsTIM a la superficie es más lenta que para TcTIM y TbTIM, y además HsTIM es menos afín a la superficie.

Tabla 5.4. Coeficientes de difusión aparentes de triosafosfato isomerasa, obtenidos a partir de la ecuación 4.4.

Concentración de proteína (mg/ml)		Concentración de Urea (M)	D (m ² /s)
HsTIM	0.01	0	2.8×10^{-10}
	0.1	0	1.5×10^{-12}
		2	3.4×10^{-12}
	0.4	0	2.5×10^{-11}
		2	2.0×10^{-10}
		5	1.1×10^{-08}
	7.5	1.8×10^{-11}	
TbTIM	0.01	0	5.2×10^{-08}
	0.1	0	5.8×10^{-10}
		2	7.0×10^{-10}
	0.4	0	1.4×10^{-10}
		2	1.9×10^{-10}
		5	1.8×10^{-09}
8		1.3×10^{-10}	
TcTIM	0.01	0	1.2×10^{-09}
	0.1	0	7.3×10^{-09}
		2	1.8×10^{-09}
	0.4	0	1.1×10^{-10}
		2	1.4×10^{-10}
		5	2.2×10^{-10}
7		2.7×10^{-10}	

5.3. Ajuste al modelo de adsorción-reorientación en la superficie

El modelo de adsorción-reorientación en la superficie descrito en la Sección 4.2 fue empleado para ajustar los datos experimentales de tensión dinámica, $\sigma(t)$. Esto se hizo de acuerdo con la ecuación 4.5 [Serrien, 1992]:

$$\sigma(t) = \sigma_{eq} + \left[\alpha \exp\left(-\sqrt{\frac{4t}{\pi\tau}}\right) + \beta \right] \exp(-kt) \quad (5.1)$$

En este modelo, hay cuatro parámetros ajustables: α , β , τ y k , ya que la tensión al equilibrio (σ_{eq}) es la ordenada al origen de la recta que describe los datos de la tensión superficial en función del inverso del tiempo ($1/t$), como se ejemplifica en la figura 5.10.

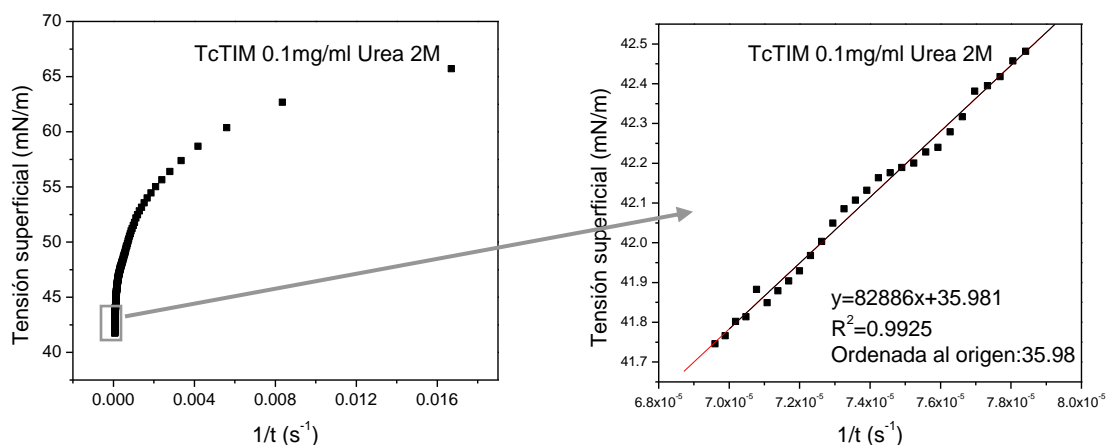


Figura 5.10. Ejemplo de una gráfica de tensión superficial como función de t^{-1} .

Cuando $t \rightarrow \infty$, $\sigma \rightarrow \sigma_{eq}$,

De acuerdo con lo planteado en este modelo, si no existiera reorientación en la superficie, y por tanto el proceso estuviera controlado sólo por difusión, $\beta = 0$ y $k = 0$. La figura 5.11 ilustra para el caso de la TcTIM a 0.4 mg/ml, el ajuste considerando únicamente difusión (línea verde) y aquel donde también se involucra al proceso de reorientación (línea roja). Claramente, una de las opciones (en este caso la de difusión y reorientación) es mejor que la otra.

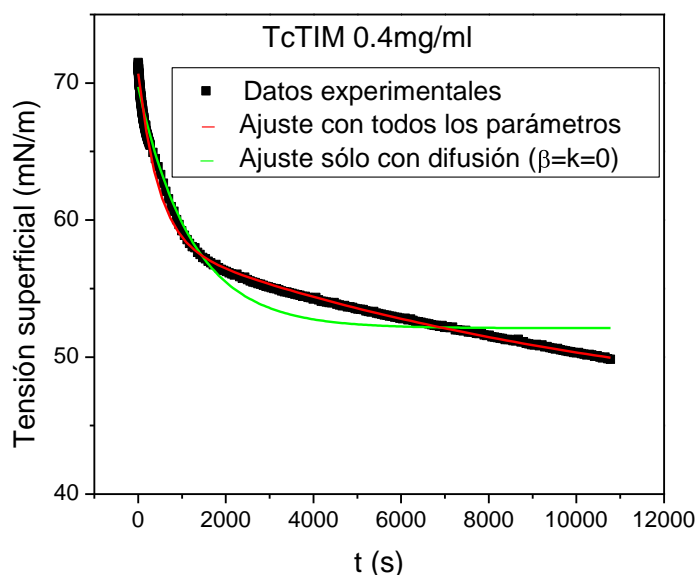


Figura 5.11. Ejemplo del ajuste considerando únicamente difusión (verde) y considerando difusión y reorientación (rojo).

Para definir entonces cual de las dos opciones reproduce mejor los resultados experimentales, se realizaron ajustes con ambas para todas las $\sigma(t)$ medidas, y se calcularon los porcentajes de error. Esta información se reporta en el Apéndice 1, donde puede verse que en la mayoría de los casos, la opción que reproduce mejor los datos es aquella donde se consideran los dos procesos: difusión y reorientación. Sin embargo, para las TIMs de las tres especies a concentraciones bajas (0.01 mg/ml) se obtuvo un mejor ajuste cuando se consideró que sólo existía difusión. Es importante hacer notar que a esta baja concentración, los ajustes con cuatro parámetros produjeron incertidumbres muy grandes de tal manera que este criterio de selección coincide con el de la evaluación del porcentaje de error. Los valores obtenidos de cada ajuste se muestran en la Tabla 5.5 junto con los reportados en la literatura para otras tres proteínas. Es interesante señalar que los valores α y β para estas últimas son muy parecidos a los de las TIMs. Por otro lado, los valores de τ y k difieren y se comentarán más adelante.

Tabla 5.5. Parámetros de ajuste obtenidos a partir de la ecuación 4.5 para las proteínas estudiadas en este trabajo, y para otras proteínas reportadas en la literatura.

Proteína	Concentración		Urea (M)	σ_{eq} (mN/m) ^a	α (mN/m)	β (mN/m)	τ (s)	k (s ⁻¹)	R ²	X ²
	mg/ml	μ M								
TcTIM	0.01	0.365	0	52.8 ± 0.2	19.47 ± 9 × 10 ⁻³	0	6542 ± 21	0	0.99511	0.05931
	0.1	3.65	0	48.4 ± 0.1	14.5 ± 0.7	9.5 ± 0.7	2027 ± 54	6 × 10 ⁻⁵ ± 6 × 10 ⁻⁶	0.99894	0.04974
	0.4	14.6	0	44.6 ± 0.1	12.1 ± 0.1	14.00 ± 0.09	304 ± 5	9 × 10 ⁻⁵ ± 1 × 10 ⁻⁶	0.99831	0.09159
	0.1	3.65	2	36.0 ± 0.1	17.8 ± 0.2	14.17 ± 0.06	269 ± 5	6 × 10 ⁻⁵ ± 6 × 10 ⁻⁷	0.99524	0.07492
	0.4	14.6	2	36.5 ± 0.2	17.7 ± 0.1	17.33 ± 0.02	191 ± 2	6 × 10 ⁻⁵ ± 1 × 10 ⁻⁷	0.99925	0.01253
	0.4	14.6	5	44.05 ± 0.01	11.8 ± 0.3	3.3 ± 0.1	48 ± 2	6 × 10 ⁻⁴ ± 3 × 10 ⁻⁵	0.96768	0.05284
	0.4	14.6	7	49.95 ± 0.05	9.8 ± 0.2	7.3 ± 0.1	48 ± 2	3.5 × 10 ⁻⁴ ± 1 × 10 ⁻⁵	0.98133	0.47639
TbTIM	0.01	0.365	0	51.5 ± 0.2	21.20 ± 0.01	0	5413 ± 25	0	0.99172	0.13605
	0.1	3.65	0	51.0 ± 0.1	4.92 ± 0.07	16.71 ± 0.07	681 ± 18	1 × 10 ⁻⁴ ± 6 × 10 ⁻⁷	0.99942	0.01738
	0.4	14.6	0	47.8 ± 0.1	14.0 ± 0.2	11.2 ± 0.2	725 ± 15	8 × 10 ⁻⁵ ± 2 × 10 ⁻⁶	0.99841	0.09551
	0.1	3.65	2	45.1 ± 0.2	9.56 ± 0.04	16.63 ± 0.04	787 ± 7	7 × 10 ⁻⁵ ± 2 × 10 ⁻⁷	0.99968	0.00623
	0.4	14.6	2	41.2 ± 0.1	16.92 ± 0.08	13.11 ± 0.03	349 ± 3	7 × 10 ⁻⁵ ± 3 × 10 ⁻⁷	0.99909	0.01622
	0.4	14.6	5	44.94 ± 0.01	22.07 ± 0.1	3.55 ± 0.08	38.6 ± 0.4	4 × 10 ⁻⁴ ± 2 × 10 ⁻⁵	0.99476	0.24652
	0.4	14.6	8	59.05 ± 0.05	6.96 ± 0.1	4.47 ± 0.07	32 ± 1	3 × 10 ⁻⁴ ± 1 × 10 ⁻⁵	0.97994	0.18641
HsTIM	0.01	0.365	0	69.2 ± 0.1	2.34 ± 0.01	0	8294 ± 248	0	0.7756	0.051
	0.1	3.65	0	62.4 ± 0.2	9.66 ± 0.01	0	8980 ± 69	0	0.98097	0.05347
	0.4	14.6	0	48.2 ± 0.1	19 ± 1.5	5 ± 1.5	2868 ± 87	2 × 10 ⁻⁵ ± 2 × 10 ⁻⁵	0.99834	0.07524
	0.1	3.65	2	47.5 ± 0.2	23.54 ± 0.02	0	6310 ± 24	0	0.99612	0.10159
	0.4	14.6	2	44.5 ± 0.1	17.8 ± 0.10	10.48 ± 0.08	660 ± 8	9 × 10 ⁻⁵ ± 9 × 10 ⁻⁷	0.9987	0.03172
	0.4	14.6	5	46.42 ± 0.04	15.8 ± 0.2	5.22 ± 0.04	6.06 ± 0.13	3 × 10 ⁻⁴ ± 1 × 10 ⁻⁵	0.9733	0.26901
	0.4	14.6	7.5	45.65 ± 0.03	2.68 ± 0.04	3.52 ± 0.02	25.3 ± 0.8	2 × 10 ⁻⁴ ± 3 × 10 ⁻⁶	0.98765	0.0312
BSA ^b	0.053	0.79	0		9.5	12	15.7	7.5 × 10 ⁻³		
	0.1	1.5	0		9.5	12	6.4	5 × 10 ⁻³		
	1	15	0		9.5	12	1.3	1.8 × 10 ⁻³		
	0.1	1.5	6		13.5	8	3.2	1 × 10 ⁻²		
	1	15	6		10	11.5	0.45	2.5 × 10 ⁻³		
Lisozima ^c	0.1	6.8	0				632	0.2 × 10 ⁻³		
	0.5	34	0				5	1.3 × 10 ⁻³		
RNasa ^c	0.5	36	0				48	0.5 × 10 ⁻³		

^a σ_{eq} obtenidos a partir de las gráficas de tensión en función de t^{-1} ; ^b Serrien, 1992; ^c Van der Vegt, 1996

En la figura 5.12 se muestran los ajustes para todas las proteínas a todas las concentraciones empleadas, en amortiguador con y sin urea. Se observa que este modelo (líneas en azul) es capaz de describir correctamente los datos experimentales. Se puede concluir que: (a) a bajas concentraciones (0.01 mg/ml) el proceso dominante es el de difusión, y al parecer, las proteínas no sufren cambios estructurales significativos en la interfase líquido/aire, (b) a concentraciones más elevadas y en presencia de urea, la lenta migración de las TIMs a la interfase líquido/aire no termina con una simple acumulación de dímeros, sino que en dicha superficie ocurre un cambio estructural como los ilustrados en la figura 4.5.

5. Resultados y discusión

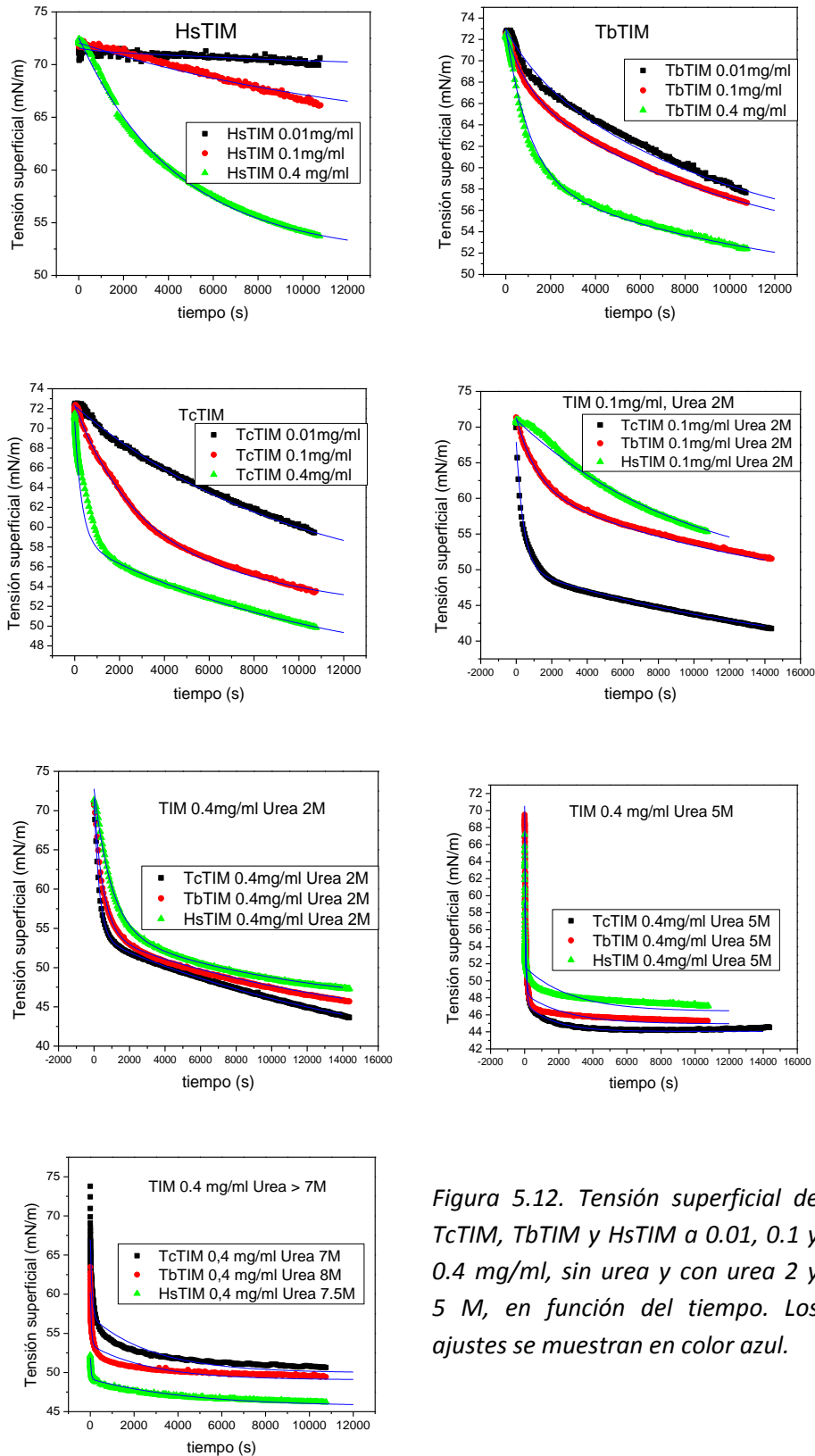


Figura 5.12. Tensión superficial de TcTIM, TbTIM y HsTIM a 0.01, 0.1 y 0.4 mg/ml, sin urea y con urea 2 y 5 M, en función del tiempo. Los ajustes se muestran en color azul.

Los valores de los parámetros en la Tabla 5.5 permiten un análisis más detallado de las características de la migración de las proteínas a la superficie y de su estado en ella:

- 1) Si se comparan los tiempos de relajación (τ) en la Tabla 5.5 para las tres proteínas cuando su concentración es 0.4 mg/ml, se observa que este valor disminuye al aumentar la concentración de urea de 0 a 2 y a 5 M, y no se observan diferencias tan significativas en presencia de urea 5 y 7 M. Entonces, al ir aumentando la concentración de urea y el grado de desplegamiento de la proteína, ésta tarda menos tiempo en migrar a la superficie. La comparación de los valores de τ para las tres TIMs con otras proteínas (Tabla 5.5) muestra que para estas últimas, τ es del orden de cien veces menor, es decir, las TIMs tienen una relajación por difusión notablemente más lenta.
- 2) Las constantes cinéticas (k) en Tabla 5.5 son del orden de 10^{-5} s^{-1} cuando la concentración de urea es $\leq 2 \text{ M}$, y aumentan al orden de 10^{-4} s^{-1} cuando la concentración de urea es igual o mayor a 5 M. Por tanto, la cinética de reorientación en la superficie es más rápida en presencia de altas concentraciones de urea, es decir cuando la proteína en la superficie está parcial o casi totalmente desnaturalizada. Los valores de k para otras proteínas (tabla 5.5) son dos órdenes de magnitud mayores que para las tres TIMs, es decir, el proceso de reorientación en la superficie que sufren las TIMs es mucho más lento.
- 3) Si la ecuación 4.5 se expresa como

$$\sigma(t) - \sigma_{eq} = \alpha \exp\left(-\sqrt{\frac{4t}{\pi\tau}}\right) \exp(-kt) + \beta \exp(-kt) \quad (5.2)$$

se tienen dos contribuciones: la primera, que corresponde esencialmente a difusión (ya que el término $\exp(-kt) \cong 1$) y la segunda que corresponde a la reorientación en la superficie. Esto permite estimar la importancia relativa de difusión y reorientación en $\sigma(t)$.

En la figura 5.13 se muestran estas dos contribuciones a un tiempo corto (1000 s) y uno largo (10 000 s). Para ambos tiempos, en TcTIM y TbTIM a bajas concentraciones (0.1 mg/ml) la difusión es dominante, mientras que a concentraciones mayores (0.1 y 0.4

mg/ml) la reorientación predomina. Para HsTIM, a tiempos cortos la difusión es la contribución más importante independientemente de la concentración, mientras que a tiempos largos la reorientación sólo es significativa a la concentración más elevada (0.4 mg/ml).

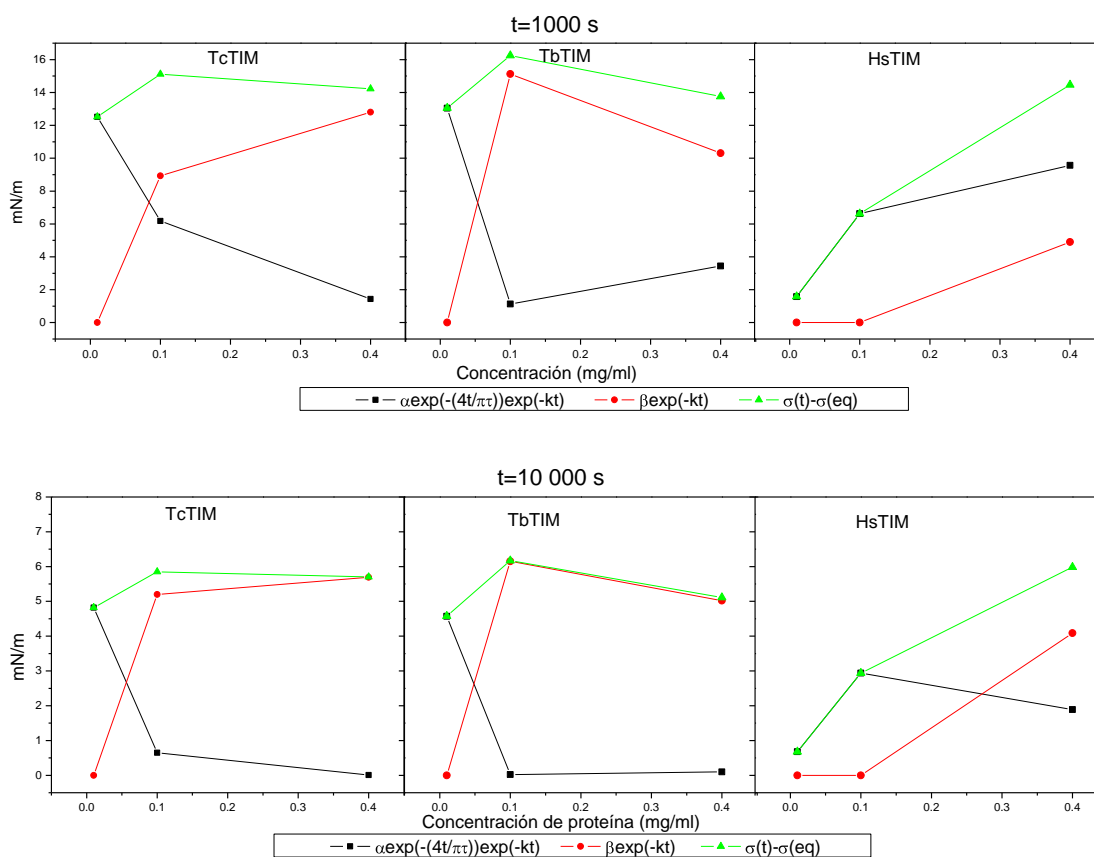


Figura 5.13. Contribuciones de los dos términos de la ecuación 5.2 (difusión y reorientación) a diferentes tiempos (1000 y 10 000 segundos) en función de la concentración de proteína para TcTIM, TbTIM y HsTIM.

En la figura 5.14 se muestran las dos contribuciones de la ecuación 5.2 para las tres proteínas (a 0.4 mg/ml) en presencia de urea, de nuevo a 1000 y 10 000 s. A ambos tiempos, para las tres proteínas domina la reorientación. Este resultado es consistente con el hecho de que en presencia 2 M de urea estas proteínas conservan la estructura nativa pero ésta es menos compacta. A concentraciones de 5 y 7-8 M de urea, como se discutió

en la Sección 5.1.2.2, la superficie está ocupada por la proteína desnaturalizada que, desde luego, puede sufrir una gran variedad de cambios conformacionales.

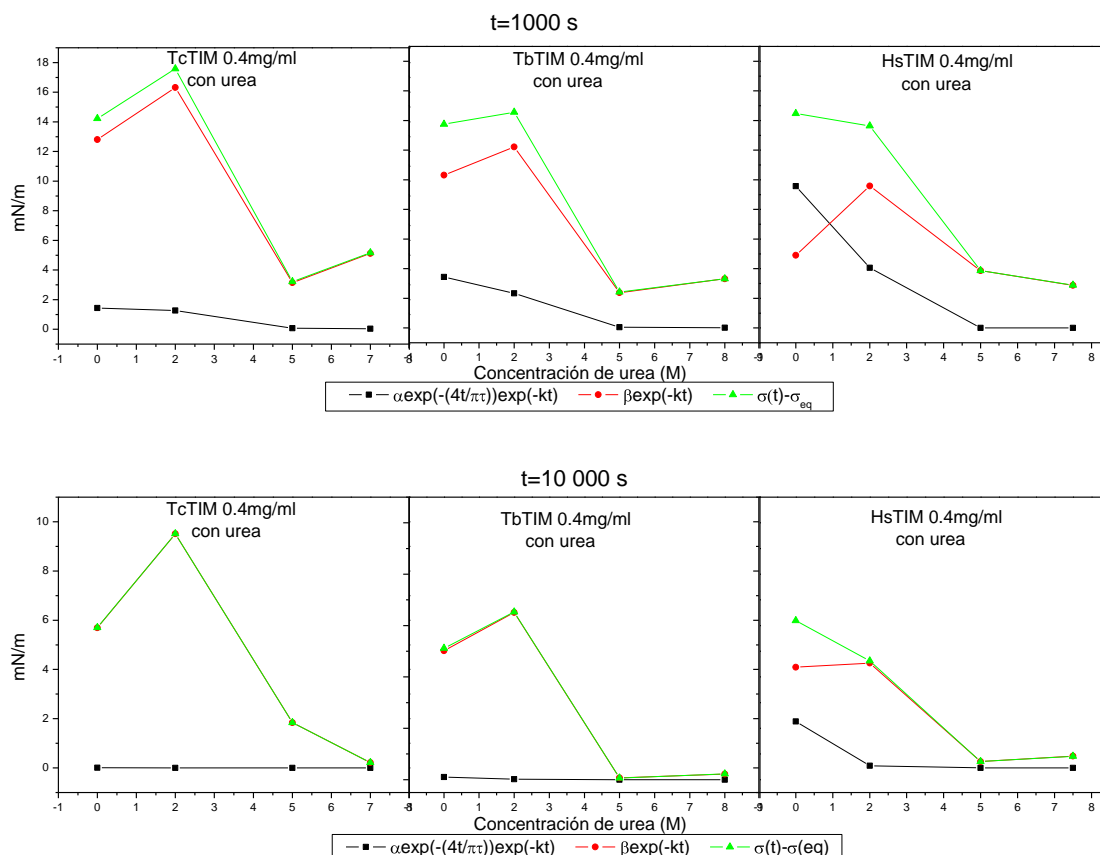


Figura 5.14. Contribuciones de los dos términos de la ecuación 5.2 (difusión y reorientación o sólo reorientación) a diferentes tiempos (1000 y 10 000 segundos) para TIM 0.4 mg/ml con diferentes concentraciones de urea.

En general, cuando la proteína en el seno de la disolución tiene una conformación nativa, no es posible distinguir cual es el proceso de reorientación que ocurre en la superficie (figura 4.5). Sin embargo, sí se puede observar que HsTIM es menos afín a la superficie en comparación con TcTIM y TbTIM y que en ausencia de urea, la contribución de reorientación a la tensión dinámica, $\sigma(t)$, es menos significativa para HsTIM que para TcTIM y TbTIM. De aquí se puede deducir que es menos probable que HsTIM sufra cambios estructurales muy severos en la superficie. Esto es consistente con otros resultados reportados para HsTIM, a saber (a) como indica la figura 1.4, comparada con

TcTIM y TbTIM, es necesario diluir mucho más a la HsTIM para poder disociar el dímero (la estructura biológicamente activa) para producir monómeros (inactivos); (b) se ha encontrado que derivados de benzotiazol inhiben de manera selectiva la actividad de TcTIM y TbTIM sin afectar la TIM de humano, como se desea hacer para encontrar potenciales fármacos para el mal de Chagas y el mal del sueño (ver Introducción); el mecanismo de inhibición parece ser el de desplazar el equilibrio $\text{dímero} \rightleftharpoons 2(\text{monómero})$ hacia los monómeros inactivos mediante la unión de estos compuestos a la intercara monómero/monómero de los dímeros. Esta unión es mucho más efectiva para TcTIM y TbTIM que para HsTIM, ya que la intercara de esta última es mucho más compacta [Téllez-Valencia, 2004; Olivares Illana, 2006]. Así, estas evidencias son consistentes con las obtenidas en este trabajo en el sentido de que indican que el dímero de HsTIM es uno mucho más “robusto” o “resistente” que los de TcTIM y TbTIM. Esto también puede servir como preámbulo en el entendimiento del proceso de movilidad a través de membranas. Por ejemplo, se han realizado estudios con péptidos, proteínas y liposomas; y el comportamiento de la proteína interactuando con los liposomas se ha podido explicar mediante la actividad superficial líquido/aire de las proteínas [Sospedra, 2002].

5.4. Posibles determinantes microscópicos del comportamiento superficial

A nivel microscópico o estructural, ¿por qué los dímeros de HsTIM son menos afines a migrar a la interfase líquido/aire que los de TcTIM y TbTIM? Para acercarse a contestar esta pregunta se consideraron las áreas accesibles al disolvente y los puntos isoeléctricos de cada proteína.

Las áreas accesibles al disolvente (ASA) se calcularon como se describe en el Apéndice 2. El programa usado arroja resultados de superficie accesible al disolvente para cada átomo. A partir de estos valores, primero se determinó el valor de ASA para cada aminoácido de la proteína. Posteriormente, se obtuvo un valor R al dividir el valor de ASA de la estructura nativa en la proteína entre el valor de ASA de cada aminoácido como tripéptido. De este

modo, si R es cercano a 1, el aminoácido en la proteína está más expuesto al disolvente. Esto es de interés principalmente para los aminoácidos hidrofóbicos (Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Tyr y Val), los cuales generalmente buscarán tener un menor contacto con el agua.

Con base en los datos obtenidos de tensión superficial, se esperaba encontrar que TcTIM tuviera una mayor proporción de residuos hidrofóbicos con un mayor grado de exposición, seguida por TbTIM y HsTIM. Esta predicción se cumple en cuanto al número total de aminoácidos hidrofóbicos en la proteína: 254 para TcTIM, 251 para TbTIM y 234 para HsTIM, sin embargo no hay una diferencia significativa en el área accesible al disolvente de estos residuos. Si se realiza un análisis con los residuos hidrofóbicos que poseen anillos aromáticos (Phe, Tyr, y Trp), la Tabla 5.6 muestra que hay mayor similitud entre TcTIM y TbTIM en comparación con HsTIM, ya que poseen un mayor número de estos residuos con un mayor grado de exposición, mientras que en HsTIM se encuentran más ocultos al interior de la proteína. Es interesante hacer notar que los 4 residuos con $R > 0.3$ en TcTIM y TbTIM son de tirosina. La ubicación de éstos se muestra en la figura 5.15.

Tabla 5.6. Número de aminoácidos hidrofóbicos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) ordenados en función de su grado de exposición al disolvente

Número de aminoácidos hidrofóbicos (sólo Phe, Tyr, Trp)			
	TcTIM	TbTIM	HsTIM
R>0.70	0	0	0
R>0.60	0	0	0
R>0.50	2	2	0
R>0.40	2	2	0
R>0.30	4	4	0

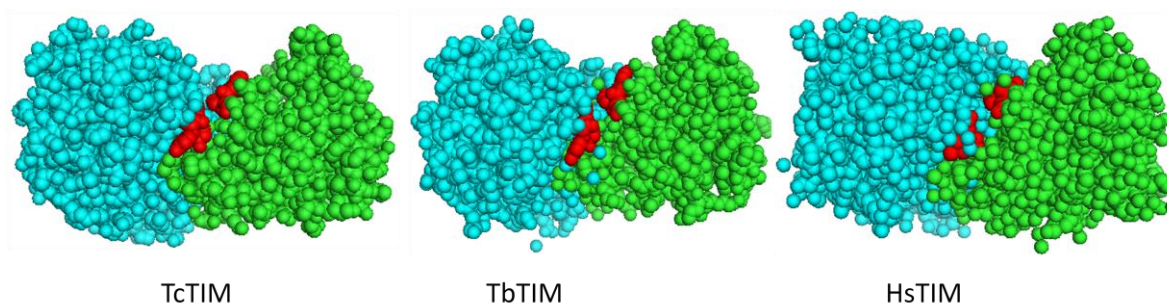


Figura 5.15. Estructura de la triosafosfato isomerasa de las tres especies estudiadas. En color azul y verde se muestran las subunidades. En TcTIM y TbTIM se muestran marcados en rojo los residuos de tirosina (101 y 102) y en HsTIM los residuos equivalentes en esa posición (Val y Phe).

Otro factor importante que puede influir en el diferente comportamiento de la proteína es su carga neta. Esta carga puede evaluarse conociendo el punto isoeléctrico de las proteínas, que se obtuvo como se describe en el Apéndice 3. Los puntos isoeléctricos promedio de las tres TIMs estudiadas son 8.4 para TcTIM, 9.5 para TbTIM y 6.9 para HsTIM [Ostoa, 1997; Chánez-Cárdenas, 2005; Borchert, 1993]. De acuerdo con estos valores, en las condiciones de pH utilizado en este trabajo (7.4), TbTIM y TcTIM tienen una carga neta positiva (un mayor número de residuos con carga positiva), mientras que HsTIM tiene una carga neta negativa (mayor cantidad de residuos con carga negativa), y se encuentra en condiciones más cercanas a su punto isoeléctrico. Esto se ilustra en la figura 5.16, donde se muestra la distribución de cargas en la superficie de las proteínas. En esta figura se puede observar que a pH 7.4, las superficies expuestas al disolvente de TcTIM y TbTIM son de carga positiva (color rojo), mientras que para HsTIM predomina la densidad de carga negativa (color azul). Por otro lado, cuando el pH de la disolución es 5, las tres proteínas al estar por debajo de su punto isoeléctrico poseen una mayor superficie cargada positivamente, y a pH 10, HsTIM tiene regiones con carga negativa que son menos evidentes en TcTIM y TbTIM por estar menos alejadas de su punto isoeléctrico.

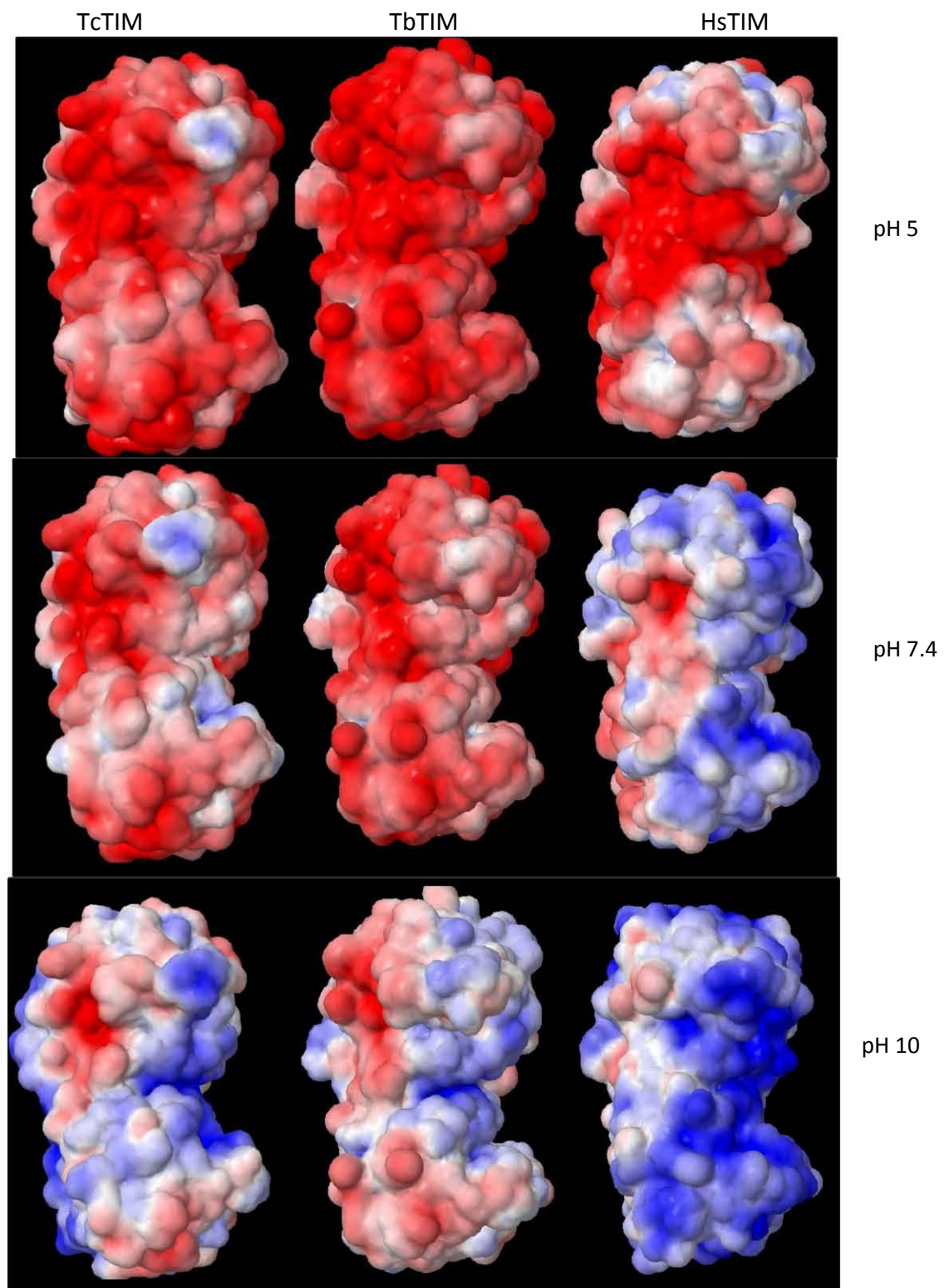


Figura 5.16. Superficie electrostática de TcTIM, TbTIM y HsTIM a pH 5, 7.4 y 10, calculada con el software APBS [Baker, 2001]. En rojo se muestran las cargas positivas y en azul las cargas negativas.

6. Conclusiones

Utilizando la técnica de gota pendiente, se determinó un comportamiento diferente en la tensión superficial dinámica de triosafosfato isomerasas de tres especies: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Homo sapiens*. Cabe destacar que la tensión dinámica es capaz de distinguir entre proteínas con estructuras muy parecidas.

La proteína de humano (HsTIM) es menos afín por la interfase líquido/aire que las proteínas de los tripanosomas (TbTIM y TcTIM). La menor afinidad por la superficie de esta proteína puede ser debido a que en su cadena de aminoácidos tiene un menor número de residuos hidrofóbicos, además de que las tirosinas de HsTIM tienen una muy baja exposición al disolvente, mientras que en TcTIM y TbTIM están más expuestas.

Para las tres TIMs al ir aumentando la concentración de urea y el grado de desplegamiento de la proteína, ésta tarda menos tiempo en migrar a la interfase líquido/aire, y su cinética de reorientación en la superficie es más rápida.

El modelo que ajustó mejor los datos experimentales fue uno donde se consideran un proceso de adsorción controlado por difusión y un proceso de reorientación en la superficie que sigue una cinética de primer orden. Con este modelo, es posible determinar la contribución del proceso difusivo y del cambio conformacional, así como la constante cinética asociada. A bajas concentraciones de proteína existe un predominio del proceso de difusión, mientras que a concentraciones altas de proteína o en presencia de urea, domina la reorientación en la superficie.

7. Sugerencias para trabajo futuro

Para las TIMs de las tres especies estudiadas en este trabajo, se sugiere:

Realizar mediciones de tensión dinámica a concentraciones muy bajas (entre 1×10^{-7} y 1×10^{-8} M) donde en el seno de la disolución existen monómeros de triosafosfato isomerasa en mayor proporción. Esto podría realizarse realizando algunas modificaciones a la metodología experimental.

Evaluar el efecto que el pH y la fuerza iónica tienen sobre el fenómeno de adsorción de la triosafosfato isomerasa de las tres especies, evaluando así la influencia de la carga neta en el comportamiento superficial de las proteínas. Estas mediciones podrían hacerse en condiciones por arriba, por debajo y cerca del punto isoeléctrico para cada especie.

Realizar experimentos a diferentes temperaturas para evaluar la energía de activación que deben vencer las triosafosfato isomerasas para lograr adsorberse a la superficie. Estas mediciones podrían hacerse a 10, 30 y 40 °C.

Apéndice 1

En las siguientes páginas se muestran las gráficas con el porcentaje de error para cada uno de los ajustes realizados con 2 y con 4 parámetros a la ecuación 4.5.

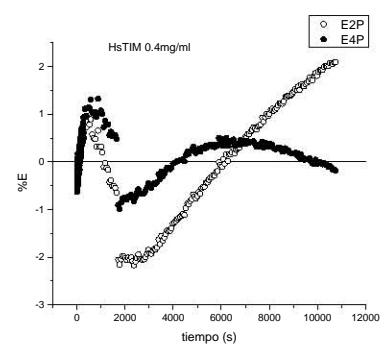
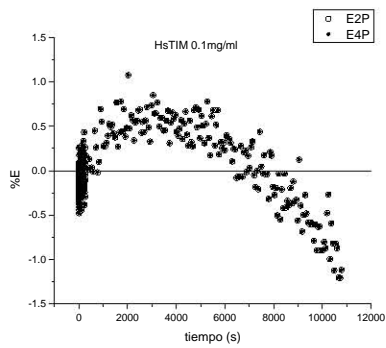
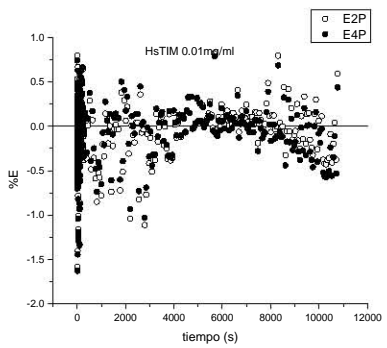
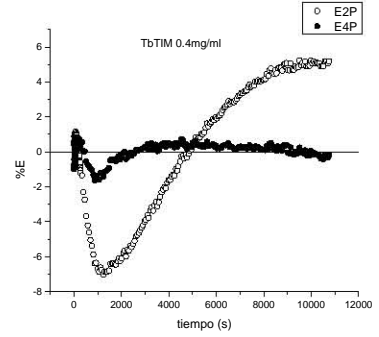
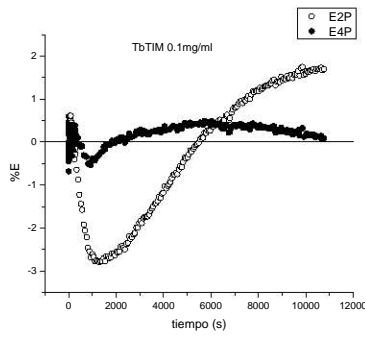
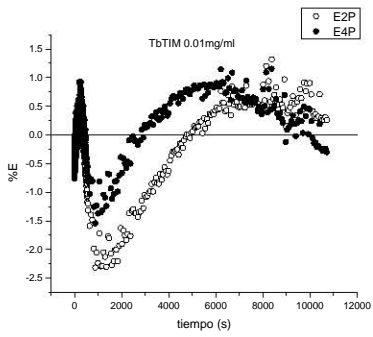
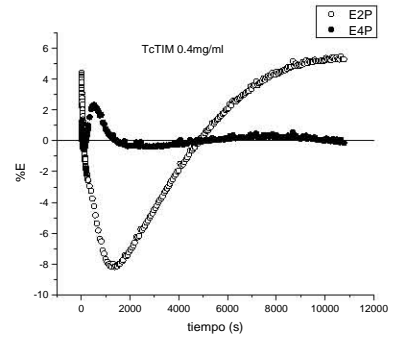
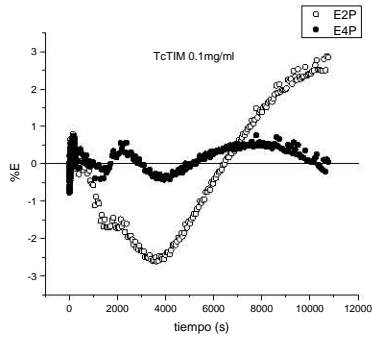
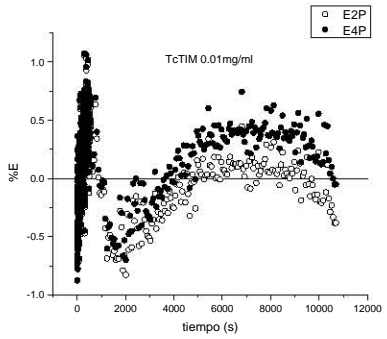
$$\sigma(t) = \sigma_{eq} + \left[\alpha \exp\left(-\sqrt{\frac{4t}{\pi\tau}}\right) + \beta \right] \exp(-kt)$$

El porcentaje de error fue estimado de la siguiente manera:

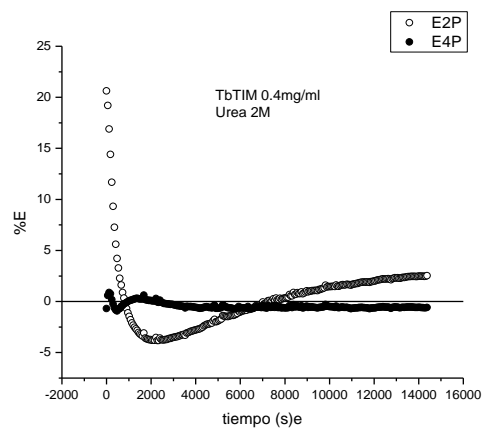
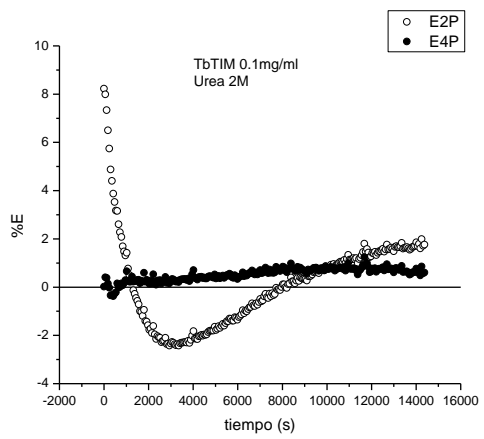
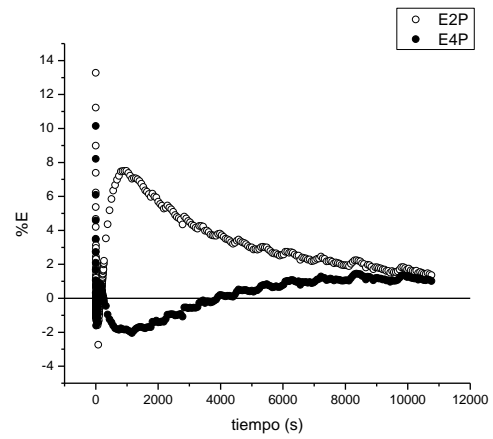
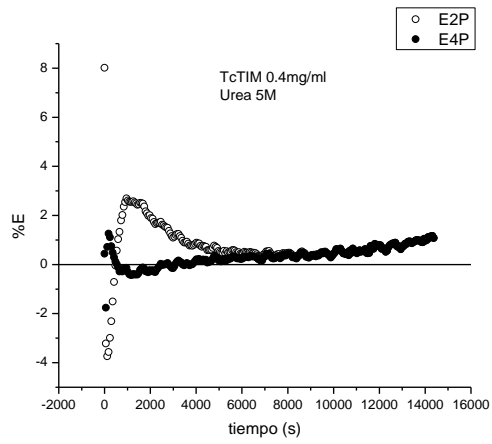
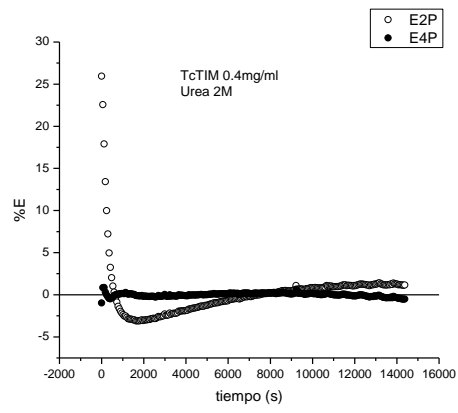
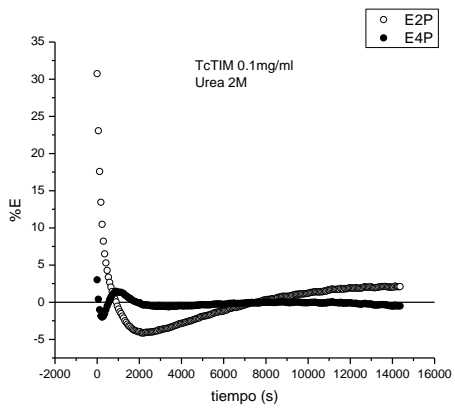
$$\% E = \frac{\sigma_{exp} - \sigma_{ajuste}}{\sigma_{ajuste}} \times 100$$

En las gráficas, se muestra con círculos vacíos el %E del ajuste con 2 parámetros ($\beta=k=0$) y en círculos negros el %E del ajuste con 4 parámetros (α, β, τ y k).

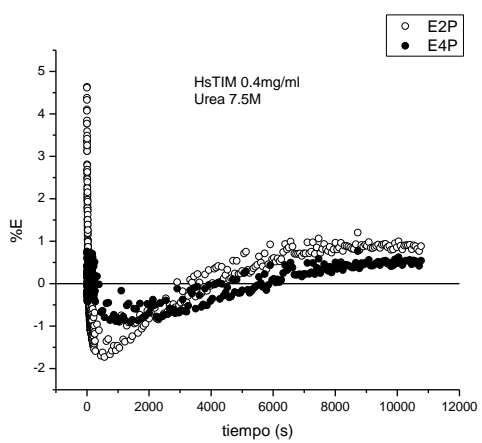
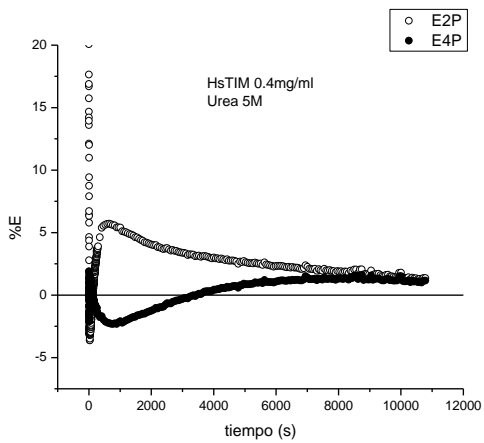
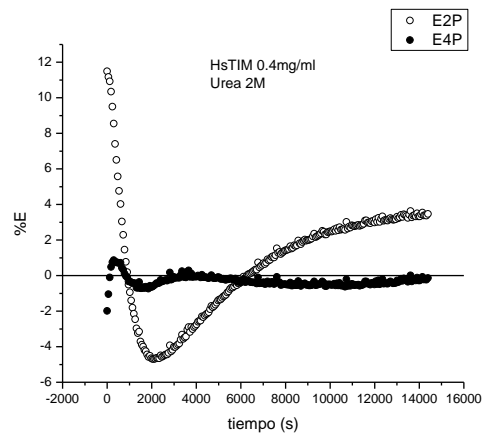
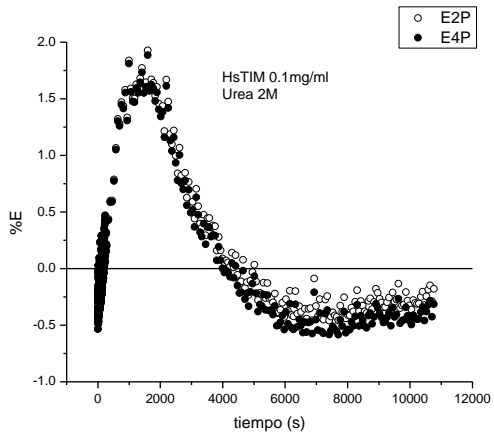
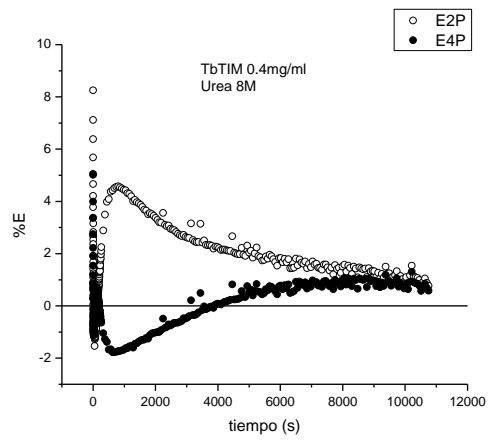
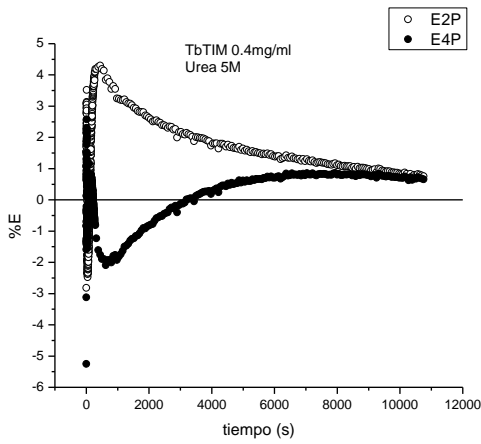
Apéndice 1



Apéndice 1



Apéndice 1



Apéndice 2

Cálculo de área accesible al disolvente (ASA)

Debido a la superficie irregular de una proteína, definir el área que está en contacto con el disolvente, en este caso agua, puede ser un poco complicado. Lo que se hace para estimarla es asumir que una esfera con un radio de 1.4 \AA , que representa una molécula de agua, se desliza sobre la superficie de la proteína, y a partir de esto, se determina la superficie de ésta a la cual tiene acceso el disolvente (figura A.1). Para calcular el área accesible al disolvente (ASA por sus siglas en inglés: Accessible Surface Area), se deben tener las coordenadas atómicas de la estructura y el radio de van der Waals de cada átomo dentro de ésta [Creighton, 1999; Kyte, 2007; Hermann, 1972].

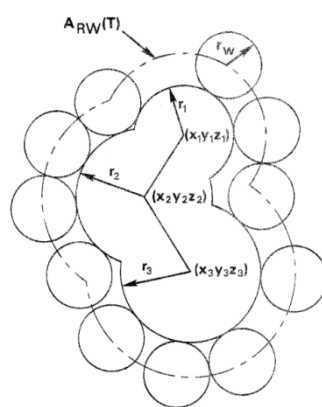


Figura A.1. Representación gráfica del cálculo de área accesible al disolvente, tomada de [Hermann, 1972]

En una proteína plegada, los residuos de los aminoácidos Phe, Leu, Ile y Met tienden a estar escondidos y en menor contacto con el disolvente por su baja polaridad, mientras que los grupos cargados de los residuos de Arg, Lys, His, Glu, y Asp tienden a estar más expuestos, debido a sus grupos polares y su posibilidad de interactuar con el agua [Creighton, 1999].

Los cálculos de área accesible al disolvente (ASA) para cada aminoácido dentro de la proteína en su estado nativo y como tripéptido se hicieron con el programa ASA-ENGG (obtenido por comunicación personal con J. M. Sánchez Ruiz, de la Universidad de Granada). Las coordenadas cristalográficas de cada proteína se tomaron del Protein Data Bank: 1tcd para TcTIM, 1tpf para TbTIM y 1wyi para HsTIM. Para hacer los cálculos, se consideraron parámetros ya reportados [Costas, 2009] como un radio de 1.4 Å para la molécula de disolvente y un radio de Van der Waals con dos mil puntos para los átomos de la proteína. Se considera para el cálculo de la proteína desplegada el tripéptido Gly-X-Gly para cada aminoácido X.

El programa da como resultado el área accesible al disolvente en Å² para cada átomo, por lo cual se hizo la suma del ASA de todos los átomos correspondientes a cada aminoácido para la proteína en estado nativo y desplegado. Posteriormente se dividió el valor del área del estado nativo entre la del estado desplegado para cada aminoácido y así obtener la relación R cuyos valores varían entre cero (aminoácido totalmente oculto en el estado nativo) y uno (aminoácido totalmente expuesto en el estado nativo).

Apéndice 3

Punto isoelectrico

Los puntos isoelectricos experimentales de las tres proteínas han sido reportados [Ostoa-Saloma, 1997; Chánez-Cárdenas, 2005; Borchert, 1993] y se muestran en la Tabla A.2. En esta misma tabla se proporcionan también los puntos isoelectricos estimados con diversos programas en la red, así como el valor promedio para cada proteína.

Tabla A.2.

	TcTIM	TbTIM	HsTIM	Referencia
Reportado	8.19 8.19	9.85 9.8	6.73	Ostoa-Saloma, 1997 Chánez-Cárdenas, 2005 Borchert, 1993 SWISS-2D PAGE
Calculado	8.61 8.52	9.4 9.05	6.91 6.93	Protein Isoelectric Point Calculator http://www.endmemo.com/bio/proie.php Protein calculator, http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html
Promedio	8.4	9.5	6.9	

Referencias

Adamson, A. W.; Gast, A. P.; PHYSICAL CHEMISTRY OF SURFACES, 6ª edición, John Wiley & Sons, E. U. A. 1997.

Angelova, A.; Ringard-Lefebvre, C.; Baszkin, A.; DRUG-CYCLODEXTRIN ASSOCIATION CONSTANTS DETERMINED BY SURFACE TENSION AND SURFACE PRESSURE MEASUREMENTS, J. Colloid Interface Sci. (1999) 212, 275–279.

Bello, M.; Pérez-Hernández, G.; Fernández-Velasco, D.A.; Arreguín-Espinosa, R.; García-Hernández, E.; ENERGETICS OF PROTEIN HOMODIMERIZATION: EFFECTS OF WATER SEQUESTERING ON THE FORMATION OF β -LACTOGLOBULIN DIMER, Proteins (2008) 70, 1475-1487.

Betts, M.J. R.B. Russell, R.B.; AMINO ACID PROPERTIES AND CONSEQUENCES OF SUBSTITUTIONS, Bioinformatics for Geneticists, M.R. Barnes, I.C. Gray eds, Wiley, 2003.

Borchert, T. V.; Pratt, K.; Zeelen, J.; Callens, M.; Noble, M.; Opperdoes, F.; Michels, P.; Wierenga, R., OVEREXPRESSION OF TRYPTOPHAN TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE IN *ESCHERICHIA COLI* AND CHARACTERISATION OF A DIMER-INTERFACE MUTANT, Eur. J. Biochem. (1993) 211, 703-710.

Chávez-Cárdenas, M.A.; Fernández-Velasco, D.A.; Vázquez-Contreras, E.; Coria, R.; Saab-Rincón, G.; Pérez-Montfort, R. UNFOLDING OF TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM *TRYPANOSOMA BRUCEI*: IDENTIFICATION OF INTERMEDIATES AND INSIGHT INTO THE DENATURATION PATHWAY USING TRYPTOPHAN MUTANTS. Arch. Biochem. Biophys. (2002) 399, 117–129.

Chávez-Cárdenas, M.A.; Pérez-Hernández, G.; Sánchez-Rebollar, B.J.; Costas, M; Vázquez-Contreras, E.; REVERSIBLE EQUILIBRIUM UNFOLDING OF TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM *TRYPANOSOMA CRUZI* IN GUANIDINIUM HYDROCHLORIDE INVOLVES STABLE DIMERIC AND MONOMERIC INTERMEDIATES, Biochemistry (2005) 44, 10883-10892.

Clustal W2, Herramienta de alineación de secuencias de proteínas <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, consultada por última vez el 26 de abril de 2013.

Costas, M.; Rodríguez-Larrea, D.; De Maria, L.; Borchert, T.V.; Gómez-Puyou, A.; Sanchez-Ruiz, J.M., BETWEEN-SPECIES VARIATION IN THE KINETIC STABILITY OF TIM PROTEINS LINKED TO SOLVATION-BARRIER FREE ENERGIES, J. Mol. Biol. (2009) 385, 924–937.

Creighton, T.E.; PROTEIN FOLDING, W. H. Freeman and Company, E.U.A. 1999.

Dickinson, E.; ADSORBED PROTEIN LAYERS AT FLUID INTERFACES: INTERACTIONS, STRUCTURE AND SURFACE RHEOLOGY; Colloids Surf. B Biointerfaces (1999) 15, 161-176.

Eastoe, J; Dalton, J., Rogueda, P; Sharpe, D.; Dong, J. INTERFACIAL PROPERTIES OF A CATIONIC SURFACTANT, Langmuir (1996) 12, 2706-2711.

Eastoe, J; Dalton, DYNAMIC SURFACE TENSION AND ADSORPTION MECHANISMS OF SURFACTANTS AT THE AIR WATER INTERFACE, Adv. Colloid and Interface Sci. (2000) 85, 103-144.

Fainerman, V.B.; Miller, R.; ADSORPTION AND INTERFACIAL TENSION ISOTHERMS FOR PROTEINS, PROTEIN AT LIQUID INTERFACES, Elsevier, 1999.

Fainerman, V.B.; Mobius, D.; Miller, R.; SURFACTANTS: CHEMISTRY, INTERFACIAL PROPERTIES, APPLICATIONS, Studies in interface science, Vol. 13. Elsevier, Holanda, 2001.

Fainerman, V.B.; Lylyk, S.V.; Aksenenko, E.V.; Petkov, J.T.; J. Yorke, J.; Miller, R.; SURFACE TENSION ISOTHERMS, ADSORPTION DYNAMICS AND DILATIONAL VISCO-ELASTICITY OF SODIUM DODECYL SULPHATE SOLUTIONS, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. (2010) 354, 8–15.

Garza-Ramos, G.; Pérez-Montfort, R.; Rojo-Dominguez, A.; Tuena, M.; Gomez-Puyou, A. SPECIES-SPECIFIC INHIBITION OF HOMOLOGOUS ENZYMES BY MODIFICATION OF NONCONSERVED AMINO ACIDS RESIDUES THE CYSTEINE RESIDUES OF TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE, Eur. J. Biochem. (1996) 241, 114-120.

Hermann, R.; THEORY OF HYDOPHOBIC BONDING II. THE CORRELATION OF HYDROCARBON SOLUBILITY IN WATER WITH SOLVENT CAVITY SURFACE AREA; J. Phys. Chem. (1972) 76, 2754-2759.

Joos, P. DYNAMIC SURFACE PHENOMENA, VSP, Holanda, 1999.

Kyte, J.; STRUCTURE IN PROTEIN CHEMISTRY, Garland Science, E.U.A., 2007.

Lozano, J. M.; Giraldoc, G. I.; Romero, C. M.; AN IMPROVED METHOD FOR ISOLATION OF B-LACTOGLOBULIN, Int. Dairy J. (2008) 18, 55–63.

Mainfroid, V.; Terpstra, P.; Beauregard, M.; Frère, J.M.; Mande, S.C.; Hol, W.G.J.; Martial, J.A.; Goraj, K.; Three hTIM Mutants that Provide New Insights on why TIM is a Dimer, J. Mol. Biol. (1996) 257, 441–456.

Maldonado, E.; Soriano-García, M.; Moreno, A.; Cabrera, N; Garza-Ramos, G.; Tuena, M.; Gomez-Puyou, A.; Pérez Montfort, R.; DIFFERENCES IN THE INTERSUBUNIT CONTACTS IN TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM TWO CLOSELY RELATED PATHOGENIC TRYPANOSOMES. J. Mol. Biol. (1998) 283, 193-203.

Madgassi, S.; Gardi, N.; (Bender, M. ed.) INTERFACIAL PHENOMENA IN BIOLOGICAL SYSTEMS, Surfactant Science Series, Cap. 12. Vol. 39. Marcel Dekker, E.U.A., 1991.

Magdassi, S.; SURFACE ACTIVITY OF PROTEINS, CHEMICAL AND PHYSICOCHEMICAL MODIFICATIONS, Marcel Dekker, E.U.A., 1996.

Manual Dataphysicsde tensiómetro Oca 20, INTRODUCTION INTO THE OPERATION OF THE OCA 20: MEASUREMENTS ACCORDING TO THE PENDANT DROP METHOD, Dataphysics instruments.

Martínez, M. A.; INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS Y POLISACÁRIDOS Y SU COMPORTAMIENTO SUPERFICIAL EN MEDIO ACUOSO, Tesis de licenciatura, Ingeniería Química, Facultad de Química UNAM, 2010.

Matsumura, Y. (Nnana, I.A. ed.) PROTEIN-BASED SURFACTANTS, Surfactant Science Series, Cap. 3. Vol. 101. Marcel Dekker, E.U.A., 2001.

Millar, T.J.; ELUCIDATE THE CONTRIBUTION OF PROTEINS TO TEARS. A CHALLENGE FOR RESEARCHERS. Arch. Soc. Esp. Oftalmol. (2006) 81, 187-190.

Olivares-Illana, V.; Pérez-Montfort, R.; López-Calahorra, F.; Costas, M.; Rodríguez-Romero, A.; Tuena de Gómez-Puyou, M.; Gómez Puyou, A., STRUCTURAL DIFFERENCES IN TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM DIFFERENT SPECIES AND DISCOVERY OF A MULTITRYPANOSOMATID INHIBITOR. Biochemistry (2006) 45, 2556-2560.

Ostoa-Saloma, P.; Garza-Ramos, G.; Ramirez, J.; Becker, I.; Berzunza, M.; Landa, A.; Gomez-Pouyou, A.; Tuena de Gomez-Pouyou, M.; Perez-Montfort, R., CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM *TRYPANOSOMA CRUZI*, Eur. J. Biochem. (1997) 244, 700-705.

Petsko, G.; Ringe, D.; PROTEIN STRUCTURE AND FUNCTION. New Science Press, Reino Unido, 2004.

Protein calculator <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>, consultada por última vez el 23 de septiembre de 2013.

Protein Isoelectric Point Calculator (ENDMEMO)

<http://www.endmemo.com/bio/proie.php>, consultada por última vez el 23 de Septiembre de 2013.

Ravera, F.; Liggieri, L.; Steinchen, A.; SORPTION KINETICS CONSIDERED AS A RENORMALIZED DIFFUSION PROCESS, J. Colloid Interface Sci. (1993) 156, 109-116.

Romero, C. M.; Albis, A., INFLUENCE OF POLYOLS AND GLUCOSE ON THE SURFACE TENSION OF BOVINE α -LACTALBUMIN IN AQUEOUS SOLUTION, J. Solution Chem. (2010) 39, 1865-1876.

Rotenberg, Y.; Boruvka, L.; Neumann, A.W.; DETERMINATION OF SURFACE TENSION AND CONTACT ANGLE FROM THE SHAPES OF AXISYMMETRIC FLUID INTERFACES, J. Colloid Interface Sci. (1983), 169-183.

Shaw, D. INTRODUCTION TO COLLOID AND SURFACE CHEMISTRY, Butterworth Heinemann, Gran Bretaña, 1992.

Shrivastava, S.; Dey, J.; INTERACTION OF ANIONIC SURFACTANT WITH POLYMERIC NANOPARTICLES OF SIMILAR CHARGE, J. Colloid Interface Sci. (2010) 350, 220–228.

Serrien, G.; Geeraerts, G., Gosh, L.; Joos, P., DYNAMIC SURFACE PROPERTIES OF ADSORBED PROTEIN SOLUTIONS: BSA, CASEIN AND BUTTERMILK, Colloids Surf. (1992) 68, 219-233.

Shirley, B. A.; PROTEIN STABILITY AND FOLDING. THEORY AND PRACTICE, Methods in molecular biology, Vol. 40, Humana Press, 1995.

Stryer, L., BIOCHEMISTRY, W.H. Freeman and Co., 3^a edición, USA 1988.

SWISS 2-D PAGE, Swiss Institute of Bioinformatics, ExPASy Bioinformatics Resource Portal, <http://world-2dpage.expasy.org/swiss-2dpage/> Consultado por última vez el 23 de septiembre de 2013.

Téllez-Valencia, A.; Olivares-Illana, V.; Hernández-Santoyo, A.; Pérez-Montfort, R.; Costas, M.; Rodríguez-Romero, A.; López-Calahorra, F.; Tuena de Gómez-Puyou, M.; Gómez-Puyou, A., INACTIVATION OF TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM TRYPANOSOMA CRUZI BY AN AGENT THAT PERTURBS ITS DIMER INTERFACE. *J. Mol. Biol.* (2004) 341, 1355–1365.

Touhami, Y.; Neale, G.H.; Hornof, V.; Khalfalah, H., A MODIFIED PENDANT DROP METHOD FOR TRANSIENT AND DYNAMIC INTERRACIAL TENSION MEASUREMENT; *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* (1996), 31-41.

Tyn, M.T.; Gusek, T.W., PREDICTION OF DIFFUSION COEFFICIENTS OF PROTEINS, *Biotechnol. Bioeng.* (1990) 35, 327-338.

Urea calculator, <http://depts.washington.edu/bakerpg/guhcl.html> consultada por última vez el 22 de Mayo de 2013.

Van der Vegt, W.; Norde, W.; Van der Mei, H.C.; Busscher, H.J.; KINETICS OF INTERFACIAL TENSION CHANGES DURING PROTEIN ADSORPTION FROM SESSILE DROPLETS ON FEP–TEFLON, *J. Colloid Interface Sci.* (1996) 179, 57–65.

Vázquez-Contreras, E.; Sánchez-Rebollar, B.G.; Chánez-Cárdenas, M.E.; The Equilibrium Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *T. cruzi* in Guanidinium Hydrochloride is a four State Process. *Intrinsic Fluorescence Studies, Rev. Soc. Quím. Méx.* (2004) 48, 296-299.

Viades-Trejo, J; Gracia-Fadrique, J.; CURVATURA Y TERMODINÁMICA, *Educ. Quím.* (2007) 18, 122-126.

Voet, D.; Voet, J.G. *BIOCHEMISTRY*, 2a edición, Wiley & Sons, USA 1995.

Ward, A. F. H.; Tordai, L.; TIME DEPENDENCE OF BOUNDARY TENSIONS OF SOLUTIONS. I. THE ROLE OF DIFFUSION IN TIME-EFFECTS, J. Chem. Phys. (1946) 14, 453-461.

Wierenga, R.K.; Noble, M.E.M.; Vriend, G.; Nauche, S. REFINED 1.83 Å STRUCTURE OF TRYPANOSOMAL TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE CRYSTALLIZED IN THE PRESENCE OF 2.4 M AMMONIUM SULPHATE, J. Mol. Biol. (1991) 220, 995-1015.

World Health Organization, página web de la organización mundial de la salud. Chagas disease (American trypanosomiasis),

http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html, consultada por última vez el 3 de Junio de 2013.