

(:entro de Investigación en Alimentación
Y Desarrollo, A. C.

*CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LA INTERACCIÓN
PROTEÍNA-CARBOHIDRATO EN DOS PROTEÍNAS DEL
CAMARÓN BLANCO, Penaeus vannamei*

Por

CLAUDIA LUCÍA VARGAS REQUENA

Tesis presentada por

para optar por el título de
DE ORIGEN ANIMAL.

Como requisito para obtener el Grado de

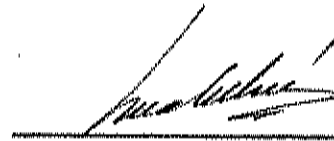
Magister en Nutrición y Alimentación

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la M. en C. Claudia Lucía Vargas Requena, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias, dentro del programa de Doctorado del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.



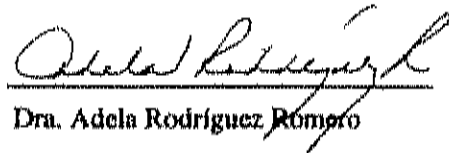
Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo
Director de Tesis



Dra. Ana María Calderón de la Barca



Dr. Francisco Goycoolea Valencia



Dra. Adela Rodríguez Romero

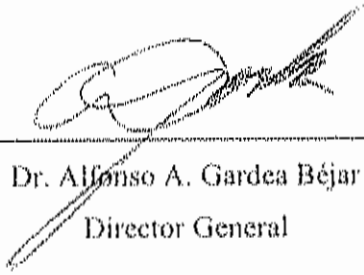


Dra. Alejandra Hernández Santoyo

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de este manuscrito con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A. C. (CIAD A.C.).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.



Dr. Alfonso A. Gardea Béjar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo proporcionado a través del proyecto 36928-B, "Caracterización estructural de lisozima y quitinasa sobreexpresada en *E. coli*".

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., quien a través del Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, me apoyó incondicionalmente en la realización de esta tesis.

Al Laboratorio de Bioquímica 3 perteneciente al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo brindado al permitirme el uso de instalaciones, reactivos y equipos para la realización de esta tesis.

Al Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el uso del equipo MALDI-TOF y de los estudios de cristalización y rayos X.

Mi más sincero agradecimiento a los miembros de mi comité de tesis. Al Dr. Rogerio Sotelo Mundo director, Dra. Ana María Calderón de la Barca, Dr. Francisco Goycoolea Valencia, Dra. Adela Rodríguez Romero y Dra. Alejandra Hernández Santoyo. Gracias por contribuir en mi formación tanto profesional como humana, por sus consejos, tiempo y paciencia, pero sobre todo su amistad son cosas que siempre valoraré.

A mi familia y amigos les agradezco su apoyo incondicional. Sin ustedes no habría podido alcanzar esta meta. Gracias.

CONTENIDO

	Página
INDICE DE TABLAS.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
INTERACCIÓN PROTEÍNA-CARBOHIDRATO.....	3
SISTEMA DE DEFENSA DEL CAMARÓN.....	5
<i>BGBP (proteína que une β-glucanos)/HDL (lipoproteína de alta densidad)</i>	<i>6</i>
<i>Lisozima.....</i>	<i>9</i>
TÉCNICAS BIOFÍSICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA CARBOHIDRATO.....	13
<i>Espectroscopía de dicroísmo circular.....</i>	<i>13</i>
<i>Dispersión dinámica de luz (DLS).....</i>	<i>15</i>
<i>Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).....</i>	<i>20</i>
<i>Cristalización de Proteínas.....</i>	<i>24</i>
<i>Fluorescencia.....</i>	<i>26</i>
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>29</i>
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
REACTIVOS.....	30
ANIMALES UTILIZADOS.....	30
OBTENCIÓN DE PLASMA.....	30
OBTENCIÓN DE LISOZIMA RECOMBINANTE.....	31
PURIFICACIÓN.....	31
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.....	32

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	
DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE).....	32
TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA.....	32
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LISOZIMA.....	33
<i>Actividad por halo de inhibición en placa</i>	33
<i>Actividad por método turbidimétrico</i>	33
SECUENCIACIÓN DE AMINO TERMINAL DE LISOZIMA.....	33
PUNTO ISOELÉCTRICO DE LISOZIMA.....	34
ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	34
ESPECTROSCOPÍA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD).....	34
CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC).....	35
DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS).....	36
CRISTALIZACIÓN.....	36
FLUORESCENCIA.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LISOZIMA.....	38
PURIFICACIÓN.....	38
MASA MOLECULAR Y AMINO TERMINAL.....	39
PUNTO ISOELÉCTRICO.....	40
EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA LISOZIMA	
DE CAMARÓN.....	40
DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS).....	42
<i>Quitotriosa</i>	42
<i>Temperatura</i>	43
<i>Cloruro de Sodio</i>	44
<i>Poli(etilenglicol) 10,000 (PEG 10,000)</i>	45
DICROÍSMO CIRCULAR.....	47
CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA.....	50
CRISTALIZACIÓN.....	52
CONCLUSIONES.....	55
MODELO TEÓRICO DE LA ACCIÓN DE LISOZIMA DE CAMARÓN	
CONTRA BACTERIAS GRAM (-).....	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE HDL/BGBP.....	58
PURIFICACIÓN.....	58
DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ.....	59

<i>pH</i>	59
<i>Temperatura</i>	59
<i>Polietilenglicol (PEG) 400 y 6,000</i>	60
<i>Cloruro de Sodio</i>	62
<i>Tritón X-100 y SDS</i>	63
<i>Calcio, Magnesio, Litio</i>	65
<i>Isopropanol y Etanol</i>	65
<i>Manitol, Sorbitol y Trealosa</i>	67
<i>Laminaribiosa</i>	68
DICROISMO CIRCULAR.....	69
FLUORESCENCIA.....	72
CRISTALIZACIÓN.....	73
CONCLUSIONES.....	75
MODELO TEÓRICO DE LA ACCIÓN DE LA HDL/BGBP EN SU INTERACCIÓN CON EL HEMOCITO DE CAMARÓN.....	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Rendimiento de la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico de lisozima de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> sobreexpresada en <i>E. coli</i>	39
Tabla 2. Comparación del contenido de estructura secundaria de lisozimas de invertebrados.....	48
Tabla 3. Contenido de estructura secundaria de la lisozima de camarón blanco al interactuar con diferentes concentraciones de quitotriosa.....	50
Tabla 4. Comparación de los parámetros termodinámicos de la interacción lisozima - quitotriosa para camarón blanco, clara de huevo de gallina y de ganso.....	52
Tabla 5. Condiciones de cristalización de la lisozima de camarón en presencia y ausencia de quitotriosa.....	54
Tabla 6. Contenido de estructura secundaria de la HDL/BGBP de camarón a diferentes concentraciones de laminorribiosa.....	71
Tabla 7. Condiciones de cristalización de la HDL/BGBP.....	74

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principio de la Dispersión Dinámica de Luz.....	15
Figura 2. Plano de dispersión y definición del ángulo de observación de la luz esparcida.....	17
Figura 3. Diagrama de Jablonski.....	27
Figura 4. Perfil de elusión de la lisozima recombinante de camarón blanco.....	38
Figura 5. Actividad específica de la lisozima de camarón a diferentes valores de pH.....	41
Figura 6. Efecto de la quitotriosa sobre el estado de agregación de la lisozima recombinante de camarón blanco.....	43
Figura 7. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la lisozima recombinante de camarón blanco.....	44
Figura 8. Efecto del cloruro de sodio sobre el estado de agregación de la lisozima recombinante de camarón blanco.....	45
Figura 9. Efecto del PEG 10, 000 sobre el estado de agregación de lisozima recombinante de camarón blanco.....	46
Figura 10. Espectro de dicroísmo circular de la lisozima de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> , en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7,0.....	47
Figura 11. Espectros de dicroísmo circular de lisozima de camarón blanco a diferentes concentraciones de quitotriosa.....	49
Figure 12. Perfil de la titulación de lisozima de camarón blanco con quitotriosa por ITC.....	51
Figura 13. Microfotografías de cristales de lisozima de camarón.....	53
Figura 14. Modelo propuesto de la forma en que actúa la lisozima de camarón blanco contra bacterias Gram (-).....	57
Figura 15. Gel de SDS-PAGE de HDL/BGBP de camarón blanco.....	58
Figura 16. Efecto del pH, temperatura y PEG 400 sobre el estado de agregación de la HDL/BGBP de camarón blanco.....	61
Figura 17. Efecto del cloruro de sodio sobre el estado de agregación	

de la HDL/BGBP de camarón blanco.....	62
Figura 18. Efecto del tritón X-100 y SDS sobre el estado de agregación de la HDL/BGBP de camarón blanco.....	64
Figura 19. Efecto del calcio y etanol sobre el estado de agregación de la HDL/BGBP de camarón blanco.....	66
Figura 20. Efecto de la trealosa sobre el estado de agregación de la HDL/BGBP de camarón blanco.....	67
Figura 21. Efecto de la laminorribiosa sobre el estado de agregación de la HDL/BGBP del camarón blanco.....	68
Figura 22. Espectros de dicroísmo circular de la HDL/BGBP de camarón blanco con diferentes concentraciones de laminorribiosa.....	70
Figura 23. Gráfica de porcentajes de hélices alfa y hojas beta de la HDL/BGBP de camarón blanco a diferentes concentraciones de laminorribiosa	71
Figura 24. Espectro de fluorescencia de la HDL/BGBP de camarón blanco en presencia y ausencia de cloruro de sodio.....	72
Figura 25. Microfotografía de cristales obtenidos de la HDL/BGBP.....	74
Figura 26. Modelo propuesto sobre la acción de la HDL/BGBP de camarón blanco al interaccionar con los beta-1,3-glucanos.....	76

RESUMEN

Se realizó la caracterización biofísica de la interacción proteína-carbohidrato de la HDL/BGBP (lipoproteína de alta densidad/proteína unidora de beta-glucanos) y lisozima de camarón blanco *Penaeus vannamei*. Las dos proteínas participan en el sistema de defensa de este crustáceo. La HDL/BGBP reconoce carbohidratos con uniones del tipo -1,3 y la lisozima hidroliza el enlace glucosídico -1,4, los cuales se encuentran en hongos y bacterias, respectivamente. La caracterización de estas proteínas se realizó mediante técnicas biofísicas como dispersión dinámica de luz, dicroísmo circular y calorimetría de titulación isotérmica. Además se usó el método de difusión de vapor en gota colgante para cristalizar ambas proteínas en ausencia y presencia de sus respectivos sustratos.

La lisozima recombinante de camarón se purificó por cromatografía de intercambio iónico y presentó dos picos máximos de actividad, a pH 5.0 y 9.0. La estructura secundaria de la lisozima a pH 7.0 es predominantemente hélices alfa (29 %), mientras que a pH 5.5 presenta una estructura con 24 % de hojas beta y 29 % de hélices alfa. El punto isoeléctrico es de 8.5 y su masa molecular de 17.1 kDa. El NaCl no altera considerablemente la agregación de la proteína y la quitotriosa disminuye su estado de agregación conforme se acerca a su saturación. Los cambios en estructura secundaria de la lisozima-quitotriosa muestran un incremento en el contenido de beta-plegados conforme se satura la proteína. La constante de asociación lisozima-quitotriosa presenta valores en un orden de magnitud mayor a los reportados para las lisozimas de gallina y de ganso. La cristalización de la lisozima se logró en presencia y ausencia de quitotriosa, utilizando condiciones diferentes a las reportadas para las lisozimas de diferentes fuentes cristalizadas a la fecha.

La HDL/BGBP disminuye su estado de agregación a 37°C, mientras el Tritón X-100 lleva a la proteína a un estado de agregación más bajo. La lisozima disminuye el estado de agregación de esta proteína, y además provoca que se exponga su sitio de unión. Se utilizó la quitotriosa como modelo de ligando para la HDL/BGBP y se observó que se forman agregados en el estado de agregación de la proteína. Este método se utilizó para observar los cambios de estructura secundaria de la HDL/BGBP al interactuar con la quitotriosa. También se obtuvieron los microcristales de esta lipoproteína,

INTRODUCCIÓN

El camarón es uno de los recursos marinos que más divisas aporta al país. Las principales pesquerías de camarón se ubican en los estados de Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Campeche. Entre las principales especies de interés comercial en el Pacífico se encuentra el camarón blanco, *Penaeus vannamei*. En México al igual que otros países, la incapacidad de satisfacer la demanda de camarón tanto en el mercado nacional como internacional es cada vez más alarmante. Esto se une a la amenaza de extinguirlo mediante su captura excesiva. Por esto se ha impulsado el desarrollo de su cultivo, principalmente en el noroeste de México (Anónimo, 2005). El cultivo de camarón en México inició hacia 1985, convirtiéndose en una actividad de trascendental importancia económica y social. Actualmente, es la principal industria acuícola del país, y los estados de Sinaloa y Sonora se han convertido en los líderes de producción. En Sonora, según un reporte del Comité Estatal de Sanidad Acuicola, se cuentan con 14,000 Ha dedicadas a la siembra y cultivo de este crustáceo (Anónimo, 2000; 2004 y 2005).

El problema más serio que presenta la industria camaronícola dedicada al cultivo de camarón es la presencia y diseminación de enfermedades. A nivel mundial, las enfermedades infecciosas han causado grandes pérdidas económicas y el cierre de granjas en Asia y América. El mal manejo sanitario general de una granja puede causar pérdidas tan importantes como las provocadas por los virus. La deficiencia en la limpieza del estanque, mala circulación del agua, ambiente estresante, son solo algunas condiciones en las que se pueden involucrar diversos parásitos (bacterias filamentosas y protozoos), (Anónimo, 2000). Los avances en higiene, reproducción, epidemiología y otras áreas de estudio, no han evitado que las enfermedades en camarón continúen siendo un problema crucial. Esto básicamente porque la respuesta fisiológica del crustáceo depende además de factores internos, como son las condiciones de salud y nutrición (Anónimo, 2005). Por esta razón, los estudios sobre las macromoléculas que participan en los diferentes procesos biológicos del camarón son cada vez más importantes. Así como la urgencia por definir

quiénes son estos componentes, cómo, cuándo y dónde interactúan con las diferentes macromoléculas presentes en su entorno.

De ahí que el objetivo primordial de este trabajo sea el de caracterizar biofísicamente a dos proteínas que interactúan con carbohidratos. Esta interacción les permite desempeñar una importante función en el sistema de defensa del camarón blanco, *Penaeus vannamei*. En los invertebrados marinos no se ha detectado una respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas específicas (Vargas-Albores *et al.*, 1997). Sin embargo, estos organismos cuentan con un sistema rápido y eficiente de defensa innata celular mediante fagocitosis, formación de nódulos y encapsulación. También, son capaces de detectar y responder a los antígenos de la pared celular de microorganismos como son lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos y β -glucanos, a través de proteínas de reconocimiento (Soderhall *et al.*, 1979; Vargas-Albores *et al.*, 1997). Una de las proteínas a estudiar es la proteína bifuncional HDL (lipoproteína de alta densidad)/BGBP (proteína que se une a beta glucanos). Esta participa en el transporte de lípidos desde el sitio de absorción al sitio de almacenamiento, síntesis y utilización. También actúa como proteína de reconocimiento de β -1,3-glucanos en el sistema de defensa del camarón. Una vez que la HDL/BGBP reconoce al glucano favorece la degranulación de los hemocitos, liberando así el sistema profenol oxidasa (proFO).

La otra proteína a caracterizar es la lisozima, la cual al igual que la HDL/BGBP, participa en el sistema de defensa del camarón. Actúa como enzima bacteriolítica ya que rompe carbohidratos con uniones del tipo β -1,4, NAM-NAG, presentes en la membrana celular de las bacterias Gram (+). También se ha encontrado que la lisozima de camarón blanco tiene la capacidad de actuar contra bacterias Gram (-) (de la Re-Vega *et al.*, 2005).

La interacción de cada una de las dos proteínas con carbohidratos ocurre en la hemolinfa del camarón, la cual tiene una concentración de 0.45 M de cloruro de sodio. De ahí que en este trabajo también se plantee el evaluar el efecto del NaCl sobre la interacción proteína-carbohidrato para estas dos proteínas.

ANTECEDENTES

Interacción proteína-carbohidrato

Los carbohidratos son los principales componentes de la superficie de muchas células. En su forma de macromoléculas, tienen la capacidad de codificar información biológica y actuar como banderas de identificación celular (Elgavish y Sanan, 1998). Por lo que los carbohidratos son reconocidos como determinantes antigénicos y marcadores de la diferenciación. La evidencia experimental implica directamente a los carbohidratos complejos en procesos de reconocimiento específico y adhesión entre células y a la matriz extracelular (Nangia-Makker *et al.*, 2002). Existen proteínas que interactúan específicamente con carbohidratos mediando una variedad de actividades biológicas, las cuales ocurren solo si estas dos macromoléculas entran en contacto (Qasba, 2000). Estas actividades biológicas van desde la fertilización, pasando por embriogénesis y maduración de tejido, y extendiéndose a procesos patológicos como es la metástasis tumoral (Aboitiz *et al.*, 2004).

Las proteínas que unen carbohidratos pueden interaccionar con oligosacáridos de diversos tamaños. La afinidad de unión para estos azúcares se incrementa por la contribución de subsitios de unión presentes en la proteína. Estos subsitios acomodan los residuos monosacáridos individuales del oligosacárido (Lammerts van Bueren y Boraston, 2004). El conocimiento de las interacciones proteína-carbohidrato deriva de estudios estructurales que involucran lectinas de leguminosas, anticuerpos, proteínas de unión periplásmicas y complejos enzima-sacárido. En la formación y estabilización de los complejos proteína-carbohidrato se aprecia el papel importante de los puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, presencia de moléculas de agua y algunos iones como el calcio. Estos avances han sido posibles mediante estudios de mutagénesis dirigida en el sitio de unión, observándose en algunos casos que la especificidad de la proteína por el carbohidrato cambia por la sustitución de sólo dos aminoácidos (Bourne *et al.*, 1993).

Las proteínas que se unen a carbohidratos han sido clasificadas en dos grandes grupos en base a la exposición hacia el solvente de sus sitios de unión al carbohidrato (Quijoch, 1989; Rini, 1995; Elgavish y Sanan, 1998). En las proteínas del grupo I, estos sitios están localizados en hendiduras profundas y la unión deja poco o nada del ligando expuesto al solvente. Los carbohidratos unidos por esta clase de proteínas son de alta afinidad, típicamente con constantes de disociación sub-micromolares. En este grupo se incluyen las proteínas de unión al periplasma bacteriano y ciertas enzimas que actúan sobre glucanos (Weiss, 1996). En contraste, los sitios de unión de las proteínas del grupo II, tienden a estar en la superficie de la proteína y son hendiduras poco profundas. Las lectinas e inmunoglobulinas se encuentran incluidas en este grupo. Las afinidades de unión son más bajas que para las proteínas del grupo I, por ejemplo, las lectinas generalmente tienen constantes de disociación en el rango milimolar. Las diferencias entre estos dos grupos se reflejan sobre todo en el número de los contactos formados y en el grado de exclusión del agua dentro de los sitios de unión (Weiss, 1996; Elgavish y Sanan, 1998; Popescu *et al.*, 2003).

La interacción proteína-carbohidrato en las proteínas periplásmicas (grupo I) se basa en la formación de puentes de hidrogeno, incluyendo al grupo hidroxilo. La interacción de estas proteínas con el carbohidrato produce un cambio conformacional en el que se excluye a la pentosa o hexosa del solvente. El gran número de puentes de hidrógeno formados en el sitio de unión se correlaciona con valores elevados de las constantes de asociación. También provoca la expulsión de cantidades grandes de moléculas de agua cuando la proteína se cierra alrededor del ligando. Todo esto crea un ambiente adecuado para proporcionar una afinidad alta entre esta clase de proteínas y el carbohidrato (Weiss, 1996).

La interacción de lectinas (grupo II) con carbohidratos también se basa en la formación de puentes de hidrógeno, pero exponiendo al solvente una porción significativa del anillo del azúcar. Esto permite el reconocimiento de sustituciones diferentes en las posiciones particulares del anillo. Las estructuras conocidas de lectinas exhiben una gama diversa de arquitecturas tridimensionales. Sin embargo, los papeles paralelos jugados por el subsitio y la multivalencia de la subunidad, proporcionan un marco para entender las bases estructurales de las interacciones de lectinas-carbohidratos. Las subunidades y la

multivalencia del subsitio son los dos mecanismos que confieren especificidad a la interacción entre estas proteínas y el carbohidrato. Este último puede ser macromolecular o un simple monómero de carbohidrato. En la interacción lectina-carbohidrato tienen un papel muy importante el solvente, la conformación y la flexibilidad del oligosacárido (Rini, 1995). La interacción proteína-carbohidrato es la base de la función biológica de algunas proteínas que participan en el sistema inmune de un gran número de organismos.

Sistema de defensa del camarón

Inmunidad es el conjunto de reacciones dirigidas a la eliminación de sustancias extrañas a través de factores humorales y celulares, que protegen al organismo contra las agresiones infecciosas, parasitarias y proliferaciones malignas. Mediante este sistema, el organismo puede detectar y combatir componentes extraños o moléculas no propias. En los vertebrados, la defensa inmune incluye memoria adaptativa, inmunoglobulinas específicas y células especializadas; así como respuesta no específica a través de células fagocíticas (Bach y Lesavre, 1983). En los invertebrados marinos no se ha detectado una respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas específicas (Vargas-Albores *et al.*, 1997). Sin embargo, estos organismos cuentan con un sistema rápido y eficiente de defensa innata celular mediante fagocitosis, formación de nódulos y encapsulación. Además, mediante proteínas de reconocimiento son capaces de detectar y responder a los antígenos de la pared celular microbiana como son lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos y β -glucanos (Soderhall y Uncstam, 1979; Vargas-Albores *et al.*, 1997).

El sistema de la profenoloxidasa (proFO) es uno de los principales componentes del sistema de defensa humoral en invertebrados (Johansson y Soderhall, 1989; Ashida, 1990; Yoshida *et al.*, 1996). Este se compone por una cascada enzimática que culmina en la formación de melanina y sus precursores (Soderhall, 1982; Ratcliffe *et al.*, 1985). El componente principal de este sistema es la enzima proFO (Johansson y Soderhall, 1989). Esta enzima se encuentra localizada en el interior de los hemocitos granulares de los crustáceos (Smith y Soderhall, 1983; Johansson y Soderhall, 1989; Gollas-Galván *et al.*, 1999), aunque también se ha detectado de forma libre en el plasma de insectos (Saul *et al.*,

1987). El sistema proFO puede ser activado por proteínas de reconocimiento ante la presencia de lipopolisacárido (LPS) (Johansson y Soderhall, 1992) o β -glucanos de la pared celular de hongos y de algunas microalgas (Saul *et al.*, 1987; Soderhall *et al.*, 1988). Estos compuestos favorecen la degranulación de los hemocitos, liberando así la proFO que se transforma en fenoloxidasa (FO) por la acción de la enzima activadora de la proFO (EaproFO) (Ashida y Soderhall, 1984; Gollas-Galván *et al.*, 1999). La FO cataliza la oxidación de fenoles a quinonas, las cuales continúan oxidándose hasta la formación de melanina. Ésta se deposita alrededor de partículas extrañas encapsuladas, en nódulos de hemocitos y en sitios de infección causada por hongos en la cutícula del exoesqueleto, constituyendo así una barrera de defensa importante (Rowley y Rahmet-Alla, 1990; Soderhall *et al.*, 1994; Vargas-Albores *et al.*, 1998). En el grupo de las proteínas de reconocimiento que desencadenan el sistema de la proFO se encuentra la HDL/BGBP.

BGBP (proteína que une β -glucanos)/ HDL (lipoproteína de alta densidad)

La BGBP es una lipoglicoproteína que reconoce carbohidratos β -1,3-glucanos presentes en la pared celular de los hongos (Saul *et al.*, 1987). Esta proteína ha sido purificada en dos insectos: *Blaberus craniifer* (Soderhall *et al.*, 1988) y *Bombyx mori* (Ochiai y Ashida, 1998) y en tres crustáceos: *Pacifastacus leniusculus* (Duvic y Soderhall, 1990), *Penaeus californiensis* (Vargas-Albores *et al.*, 1996) y *Penaeus vannamei* (Vargas-Albores *et al.*, 1997). Este tipo de proteína también se ha identificado en crustáceos como los langostinos de agua dulce *Astacus astacus* y *Procambarus clarkii* (Duvic y Soderhall, 1993), así como el cangrejo marino, *Carcinus maenas* (Thornqvist *et al.*, 1994).

Una vez que la BGBP interacciona con los beta-glucanos, el complejo adquiere la capacidad de unirse a un receptor en la membrana celular de los hemocitos (Barraco, *et al.*, 1991). Esto favorece la degranulación de hemocitos, lo cual incrementa la activación del sistema de la proPO (Vargas-Albores, 1995), así como las actividades opsonicas (Johansson y Soderhall, 1992; Vargas-Albores, 1995). Se propone que el receptor para el complejo proteína-carbohidrato está más involucrado en la respuesta de defensa que con el transporte de lípidos (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). La BGBP de *P. vannamei*

y de *P. californiensis* pesa de 100 a 125 kDa y su composición de aminoácidos es similar entre ellas. Ambas son glicoproteínas que contienen manosa, glucosa y N-acetil glucosamina (Vargas-Albores *et al.*, 1997). Además, la BGBP tiene la capacidad de unirse a heparina, por lo que se le considera una HBP (del inglés "*Heparin Binding Protein*") (Jiménez-Vega *et al.*, 2002). Esta proteína también se conoce con el nombre de HDL (lipoproteína de alta densidad) por su participación en el transporte de lípidos dentro del camarón blanco.

Los lípidos en la hemolinfa se encuentran como un complejo soluble en medio acuoso mediante la interacción apoproteína – lípido, llamado lipoproteína. Estos complejos transportan lípidos desde los sitios de absorción, almacenamiento o síntesis a los sitios de utilización (Mathews y van Holde 1997). Se clasifican en base a su densidad como: VLDL (lipoproteína de muy baja densidad), < 1.006 g/mL; LDL (lipoproteína de baja densidad), 1.006 - 1.06 g/mL; HDL (lipoproteína de alta densidad), 1.06 - 1.21 g/mL y VHDL (lipoproteína de muy alta densidad), > 1.21 g/mL (Teshima y Kanazawa, 1980; Lee, 1991). La HDL y la VHDL son las más abundantes en crustáceos (Lee, 1991; Spaziani y Wang, 1991; Stratakis *et al.*, 1992; Komatsu *et al.*, 1993).

Las lipoproteínas de invertebrados están constituidas por un máximo de tres polipéptidos, por lo que se les clasifica como apolipoproteínas simples (Kanost *et al.*, 1995). En crustáceos existen dos clases de lipoproteínas, las relacionadas con la reproducción y las involucradas con la nutrición. Las lipoproteínas reproductivas o vitelogeninas se encuentran sólo en la hemolinfa de las hembras maduras y su función es transportar lípidos del hepatopáncreas hacia el ovario (García-Orozco *et al.*, 2002). Las lipoproteínas presentes en organismos de ambos sexos cumplen la función nutricional, transportan lípidos del hepatopáncreas hacia los tejidos de utilización, como el músculo (Lee, 1991). De acuerdo a su densidad, estas lipoproteínas se clasifican como VHDL y HDL. Hall y colaboradores (1995), encontraron que la HDL y VHDL en el plasma de *Pacifastacus leniusculus* correspondían a dos proteínas involucradas en el reconocimiento de partículas extrañas y en la coagulación, descritas previamente como BGBP y CP (proteína de coagulación), respectivamente. Lo mismo se encontró para la VHDL del langostino de arena (Komatsu y Ando, 1998) y para los camarones marinos *P. vannamei* y

P. californiensis, donde la HDL también se identificó como BGBP (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998).

La HDL de camarón blanco es una lipoglicoproteína con densidad de 1.15 g/mL, de 125 kDa y punto isoeléctrico de 5.8 (Sotelo-Mundo, 1993; Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995). Contiene aproximadamente un 57 % de lípidos, los cuales están compuestos por 43 % de fosfolípidos, 9.5 % de acilgliceroles, 4.8 % de esteroides y trazas de ácidos grasos libres (Ruiz-Verdugo *et al.*, 1997). La secuencia del extremo amino terminal y su contenido total de aminoácidos son muy similares a las reportadas para *P. californiensis* (Ruiz-Verdugo *et al.*, 1997; Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998) y *Pacifastacus lentusculus* (Cerenius *et al.*, 1994). También se encontró una reactividad cruzada con anticuerpos antiHDL y antiBGBP (Ruiz-Verdugo *et al.*, 1997). En base a todo lo anterior se dedujo que BGBP y HDL son la misma proteína y se le conoce como la proteína bifuncional HDL/BGBP (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998).

Más recientemente se ha caracterizado biofísicamente a la HDL/BGBP. Mediante técnicas de dicroísmo circular se ha determinado que su estructura secundaria está compuesta por un 53 % de hoja beta (37 % antiparalelas y 16 % paralelas), un 20 % de hélices alfa y el porcentaje restante formado por lazos y estructura no ordenada (Vargas-Requena, 2001; Vargas-Requena *et al.*, 2002). Por otro lado, las constantes de disociación entre HDL/BGBP y carbohidratos tipo beta-glucano como laminarribiosa, o del tipo sulfatados como heparina, tienen valores en el orden de concentración micromolar. Además, la HDL/BGBP interactúa con membranas de fosfolípidos, generando procesos de agregación similares a los observados en LDL de humanos. Sin embargo, aún no se ha elucidado si dicho proceso involucra la fusión de membranas o es únicamente debido a agregación de vesículas (Vargas-Requena *et al.*, 2002).

La secuencia aminoacídica de la HDL/BGBP deducida a partir de su cDNA contiene un marco de lectura abierta de 1454 aminoácidos (Romo-Figueroa *et al.*, 2004). Incluida en esta secuencia se encuentra la del amino terminal y tres secuencias internas de aminoácidos, obtenidas por digestión trípica (GenBank AY249858). El primer residuo de metionina se encuentra a 197 residuos en el lado opuesto al amino terminal, y no tiene una

secuencia de péptido señal consenso (Romo Figueroa *et al.*, 2004). La secuencia amino terminal de la HDL/BGBP es una región muy conservada entre los camarones peneidos (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998; Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998) y el cangrejo de agua dulce (Cerenius *et al.*, 1994). En esta secuencia se encontraron cuatro probables sitios de O-glicosilaciones y cinco de N-glicosilaciones. La identidad de esta secuencia de HDL/BGBP con la del cangrejo de agua dulce (Cerenius *et al.*, 1994) es del 54 % y considerando reemplazos conservados tiene una similitud del 73 % (Romo-Figueroa *et al.*, 2004). En la secuencia de BGBP de *Pacifastacus leniusculus* se han encontrado dos secuencias de dominios de glucanasa, aunque no se ha detectado la actividad correspondiente en esta proteína (Cerenius *et al.*, 1994). Estas regiones se encuentran también en la secuencia de HDL/BGBP del camarón blanco, la cual corresponde a los residuos 456-476 y 911-931 (Romo-Figueroa *et al.*, 2004).

El análisis computacional de la estructura secundaria de la HDL/BGBP deducida del cDNA da valores de 50.2 % hojas beta, 10.5 % hélices alfa y 39.3 % de otras estructuras (Romo-Figueroa *et al.*, 2004). Esto coincide con lo determinado experimentalmente para la proteína obtenida de la hemolinfa de camarón (Vargas-Requena *et al.*, 2002). Estos contenidos de estructura secundaria también son similares a los que presentan las lipoforinas de alta densidad de insectos. En estas últimas se encuentran secuencias similares a integrina y dominios de glucanasa, que son fundamentales como proteínas de reconocimiento de peptidoglucanos involucrados en la inmunidad innata. Así se explica de forma parcial, la relación estructura- bifuncionalidad de la HDL/BGBP de camarón blanco *P. vannamei* (Romo-Figueroa *et al.*, 2004).

Lisozima

La lisozima (E.C. 3.2.1.17) es otra proteína que participa en el sistema de defensa del camarón y que además interacciona con carbohidratos para desempeñar su función biológica. Descubierta por Fleming en 1922, es una enzima con capacidad bacteriolítica, presente en tejidos y secreciones. Esta enzima ha sido clasificada en base a las propiedades físicoquímicas, estructura primaria, masa molecular y fuentes biológicas. Existen diversos

tipos basados en su origen y secuencia: lisozima de gallina (tipo c), de ganso (tipo g), de fagos (tipo f), plantas, hongos e invertebrados (tipo l) (Jolles y Jolles, 1984). La lisozima presente en huevo de gallina fue la primera proteína de la cual se obtuvo la secuencia total de aminoácidos (Jolles y Jolles, 1961; Jolles *et al.*, 1963; Canfield, 1963). También fue la primera de la cual se propuso un mecanismo de acción detallado (Phillips, 1966), así como su estructura tridimensional, mediante difracción de rayos X (Blake, 1965).

La interacción de la lisozima con su carbohidrato específico, formado por seis unidades del oligosacárido formado NAG-NAM, se lleva a cabo debido a que su sitio activo se compone de seis sitios de unión, denominados A, B, C, D, E y F. La hidrólisis del polisacárido se lleva a cabo entre los subsitios D y E del sitio activo de la lisozima. El resto de los subsitios se han identificado como necesarios para la unión del sustrato durante la catálisis (Blake, 1965; Phillips, 1966). La lisozima se ha establecido como una proteína modelo ampliamente utilizada en estudios fisicoquímicos, inmunológicos y evolutivos (Jolles y Jolles, 1984), y aún es bastante estudiada en otras especies por su importancia como agente antibacteriano.

Bioquímicamente, la lisozima se define como una β -1,4-N-acetilmuramidasa que rompe el enlace glicosídico entre el carbono C1 del ácido N-acetilmurámico y el carbono C4 de la N-acetilglucosamina. Estos carbohidratos se encuentran en el peptidoglicano de bacterias Gram (+) como *Micrococcus luteus*, por lo cual se dice que la lisozima tiene un efecto bactericida. Algunas lisozimas también presentan actividad de quitinasa, la cual corresponde a una hidrólisis aleatoria de uniones β -1,4-N-acetilglucosamina en la quitina (Jolles y Jolles, 1984). Por otra parte, se ha sugerido que la lisozima además desempeña una función en procesos digestivos en algunos insectos y rumiantes (Lemos y Terra, 1991; Kylsten *et al.*, 1992; Mulnix y Dunn, 1994). En frutos y raíces, se postula que participa en la defensa contra el ataque de hongos que contienen quitina en su pared celular (Jolles y Jolles, 1984).

La lisozima es ubicua desde virus hasta humanos: se encuentra en la clara del huevo de gallina (Eshdat y Sharon, 1977), lágrimas de humano (Eshdat y Sharon, 1977; Morsky y Aine, 1983), suero de peces (Smith *et al.*, 2000) y saliva de insectos (Hultmark, 1996). Se

ha clasificado como un agente antifúngico efectivo y antibacteriano (Germaine y Tellefson, 1986; Samaranyake *et al.*, 2001). Recientemente se encontró que la lisozima presente en orina humana muestra actividad contra el virus de inmunodeficiencia humana (anti-VIH), (Lee-Huang *et al.*, 1999), y también se ha utilizado para la síntesis de derivados de quitooligosacáridos (Akiyama *et al.*, 1995; Lee y Yang, 2002). Aunque se encuentra en la gran mayoría de los organismos, los estudios solo se han realizado con lisozimas de vertebrados. En contraste, aunque se conocen las secuencias de DNA de lisozimas de varias especies de invertebrados, solo se han analizado pocas de sus características fisicoquímicas y estructurales (Matsuura *et al.*, 2002).

La actividad de lisozima en insectos fue detectada primeramente en miel de abeja (Mohrig y Messner, 1968). Posteriormente se ha aislado y estudiado a partir de la hemolinfa de varios insectos (Hultmark *et al.*, 1980; Engstrom *et al.*, 1984; Kaaya y Darji *et al.*, 1988) y bivalvos (Cheng y Rodrick, 1974; Foley y Cheng, 1977; Cheng y Butler, 1979). Estas lisozimas tienen cerca del 40 % de identidad con las lisozimas de gallina y humano, así como una homología del 75 % entre las de insectos (Jolles *et al.*, 1979; Sangki y Yonggyun, 2003). La comparación se basó en la secuencia amino terminal del gen de la lisozima de *Hyalophora cecropia* (Hultmark *et al.*, 1980), *Bombyx mori* (Abraham *et al.*, 1995), *Galleria mellonella* (Powning y Dabidson, 1976), *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, *Samia cynthia ricino* (Fujimoto *et al.*, 2001), *Manduca sexta* (Spies, *et al.*, 1986), *Drosophila melanogaster* (Regel *et al.*, 1998), *Musca domestica* (Ito *et al.*, 1995), *Aedes aegypti* (Rossignol y Lueders, 1986) y *Heliothis virescens* (Jockey y Ourth, 1996). En base a las secuencias consenso de los sitios activos de la lisozima de insectos y la lisozima tipo c, se sugiere que todas ellas tienen un mecanismo de acción similar contra las bacterias (Jain *et al.*, 2001).

En *Bombyx mori*, se ha determinado la secuencia codificante del gen de lisozima (BmLZ) y se ha construido dentro de un sistema de expresión (Lee y Brey, 1995; Masaka *et al.*, 2001; Koganesawa *et al.*, 2001). Esta lisozima tiene 119 aminoácidos y su peso molecular es de 13.8 kDa aproximadamente, lo cual indica una delección de 9 ó 10 aminoácidos en comparación con otras lisozimas de vertebrados. El nivel de identidad entre la secuencia de BmLZ y HEWLZ es de aproximadamente el 40 %. Estos niveles de

identidad entre lisozimas de vertebrado e invertebrado implica la posibilidad de diferencia entre sus características estructurales, pero no en la función. La caracterización de la BmLZ se realizó al obtener su estructura tridimensional por difracción de rayos X de un cristal de la proteína (Matsuura *et al.*, 2002). Con unas pocas excepciones (Powring y Davidson, 1976; Kwan *et al.*, 1985), las lisozimas de insectos son todas básicas, estables al calor a pH ácido, exhiben su actividad máxima entre pH 5.5 y 6.5, y tienen masa molecular en un intervalo de 14 a 16.5 kDa (Powring y Davidson, 1973; Hultmark *et al.*, 1980; Kwan *et al.*, 1985; Hietter *et al.*, 1989). Éstas se encuentran presentes en hemolinfa (Dunn y Bruce, 1973; Powring y Davidson, 1976; Hultmark *et al.*, 1980; Jones *et al.*, 1989) o en hemocitos (Cook *et al.*, 1985; Hietter *et al.*, 1989; Sangki y Yonggyun, 2003).

La presencia de actividad hemolítica causada por lisozima en células libres se ha identificado en la hemolinfa de *P. vannamei* (Gray *et al.*, 1996; Noga *et al.*, 1996; Alabi *et al.*, 2000), así como en seis especies de crustáceos de agua dulce (Fenouíl y Roch, 1991). El reporte de una etiqueta de gen expresado (EST de sus siglas en inglés Expressed Sequence Tag) de *P. vannamei* similar a lisozima (número de acceso BE188312), (Gross *et al.*, 2001), confirmó su presencia y expresión en camarón. Posteriormente, se identificó la región codificante de la lisozima de camarón blanco mediante PCR (Sotelo-Mundo *et al.*, 2003), (GenBank AF425673) y actualmente se ha logrado su sobreexpresión en *Escherichia coli* (de la Re-Vega *et al.*, 2004). Las diferencias a nivel de secuencia de la lisozima de camarón se refleja en su capacidad de actuar sobre bacterias Gram (-) como las del género *Vibrio*, el cual es patógeno para camarón (Hikima *et al.*, 2003; de la Re-Vega, 2005). En el estudio de las interacciones proteína-carbohidrato, los análisis de rayos X, RMN, modelación molecular, estudios calorimétricos y biofísicos, se han utilizado para obtener más detalles estructurales y termodinámicos sobre estas interacciones.

Técnicas biofísicas empleadas en el estudio de las interacciones proteína-carbohidrato

La función de las proteínas depende de su secuencia de aminoácidos y de su estructura tridimensional (Mathews y van Holde, 1997). La caracterización bioquímica y fisicoquímica de proteínas ha sido muy útil para entender la función de estas macromoléculas biológicamente activas. Además, existe el interés de conocer la influencia de los factores externos en la estabilidad de las proteínas como una herramienta en el diagnóstico de la integridad de la estructura. El análisis de la secuencia primaria de una proteína permite predecir posibles sitios de modificaciones postraduccionales, como glicosilación, procesamiento del extremo amino terminal y fosforilación. Esta secuencia se puede determinar mediante el mapeo peptídico, o deducir mediante el análisis de la secuencia del DNA que lo codifica (Matsudaira, 1993; Baxevanis y Ouellette, 2004). La determinación de estructura secundaria y terciaria de proteínas requiere del uso de técnicas experimentales, debido a que computacionalmente aún no es posible predecir la estructura de cualquier secuencia de aminoácidos. Las técnicas espectrométricas y calorimétricas, constituyen una metodología para la caracterización fisicoquímica de proteínas obtenidas de forma nativa o recombinante. La combinación de la calorimetría diferencial de barrido, el dicroísmo circular, la fluorescencia y la resonancia magnética nuclear, han servido para evaluar la estabilidad conformacional de proteínas en general (Matsudaira, 1993).

Espectroscopía de dicroísmo circular (CD)

La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) se utiliza como herramienta en la determinación de la estructura secundaria de proteínas, y se basa en la quiralidad del enlace peptídico entre los residuos de aminoácidos que la conforman. Esta técnica se fundamenta en las propiedades de la luz polarizada formada por dos componentes polarizados circulares, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfaseamiento y un cambio de

magnitud diferencial en ambos componentes circularmente polarizados de la luz. Esto provoca una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse. Estos fenómenos varían de acuerdo con la longitud de onda incidente, y es posible obtener un espectro al graficar la rotación o elipticidad respecto a la longitud de onda (λ), (Alder y Pasman, 1973; Greenfield, 1996; Johnson, 1990).

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250-350 nm) y lejano (180-250 nm) de la radiación electromagnética. En la primera región, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina, y fenilalanina. Los espectros en esta región son reflejo de la conformación global de la proteína y las señales obtenidas son extremadamente sensibles a los cambios de conformación asociados a la estructura terciaria (Alder y Pasman, 1973; Greenfield, 1996).

Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano se deben principalmente a los enlaces peptídicos que unen los residuos de aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presente. Es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural en particular (hélices alfa, beta plegados, giros y lazos). Para realizar este análisis, Hennessey y Johnson utilizaron los espectros de un conjunto de proteínas cuya estructura tridimensional era conocida como base de datos inicial. A partir de estos espectros, se demostró que basta la combinación lineal de cinco espectros base, para describir perfectamente los espectros experimentales. Además, se determinó que a cada uno de los cinco espectros base puede asignársele un contenido de estructura secundaria (Johnson, 1990; Greenfield, 1996).

El análisis del espectro de dicroísmo circular de una proteína cualquiera consiste en encontrar la combinación lineal de los cinco espectros base que logra reproducir el perfil del espectro experimental de la mejor manera posible. Una vez logrado esto y considerando que las señales son aditivas, se suma el producto del contenido de cada estructura secundaria de los espectros base por su coeficiente en la combinación lineal. Los resultados

de esta adición representan la estimación experimental de los porcentajes de los residuos en cada una de las estructuras secundarias de la conformación de la proteína analizada (Alder y Pasman, 1973; Johnson, 1990; Greenfield, 1996).

Dispersión dinámica de luz (DLS)

Las partículas en solución se desplazan debido a que presentan movimientos brownianos. Esta movilidad está relacionada con el coeficiente de difusión y éste con el radio de la partícula. Cuando un haz de luz es dirigida a una solución coloidal, puede ser que pase libremente a través de ella, que sea dispersado o absorbido. El efecto de dispersar la luz es empleado para medir el tamaño de las partículas de forma rutinaria, siendo la dispersión dinámica de luz la técnica que permite realizar estas mediciones. En esta técnica, un haz de luz monocromática es dirigido a través de la muestra y las fluctuaciones de intensidad son analizadas (Figura 1).

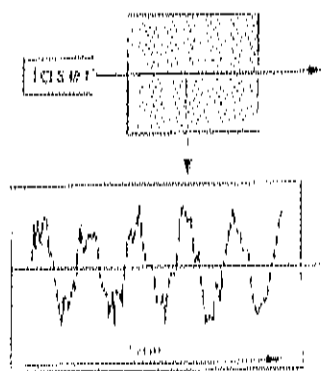
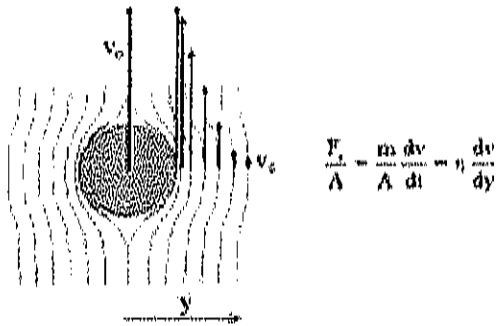


Figura 1. Principio de la Dispersión dinámica de luz. La gráfica muestra las fluctuaciones en la intensidad de dispersión alrededor de su valor medio.

La DLS proporciona el coeficiente de difusión de translación (D_T) de las partículas en la solución, el cual es convertido al radio hidrodinámico (R_H) de las partículas por la ecuación de Stokes-Einstein (Pusey, 1975; van de Hulst, 1981). Este modelo se basa en la resistencia que presenta el movimiento de una esfera sólida a través de un líquido viscoso. La resistencia al movimiento es relacionado a la fuerza dividida entre planos adyacentes del solvente movidos a diferentes velocidades. La fuerza dividida por unidad de área en cada plano (F_s/A) es descrita con la ecuación diferencial fundamentada en la siguiente figura.



Donde m es la masa, A es la área de superficie, $d v / d t$ es la aceleración, η es la viscosidad del medio y $d v / d y$ es la velocidad de gradiente que cruzan los planos dividiéndolos. Para establecer las condiciones de interacción, los límites asumidos son hechos con la capa de fluido adyacente a la partícula, como la misma velocidad de la partícula. Bajo estas condiciones, la ecuación en la figura da la fuerza total de resistencia a la viscosidad (F_{vis}). Esto se representa en la ecuación donde R es el radio de la partícula y v_s es el límite del estado de firmeza de la velocidad del fluido: $F_{vis} = 6\pi\eta R(v_s)$. El factor de proporcionalidad en la expresión anterior es definido como el coeficiente de fricción ($f = 6\pi\eta R$), y este es usado para calcular el radio de una partícula a partir de la medición del coeficiente de difusión (D). De acuerdo a la ecuación de Einstein, el coeficiente de difusión es inversamente proporcional al coeficiente de fricción. Después de la substitución la ecuación de Stokes-Einstein se escribe de la siguiente manera:

$$D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta R} \implies R = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

donde k es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta.

Cuando una molécula es iluminada por un rayo de luz, la luz que incide sobre la molécula es dispersada en todas direcciones. Para partículas que tienen dimensiones menores del 1/20 de la longitud de luz, se aplican las reglas de la dispersión de Rayleigh. La intensidad de dispersión de una molécula suspendida en un medio transparente e iluminado por luz monocromática se da en el plano de luz polarizada mediante la siguiente ecuación

$$I_s(\theta) = \frac{4 \pi^2 M^2 \sin^2 \theta (dn/dc)^2 I_0}{N_A^2 \lambda^2 r^2}$$

Donde el ángulo de luz dispersado es definido por ϕ y θ en la Figura 2, M es la masa molecular en daltons, dn/dc es el cambio en el índice de refracción con la concentración de soluto, I_0 es la intensidad de la luz incidente, N_A es el número de Avogadro, λ es la longitud de onda de la luz en la solución, y r es la distancia de la molécula al punto de detección. La intensidad máxima de la luz dispersada ocurre en el plano xy , normal al plano de polarización de la luz incidente. El plano xy es conocido como el plano de dispersión.

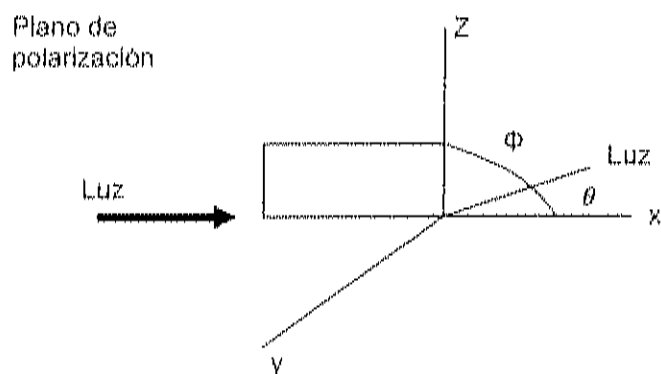


Figura 2. Plano de dispersión y definición del ángulo de observación de la luz esparcida

Si un número grande de partículas semejantes son iluminadas simultáneamente, la intensidad de la luz dispersada a una distancia del punto del detector es dada por el cuadrado de la suma de los vectores de la luz dispersada para cada partícula. Cuando la luz incidente toma la forma de una onda plana, la amplitud de la señal detectada puede variar conforme las partículas individuales se muevan aleatoriamente bajo el movimiento Browniano. Estos efectos se originan porque las partículas se mueven unas con respecto de otras, y las fases de su constitución individual para el campo de luz dispersada al detector son cambiadas constantemente. El rango total de las condiciones de interferencia óptica entre el máximo y el mínimo pueden elevarse. Los valores instantaneos de la intensidad total dispersada es dado por

$$I_s = I_0 (1) \left\{ N + 2 \sum_{j=1}^N \cos (\delta_j - \delta_1) \right\}$$

Donde N es el número de partículas iluminadas y δ_i y δ_j son las fases de los campos de luz dispersada de las partículas i -ésima y j -ésima, respectivamente. El primer término de esta ecuación da el tiempo promedio de la intensidad dispersada. El segundo término representa las fluctuaciones en términos cortos para un detector sensible solo a la luz dispersada a través de un intervalo muy cercano de ángulos. Éste segundo término puede tomar cualquier valor entre $-N$ y $+N$. Así las fluctuaciones de intensidad observadas alrededor del valor de tiempo promedio tienen un mínimo que se aproxima a cero de intensidad y un máximo cercano al doble del valor medio.

La técnica matemática usada para determinar el espectro de frecuencia de estas señales es la autocorrelación. En términos generales, la similitud entre la forma de la onda de la señal y una insignificante copia del tiempo retrasado, es determinado multiplicando las dos formas de onda juntas elemento por elemento y sumando los resultados para dar el primer punto de la función de autocorrelación. Este procedimiento se repite utilizando valores incrementales de tiempo de retraso para así tomar la función de autocorrelación completa. Al final del proceso, los valores de las ordenadas corresponden a los puntos de la función de autocorrelación discreta que se registran como elementos (fotones) detectados en forma acumulativa en un registrador. En tanto que los valores de la abscisa están dados por los tiempos de retardo de los elementos desplazados en el registrador utilizados para generar la función. Matemáticamente, si la intensidad a tiempo $t=T$ es representada por $c(t)$, el número de pulsos contados durante el intervalo de muestreo entre $t-\Delta t$ y t , entonces la función descrita de autocorrelación está dada por:

$$R(k) = \sum_{j=1}^N c(t_j) c(t_j + k \Delta t)$$

Donde N es el número total de muestras tomadas, k es un entero (el número de desplazamientos periódicos muestreados) y $k\Delta t = \tau$.

El análisis de la función de autocorrelación es simplificado si las coordenadas "y", son normalizadas para una línea base con valor unitario al dividirlo por su valor ideal, dado por:

$$c = \frac{R(k)}{N}$$

Donde C es el número total de protones contados durante el experimento.

La función de autocorrelación para una suspensión monodispersa ideal, puede ser representado por

$$R(\tau) = 1 - A e^{(-2\Gamma\tau)}$$

A representa la amplitud total, la cual es una medición del radio de la luz dispersada de las partículas en solución para el ruido experimental.

La escala de tiempo de las fluctuaciones de intensidad es dada por la constante de tiempo del decaimiento exponencial Γ , la cual físicamente representa el tiempo tomado por una partícula para recorrer una distancia que da origen a un cambio en la fase óptica de π radiones en el campo de luz dispersado en el detector. El valor exacto de esta distancia, depende del ángulo de dispersión θ , la longitud de onda del espacio libre de la luz λ_0 y el índice de refracción de la solución n . La amplitud del vector dispersado se define como

$$Q = \frac{4\pi n \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda_0}$$

El coeficiente de difusión traslacional de las partículas D_T , es dado por $D_T = \Gamma/q^2$ y por definición estricta, el radio hidrodinámico deriva del coeficiente de difusión traslacional si hablamos hipotéticamente de una esfera sólida que difunde con la misma velocidad que la partícula en estudio. El radio hidrodinámico se calcula mediante la ecuación de Stokes-Einstein, la cual fue anteriormente descrita. Cuando la suspensión de partículas es polidispersa (contiene partículas de muchos tamaños) y cuando las partículas de polvo afectan los resultados, la función de autocorrelación normalizada puede ser escrita como una suma de exponenciales con una línea base fuera de compensación (B).

$$R(\tau) = B + \sum_{i=1}^L A_i e^{(-2\Gamma_i\tau)}$$

donde L es el número de diferentes componentes de tamaño presentes. A_i es la amplitud de la intensidad de la luz dispersada debido al componente i-ésimo y D_T para cada componente puede ser obtenido de Γ_i .

Mediante el software correspondiente, los equipos de DLS realizan la búsqueda de los valores de mejor ajuste para A_i , T_i y B (utilizando un método de minimización no lineal). La suma de cuadrados se reduce aun más ajustando una función Gaussiana de amplitud contra la constante de tiempo centrada en el valor de R_h . La desviación estándar de la curva de mejor ajuste de esta función de distribución, proporciona la polidispersión (en unidades de distancia, típicamente en nm).

En la práctica, las macromoléculas en solución no son esféricas, sino dinámicas y solubles. Así que el radio calculado de las propiedades de difusión de una partícula son indicativas del tamaño aparente de la partícula dinámica hidratada/soluble, de ahí la terminología de radio "hidrodinámico" (Mattison, 2001). También es posible determinar el peso molecular por medición del coeficiente de difusión a varias concentraciones. El valor extrapolado a cero de concentración (donde no existen interacciones termodinámicas o interferencia de cercanía entre las moléculas del polímero en la solución) contiene la información necesaria sobre la molécula. Específicamente el coeficiente de difusión a concentración cero es relacionado con el peso molecular por la siguiente fórmula: $D_0 = \alpha M^{-\beta}$, donde α y β reflejan las dimensiones y las propiedades de escalamiento del polímero, similar a los parámetros de viscosidad intrínseca de Mark-Houwink. Así, la constante de proporcionalidad que surge de esta ecuación toma en cuenta las propiedades del disolvente y se representa por α . Esta ecuación requiere de una estimación adecuada del factor de estructura, que para el caso particular de proteínas esféricas tiene un valor de 0.33 y se aplica también a modelos cuasi-esféricos (Pusey, 1975; van de Hulst, 1981; Mattison, 2001).

Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

La ITC es una técnica que mide directamente el calor liberado o absorbido en una reacción que pone en juego interacciones intermoleculares e intramoleculares. Las asociaciones proteína-ligando, proteína-proteína, proteína-ADN/ARN son ejemplos de indudable interés biológico. Cuando ambos elementos interactúan, el calor liberado o absorbido es proporcional a la afinidad de la interacción. Al acercarse a la saturación, la

señal del calor disminuye hasta que solo es observado el fondo del calor de dilución. El área bajo cada pico de la inyección es igual al calor total liberado por la inyección. La información que se obtiene del estudio de la interacción de dos moléculas mediante un experimento de ITC son: la estequiometría (n), la entalpía de formación (ΔH) y la constante de unión (K_a). También se puede obtener la energía libre de Gibbs de formación del complejo ($\Delta G = -RT \ln K$) y la entropía del proceso ($\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T$), mediante cálculos a partir de los valores obtenidos en principio (Haynie, 2001).

El análisis de datos se hace en base a un modelo de la interacción. Si la interacción proteína-ligando no muestra un efecto cooperativo, positivo o negativo, y la proteína tampoco presenta diferentes clases de sitios de unión para el ligando, entonces el comportamiento del sistema se describe a través del modelo de *unión de un ligando a una macromolécula con sitios idénticos e independientes*. El término "idénticos" implica la misma constante de unión microscópica a cualquiera de los "n" sitios. El término "independientes" se refiere a que la unión a un sitio cualquiera no modifica la afinidad de los restantes. El análisis termodinámico que describe las poblaciones de los diferentes estados moleculares accesibles del sistema, es: $Z = (1 + k [L])^n$, donde k es la constante microscópica aparente del equilibrio de unión, $[L]$ la concentración de ligando libre y n es el número de sitios de unión de la macromolécula para el ligando,

La razón de la concentración de ligando unido $[L]_b$ a la concentración de macromolécula total $[M]_T$ conocida como *parámetro de unión*, está relacionada con la función de partición de unión por:

$$v = \frac{[L]_b}{[M]_T} = \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln [L]}$$

$[L]$ representa la concentración de ligando libre en equilibrio con las otras especies moleculares presentes en el sistema que interacciona (M , ML , ML_2, \dots , ML_n). Por consiguiente la concentración de ligando unido por mol de macromolécula para un sistema representado por el modelo de n sitios idénticos e independientes será:

$$\bar{V} = \frac{nK [L]}{1 - K [L]}$$

Un experimento convencional en ITC consiste en una serie de inyecciones de un determinado volumen de disolución del ligando. Separada cada una por un intervalo de tiempo suficiente para asegurar que se ha alcanzado el equilibrio y se ha transferido o compensado todo el calor liberado o absorbido. La disolución de macromolécula cubre completamente la celda de reacción y se agita permanentemente el contenido de ésta. Si se hace la suposición de que no existen otros procesos concomitantes, como ionización del tampón, en una inyección cualquiera de la serie, el calor liberado o absorbido será:

$$q_i = \Delta H_b \left(\frac{\text{kcal}}{\text{mol } L_b} \right) \cdot \Delta(\text{moles } L_b)$$

donde L_b representa el ligando unido y ΔH_b es el cambio de entalpía por mol de ligando unido. Si V_C representa el volumen de la celda que coincide con el volumen inicial de la muestra, la ecuación anterior puede expresarse más explícitamente como:

$$q_i = \Delta H_b \cdot V_C \cdot ([L]_{b,i} - [L]_{b,i-1}) = \Delta H_b \cdot V_C \cdot (\bar{V}_i [M]_i - \bar{V}_{i-1} [M]_{i-1})$$

Al considerar que el volumen efectivo que interviene en la reacción es aquel que llena la celda, las concentraciones de macromolécula y ligando deben de corregirse por las pequeñas cantidades de estos componentes contenidas en el volumen desplazado fuera de la celda. Así la concentración actual de M en la célula ($[M]_i = [M] + [ML] + [ML_2] + \dots$) será:

$$[M]_i = [M]_{i-1} \cdot \frac{V_C - V_m}{V_C}$$

y la concentración total del ligando en la celda de reacción:

$$[L]_{T,i} = \frac{(V_C - V_m) [L]_{T,i-1} - V_m [L]_0}{V_C}$$

donde V_m y $[L]_0$ son el volumen de inyección y la concentración en jeringa del ligando.

El calor total acumulado después de N inyecciones:

$$Q = \sum_{i=1}^N q_i = V_C [M]_N \cdot \Delta H_b \cdot \bar{V}_N = V_C [M]_N \cdot \Delta H_b \cdot \frac{nK [L]}{1 - K [L]}$$

En ITC el valor de la variable $[L]$ no es conocida por lo que operativamente conviene expresarla en función de las variables experimentales $[L]_f$ y Q :

$$[L] = [L]_f - [L]_b = [L]_f - \frac{Q}{V_c \Delta H_b}$$

Sustituyendo $[L]$ en la ecuación de calor acumulado por la expresión representada en la fórmula anterior, se obtiene una ecuación de segundo grado en Q cuya solución es:

$$Q = \frac{V_c \Delta H_b}{2k} \cdot \left[1 + k[L]_f + nk[M]_f - \sqrt{(1 - k[L]_f + nk[M]_f)^2 - 4nk^2[M]_f[L]_f} \right]$$

Esta ecuación relaciona el calor total acumulado después de N inyecciones con las variables experimentales V_c , $[L]_f$ y $[M]_f$ y los parámetros n , k y ΔH_b a determinar en el análisis de los datos de un experimento de ITC convencional. Por otro lado, la ecuación de la variable $[L]$ puede describirse como:

$$[L] = [L]_f - [L]_b = [L]_f - [M]_f \cdot \frac{nk[L]}{1 - k[L]}$$

y despejando $[L]$ se puede expresar esta concentración libre de ligando en términos de n , k , $[L]_f$ y $[M]_f$:

$$[L] = \frac{1}{2k} \cdot \left[-(1 - nk[M]_f - k[L]_f) + \sqrt{(1 + nk[M]_f - k[L]_f)^2 + 4k[L]_f} \right]$$

Derivando la ecuación de Q respecto a $[L]_f$ se obtiene una expresión del calor por mol de ligando añadido asociado a cada inyección:

$$\frac{1}{V_c} \cdot \frac{dQ}{d[L]_f} \approx \frac{1}{V_c} \cdot \frac{\Delta Q}{\Delta[L]_f} = \frac{\Delta H_b}{2} \left[1 - \frac{1 - k[M]_f \Theta - nk[M]_f}{\sqrt{(1 + k[M]_f \Theta - nk[M]_f)^2 - 4nk^2[M]_f^2 \Theta}} \right]$$

donde

$$\Theta = \frac{[L]_f}{[M]_f}$$

Las anteriores ecuaciones se utilizan para diseñar experimentos manejando cualquier parámetro ya medido (estequiometría, afinidad, etc.), predicho en base a la

estructura, o simplemente valores esperados por analogía con sistemas similares. Siempre que sea posible se debe seleccionar un valor para $[M]_T$ que optimice la forma de la isoterma esperada. Así mismo, estas ecuaciones se utilizan como modelo para la determinación de los parámetros termodinámicos n , k y ΔH_b mediante procesamiento por regresión no lineal de los datos experimentales. De las dos posibles formas de tratar los calores experimentales mencionados, la del calor por mol de ligando añadido asociado a cada inyección tiene la ventaja de evitar la propagación de errores experimentales (López-Mayorga, 2001).

Cristalización de Proteínas

Un cristal está formado por un sólido regular de caras planas y aristas rectas, además de una estructura interna periódica y ordenada en tres dimensiones. El hecho de que un sistema pierda los grados de libertad de sus moléculas parece una contradicción desde el punto de vista entrópico. Sin embargo, la cristalización es un fenómeno espontáneo y reversible, cuyos parámetros cinéticos y termodinámicos dependen de las propiedades físicoquímicas del solvente y soluto involucrados. La cristalización se produce cuando bajo ciertas condiciones de supersaturación, el sistema se dirige hacia el estado de equilibrio entre dos fases, una soluble y una sólida. Las moléculas individuales pierden libertad rotacional y traslacional, disminuyendo así la entropía del sistema. Sin embargo, al mismo tiempo establecen nuevas interacciones. Esto reduce la energía libre del sistema y provee la fuerza directriz del proceso de ordenamiento. Por tanto, las moléculas cristalizan minimizando su energía libre al disponerse periódicamente en unidades repetitivas y simétricas en el estado sólido, maximizando las interacciones intermoleculares favorables (Ducruix y Giege, 1992; Otálora *et al*, 1999).

La solubilización es un factor vital para la cristalización de macromoléculas. En soluciones extremadamente concentradas, donde no hay agua suficiente para mantener la hidratación, las moléculas pueden agregarse como un precipitado amorfo o bien cristalizar. La estrategia para inducir la cristalización consiste en llevar al sistema hacia el estado de mínima solubilidad lentamente y lograr así un grado de supersaturación limitado. Para lograr que las moléculas tengan oportunidad de formar el mayor número de interacciones

favorables entre sí, se modifican las propiedades del solvente con agentes precipitantes o se alteran algunas propiedades físicas como la temperatura (Mc Pherson, 1989; Drenth, 1994).

La determinación de la estructura cristalográfica empieza con el crecimiento de un cristal adecuado. Para ello pueden aplicarse distintos métodos que se diferencian por las condiciones y solutos que emplean. Para decidir el método mejor para cristalizar una proteína determinada se deben entender los fundamentos de la cristalización. La formación de un cristal de proteína macroscópico que contiene hasta 10^{15} moléculas, empieza con la aparición de agregados de proteína mediante contactos intermoleculares (*agregación*). Estos agregados pre-nucleares eventualmente alcanzan el tamaño nuclear crítico y una vez formado un núcleo estable (*nucleación*), el crecimiento prosigue por la adición de moléculas a la red cristalina. Tanto la nucleación del cristal como el *crecimiento* ocurren en soluciones supersaturadas, donde la concentración de proteína es mayor que su valor de solubilidad en equilibrio (Mc Pherson, 1989; Ducruix, 1992).

La supersaturación es una función de la concentración de la proteína y de diversos parámetros que afectan su solubilidad. En general, se logra a altas concentraciones de macromoléculas y a valores crecientes de parámetros de la solución reductores de la solubilidad macromolecular. Los factores que pueden influir en la solubilidad proteica son por ejemplo, la inclusión de aditivos tales como alcoholes, polímeros hidrofílicos y detergentes que puedan disminuir la solubilidad. Estos son *agentes precipitantes* ya que influyen en la solubilidad provocando la precipitación macromolecular. Otro factor que afecta la solubilidad proteica es la sal. Esta varía generalmente como una curva asimétrica en forma de campana indicando que la solubilidad decrece tanto a altas como a bajas concentraciones de sal. Parámetros de la solución tales como pH o temperatura también pueden afectar dramáticamente la solubilidad macromolecular (McPherson, 1989; Ducruix y Giege, 1992; Drenth, 1994; Otálora *et al*, 1999).

La técnica más utilizada en la cristalización de proteínas es la *Difusión de vapor*. Las condiciones dentro de una solución con proteína son manipuladas mediante la difusión a través del aire, donde el objetivo es formar núcleos de cristalización. La nucleación ocurre cuando se aumenta la concentración de proteína al reducir el volumen de la solución. Esto

ocurre porque el vapor de agua en la gota que contiene la proteína se deshidrata buscando el equilibrio con la solución de reserva, la cual es más higroscópica. La solución permanece supersaturada una vez que se han alcanzado las condiciones de nucleación, de modo que puede producirse simultáneamente la nucleación y el crecimiento de cristales. Para evitar que los valores de supersaturación excedan los requeridos para la nucleación, se han diseñado métodos para alcanzar el equilibrio muy lentamente. Dentro de un marco teórico, pareciera que las condiciones para cristalizar una proteína no son óptimas, sin embargo, la difusión de vapor por gota colgante (*"hanging drop"*) y gota sentada o posada (*"sitting drop"*) son amplia y exitosamente usados para el crecimiento de cristales de proteína. Otros factores como formación de núcleos o precipitados, incorporación en cristales crecientes o desnaturalización macromolecular, pueden disminuir la concentración proteica a valores menos propicios para la nucleación y más adecuados para el crecimiento (McPherson, 1989; Ducruix y Giege, 1992; Drenth, 1994; Otálora et al, 1999).

Fluorescencia

La fluorescencia es el fenómeno físico mediante el cual ciertas sustancias absorben energía emitiéndola en forma de luz o de otro tipo de radiación electromagnética. A diferencia de la fosforescencia, la fluorescencia tiene lugar únicamente mientras dura la excitación que la provoca, y desaparecen ambos simultáneamente. La fluorescencia es una técnica muy utilizada en el estudio de interacciones moleculares, entre las que se encuentra la dinámica del plegamiento de proteínas. Otras aplicaciones son la medición de la concentración de iones dentro de células vivas, la estructura de membranas, rastros de materiales fluorescentes en mezclas, la elucidación de la estructura electrónica y la dinámica de un estado excitado de una molécula. La detección de fluorescencia tiene tres ventajas principales sobre otros métodos experimentales a base de luz: alta sensibilidad, alta velocidad y seguridad. El punto de seguridad se refiere al hecho que las muestras no son afectadas o destruidas en el proceso. La sensibilidad es importante porque la señal de fluorescencia es proporcional a la concentración de la sustancia investigada. Esta es una técnica no invasiva que requiere de niveles bajos de intensidad para la excitación y generación de una señal de fluorescencia. Esto reduce los efectos de fotoblanqueo y el

tejido puede ser investigado sin efectos adversos sobre su comportamiento fisiológico natural (Brand y Johnson, 1997; Mathies *et al.*, 1990).

La fluorescencia es el resultado de un proceso de tres etapas que ocurre en ciertas moléculas (generalmente hidrocarburos poliaromáticos o los heterociclos), llamados fluoróforos o tintes fluorescentes. Una sonda fluorescente es un fluoróforo diseñado para localizarse dentro de una región específica de un espécimen biológico o responder a un estímulo específico. El proceso responsable de la fluorescencia de sondas fluorescentes y otros fluoróforos es ilustrado por un sencillo diagrama electrónico de estado en la Figura 3.

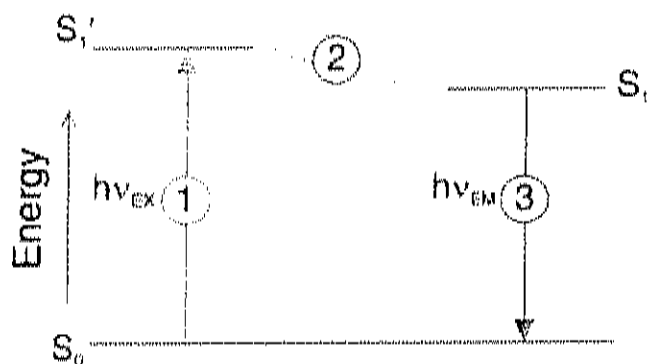


Figura 3. Diagrama de Jablonski.

En la excitación (etapa 1), un fotón de energía $h\nu_{EX}$ es suministrado por una fuente externa, como una lámpara incandescente o un láser, y es absorbido por el fluoróforo creando un estado electrónico de excitación (S_1'). Este proceso distingue la fluorescencia de quimioluminiscencia, donde el estado excitado es poblado por una reacción química. El estado excitado (etapa 2) existe durante un tiempo finito (típicamente 1-10 nano segundos). Durante este tiempo, el fluoróforo sufre cambios conformacionales y es sometido a múltiples posibles interacciones con su ambiente molecular. Estos procesos tienen dos consecuencias importantes. Primero, la energía de S_1' es disipada parcialmente, pasando a un estado de excitación relajado (S_1), del cual proviene la emisión de fluorescencia. Segundo, no todas las moléculas excitadas por la absorción (etapa 1) regresan al estado basal (S_0) por la emisión de fluorescencia. El quantum de fluorescencia producida es proporcional al número de fotones de fluorescencia emitidos (etapa 3) y al número de fotones absorbidos (etapa 1). Es una medida del intervalo relativo a la cual estos procesos

ocurren. En la emisión de la fluorescencia (etapa 3), el fotón de energía $h\nu_{EM}$ es emitido, regresando al fluoróforo a su estado basal S_0 . Debido a la disipación de energía durante la vida del estado excitado, la energía de este fotón es inferior, y por lo tanto de longitud de onda más larga que la excitación del fotón $h\nu_{EX}$. La diferencia en la energía de longitud de onda representada por $(h\nu_{EX} - h\nu_{EM})$ es llamado el cambio de Stokes. Esta diferencia es fundamental para la sensibilidad de técnicas de fluorescencia, ya que permite detectar la emisión de los fotones contra un fondo bajo, aislados de los fotones de excitación (Brand y Johnson, 1997; Mathies *et al.*, 1990; Dewey, 1991; Powe *et al.*, 2004).

HIPÓTESIS

Las proteínas lisozima y HDL/BGBP de camarón blanco *Penaeus vannamei*, presentan adaptaciones que les permiten llevar a cabo sus funciones respectivas de catálisis y reconocimiento, al interactuar con carbohidratos en un medio con una salinidad del 0,45 M.

Objetivo General

Elucidar las bases biofísicas de la interacción proteína-carbohidrato en lisozima y HDL/BGBP de camarón blanco *Penaeus vannamei*.

Objetivos específicos

Determinar el comportamiento en solución de lisozima y HDL/BGBP mediante dispersión dinámica de luz como respuesta a variaciones de salinidad, temperatura, pH, presencia de aditivos y durante su interacción con glucanos.

Determinar el contenido de estructura secundaria y los cambios conformacionales inducidos por la interacción con ligandos utilizando espectroscopia de dicroísmo circular.

Determinar constantes de afinidad a glucanos mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Determinar las condiciones de cristalización de éstas proteínas, en presencia y ausencia de glucanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los estándares y reactivos utilizados en la elaboración de esta tesis fueron adquiridos en Sigma Chem., Co. (St. Louis MO., USA). Excepto los utilizados para las diversas pruebas de cristalización, los cuales se adquirieron en Hampton Research (34 Journey Aliso Viejo, CA 92656-3317).

Animales utilizados

En la extracción de plasma se utilizaron ejemplares adultos de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) de ambos sexos y aparentemente sanos. Los animales se adquirieron en el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), campus Guaymas, Sonora, y se mantuvieron vivos en las instalaciones del CIBNOR-Unidad Guaymas durante todo el muestreo.

Obtención de plasma

La hemolinfa se extrajo por punción en la base de los pleópodos, ligeramente anterior al poro genital (primer segmento de la región abdominal) con jeringas estériles de 3 mL. La hemolinfa se mezcló con solución isotónica anticoagulante para camarón con EDTA (SIC-EDTA 850 mOsm/Kg: NaCl 450 mM, KCl 10 mM, EDTANa₂ 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.3), previamente enfriada a 10°C y en una proporción de 2:1 (2 volúmenes de SIC-EDTA por cada volumen de hemolinfa extraída). La hemolinfa se centrifugó a 800 \times g por 5 min y el sobrenadante (plasma) se almacenó a -20°C, hasta su utilización en el aislamiento y purificación de la HDL/BGBP (Vargas-Albores *et al.*, 1993).

Obtención de la Lisozima recombinante

El cDNA de la lisozima de camarón blanco *Penaeus vannamei* (LisPv) fue clonado en el vector de expresión pET5a (Novagen), para posteriormente transformar la cepa de *E. coli* BL21 (CodonPlus). Las bacterias se llevaron a crecimiento exponencial (OD = 0.6) en caldo Luria Broth (LB) con antibióticos ampicilina 100 µg/mL, kanamicina 15 µg/mL, tetraciclina 12.5 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL. La proteína se recuperó de cuerpos de inclusión a partir del pellet bacteriano sonificado y disueltos en amortiguador con cloruro de guanidinio 8 M. La proteína desnaturalizada fue replegada por dilución utilizando un amortiguador de replegamiento compuesto de Tris-HCl 55 mM, pH 8.5, glutatión reducido (GSH) 1 mM, glutatión oxidado (GSSG) 0.1 mM, NaCl 264 mM, KCl 11 mM, guanidinio-HCl 550 mM, EDTA 1 mM (Sotelo-Mundo, *et al.*, 2003; Calderón-Arredondo, 2003; de la Re-Vega *et al.*, 2004).

Purificación

Para la purificación de HDL/BGBP, el plasma (30 mL) se dializó contra dos recambios de dos litros de agua desionizada por 16 h a 10°C, con agitación constante (Vargas-Albores, *et al.*, 1996). Posteriormente se centrifugó a 3,000 \times g por 20 min a 4°C. El precipitado de color naranja se resuspendió en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 para purificar HDL/BGBP por cromatografía de afinidad a heparina, de acuerdo a la metodología descrita por Jiménez-Vega (Jiménez-Vega, 2000; Jiménez-Vega *et al.*, 2002).

La lisozima se purificó a partir de la mezcla de proteínas encontradas en la solución de replegamiento (Calderón-Arredondo, 2003; de la Re-Vega *et al.*, 2004). Esta solución se dializó contra Tris-HCl 50mM, pH 8.5 durante 6 h, con mínimo tres recambios de solución amortiguadora. Se aplicaron 100 mL de la solución (0.5 mg/mL) por cada 5 mL de matriz de carboximetil-sefarosa previamente equilibrada con Tris-HCl 50 mM, pH 8.5. La elusión se hizo con Tris-HCl 50 mM, pH 8.5 con 0.2, 0.5 y 1 M de NaCl. El flujo de cargado de muestra fue de 0.1 mL/min y de 0.2 mL/min durante la elusión, y se colectaron fracciones de 2 mL. La medición de la actividad enzimática de las diferentes fracciones permitió

identificar donde se encontraba la enzima por el método de halo de inhibición (Mohrig y Messner, 1968).

Determinación de la concentración de proteína

La cuantificación de proteína se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (MicroBCA, PIERCE 23235), con lectura de absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro UV-VIS TU-1901. Esta técnica se basa en la reacción de Folin-Ciocalteu, donde la proteína interacciona con el cobre +2 alcalino, formando el complejo de Biuret y quedando el cobre +1 libre. Éste interacciona con el ácido bis-cinconínico formando un complejo que absorbe a 562 nm (Smith *et al.*, 1985).

Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

El análisis de pureza y seguimiento de la purificación de la HDL/BGBP requirió de la utilización de geles homogéneos de poliacrilamida al 7 y 7.5 % (8 x 10 x 0.1 cm). Mientras que para la visualización de la banda de lisozima se utilizaron geles del 12.5%. En ambos casos se aplicó una corriente constante de 50 V en una solución amortiguadora de Tris (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1 %, pH 8.3) y con solución amortiguadora para carga de muestra 2X (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %, azul de bromofenol 0.5 %, β -mercaptoetanol) (Laemli, 1970).

Tinción con nitrato de plata

Los geles se fijaron con una solución de ácido acético 10 % y etanol 40 % en agua, por 30 min. Después de descartar la solución fijadora, el gel se colocó en solución incubadora (etanol 30 %, acetato de sodio 4.1 %, tiosulfato de sodio 0.2 % y glutaraldehído 0.52 %, adicionado al momento de usarse) por 30 min. Posteriormente se lavó con agua por 3 min y se repitió esto cinco veces. Después se incubó por 20 min con la solución de nitrato

de plata (nitrato de plata 0.1 %, etanol 20 %, formaldehído 0.027 % adicionado al momento de usarse). La solución de plata se descartó y se adicionó al gel solución reveladora (carbonato de sodio 2.5 %, etanol 20 % y formaldehído 0.01 % adicionado al momento de usarse), a una temperatura de 42°C. Para detener la reacción se añadió EDTA dihidratado 1.46 % y etanol 20 % en agua (Merril *et al.*, 1981).

Actividad enzimática de la lisozima

Actividad por halo de inhibición en placa. Se preparó una solución de agarosa al 0.8 % en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.8. Se disolvió en baño de agua a ebullición y se dejó enfriar sin que se solidificara la solución. Se adicionó *Micrococcus luteus* en una relación de 5 mg por cada 10 mL de solución de agarosa (*M. luteus* fue previamente dispersado en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.8). Esta mezcla se colocó en cajas Petri y se dejó enfriar para la solidificación de la agarosa. Posteriormente se realizaron perforaciones de aproximadamente 5 mm en donde se colocó la proteína. La placa se incubó a 37 °C por 12 horas y transcurrido este tiempo se observó la presencia de halos de inhibición (Mohrig y Messner, 1968).

Actividad por método turbidimétrico. Se colocaron en un tubo 100 µL de la muestra con proteína y 1 mL de solución de 0.25 mg/mL de *M. luteus* en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.8. Se incubó a 37°C por 12 horas y pasado este tiempo se midió su absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS TU-1901. Una unidad de actividad de lisozima se define como la concentración a la cual se causa un cambio de 0.001 unidades de absorbancia por minuto a 540 nm (Shugar, 1952).

Secuenciación de amino terminal de lisozima

La secuenciación del amino terminal de la lisozima se realizó mediante el método de degradación de Edman en el laboratorio de Servicios de Estructura de Proteínas en la Universidad de Davis, California (UC-Davis, Protein Structure Facility). Este método

consiste en realizar una derivatización del aminoácido del extremo N-terminal por reacción del grupo amino. Posteriormente, el aminoácido modificado se eluye por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase reversa y se detecta en ultravioleta a 270 nm. Los tiempos de retención obtenidos se comparan contra los de una muestra estándar de aminoácidos lo cual permite identificar los residuos (Matsudaira, 1993).

Punto isoelectrico de lisozima

El punto isoelectrico de la lisozima se determinó mediante un equipo de electroforesis Phast System de Pharmacia. El gradiente de pH de los geles de poliacrilamida para enfoque isoelectrico (35x 0.43 x 50 mm) fue de 3 a 9. La formación del gradiente de pH y el enfoque de las muestras, tomó aproximadamente 40 minutos bajo una corriente constante de 3.5 W. Los geles se revelaron de acuerdo a la técnica empleada por Neuhoff y colaboradores (Butcher y Tomkins, 1985).

Espectrometría de Masas

El análisis de la masa molecular de la lisozima se hizo utilizando un equipo OMNIFLEX MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) de Bruker-Daltonics. Para esto, la proteína se mezcló con ácido sinapínico disuelto en una solución de 30 % acetonitrilo, 70 % agua y 0.1 % ácido trifluoroacético. Una pequeña gota de esta solución (1 µL) se dejó secar a vacío hasta que cristalizó. Posteriormente se analizó mediante la incidencia de un láser a 337.1 nm y con una aceleración de voltaje de 19 kV en modo lineal.

Espectroscopía de dicroísmo circular (CD)

El contenido de estructura secundaria en estas proteínas se determinó mediante espectroscopía de dicroísmo circular. Estos espectros se obtuvieron a 20°C en un espectropolarímetro Jasco J-700 (Jasco Inc., Easton, MD), equipado con una celda Peltier

para control de temperatura PTC-348WI. Las proteínas se colocaron en una celda de 0.1 cm de paso óptico y se leyeron en la región de ultravioleta lejano (184-260 nm). La elipticidad por residuo medio [θ] se calculó utilizando una masa molecular de 110 g/mol por residuo. Cada espectro fue el promedio de tres lecturas y se corrigieron con la señal del amortiguador. Se obtuvieron curvas múltiples independientes, variando la concentración de análogo de sustrato para cada una de las proteínas.

La lisozima se utilizó a una concentración de 0.3 mg/mL y la quitotriosa en un intervalo de 0.004 a 0.050 μM. El amortiguador utilizado fue acetatos 10 mM, pH 5.5. La HDL/BGBP se utilizó a una concentración de 0.03 mg/mL en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0, y la laminorribiosa en un intervalo de 0 a 71 μM.

Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

La ITC se utilizó para determinar constantes de afinidad, estequiometría de la interacción receptor-ligando y el perfil termodinámico general de los procesos térmicos de la reacción, que incluye el cálculo de entalpía (ΔH) y entropía (ΔS). Estos análisis se realizaron en un calorímetro de titulación isotérmica de alta precisión (VP-ITC, Microcal, Inc.), a una temperatura constante de 25°C. Las soluciones fueron desgasificadas y colocadas lentamente en la celda del equipo, cuidando de no formar burbujas dentro de la celda. Una alícuota de lisozima (3.7 mg/mL) fue dializada contra una solución amortiguadora de acetatos 50 mM, pH 5.5 con NaCl 0.15 M. Mientras que otra alícuota de esta misma proteína (1.515 mg/mL) se dializó contra amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 con NaCl 0.15 M. El análogo de sustrato utilizado fue la quitotriosa en una concentración de 1.96 mM para la lisozima a pH de 5.5 y de 0.637 mM para la proteína en pH 7.0. En ambos análisis se hicieron 25 inyecciones de 7 μL para lograr la saturación de la proteína. Igualmente los amortiguadores utilizados se titularon con el análogo de sustrato para poder utilizarlos como blanco de señal.

Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Las mediciones fueron realizadas utilizando un equipo de dispersión dinámica de luz DynaPro-801 ("Dynamic Light Scattering", Protein Solutions Co.), y analizadas mediante el paquete computacional Dynamics[®]. La HDL/BGBP se dializó exhaustivamente contra agua calidad milliQ y previo a su inyección en el equipo fue filtrada a través de un tamaño de poro de 0.02 μm . En este estudio se evaluó el comportamiento de la proteína en solución. Para lo cual se analizaron los cambios en polidispersidad y masa molecular en respuesta a la presencia de diversos aditivos (manitol, sorbitol, trealosa, laminaribiosa, heparina, tritón, SDS, calcio, magnesio y litio), así como a modificaciones en la fuerza iónica (NaCl), constante dieléctrica (PEG 6,000, PEG 400, etanol, isopropanol), pH y temperatura. La lisozima se dializó contra amortiguador Tris-HCl 50mM, pH 8.5. Se filtró antes de ser inyectada para analizar su comportamiento ante diversas concentraciones de NaCl, PEG 10,000, quitotriosa y cambios de temperatura. La temperatura utilizada para la realización de todas estas mediciones, excepto en la evaluación del efecto de este parámetro, fue de 18°C. La lisozima y la HDL/BGBP se utilizaron a una concentración promedio de 1 mg/mL.

Cristalización

El método de matriz incompleta y la técnica de difusión de vapor en gota colgante fueron las herramientas utilizadas para buscar las condiciones de cristalización adecuadas de ambas proteínas (Jancarik *et al.*, 1991; Drenth, 1994). Las pruebas de cristalización para HDL/BGBP y lisozima se hicieron en un rango de concentración de proteína desde 1.0 mg/mL hasta 3.7 mg/mL. Se colocaron gotas de 5 μL de proteína y 5 μL de agente precipitante (soluciones comerciales de Hampton, Kit 1 y 2) en los cubreobjetos. En el receptáculo inferior se colocaron 400 μL del agente precipitante, con el fin de retardar el proceso de saturación. Estas pruebas se colocaron en una cámara de temperatura controlada a 4°C. En el caso de la lisozima se montaron pruebas a pH de 5.5 y 7.0, así como en presencia y ausencia de quitotriosa. Para la HDL/BGBP solo se utilizó el pH de 7.0. Las fotografías de los cristales se obtuvieron únicamente para observar la morfología y evaluar

el crecimiento cristalino, para lo cual se utilizó un microscopio Zeiss Stemi SVII, a 4 ó 10 aumentos.

Fluorescencia

Los espectros de fluorescencia fueron colectados en un espectrofluorómetro modelo K-2 (ISS, Urbana IL), usando una lámpara de xenón de 200 W como fuente de excitación. Las muestras se excitaron a 280 nm y la emisión del espectro se colectó de 275 a 295 nm correspondientes a la dispersión de la muestra. Las mediciones fueron realizadas en una celda de 0.4 mm de longitud y una temperatura de 25°C. La absorbancia a 280 nm fue 0.05 o menor para evitar efectos debidos al filtro. Los datos fueron corregidos por la dilución.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LISOZIMA

Purificación

La solución de replegamiento conteniendo la lisozima recombinante se dializó contra Tris-HCl 50 mM, pH 8.5 para eliminar las sales debidas a la naturaleza de este proceso. Posteriormente, la muestra se inyectó en la columna de carboximetil-sefarosa y se eluyó con 0.0, 0.2, 0.5 y 1 M de NaCl en Tris-HCl 50 mM (Figura 4). Las fracciones eluidas con 0.2 y 0.5 M de NaCl resultaron positivas a la prueba de actividad de lisozima (Mohrig y Messner, 1968). La lisozima pura se identificó en la fracción eluida con 0.5 M de NaCl (Figura 4) mediante un gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras y desnaturizantes teñido con plata (Laemmli, 1970; Merrill *et al.*, 1981). A partir de los datos de purificación de la proteína se estructuró la tabla de rendimiento (Tabla 1), la cual muestra un bajo rendimiento. Sin embargo, las cantidades de proteína fueron suficientes para permitir la realización de los estudios biofísicos propuestos.

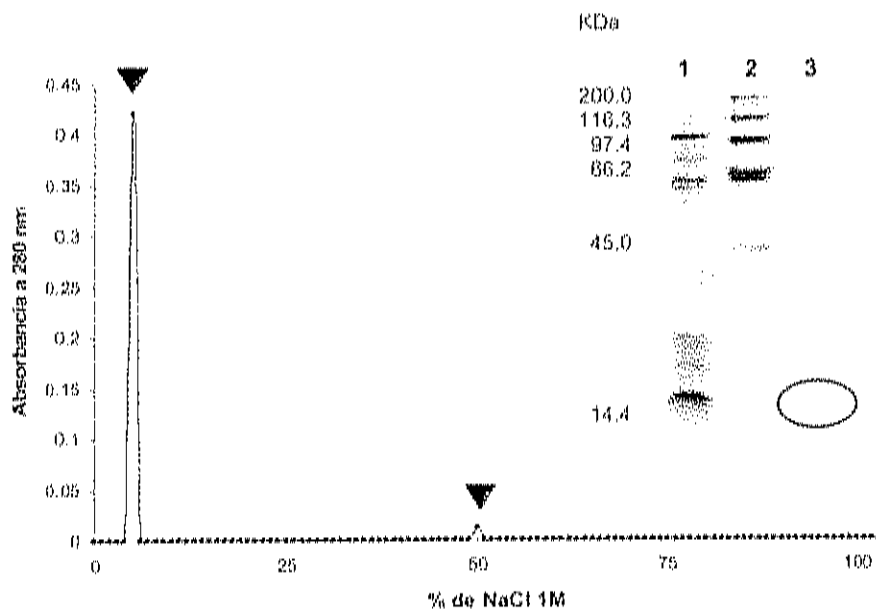


Figura 4. Perfil de elución de la lisozima de camarón. Las flechas indican presencia de actividad. Carril 1: fracción eluida con 0.2 M NaCl, carril 2: marcadores de peso molecular, y carril 3: fracción eluida con 0.5 M NaCl (lisozima pura).

Tabla 1. Rendimiento de la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico de lisozima de camarón blanco *Penaeus vannamei* sobreexpresada en *E. coli*. La tabla se contruyo a partir de un litro de cultivo.

<i>Etapa de purificación</i>	<i>Proteína mg/mL</i>	<i>Proteína total mg</i>	<i>Actividad (U)</i>	<i>Actividad Específica (U/mg)</i>	<i>Rendimiento %</i>	<i>Purificación</i>
<i>Extracto total</i>	1.0	1000	1.012	1.012	100	1
<i>Cromatografía de intercambio iónico CM-Sefarosa</i>	0.007	7	1.477	1055	0.7	1042

* Una unidad se define como la concentración de proteína que causa disminución en la absorbancia de 0.001 por minuto (540 nm y 37 °C).

Masa Molecular y Amino Terminal

La estimación de la masa molecular de la lisozima fue realizada por electroforesis SDS-PAGE (condiciones reductoras y desnaturalizantes) y por espectrometría de masas (MALDITOF MS). La lisozima recombinante muestra una masa de aproximadamente 17.8 kDa mediante SDS-PAGE, mientras que por MALDITOF MS se encontró un valor de 17.11 kDa. Esta proteína es la lisozima de mayor masa molecular hasta la fecha reportada, debido a que posee una inserción y una extensión de siete y nueve aminoácidos, respectivamente. Esta característica en su secuencia solo se ha observado en lisozimas identificadas en otros peneidos (Sotelo-Mundo *et al.*, 2003).

La secuenciación del amino terminal de la lisozima fue realizada mediante el método de degradación de Edman, en la Universidad de Davis, California. La secuencia obtenida confirma que la proteína sobreexpresada en *E. coli* tiene el mismo amino terminal que la secuencia introducida originalmente a la bacteria.

SDAKVFGKCEF ----- secuencia original del amino terminal
deducida del cDNA
SDAKVFGKXEF -----secuencia determinada experimentalmente
por degradación de Edman

Las lisozimas son clasificadas en diversos grupos en base a su secuencia de aminoácidos. La lisozima de camarón pertenece al grupo "c" debido al alto porcentaje de similitud con la lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL). Todas aquellas lisozimas con una identidad mayor al 30 % con respecto a la HEWL son clasificadas dentro de este grupo (Jolles y Jolles, 1984; Jain *et al.*, 2001). Por tanto, una similitud del 46 % con la de HEWL, la presencia de los residuos catalíticos y la conservación en la posición de las cisteínas que forman los cuatro enlaces disulfuro, permiten clasificar a la lisozima de camarón blanco como tipo c.

Punto isoeléctrico

La lisozima se analizó mediante un gel de enfoque isoeléctrico para determinar el punto isoeléctrico (pI), así como evaluar su homogeneidad y pureza. El gel presentó una única banda lo cual demuestra que la muestra es homogénea. Al correlacionar la banda contra los marcadores de punto isoeléctrico, se determinó que la lisozima de camarón tiene un punto isoeléctrico a un pH de 8.5. Todas las lisozimas reportadas en la actualidad presentan valores de punto isoeléctrico en pH alcalinos (Halliday *et al.*, 1993; Lemos *et al.*, 1993). La lisozima de camarón blanco no es la excepción en este aspecto.

Efecto del pH sobre la actividad de la lisozima de camarón

La actividad de la lisozima a diferentes valores de pH se estudió mediante el método turbidimétrico (Shugar, 1952). Los valores obtenidos muestran dos picos máximos de actividad a valores de 5.0 y 9.0 (Figura 5). El valor de pH de 5.0 hace coincidir a la lisozima de camarón con el resto de las lisozimas tipo c reportadas a la fecha. Se sabe que las lisozimas de este grupo realizan la hidrólisis del sustrato con mayor eficiencia a valores

de pH cercanos a 6.0 (Jolles y Jolles, 1984). Esto debido a que las lisozimas tipo c se encuentran más cargadas a valores ligeramente ácidos. Esto permite que sus sitios de unión tengan mayor afinidad al carbohidrato y que el sitio activo lleve a cabo su función con mayor éxito (Phillips, 1966; Blake *et al.*, 1965). La lisozima de camarón también presenta una actividad marcada a pH 9.0, contrario a las de su grupo y con valores en el mismo intervalo que los obtenidos a pH 5.0. Esto puede deberse a variaciones en su conformación que le permiten exponer sus aminoácidos cargados en los sitios de unión de una forma alternativa.

Es probable que el pH óptimo en el rango ácido sea más relevante fisiológicamente, ya que se ha reportado la localización de lisozima en lisosomas de invertebrados (Pipe, 1990). Así mismo, en un estudio ultraestructural de hemocitos del langostino *Procambarus clarki*, se menciona la posibilidad de que en los gránulos se encuentren proteínas antibacterianas con función de defensa (Lanz *et al.*, 1993).

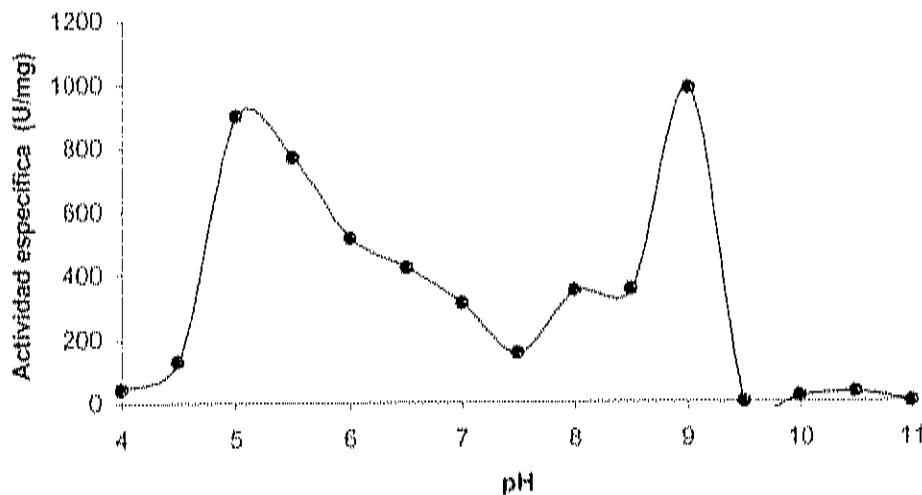


Figura 5. Actividad específica de lisozima de camarón a diferentes valores de pH.

Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

En este estudio se utilizó la dispersión dinámica de luz como una herramienta para auxiliar a la cristalización de proteínas, ya que está demostrado que una proteína en estado monodisperso cristaliza con mayor facilidad. Por ello, se evaluaron factores que pueden ser modificados experimentalmente, como temperatura, pH o algunos ligandos, sin que estos tengan *per se* alguna relevancia o función fisiológica en el organismo. Sin embargo, el estado de oligomerización y agregación puede modificar y regular la actividad de enzimas o la afinidad de proteínas reconocedoras de carbohidratos ("pattern recognition proteins"), (Hernández-Santoyo *et al.*, 2000). Por otra parte, también se busca evaluar los cambios en el estado de agregación que sufre la lisozima al interactuar con su sustrato específico. El compuesto utilizado es un análogo de sustrato (quitotriosa), lo que significa que interactuará con la proteína pero no es susceptible a la hidrólisis. La conducta de agregación de la lisozima se investigó en función de los siguientes parámetros: temperatura, PEG 10,000, NaCl y quitotriosa.

1) Quitotriosa

La lisozima se utilizó a una concentración de 0.045 mM y temperatura constante de 18°C. La quitotriosa se utilizó en solución a una concentración de 1.96 mM y se adicionó en un intervalo de 0 a 0.09 mM. La lisozima mostró una clara tendencia a disminuir la masa molecular de sus agregados al momento en que inicia la interacción con la quitotriosa. Sin embargo, al llegar a una concentración de 0.06 mM de quitotriosa, la masa molecular de los agregados se incrementó y la polidispersidad varió de 11 a 21 nm sin un comportamiento regular. Es importante mencionar que las condiciones en que cambia el comportamiento hidrodinámico son cuando ambas moléculas, lisozima y quitotriósido, se encuentran en concentraciones equimolares. La masa de los agregados de la lisozima pasó de 25,000 kDa a 7,000 kDa al llegar a 0.06 mM de quitotriosa (Figura 6). El cambio en los tamaños de los agregados puede deberse a que el exceso de quitotriosa promueve interacciones no específicas entre las moléculas de lisozima. Para fines de cristalización, la concentración de quitotriósido puede ser equimolar a la de lisozima, ya que la polidispersidad se mantiene

relativamente constante. Dado que este es un análogo de sustrato, no se puede establecer una interpretación fisiológica de estos resultados.

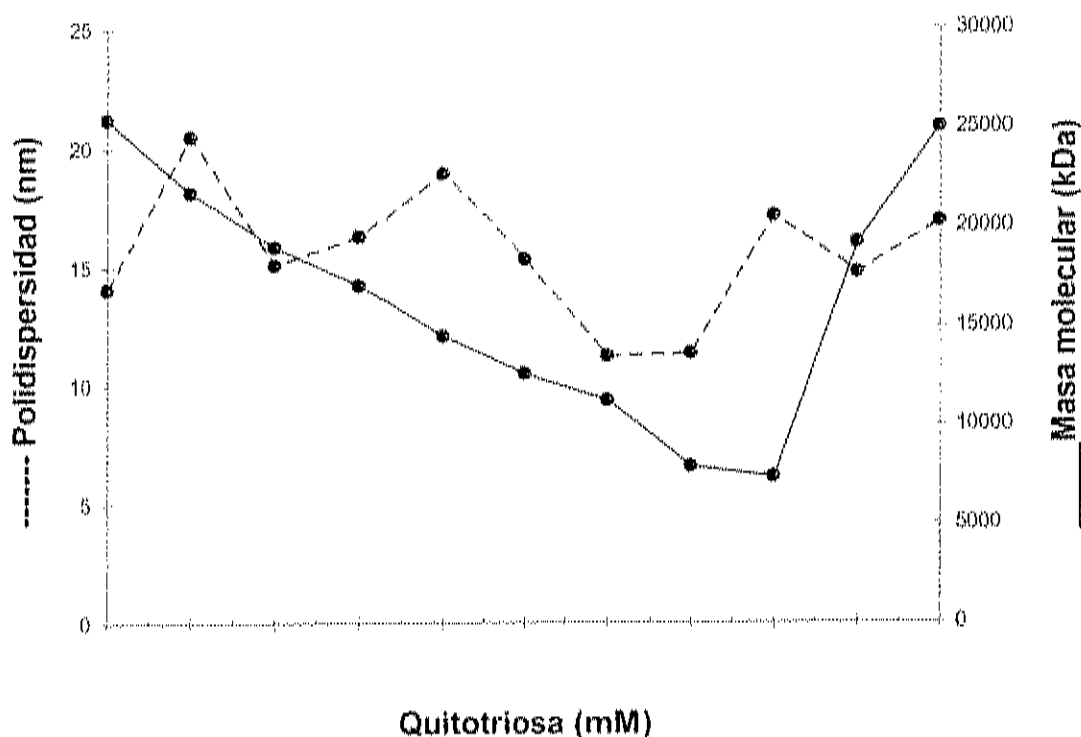


Figura 6.- Efecto de la quitotriosa sobre el estado de agregación de la lisozima recombinante de camarón blanco.

2) Temperatura

El efecto de la temperatura sobre la polidispersidad y la masa molecular de la lisozima se determinó utilizando una concentración de 0.045 mM de la proteína, en un amortiguador de glicina-NaOH, pH 9 con NaCl 1M. El análisis de masa molecular y polidispersidad de la lisozima sometida a cambios de temperatura muestra constantes ambos parámetros hasta los 15°C. Tanto la masa como la polidispersidad se incrementaron junto con la temperatura a partir de 15°C (Figura 7). Este proceso es reversible, ya que al disminuir la temperatura nuevamente disminuye su estado de agregación. Por tanto, la temperatura de almacenamiento para las placas de cristalización debe estar por debajo de

15°C para que la proteína se encuentre menos agregada y el proceso de cristalización pueda ser exitoso. Este resultado tiene implicaciones experimentales para cristalización de proteínas únicamente, ya que fisiológicamente el camarón difícilmente se expone a temperaturas menores a 20°C y mayores a 25°C.

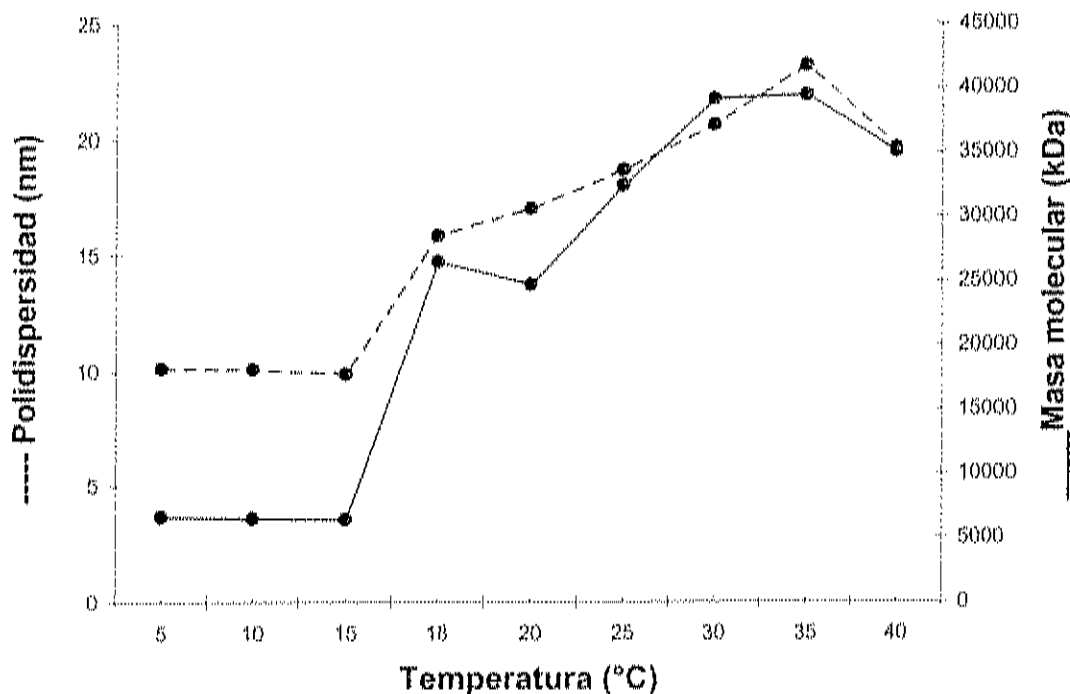


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la lisozima recombinante de camarón blanco.

3) Cloruro de Sodio

El efecto de la salinidad sobre la lisozima se estudió utilizando una concentración de 0.036 mM de proteína, temperatura constante de 18°C y una solución base de 2.7 M de cloruro de sodio. Los valores de polidispersidad, así como la masa molecular de la lisozima variaron de 10 a 15 nm y de 5,000 a 10,000 kDa, respectivamente, sin tendencia definida entre los 0 y 0.45 M de cloruro de sodio. Aún cuando los valores hidrodinámicos muestran una gran variación (Figura 8), se mantienen dentro de los mismos valores en el rango de salinidad estudiado. Considerando que la función de la lisozima en el plasma ocurre a 0.45

M de NaCl, se puede considerar que el estado de agregación es poco sensible a la salinidad, comparado con el efecto de temperatura mostrado anteriormente.

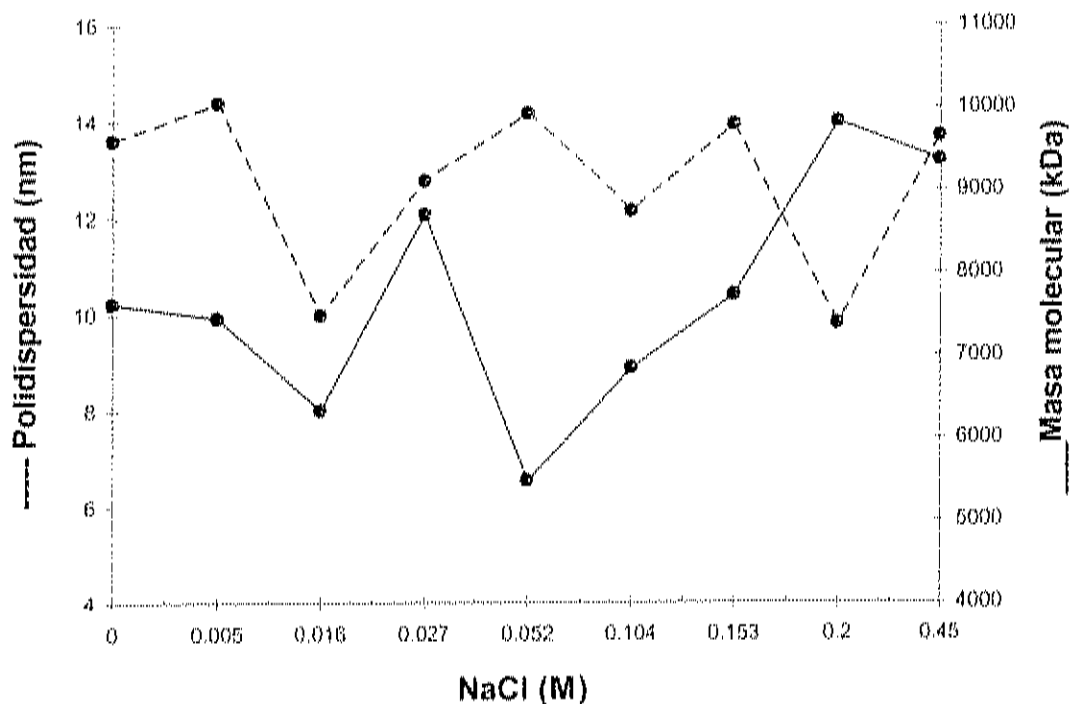


Figura 8. Efecto del cloruro de sodio sobre el estado de agregación de la lisozima recombinante de camarón blanco.

4) Polietilenglicol 10,000 (PEG 10,000)

El PEG es utilizado ampliamente como un precipitante o aditivo en cristalización de proteínas. Este componente permite que la interacción entre las moléculas de proteína se de en forma lenta, lo cual facilita que estas se estabilicen en un solo estado de agregación. Por esta razón es que se estudio su efecto en el estado de agregación de la lisozima de camarón. La lisozima (0.045 M) se sometió a concentraciones variables de una solución base de PEG 10,000 al 51.47 % y una temperatura constante de 18°C durante el análisis. Los agregados de lisozima disminuyen notablemente su masa molecular a valores menores al 1 % de PEG.

Sin embargo, la polidispersidad solo disminuye ligeramente al inicio de la titulación, y posteriormente se incrementa de forma paralela a la concentración del aditivo (Figura 9). El PEG es un polímero lineal soluble en agua, que al unirse a la proteína actúa como un bloque hidrofílico permitiéndole una mayor solubilidad. Sin embargo, puede formar redes con la proteína cuando se utiliza a concentraciones elevadas, propiciando la agregación de la misma (Meyuhás y Lichtenberg, 1996). Precisamente, este es el fenómeno que se observa con la lisozima de camarón. El PEG es muy utilizado en estudios de cristalización, debido a que en un principio estabiliza los agregados proteicos, y posteriormente favorece la obtención de núcleos de proteína que dan lugar a la formación de un cristal. Se recomienda utilizar una concentración del 1% de PEG 10,000 para la cristalización de lisozima de camarón.

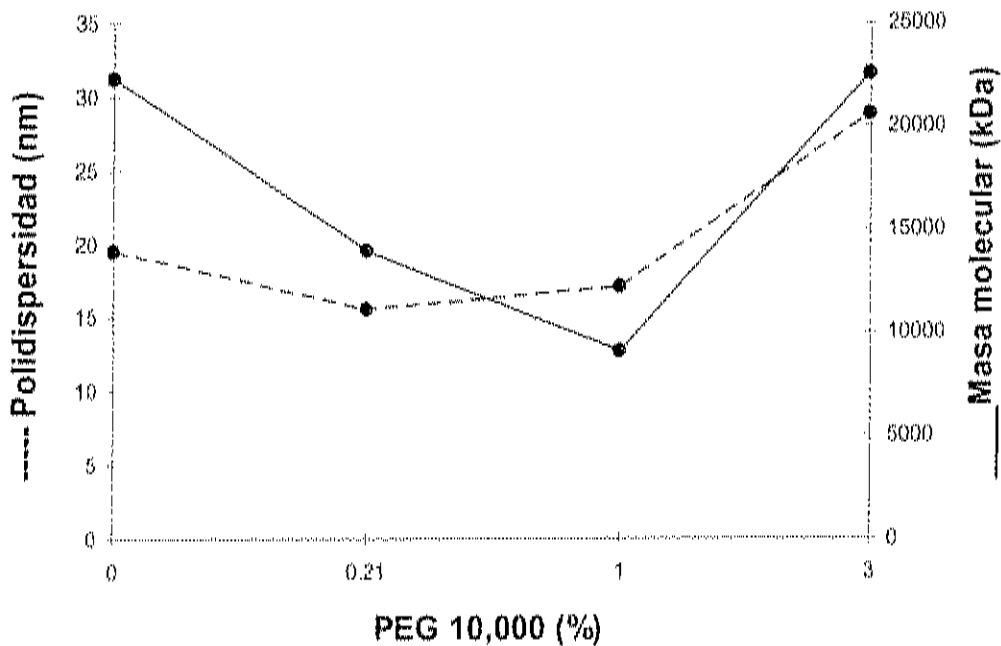


Figura 9. Efecto del PEG 10,000 sobre el estado de agregación de lisozima recombinante de camarón blanco

Dicroísmo circular

Los datos de elipticidad molar obtenidos por espectroscopía de dicroísmo circular se analizaron mediante el uso de los programas computacionales como CCA, Hennessey-Johnson y VARSELEC (Compton y Johnson, 1986). Estos métodos se basan en un análisis de correlación entre valores de elipticidad en el rango lejano del ultravioleta para proteínas de las cuales se conoce su estructura. Aplicando este análisis para las elipticidades de lisozima de camarón blanco en amortiguador de fosfatos pH 7.0, se dedujo que el contenido de estructura secundaria corresponde a: 29 % de hélices-alfa, 4.6 % de beta plegados, 5.2 % de giros, y el 63 % formado por estructura no ordenada (Figura 10). Todas las lisozimas tipo c reportadas a la fecha presentan una estructura secundaria constituida principalmente por hélices alfa, con valores por encima del 30 %. En lo que respecta a la estructura de hojas beta, estas se reportan con valores por debajo del 10 % (Jolles *et al.*, 1979). La lisozima de camarón coincide completamente con los patrones establecidos para las lisozimas del tipo c (Tabla 2).

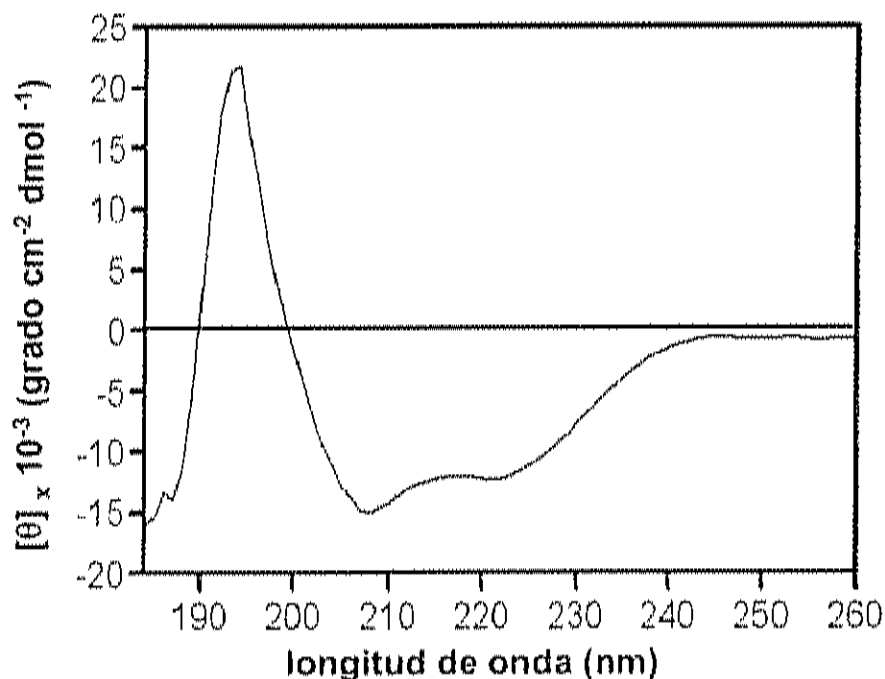


Figura 10. Espectro de dicroísmo circular de la lisozima recombinante de camarón blanco en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0.

Tabla 2. Comparación del contenido de estructura secundaria de lisozimas de invertebrados

Espece	Hélices Alfa %	Hojas Beta %	Lazos	Otras
<i>Penaeus vannamei</i> †	29	4.6	5.2	62.6
<i>Manduca sexta</i> ⁽¹⁵¹⁾	57	2.5	20	20.5
<i>Bombix mori</i> *	32.7	3.1	---	---
<i>Antheraea milita</i> *	34.2	6.7	---	---
Lisozima de clara de huevo de gallina *	30.23	6.2	---	---
Lisozima de humano *	29.23	7.69	---	---
Bacteriófago T4 *	64.63	4.88	---	---

† Resultados obtenidos en este trabajo

* Valores estimados a partir de las estructuras cristalinas depositadas en el PDB (Protein Data Bank)

La interacción lisozima-quítotriosa también se analizó por CD con la finalidad de monitorear los cambios en estructura secundaria que ocurren en la proteína al interactuar con un análogo de sustrato. La quítotriosa se utilizó en un intervalo de 0.004 a 0.050 mM y la lisozima a 0.018 mM, ambos en un amortiguador de acetatos 10 mM, pH 5.5. El análisis del espectro de CD de la lisozima a pH 5.5 arroja los siguientes porcentajes de estructura secundaria: hélices alfa 24.3 %, hojas beta 29 %, giros 6.4 %. Estos valores son considerablemente diferentes a los de lisozima de camarón a pH 7.0, en donde se aprecia la predominancia de las hélices alfa. Esto revela que los cambios en el pH están provocando cambios conformacionales en la proteína. La enzima pasa de una estructura con predominancia de hélices alfa a una donde con valores muy similares tanto de hélices alfa como de hojas beta, pero que también es activa enzimáticamente, como se mostró anteriormente. Considerando que la lisozima se mantiene almacenada en lisosomas ácidos para posteriormente ser secretada a hemolinfa, donde el pH es cercano a 7.0, esta proteína

debe sufrir un cambio conformacional en la estructura globular comúnmente reportada. Estas consideraciones deberán ser abordadas en futuros estudios.

También se realizó la interacción de la lisozima con quitotriosa a pH 5.5, y se calcularon los porcentajes de estructura secundaria de los diversos espectros de CD obtenidos (Figura 11, Tabla 3). Estos resultados muestran que disminuye la cantidad de hélices alfa conforme se incrementa la concentración del ligando y se acerca la saturación de la lisozima. Este reacomodo estructural es el que permite que la proteína exponga de mejor manera sus sitios de unión y activo. Al relacionar esto con el efecto del pH en la actividad, se revela que este cambio conformacional favorece la actividad hidrolítica de la lisozima.

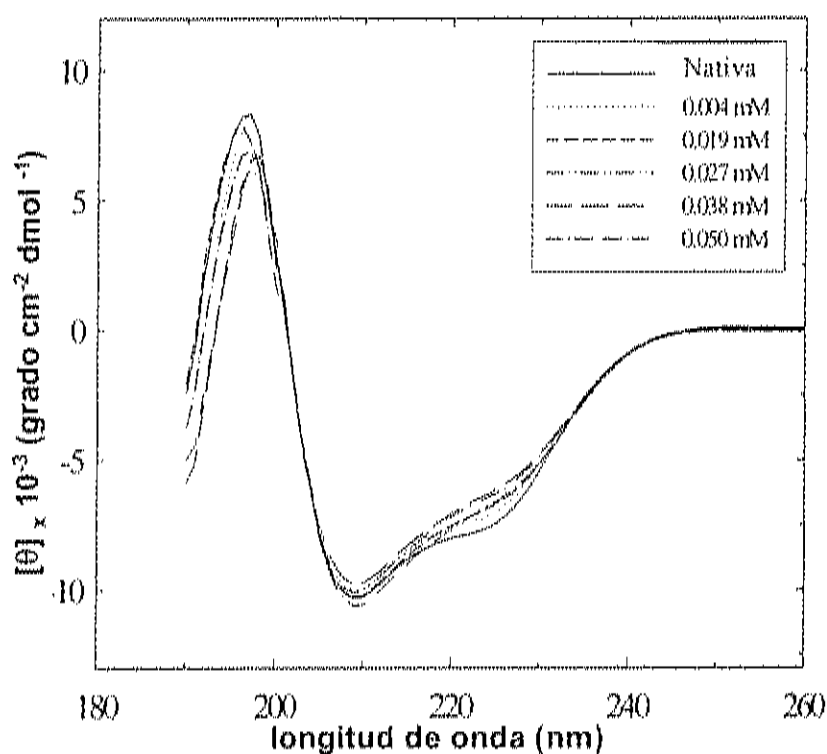


Figura 11. Espectros de dicroísmo circular de lisozima de camarón blanco a diferentes concentraciones de quitotriosa. En amortiguador de acetatos pH 5.5.

Tabla 3. Contenido de estructura secundaria de la lisozima de camarón blanco al interactuar con diferentes concentraciones de quitotriosa.

pH	Quitotriosa	Hélices α	Hojas β	Lazos	PP2	Otras
	(mM)	%	%	%	%	%
5.5	0.000	24.3	29.0	6.4	15.9	28.9
	0.004	12.6	35.5	7.3	17.5	31.4
	0.019	12.5	36.4	8.4	17.9	31.3
	0.027	12.1	35.2	7.2	16.5	31.0
	0.038	11.7	35.9	7.3	16.7	31.5
	0.050	11.0	36.4	7.3	16.8	31.7

Calorimetría de Titulación Isotérmica

La ITC es una técnica que permite evaluar la energía de unión de la lisozima de camarón a la quitotriosa, y de esta forma evaluar la afinidad al ligando. El número de sitios de unión en la proteína (n), ΔH y K_a fueron obtenidos de la curva no lineal obtenida en base al modelo de un sitio de unión (Fig 12b). ΔG y ΔS son calculadas de estas magnitudes por el uso de la relación de datos mediante la siguiente fórmula $\Delta G = -RT \ln K_a$ y $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$. Ambas macromoléculas se disolvieron en amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.5 con 150 mM de NaCl a una temperatura de análisis de 25°C. La curva de titulación de lisozima con quitotriosa muestra señales negativas lo cual es típico de una reacción endotérmica (Figura 12a). Los valores de n indican que la estequiometría de unión es de 1:1, es decir, la proteína tiene un solo sitio activo. Las constantes de unión y disociación para la lisozima de camarón, así como para las lisozimas de clara de huevo de gallina y de ganso (Kawamura *et al.*, 2002) se muestran en la Tabla 4. Estas constantes revelan que la lisozima de camarón tiene una mejor interacción con su sustrato, basado en que sus valores

presentan un orden de magnitud mayor con respecto a la lisozima de gallina y de ganso. Es decir, se requiere diez veces menos cantidad de quitotriosa para saturar la lisozima de camarón que para saturar las otras lisozimas. Lo que lleva a resaltar que es la única lisozima reportada con una afinidad tan alta hacia a un análogo de sustrato, hasta la fecha.

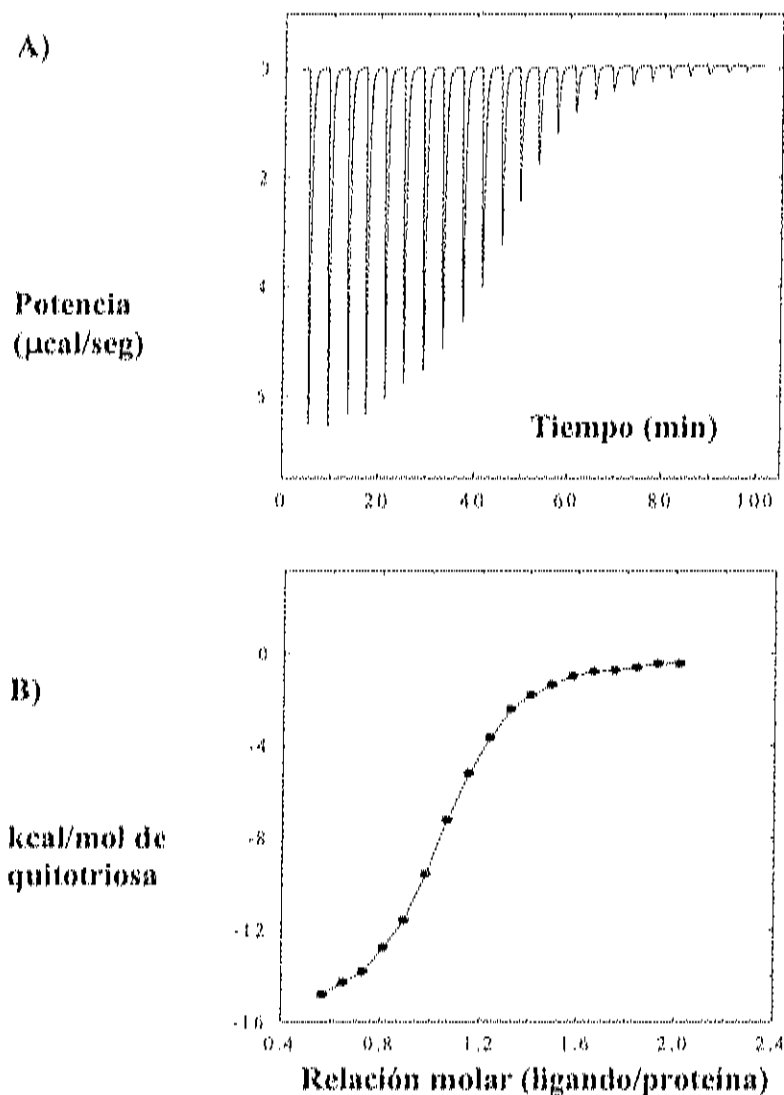


Figura 12. Perfil de titulación de la lisozima de camarón blanco con quitotriosa por ITC.

A) Curva de titulación. B) Curva de titulación normalizada

Tabla 4. Comparación de los parámetros termodinámicos de la interacción lisozima - quitotriosa para camarón blanco, clara de huevo de gallina y de ganso. Realizados a 25°C y pH 5.5.

Especie	K_a (μM^{-1})	K_d (μM)	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	TAS (kcal mol ⁻¹)	n
Lisozima de <i>P. vannamei</i>	0.35	2.43	-7.628 ± 0.08	16.02 ± 0.03	-8.353	1.020 ± 0.001
Lisozima de clara de huevo de gallina ⁽¹⁵²⁾	0.043	23.1	-8.85	---	---	0.99 ± 0.003
Lisozima II de clara de huevo de ganso ⁽¹⁵²⁾	0.034	29.7	-8.85	---	---	---

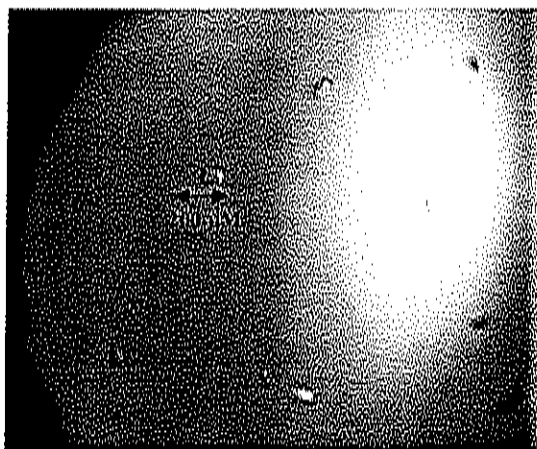
Cristalización

Con el fin de determinar la estructura tridimensional de la lisozima de camarón, se realizaron ensayos de cristalización con la proteína libre y en presencia del ligando, mediante la técnica de la gota colgante. La lisozima libre se encontraba en amortiguador Tris-HCL 50 mM, pH 7.0 y 8.5, mientras que en interacción con quitotriosa se encontraba en solución de acetatos 50 mM, pH 5.5 con 0.15 M de NaCl y en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 con 0.15 M NaCl. Los cristales se lograron mediante la utilización del juego de reactivos de matriz incompleta número II de Hampton (Tabla 5). Los cristales obtenidos de lisozima libre y en interacción con quitotriosa tuvieron un tamaño de 200 μm (figura 13 A y 13B, respectivamente). A pesar de que fueron pequeños, fue posible montar los cristales en el equipo de difracción de rayos X del Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas del Instituto de Química de la UNAM. En el experimento de difracción se encontró que el crioprotector utilizado no fue el adecuado, ya que dió lugar al

congelamiento del cristal y un decaimiento en la señal de difracción. Futuros estudios deberán evaluar las condiciones adecuadas de crioprotector, con el fin de obtener una difracción de rayos X adecuada para resolver la estructura tridimensional.

Las condiciones de cristalización de la lisozima libre y en interacción con su ligando fueron muy diferentes de las reportadas anteriormente. La HEWL (a 50 mg/mL) cristaliza en una solución de NaCl al 4 % en amortiguador de acetatos 50 mM, pH 4.5. Mientras que la lisozima de camarón blanco cristaliza a concentraciones de 1 a 4 mg/mL y en amortiguadores con pH entre 7.5 y 8.5, los cuales contienen alcoholes y PEG en su composición (Tabla 5). Esto revela que el estado de agregación en el que se encuentra la proteína sustituye a la alta concentración que generalmente se requiere para cristalizar a las lisozimas de otras especies. Así, al aumentar la constante dieléctrica por presencia de alcoholes, la proteína reduce su interacción. Posteriormente, al iniciarse la difusión de vapor, la constante dieléctrica disminuye y la proteína comienza a interactuar con sus semejantes.

A)



B)

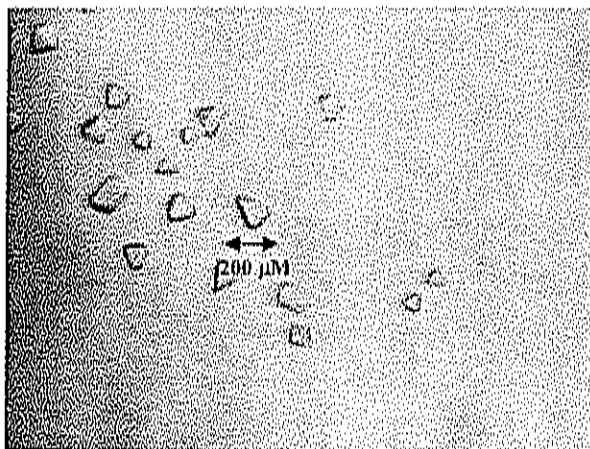


Figura 13. Microfotografías de cristales de lisozima de camarón. A) lisozima libre pH 7.0, B) lisozima-quitotriosa pH 5.5

Tabla 5. Condiciones de cristalización de la lisozima de camarón en presencia y ausencia de quitotriosa

Muestra	Amortiguador	Condición de crecimiento # 2
lisozima	pH 7	Sln. 40: 0.1M de Tris pH 8.5 y 25 % (v/v) tert-Butanol
	pH 8.5	Sln. 40: 0.1M de Tris pH 8.5 y 25 % (v/v) tert-Butanol
Lisozima- quitotriosa pH 5	Acetatos 50mM pH 5.5 con 0.15 M NaCl	Sln. 30: HEPES 0.1 M pH 7.5; 10 % (w/v) PEG 6000; 5 % (v/v) MPD
		Sln. 38: HEPES 0.1 M pH 7.5; 20 % (w/v) PEG 10,000
		Sln. 40: 0.1M de Tris pH 8.5 y 25 % (v/v) tert-Butanol
Lisozima- quitotriosa pH 7	Fosfatos 50mM pH 7 Con 0.15 M NaCl	Sln. 30: HEPES 0.1 M pH 7.5; 10 % (w/v) PEG 6000; 5 % (v/v) MPD
		Sln. 38: HEPES 0.1 M pH 7.5; 20 % (w/v) PEG 10,000
		Sln. 40: 0.1M de Tris pH 8.5 y 25 % (v/v) tert-Butanol

Conclusiones

La lisozima de camarón blanco obtenida de forma recombinante fue purificada cromatográficamente a homogeneidad con bajos rendimientos. Tiene un punto isoelectrico de 8.5 y una masa molecular de 17.1 kDa. Es la lisozima con mayor masa molecular hasta la fecha reportada, lo cual se atribuye a que cuenta con una inserción y una extensión en su secuencia aminoacídica de 7 y 9 aminoácidos, respectivamente. La constante de unión de la lisozima de camarón por la quitotriosa es un orden de magnitud mayor que las reportadas para la lisozima de la clara de huevo de gallina y de ganso. Lo cual la coloca como la lisozima con mayor capacidad de interacción con su sustrato.

El pH tiene un efecto bastante marcado en la estructura secundaria de la lisozima. A pH de 7.0, la proteína muestra una estructura predominantemente de hélices alfa. Sin embargo al colocarla a pH 5.5, tanto las hélices alfa como las hojas beta se presentan porcentajes muy similares. La titulación de la proteína con la quitotriosa provoca que el porcentaje de hélices alfa en su estructura disminuya marcadamente.

De igual forma, la interacción proteína-carbohidrato provoca disminución del estado de agregación de la proteína, el cual tiende nuevamente al incremento por encima de la concentración de saturación de la enzima. La presencia de NaCl no muestra un cambio significativo en el estado de agregación de la lisozima, mientras que el PEG ayuda a disminuir el proceso de agregación en concentraciones menores al 1 %. Además, el estado de agregación de la lisozima es estable por debajo de los 15°C, por lo que las placas de cristalización fueron incubadas a 4°C.

Los cristales de la lisozima libre y la lisozima-quitotriosa se obtienen en presencia de alcoholes y PEG, así como a pH alcalinos. La naturaleza especial de esta lisozima se evidencia al encontrar en la base de datos de cristalización de biomoléculas (Guilliland, 1994), que no se había reportado anteriormente aditivos como el terbutanol, PEG 6,000 ó PEG 10,000 para la cristalización de una lisozima.

Modelo teórico de la acción de lisozima de camarón contra bacterias Gram (-)

Las lisozimas en general tienen una función antibacteriana debido a su capacidad de hidrolizar el péptidoglicano de la pared de las bacterias Gram (+). Específicamente, esta enzima rompe el enlace β ,1-4 entre el ácido N-acetil murámico y la N-acetilglucosamina (Jolles y Jolles, 1984). Recientes estudios indican que las lisozimas de camarones peneidos tienen además función antibacteriana contra bacterias Gram (-), (Hikima, 2003; de la Re-Vega, 2005, de la Re-Vega *et al*, 2005). Las bacterias Gram (-) contienen un 10% de peptidoglicano, el cual se encuentra entre dos membranas. La membrana externa contiene lipopolisacáridos, en contraste, las Gram (+) tienen el peptidoglicano expuesto. Es de esperarse que la lisozima actúe con mayor eficiencia contra las bacterias Gram (+), debido a que no existe barrera alguna que impida su acceso al sustrato.

Como un antecedente a esta aparente contradicción, existe un reporte en el que se analizó una lisozima quimérica, es decir, se expresó el gen de la lisozima de huevo junto con una secuencia que codifica para un pentapéptido hidrofóbico (Ibrahim *et al.*, 1994). Esta lisozima presentó actividad contra *E. coli*, que es una bacteria Gram (-), y además perforó liposomas, indicando su capacidad de interactuar con membranas. El hecho que la lisozima de camarón tiene mayor actividad contra bacterias Gram (-), como los Vibrios que son de ambientes marinos, sugiere que esta función es evolutivamente importante. Basados en estos conocimientos y en la información obtenida al evaluar la interacción lisozima-carbohidrato se postula el siguiente modelo de acción (Figura 14).

Inicialmente, la lisozima de camarón se ancla a la membrana formada por lipopolisacáridos a través de la región en su carboxilo terminal, formada predominantemente por aminoácidos hidrofóbicos. Entonces, para que la enzima pueda hidrolizar el peptidoglicano, tendrían que ocurrir dos eventos necesariamente: penetración de la membrana y actividad hidrolítica dentro del periplasma. Aún cuando este trabajo no se enfocó a investigar directamente el mecanismo de acción, los datos experimentales muestran que dichos eventos son posibles.

La capacidad de interacción con membranas de una lisozima con residuos hidrofóbicos en el C-terminal fue mostrado por Ibrahim (1994). Al incorporarse a la membrana, la proteína debería sufrir un cambio conformacional. El periplasma o región entre las membranas externa e interna de las bacterias Gram (-) tiene un pH de aproximadamente 6.0 (Madigan *et al.*, 2000). Es precisamente a un pH ácido cuando la lisozima de camarón sufre un cambio conformacional hacia una estructura con mayor contenido de hojas beta. También se encontró que el cambio conformacional se acentúa al unir el ligando o sustrato en condiciones ácidas, como las del periplasma bacteriano. Además, la lisozima de camarón tiene una afinidad diez veces mayor a pH 5.5 comparado con las lisozimas de aves, por lo que se requiere de una menor cantidad de enzima para llevar a cabo su función.

Todo lo anterior son evidencias que sugieren pero no demuestran el modelo planteado (Figura 14). Futuros estudios experimentales deberán abordar estas hipótesis, ya que son las bases moleculares de su función, además como un sistema modelo de una enzima que se transloca a través de membranas. También es importante señalar que las técnicas biofísicas aportan información relevante y complementadas con técnicas bioquímicas de microscopía ayudarán a elucidar el mecanismo de acción de esta molécula.

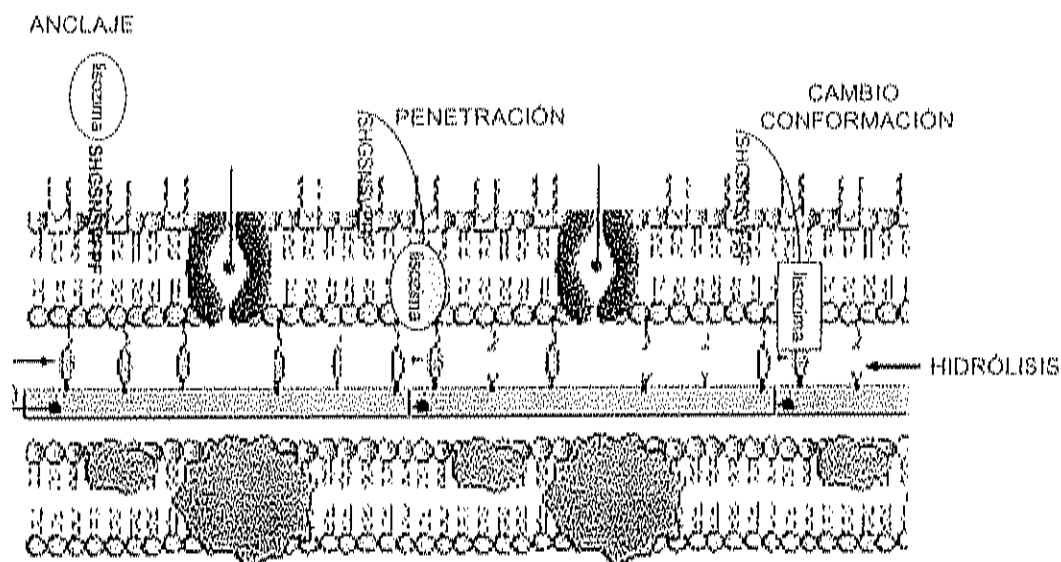


Figura 14. Modelo propuesto de la forma en que actúa la lisozima de camarón blanco contra bacterias Gram (-).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE HDL/BGBP

Purificación

La HDL/BGBP se purificó siguiendo las condiciones establecidas por Jiménez-Vega (2000). Mediante electroforesis SDS-PAGE con tamaño de poro de 7.5 % y bajo condiciones reductoras se comprobó su pureza y homogeneidad (Figura 15).

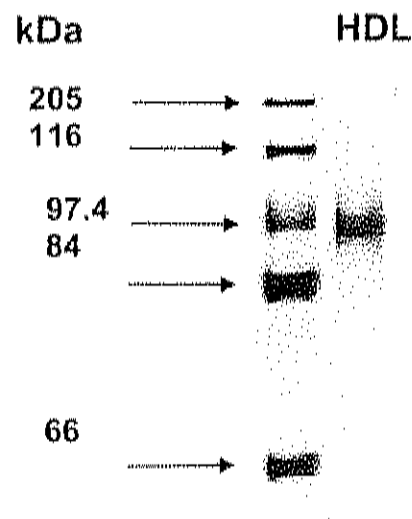


Figura 15. Gel de SDS-PAGE de HDL/BGBP de camarón blanco. Carril 1 marcadores de peso molecular; carril 2 proteína purificada.

Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz se utilizó para evaluar el comportamiento en solución de la HDL/BGBP de camarón blanco *P. vannamei*. La masa molecular y la polidispersidad fueron monitoreadas para determinar las condiciones donde la proteína presenta un menor estado de agregación, así como una disminución en la polidispersidad. Para esto fue necesario evaluar la conducta de la proteína al modificar su pH, temperatura, disolventes, fuerza iónica y al adicionar su ligando específico. Como se mencionó anteriormente, este estudio se realizó únicamente como base para la cristalización de la lipoproteína.

1) pH

El efecto del pH sobre la HDL/BGBP se estudió utilizando los siguientes amortiguadores: glicina-HCl, pH 3, acetato de sodio-ácido acético, pH 4.0 y 5.0, fosfato dibásico-fosfato monobásico, pH 6 y 7, Tris-HCl, pH 8.0, glicina-NaOH, pH 9.0 y 10.0, y fosfato monobásico-NaOH, pH 11. Las muestras de proteína (0.25 mg/mL) se inyectaron y analizaron en el equipo de DLS a una temperatura constante de 18°C. La masa molecular y la polidispersidad se incrementan notablemente a pH de 4, es decir, el mayor estado de agregación de la proteína se presenta en este valor. El pH de 7.0 es el que normalmente se mantiene a la proteína presenta mínimas alteraciones en polidispersidad y masa molecular con respecto al resto de los pH (Figura 16). De aquí que se decida seguir utilizando este valor de pH para la cristalización de la proteína.

2) Temperatura

El estado de agregación de la HDL/BGBP (0.5 mg/mL) se determinó al someterla a un intervalo de temperatura de 4 a 45°C. La masa molecular y la polidispersidad de los agregados se incrementan paralelamente al incremento de temperatura. Este proceso es reversible, al disminuir la temperatura se decrecen los valores de masa molecular y polidispersidad en la proteína (Figura 16). Las temperaturas elevadas incrementan la formación de interacciones hidrofílicas y disminuyen la viscosidad del medio y de la

proteína (Walstra, 1990; Betoluzzo *et al*, 1999). La HDL/BGBP es una lipoproteína, por lo que se puede suponer que la viscosidad de sus componentes lipídicos (57 %) disminuye ante el incremento de temperatura. Esto permite que la proteína se mueva más libremente por el solvente, permitiéndole interactuar en mayor medida consigo misma. Esta observación lleva a considerar que la HDL/BGBP debe de manejarse a bajas temperaturas para evitar que forme agregados grandes. Por lo que para tener mayor control sobre el proceso de cristalización deben de almacenarse las placas de cristalización a una temperatura de 4 °C.

3) Polietilenglicol (PEG) 400 y 6,000

La HDL/BGBP (0.552 mg/mL) se sometió a concentraciones variables de soluciones base de PEG 6,000 al 52.26 % y PEG 400 al 50 % y temperatura de análisis constante de 18°C. La masa molecular y la polidispersidad de la HDL/BGBP se incrementan al aumentar la concentración de ambas soluciones. Los PEG son polímeros que se unen a las proteínas y a las moléculas de agua a través de puentes de hidrógeno favoreciendo la solubilidad de las proteínas. Sin embargo, cuando la proteína tiene una carga electrostática elevada, puede actuar como puente de enlace entre las proteínas formando agregados grandes (Meyuhas y Lichtenberg, 1996). Esto revela la disponibilidad de los residuos cargados en la HDL/BGBP, o tal vez sean los fosfolípidos quienes interactúen con el PEG favoreciendo la agregación de la proteína.

La agregación se lleva a cabo lentamente, lo cual es ventajoso en estudios de cristalización. En donde se desea una agregación lenta de las moléculas para que se favorezca la formación de centros de nucleación (Figura 16).

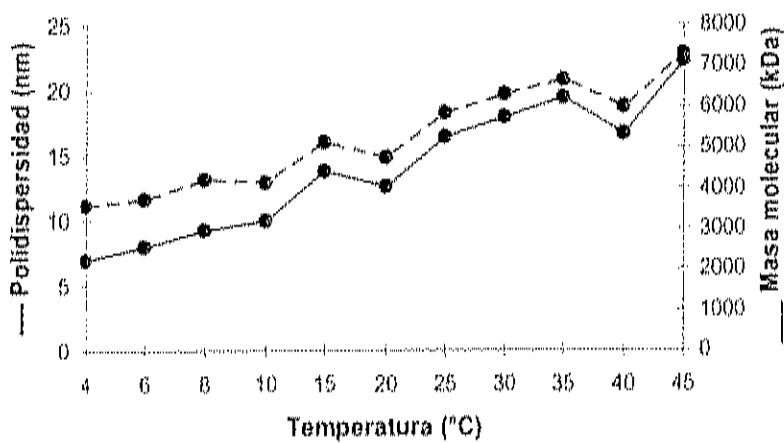
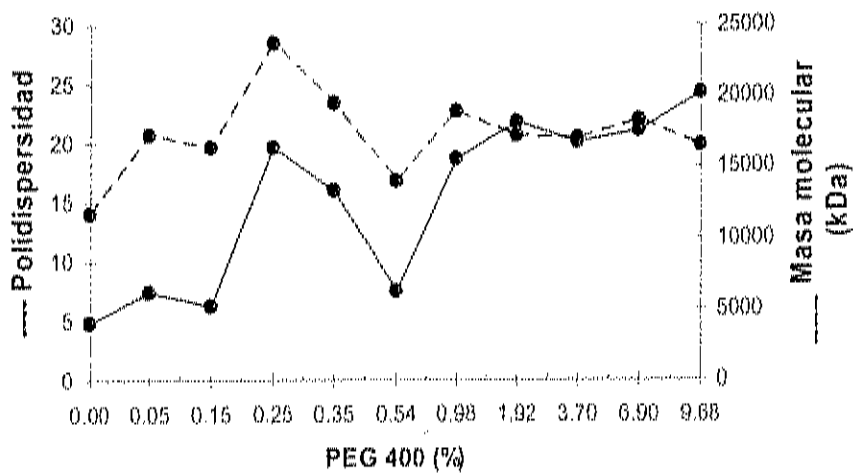
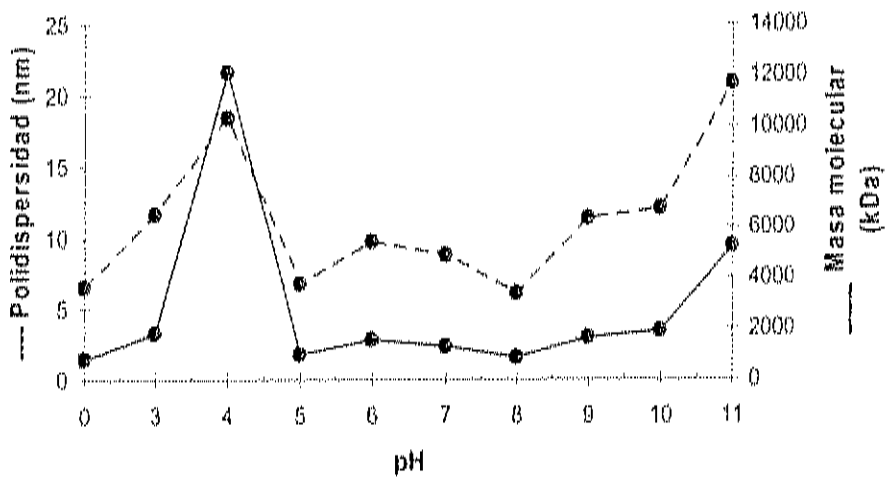


Figura 16. Efecto del pH, temperatura y PEG sobre el estado de agregación de la HDL/BGBP de camarón blanco.

4) Cloruro de sodio

El efecto de la salinidad se evaluó a una temperatura constante de 18°C y concentración de 0.5496 mg/mL de proteína. La HDL/BGBP presenta valores de polidispersidad y masa molecular incrementados directamente proporcionales al incremento de la concentración del NaCl (Figura 17). A concentraciones bajas de sales, las proteínas altamente hidrofóbicas precipitan, mientras que a elevadas concentraciones de sales se incrementa la solubilidad de estas proteínas. Se puede deducir que el acomodo de los agregados de HDL/BGBP tiene expuestos residuos cargados que les permiten comportarse como una proteína hidrofílica. Por lo que al incrementar la concentración de NaCl estas tienden a formar grandes agregados que llegan a precipitar.

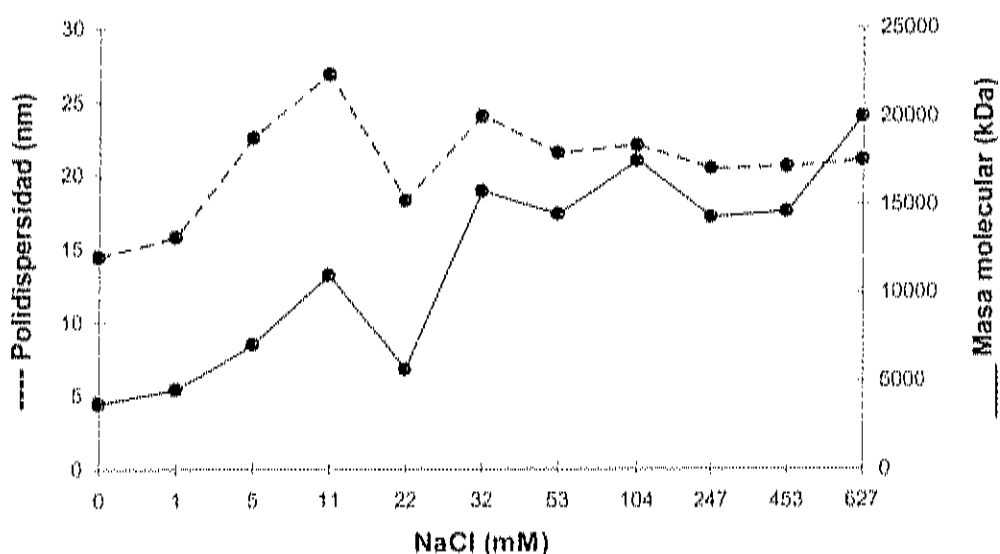


Figura 17. Efecto del cloruro de sodio sobre el estado de agregación de la HDL/BGBP de camarón blanco.

5) Tritón X-100 y SDS

El efecto del Tritón X-100 y SDS sobre la HDL/BGBP (0.552 mg/mL) se estudió colocando a la proteína en un intervalo del 0 al 10.3 % de Tritón X-100 y del 0 al 1.3 % de SDS, a una temperatura constante de 18°C. El Tritón disminuye los valores de masa molecular y polidispersidad conforme se incrementa la concentración del detergente, siendo posible obtener el monómero de proteína a partir de una concentración del 5 %. Para que esto ocurra deben de interactuar estas dos moléculas por 12 horas antes de realizar las mediciones. El SDS disminuye la agregación de la HDL/BGBP inicialmente, pero en porcentajes por encima del 0.15 % se incrementa la masa y la polidispersidad de sus agregados (Figura 18).

El SDS es un detergente desnaturizante que se une a las proteínas bloqueando las cargas propias de éstas, confiriéndoles una carga neta negativa y favoreciendo así su solubilidad (Bullis *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha observado que algunas proteínas, sobre todo las de membrana, presentan regiones resistentes a la acción del SDS. Se dice que esto es debido a que tienen sitios que no pierden su plegamiento, lo cual evita que se solubilizan en su totalidad (Sagne *et al.*, 1996). El comportamiento de la HDL/BGBP ante el SDS es bastante similar a lo reportado para estas proteínas de membrana, lo cual pudiera deberse a que la HDL/BGBP esta compuesta por un 57 % de lipidos.

El Tritón X-100 se clasifica como un tensoactivo no iónico. Este detergente basa sus propiedades en su carácter dual, es decir tiene un grupo hidrofílico y otro lipofílico. El grupo hidrofóbico se une a la proteína, mientras el hidrofílico ejerce un efecto solubilizante y tiende a llevar a la molécula a disolución completa. Esta capacidad del Tritón X-100 es la que ha permitido que los agregados de HDL/BGBP se disminuyan hasta llevar a la proteína a su estado monodisperso.

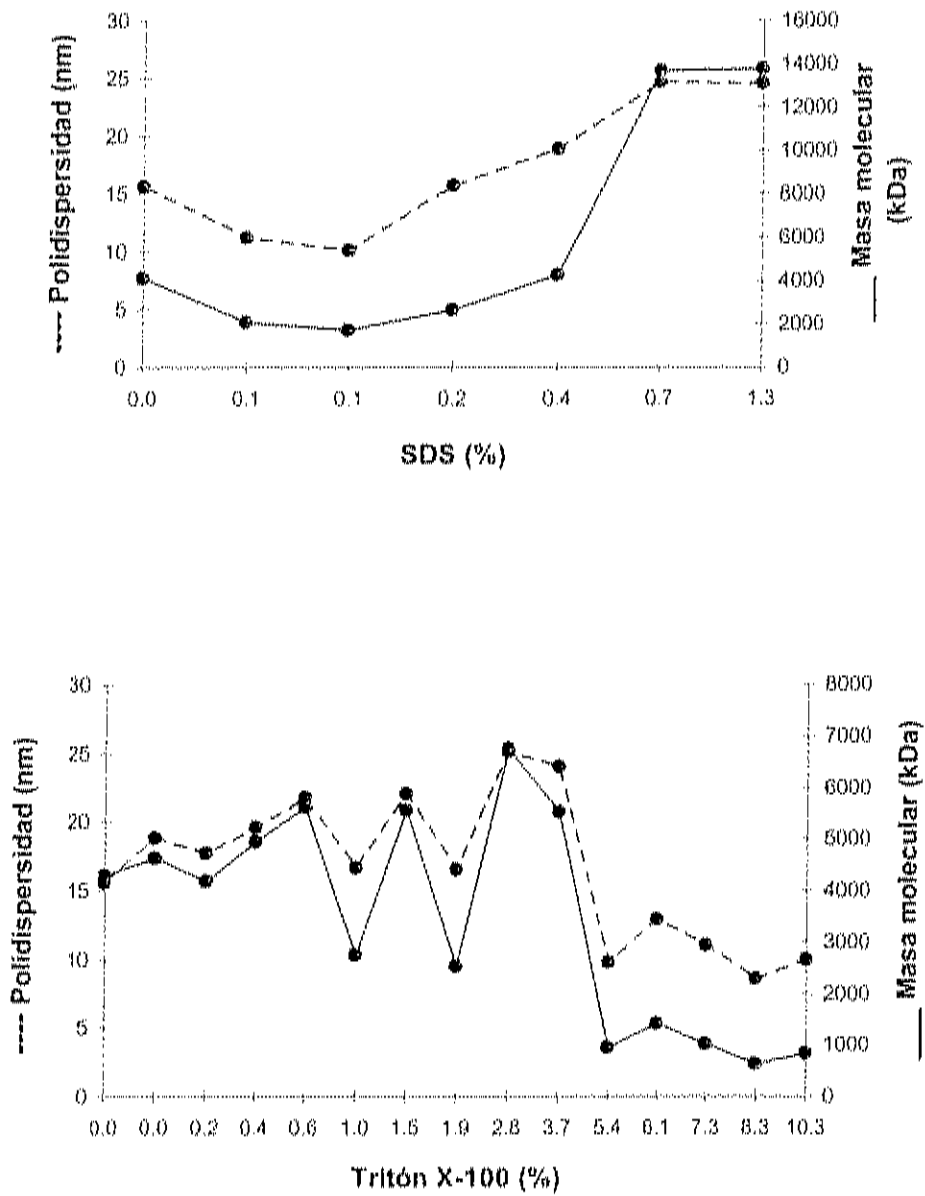


Figura 18. Efecto del Tritón X-100 y SDS sobre el estado de agregación de la HDL/BGBP de camarón blanco.

6) Calcio, Magnesio y Litio

Las soluciones de cloruro de calcio, cloruro de magnesio y cloruro de litio se utilizaron en un intervalo de 0.0 a 8.3 mM, 0.0 a 10.3 mM y 0.0 a 12.3 mM, respectivamente. La HDL/BGBP se utilizó a una concentración de 0.552 mg/mL y los datos se obtuvieron a temperatura constante de 18°C. Los valores de masa molecular y polidispersidad en los tres casos se incrementan conforme la concentración de las sales metálicas se incrementa. En la Figura 19 se muestra solo el comportamiento del Calcio, el cual es muy similar a los otros metales. Se dice que los iones metálicos actúan incrementando la estructura del agua, lo cual ayuda a que se incremente la solubilidad de las moléculas no polares. Sin embargo, ninguno de estos tres iones hizo que el estado de agregación se revirtiera.

7) Isopropanol y Etanol

Se utilizó una concentración de HDL/BGBP de 0.584 mg/mL, una temperatura constante de 18°C y etanol e isopropanol en un intervalo del 0 al 10 % y 0 al 20 %, respectivamente. Al incrementar la concentración de estos alcoholes, la masa molecular y la polidispersidad comienzan a presentar una lenta tendencia a la formación de agregados. Se muestra la gráfica solo de etanol por ser muy semejante a la de isopropanol (Figura 19). Los alcoholes actúan modificando la constante dieléctrica (medición de la facilidad para separar dos moléculas cargadas de forma diferente). Al disminuir esta constante se favorece que las moléculas cargadas de forma diferente puedan interactuar. Al manipular adecuadamente esta constante, se puede favorecer que la interacción intermolecular se de con lentitud, efecto que se busca en un proceso de cristalización. Por lo que la tendencia lenta a la agregación de la HDL/BGBP, al entrar en contacto con estos alcoholes, es algo que podría favorecer la cristalización de la proteína.

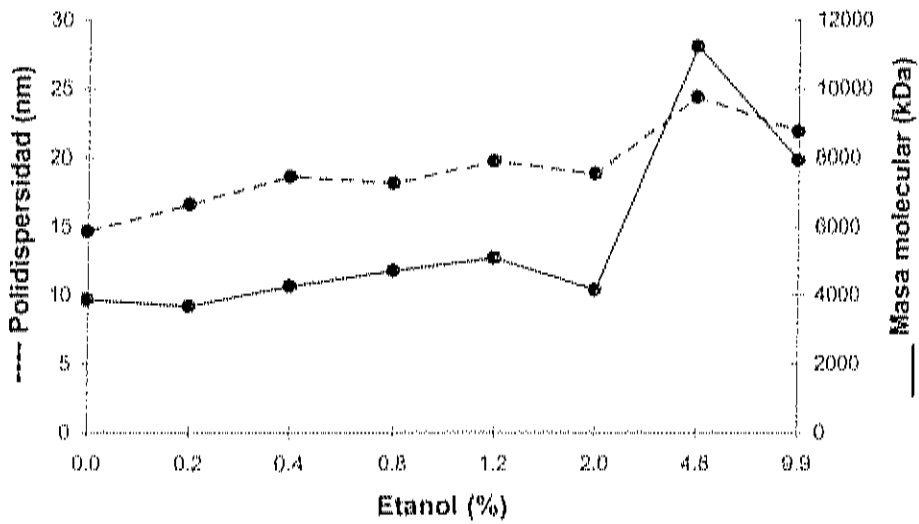
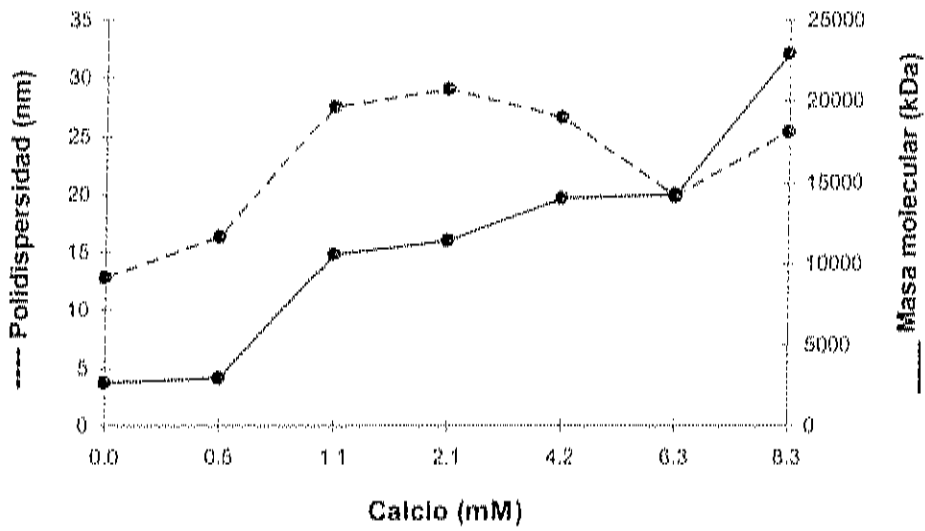


Figura 19. Efecto del calcio y etanol sobre el estado de agregación de la HDL/BGBP de camarón blanco.

8) Manitol, Sorbitol y Trealosa

El efecto de estos azúcares sobre la HDL/BGBP (0.552 mg/mL) se estudió a temperatura constante de 18°C y concentraciones de manitol, sorbitol y trealosa en intervalos del 0 al 4.4 %, 4.6 % y 5.2 %, respectivamente. Los valores de masa molecular se incrementan conforme se incrementa la concentración del azúcar. Por el contrario, la polidispersidad presenta una tendencia a la disminución, lo cual habla de la homogeneidad con la que se están formando los agregados (Figura 20, solo gráfica de trealosa). El efecto de los azúcares es el de atrapar moléculas de agua (Meyuhas y Lichtenberg, 1996). Las observaciones revelan que los azúcares no interactúan con la proteína en solución, sino que lo hacen solo con las moléculas de agua. Por lo que en respuesta se aceleró la formación de agregados de proteína.

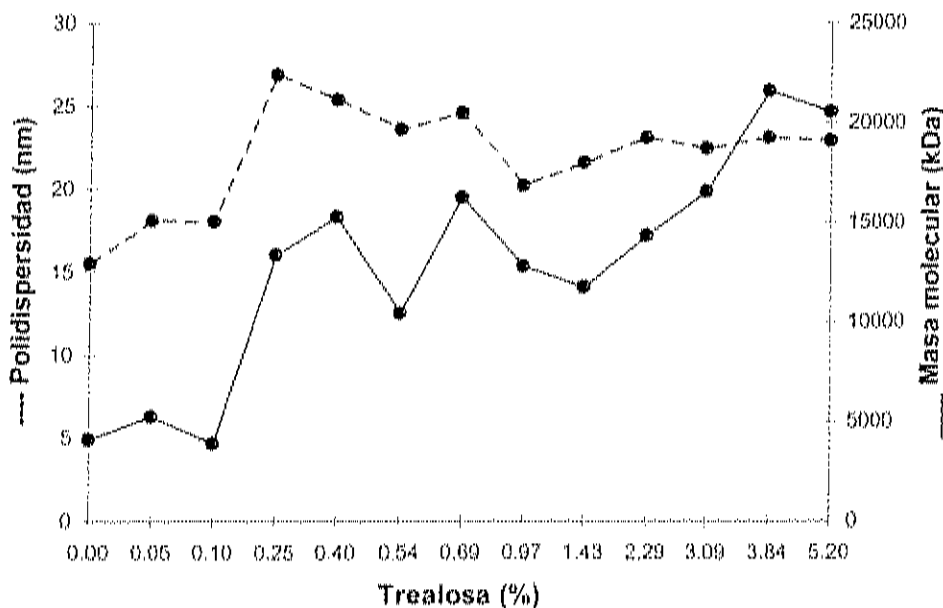


Figura 20. Efecto de la trealosa sobre el estado de agregación de la HDL/BGBP de camarón blanco.

9) Laminorribiosa

La HDL/BGBP (0.25 mg/mL) se hizo interactuar con la laminorribiosa en concentraciones de 0 a 12.36 μM y a una temperatura de 18°C. Los datos obtenidos de masa molecular y polidispersidad no muestran una tendencia clara, se incrementan y disminuyen (Figura 21). Estos comportamientos erráticos son similares a los observados en ITC en la interacción HDL/BGBP-laminorribiosa (Vargas-Requena, 2001), donde se encontraron fases endo y exotérmicas alternadas que sugerían un cambio conformacional errático.

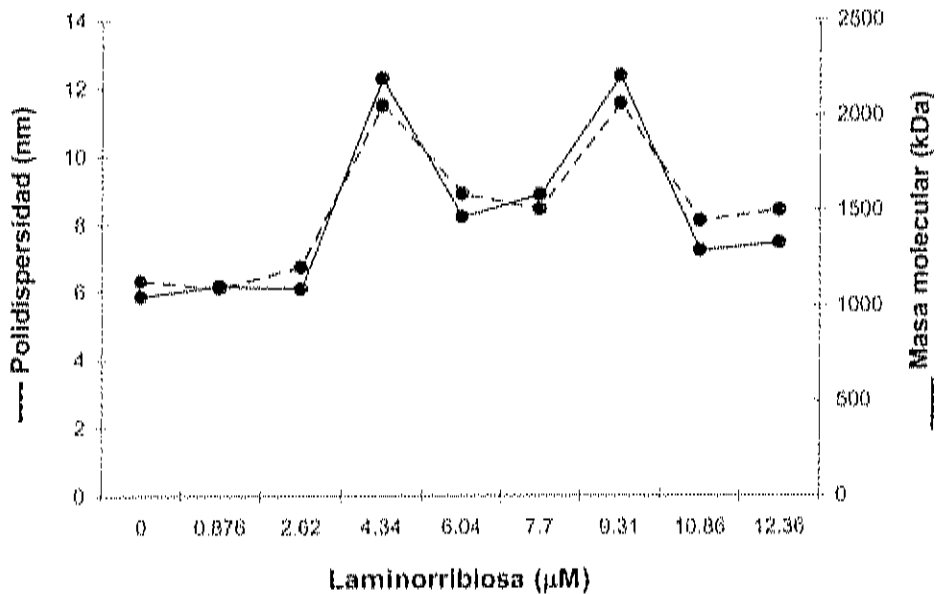


Figura 21. Efecto de la laminorribiosa sobre el estado de agregación de la HDL/BGBP de camarón blanco.

Dicroísmo circular

La estructura secundaria de la HDL/BGBP obtenida en anteriores estudios mediante dicroísmo circular muestra una proteína formada predominantemente por hojas beta (Vargas-Requena *et al.*, 2002). En esta ocasión, se estudiaron los cambios conformacionales en la proteína originados al entrar en contacto con la laminorribiosa (carbohidrato formado por uniones beta-1,3). Los espectros obtenidos a diversas concentraciones del ligando reflejan un cambio constante en la estructura secundaria, pero sin ninguna tendencia marcada (Figura 22, Tabla 6). Por esto, se propone que lo observado es un cambio en la estructura debido a un proceso constante de unión y desunión entre las moléculas de HDL/BGBP. Además, es un efecto muy semejante a lo observado mediante DLS (Figura 21), así como en anteriores estudios realizados mediante ITC (Vargas-Requena, 2001). Estos estudios de CD refuerzan el planteamiento de que al entrar en contacto la proteína con el carbohidrato se desencadena un proceso continuo de agregación y desagregación acoplado a cambios conformacionales y fases endo y exotérmicas.

Para tratar de establecer una relación entre este cambio conformacional y estudios anteriores, se graficaron los valores de estructura secundaria obtenidos para cada espectro contra la concentración de laminorribiosa (Figura 23). Se obtiene un punto de cruce donde se igualan porcentajes de hélices alfa y hojas beta. Esta concentración de laminorribiosa (aproximadamente 21 μM) es muy similar a la constante aparente de disociación (22 μM), obtenida por fluorescencia evaluando esta misma interacción (Vargas-Requena *et al.*, 2002)

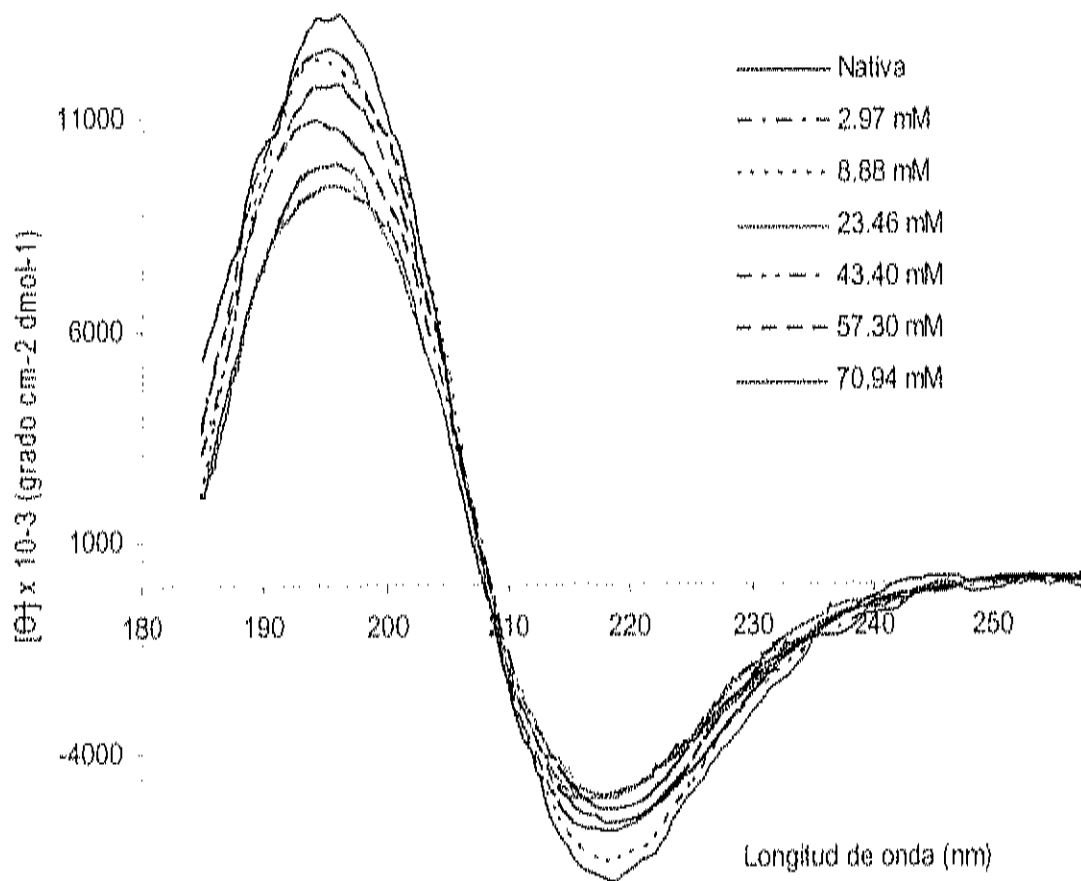


Figura 22. Espectros de dicroísmo circular de la interacción de HDL/BGBP de camarón blanco con diferentes concentraciones de laminaribiosa.

Table 6. Porcentajes de estructura secundaria de la HDL/BGBP de camarón blanco a diferentes concentraciones de laminorribiosa

Quitotriosa (μM)	helices α	hojas β	Vueltas	Otras
	%	%	%	%
0.000	20	53	2	25
2.97	13.6	22.6	18.9	44.9
8.88	8.2	30.8	11.7	49.3
23.46	10.8	28.8	8.6	51.8
43.40	16	23.6	13.4	47
57.3	29	1.6	19.5	49.9
70.94	19.6	10.5	7.4	62.5

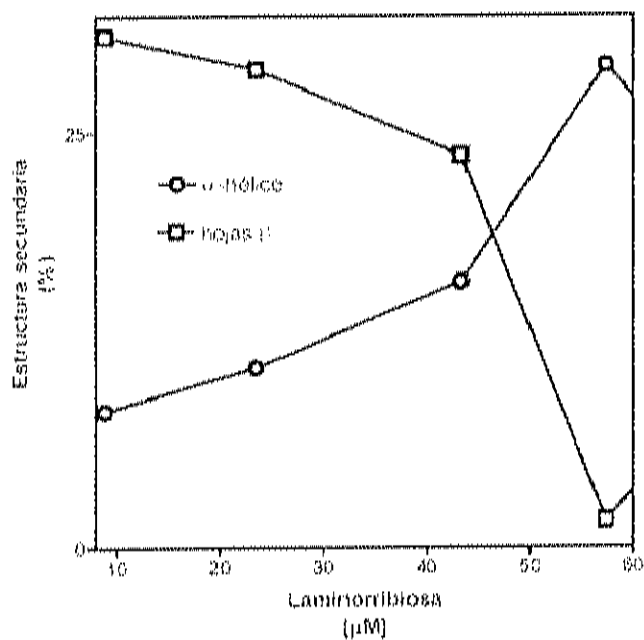


Figura 23. Gráfica de porcentajes de hélices alfa y hojas beta de la HDL/BGBP de camarón blanco a diferentes concentraciones de laminorribiosa.

Fluorescencia

Los efectos de la salinidad sobre la estructura de la HDL/BGBP evaluados por fluorescencia se hicieron utilizando una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de proteína. Al ser colocada en un medio con una salinidad de 0.45M, la proteína muestra un espectro cuya señal se mueve ligeramente hacia la derecha (corrimiento al azul) con respecto al espectro de referencia de la HDL/BGBP sin NaCl (Figura 24). Este corrimiento al azul se interpreta como un incremento en la exposición al solvente de los residuos de triptófano que constituyen la proteína (Dewey, 1991). Esto significa que la HDL/BGBP expone sus residuos aromáticos a la concentración de 0.45 M de NaCl, que es la fisiológica en la hemolinfa de camarón.

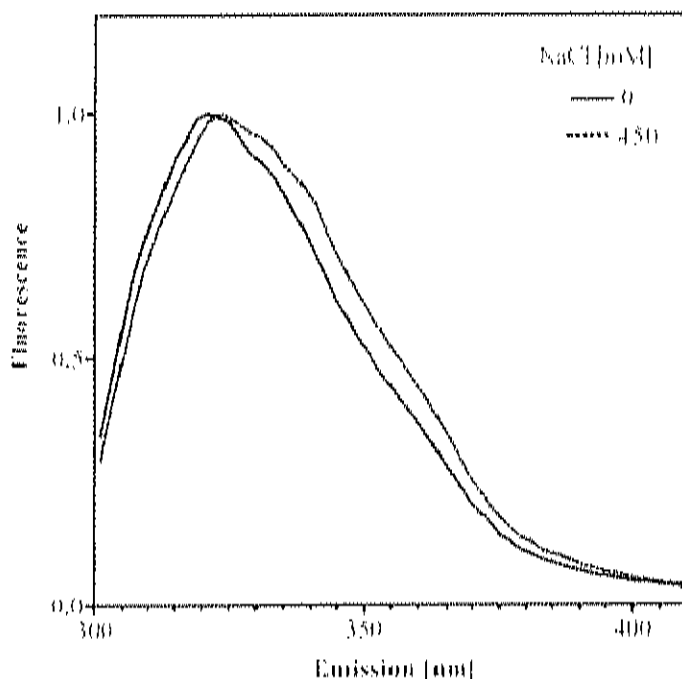


Figura 24. Espectro de fluorescencia de la HDL/BGBP de camarón blanco en presencia y ausencia de cloruro de sodio.

Cristalización

Las placas de cristalización se montaron mediante la técnica de la gota colgante utilizando una concentración de 2.0 mg/mL de HDL/BGBP en amortiguador de Tris-HCL, pH 7.0. Los microcristales se obtubieron con el kit de matriz incompleta número 1 de Hampton (Tabla 7). Los cristales obtenidos de la HDL/BGBP presentaron un tamaño de 50µm, por lo que fue imposible colocarlos en el equipo de difracción de rayos X (Figura 25). Sin embargo, cabe resaltar que la obtención de microcristales de una lipoglicoproteína es un alcance muy importante.

Tabla 7. Condiciones de cristalización de la HDL/BGBP.

Muestra	Amortiguador	Condición de crecimiento kit 2
HDL/BGBP	pH7.0	Solución 10: acetato de amonio 0.2M, acetato de sodio trihidratado 0.1M pH4.6, PEG 4000 30% w/v
		solución 26: acetato de amonio 0.2M, citrato trisódico dihidratado0.1M pH 5.6, 2-metil 2,4-pentanediol 30% v/v
		solución 29: HEPES 0.1M pH 7.5, Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 0.8M
		solución 45: acetato de Zinc dihidratado 0.2M, cacodilato de sodio 0.1M pH 6.5, PEG 8000 18% w/v

Hay pocos ejemplos de lipoproteínas cristalizadas en presencia de lípidos. La fosfotilina de la yema de huevo de la lamprea se ha cristalizado y obtenido su estructura a 2.8 Å (Raag *et al.*, 1988). También de una hemolipoproteína de la pulga del ganado *Boophilus microplus* (Alves *et al.*, 2004), donde la resolución fue de 2.1 Å y aun no ha sido determinada su estructura. En este trabajo usan hexanediol, similar al pentanediol usado con HDL/BGBP. Y el estudio más completo de la apo A-1 de humanos donde se plantea un modelo conteniendo lípidos y una forma discoidal (Borhani *et al.*, 1999; Segrest *et al.*, 1999). Estudios de microscopía electrónica de LDL de humano han llegado a modelos de baja resolución de 27 Å (Lunin *et al.*, 2001). De ahí que este resultado deberá continuarse en futuros estudios para contribuir al conocimiento estructural de lipoproteínas.

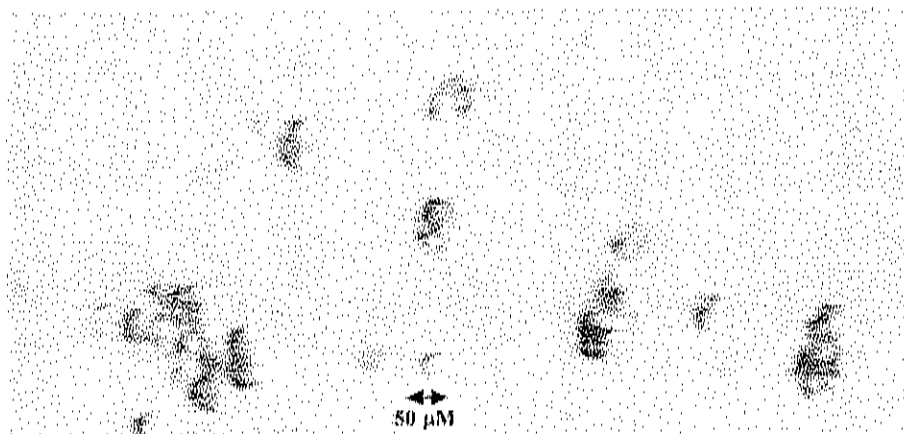


Figura 25. Microfotografía de cristales obtenidos de la HDL/BGBP.

Conclusiones

La laminorribiosa (disacárido beta-1,3-glucano), al interactuar con la HDL/BGBP induce cambios conformacionales en la proteína. La estructura que predomina en la HDL/BGBP es la de hojas beta, la cual cambia a predominantemente hélices alfa cuando entra en contacto con el glucano. Estos cambios en la conformación de la proteína favorecen el proceso de agregación de la misma. Las interacciones que tiene la HDL/BGBP consigo misma son bastante resistentes a la acción de aditivos, siendo el detergente Tritón X-100 el único compuesto que lleva a la proteína a su estado monomérico. El NaCl a una concentración de 0.45M (salinidad presente en la hemolinfa) favorece que los residuos aromáticos de la proteína estén más expuestos. Lo cual se ve que incrementa el estado de agregación de la HDL/BGBP por DLS. Se establecieron las condiciones de cristalización de la proteína, aunque los cristales obtenidos son aún muy pequeños para ser sometidos a difracción de rayos X.

Modelo teórico de la acción de la HDL/BGBP en su interacción con el hemocito de camarón

Al interactuar con su sustrato específico, el cambio conformacional en la HDL/BGBP provoca que las hélices alfa predominen con respecto a las hojas beta. Así mismo, altera el estado de agregación de la proteína. Las hélices alfa formadas parecen conferir a la proteína la capacidad de interactuar consigo misma. Por lo que basados en que es una lipoglicoproteína, estas hélices pudieran ser de carácter anfipático. Esta alteración creciente en el estado de agregación de la HDL/BGBP inducido por los beta-glucanos, pudiera ser suficiente para inducir la degranulación del hemocito al interactuar directamente con su membrana. Y por tanto favorecer a que el sistema proPO, el principal sistema de defensa de este crustáceo, sea liberado (Figura 26).

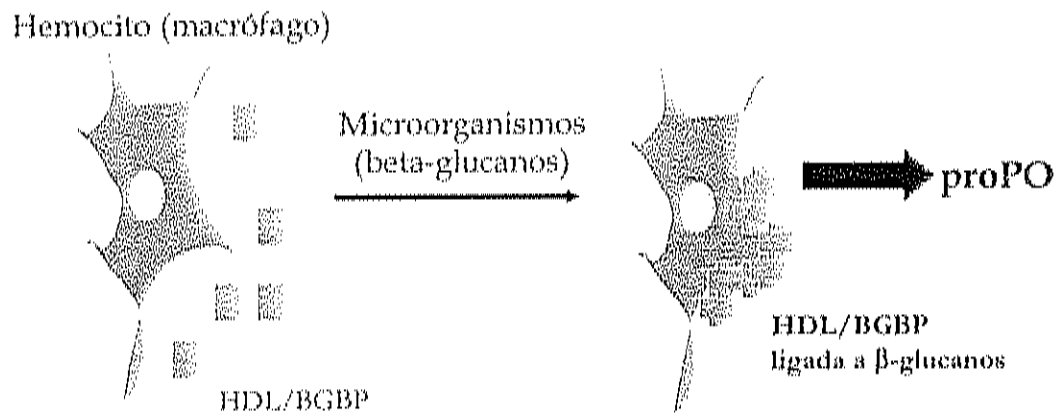


Figura 26. Modelo propuesto sobre la acción de la HDL/BGBP de camarón blanco al interactuar con los beta-1,3-glucanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboitiz, N., Vila-Perelló, M., Groves P., Asensio, J. L., Andreu, D., Cañada, F. J. y Jiménez-Barbero, J. (2004) NMR and modeling studies of protein-carbohydrate interactions: synthesis, three-dimensional structure, and recognition properties of a minimum hevein domain with binding affinity for chitoooligosaccharides. *Chem. Bio. Chem.* 5:1245-1255.
- Abraham, E. G., Nagaraju, J., Salunke, D., Gupta, H. M. y Datta, R. K. (1995) Purification and partial characterization of an induced antibacterial protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 65:17-24.
- Akiyama, K., Kawazu, K. y Kobayashi, A. (1995) A novel method for chemo-enzymatic synthesis of elicitor-active chitosan oligomers and partially N-deacetylated chitin oligomers using N-acylated chitotrioses as substrates in a lysozyme catalyzed transglycosylation reaction system. *Carbohydrate Res.* 279:151-160.
- Alabi, A. O., Latchford, J. W. y Jones, D. A. (2000) Demonstration of residual antibacterial activity in plasma of vaccinated *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* 187:15-34.
- Alder, A. J., Greenfield, N. J. y Fasman, G. D. (1973) Circular dichroism and optical rotary dispersion of proteins and polypeptides. *Methods in Enzymology.* 27: 675.
- Alves, L. R., Oliveira, P. L., Barbosa, J. A., Guimaraes, B. G. y Medrano, F. J. (2004) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* S60:1639-40.
- Anónimo. (2004) Reporte de mercado de camarón en México. *Revista Panorama Acuicola.*
- Anónimo. (2000) Alerta permanente en granjas de camarones. *Revista Panorama Acuicola.* 50-52.
- Anónimo. (2004) Topic protein purification by precipitation.
- Ashida, M. (1990) The prophenoloxidase cascade in insect immunity. *Res. Immunol.* 141: 908-910.
- Ashida, M. y Söderhäll, K. (1984) The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B: 21-26.
- Bach, J. F., y Lesavre, P. (1983) De la inmunidad a la inmunopatología. En *Inmunología*, Barcelona, España. Pp. 3-6.
- Barracco, M. A., Duvic, B. y Söderhäll, K. (1991) The β -1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus lentusculus*, when reacted with a β -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell Tissue Res.* 266: 491-497.
- Baxevanis, A. y Ouellette, B. F. (1998) *BIOINFORMATICS*, a practical guide to the analysis of genes and proteins. John Wiley and Sons.
- Bertoluzzo, S. M., Bollini, A., Rasia, M. y Raynal, A. (1999) Kinetic model for erythrocyte aggregation blood cells. *Molecules and Diseases.* 30: 339-349.
- Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C. y Sarma, V. R. (1965) Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature.* 206:757-61.

- Borhani, D. W., Engler, J. A. y Brouillette, C. G. (1999) Human apolipoprotein A-I: structure determination and analysis of unusual diffraction characteristics. *Acta Cryst. D Biol Crystallogr.* 55:2013-21.
- Bourne, Y., van Tilbeurgh, H., y Cambillau, C. (1993) Protein-carbohydrate interactions *Current Opinion in Structural Biology.* 3:681-686.
- Brand, L. y Johnson, M. L., Eds. (1997) *Fluorescence Spectroscopy. Methods in Enzymology.* Volume 278. Academic Press.
- Bulli, B. L., Li, X., Singh, D. N., Berthiaume, L. G. y Fliegel, L. (2002) Properties of the Na⁺/H⁺ exchanger protein. Detergent-resistant aggregation and membrane microdistribution. *Eur. J. Biochem.* 269:4887-4895.
- Butcher, L. A. y Tomkins, J. K. (1985) A comparison of silver staining methods for detecting proteins in ultrathin polyacrylamide gels on support film after isoelectric focusing. *Anal. Biochem.* 148:384-8.
- Cáceres-Martínez, J., Olivas-Valdéz, J. Á. y Unzueta-Bustamante M. L. (2003) ¿Es posible una camaronicultura "saludable" en las nuevas regiones donde su implementación nace con una gran expectativa? *Panorama Acuicola.* 8:64-66.
- Calderon-Arredondo, S. A. (2003) Sobreexpresión, replegamiento y Aislamiento de la lisozima de camaron blanco (*Penaeus vannamei*) en *Escherichia coli*. Tesis, Instituto Tecnológico de Los Mochis. Los Mochis, Sinaloa.
- Canfield, R. E. (1963) The amino acid sequence of egg white lysozyme. *J. Biol. Chem.* 238:2698-2707.
- Cerenius, L., Liang, Z., Duvic, B., Keyser, P., Hellman, U., Palva, E. T., Iwanaga, S. y Söderhall, K. (1994) Structure and biological activity of a 1,3-beta-D-glucan-binding protein in crustacean blood. *J. Biol. Chem.* 269:29462-7.
- Cheng, T. C. y Butler, M. S. (1979) Experimentally induced elevations in acid phosphatase activity in hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). *J. Invertebr. Pathol.* 34:119-24.
- Cheng, T. C. y Rodrick, G. E., (1974) Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft-shelled clam, *Mya arenaria*. *Biol. Bull.* 147:311-20.
- Compton, L. A. y Johnson, W. C. (1986) Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.* 155:155-167.
- Cook, G. M., Bellairs, R., Rutherford, N. G., Stafford, C. A. y Alderson, T. (1985) Isolation, characterization and localization of a lectin within the vitelline membrane of the hen's egg. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 90:389-407.
- de-la-Re-Vega, E., García-Galaz, A., Díaz-Cinco, M. E. y Sotelo-Mundo, R. R. (2005) Recombinant shrimp lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. En prensa en "Fish and Shellfish Immunology".
- de-la-Re-Vega, E., García-Orozco, K. D., Calderón-Arredondo, S. A., Romo-Figueroa, M. G., Islas-Osuna, M. A., Yepiz-Plascencia, G. M. y Sotelo-Mundo, R. R. (2004) Recombinant expression of marine shrimp lysozyme in *Escherichia coli*. *Electr. J. Biotechnol.* 7:295-301.
- Dewey, T. G., Ed. (1991) *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Publishing.
- Drenth, J. (1994) *Principles of protein X-ray crystallography*, Springer Verlag Publ.
- Dueruix, A. y Giege, R. (1992) *Protein and nucleic acid crystallization. A practical approach*; IRL Press: Oxford.

- Dunn, B. M. y Bruice, T. C. (1973) Physical organic models for the mechanism of lysozyme action. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 37:1-60.
- Duvic, B. y Söderhäll, K. (1993) β -1,3-glucan-binding proteins from plasma of the freshwater crayfishes *Astacus astacus* and *Procambarus clarkii*. *J. Crust. Biol.* 13:403-408.
- Duvic, B. y Söderhäll, K. (1990) Purification and characterization of a β -1,3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 265: 9327-9337.
- Elgavish, S. y Shaanan, B. (1998) Structures of the *Erythrina corallodendron* lectin and of its complexes with mono- and disaccharides. *J. Mol. Biol.* 277:917-32.
- Engstrom, P., Carlsson, A., Engstrom, A., Tao, Z. J. y Bennich, H. (1984) The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 3:3347-51.
- Eshdat, Y. y Sharon, N. (1977) Lysozyme. *Methods in Enzymol.* 46:403-414.
- Fenouil, E. y Roch, P. (1991) Evidence and characterization of lysozyme in six species of freshwater crayfishes from astacidae and cambaridae families. *Comp. Biochem. Physiol.* 99B:43-49.
- Foley, D. A. y Cheng T. C. (1977) Degranulation and other changes of molluscan granulocytes associated with phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.* 29:321-5.
- Fujimoto, S., Toshimori-Tsuda, I., Kishimoto, K., Yamano, Y. y Morishima I. (2001) Protein purification, cDNA cloning and gene expression of lysozyme from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. *Comp. Biochem. Physiol.* 128B:709-718.
- García-Orozco, K. D., Vargas-Albores, F., Sotelo-Mundo, R. R. y Yepiz-Plascencia, G. M., Molecular characterization of vitellin from the ovaries of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Comp. Biochem. and Physiol.* 133B:361-369.
- Germaine, G. R. y Tellefson, L. M. (1986) Potential role of lysozyme in bactericidal activity of *in vitro*-acquired salivary pellicle against *Streptococcus faecium* 9790. *Infect. Immun.* 54:846-854.
- Gilliland, G. L., Tung, M., Blakeslee, D. M. y Ladner, J. (1994) The biological macromolecule crystallization database, version 3.0: new features, data, and the NASA archive for protein crystal growth data. *Acta Crystallogr.* D50 408-413.
- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. y Vargas-Albores, F. (1999) Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) hemocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 122B: 77-82.
- Gray, T. E., Guzman, K., Davis, C. W., Abdullah, L. H. y Nettesheim, P. (1996) Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 14(1):104-12.
- Greenfield, N. (1986) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry.* 8: 4108.
- Gross, P. S., Bartlett, T. C., Browdy, C. L., Chapman, R. W. y Warr, G. W. (2001) Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* 25(7):565-77.
- Hall, M., Van Heusden, M. C. y Söderhäll, K. (1995) Identification of the major lipoproteins in crayfish hemolymph as proteins involved in immune recognition and clotting. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 216: 939-946.
- Halliday, J. A., Bell, K. y Shaw, D. C. (1993) Feline and canine milk lysozymes. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 106(4):859-65.

- Hanging drop vapor diffusion crystallization. Hampton research technical support internet: www.hamptonresearch.com
- Haynie, D. T. (2001) Binding equilibria. En *Biological Thermodynamics*, Editorial Cambridge. 223-231.
- Hietter, H., Luu, B., Goltzene, F., Zachary, D., Hoffmann, J. y Van Dorsselaer, A. (1989) Isolation and structure of two novel 6-kDa dimeric peptides from the corpora cardiaca of the insect *Locusta migratoria*. Molecular mass determination by mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* 182(1):77-84.
- Hikima, S., Hikima, J., Rojinnakom, J., Hirono, I. y Aoki, T. (2003) Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*, 316:187-95.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T. y Boman, H. G. (1980) Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106(1):7-16.
- Hultmark, D. (1996) Insect lysozymes. *EXS.* 75:87-102.
- Ibrahim, H. R., Yamada, M., Matsushita, K., Kobayashi, K. y Kato, A. (1994) Enhanced bactericidal action of lysozyme to *Escherichia coli* by inserting a hydrophobic pentapeptide into its C terminus. *J. Biol. Chem.* 269(7):5059-63.
- Ito, Y., Nakamura, M., Hotani, T. e Imoto, T. (1995) Insect lysozyme from house fly (*Musca domestica*) larvae; possible digestive function based on sequence and enzymatic properties. *J. Biochem. (Tokyo)* 118(3):546-51.
- Jain D, Nair, D. T., Swaminathan, G. J., Abraham, E. G., Nagaraju, J. y Salunke, D.M. (2001) Structure of the induced antibacterial protein from tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. Implications to molecular evolution. *J. Biol. Chem.* 276(44):41377-82.
- Jancarik, J., Scott, W. G., Milligan, D. L., Koshland, D. E. Jr. y Kim, S. H. (1991) Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 221(1):31-4.
- Jiménez-Vega, F. (2000) Identificación y caracterización de péptidos de la proteína que une beta-glucanos (BGBP) de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Tesis de maestría CIBNOR. La Paz, B.C.S. México.
- Jiménez-Vega, F., Sotelo-Mundo, R., Ascencio-Valle, F. y Vargas-Albores, F. (2002) 1,3-β-D-glucan binding protein (BGBP) from white shrimp *Penaeus vannamei*, is also an heparin binding protein. *Self and selfish immunology.* 13(3):171-81.
- Johansson, M. W. y Söderhäll, K. (1989) A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. *Insect Biochem.* 19: 183-190.
- Johansson, M. W. y Söderhäll, K. (1992) Cellular defence and cell adhesion in crustacean. *Anim. Biol.* 1: 97-107.
- Johnson, W. C. (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins*, 7: 205-214.
- Jolles, J., Jauregui Adell, J., Bernier, I. y Jolles, P. (1963) The chemical structure of hen's egg-white lysozyme: detailed study. *Biochim. Biophys. Acta.* 13(78):668-89.
- Jolles, J. y Jolles, P. (1961) Chemical structure of the lysozyme of chicken egg white: the developed formula. *C. R. Hebd Seances Acad. Sci.* 4(253):2773-2775.

- Jolles, J., Schoentgen, F., Croizier, G., Croizier, L. y Jolles, P. (1979) Insect lysozymes from three species of Lepidoptera: their structural relatedness to the C (chicken) type lysozyme. *J. Mol. Evol.* 14(4):267-71.
- Jolles, P. y Jolles, J. (1984) What's new in lysozyme research? *Mol. Cell. Biochem.* 63:165-89.
- Jones, R. D., Rowley, A. F. y Ratcliffe, N. A. (1989) Effect of exposure of *Pteris brassicae* larvae to 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on the natural antibacterial activity of serum. *J. Invertebr. Pathol.* 54(1):63-70.
- Kaaya, G. P. y Darji, N. (1998) The humoral defense system in tse-tse: differences in response due to age, sex and antigen types. *Dev. Comp. Immunol.* 12(2):255-68.
- Kanost, M. R., Sparks, K. A. y Wells, M. A. (1995) Isolation and characterization of apolipoprotein-III from the giant water bug (*Lethocerus medius*). *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 25(7):759-64.
- Kawamura, S., Toshima, G., Imoto, T., Araki, T. y Torikata, T. (2002) Amino acid residues in subsites e and f responsible for the characteristic enzymatic activity of duck egg-white lysozyme. *J. Biochem. (Tokyo)*. 131(5):663-670.
- Koganawasa, N., Aizawa, T., Masaki, K., Matsuura, A., Nimori, T., Bando, H., Kawano, K. y Nitta, K. (2001) Construction of an expression system of insect lysozyme lacking thermal stability: the effect of selection of signal sequence on level of expression in the *Pichia pastoris* expression system. *Protein. Eng.* 14:705-10.
- Komatsu, M. y Ando, S. (1998) A very-high-density lipoprotein with clotting ability from hemolymph of sand crayfish, *Ibacus ciliatus*. *BioSci. Biotechnol. Biochem.* 62: 459-463.
- Komatsu, M., Ando, S. y Teshima, S. I. (1993) Comparison of hemolymph lipoproteins from four species of crustacea. *J. Exp. Zool.* 266: 257-265.
- Kwan, T. H., Smoller, B. R. y Schneider, D. R. (1985) Alpha 1-antitrypsin and lysozyme in fibrous papules and angiofibromas. *J. Am. Acad. Dermatol.* 12(1 Pt 1):99-101.
- Kylsten, P., Kimbrell, D. A., Daffre, S., Samakovlis, C. y Hultmark D. (1992) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands. *Mol. Gen. Genet.* 232(3):335-343.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lanyi, J. K. (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38(3): 272-290.
- Lee, W.J. y Brey, P. T. (1995) Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm *Bombyx mori*. *Gene*. 161(2):199-203.
- Lee, Y. C. y Yang, D. (2002) Determination of lysozyme activities in a microplate format. *Analytical Biochemistry*. 310:223-224.
- Lee, R. F. (1991) Lipoproteins from the Hemolymph and Ovaries of Marine Invertebrates. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 7: 187-207.
- Lee-Huang, S., Huang, P. L., Sun, Y., Kung, H. F., Blithe, D. L. y Chen, H. C. (1999) Lysozyme and RNases as anti-HIV components in betacore preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:2678-2681.
- Lehninger, A. L. (1994) *Bioquímica*. 2ª ed., Ed. Omega. 59-72.
- Lemos, F. J. y Terra, W. R. (1991) Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. *Comp. Biochem., Physiol. B.* 100(2):265-268.

- Lemos, F. J., Ribeiro, A. F. y Terra, W. R. (1993) A Bacteria digesting midgut-lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae. Purification, properties and secretory mechanism. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23(4):533-541.
- Lockey, T. D. y Ourth, D. D. (1996) Purification and characterization of lysozyme from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220(3):502-8.
- López-Mayorga, O. (2001) Calorimetría isotérmica de titulación (ITC). Departamento de Química Física, Universidad de Granada.
- Lumin, V. Y., Lumina, N.L., Ritter, S., Frey, I., Berg, A., Diederichs, K., Podjarny, A. D., Urzhumtsev, A. y Baumstark, M. W. (2001) Low-resolution data analysis for low-density lipoprotein particle. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57(Pt 1):108-21.
- Madigan, T. M., Martinko, J. M y Parker, J. (2000) Brock: biology of microorganisms. University Carbondale. Prentice Hall Press. 9a edición. Southern Illinois, USA.
- Masaki, K., Aizawa, T., Koganesawa, N., Nimori, T., Bando, H., Kawano, K. y Nitta, K. (2001) Thermal stability and enzymatic activity of a smaller lysozyme from silk moth (*Bombyx mori*). *J. Protein. Chem.* 20(2):107-13.
- Mathews, C. K., van Holde, K. E. (1997) Biochemistry. Redwood City, CA.
- Mathies, R. A., Peck, K. y Stryer, L. (1990) Optimization of high-sensitivity fluorescence detection. *Anal Chem.* 62:1786-1791.
- Matsudaira, P. (1993) A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic Press. 15-41.
- Matsuura, A., Yao, M., Aizawa, T., Koganesawa, N., Masaki, K., Miyazawa, M., Demura, M., Tanaka, I., Kawano, K. y Nitta, K. (2002) Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures. *Biochemistry.* 41:12086-12092.
- Mattison, K. W., Nobbmann, U. y Dolak, D. (2001) The role of the hydrodynamic radius in biomolecular characterization. Protein solution Inc. Note Application.
- McPherson, A. (1989) Preparation and analysis of protein crystals. Krieger Publ. Malabar, Florida.
- Merril, C. R., Goldmann, D., Sedman, S. A. y Ebert, M. H. (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrilamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science.* 211:1437-1438.
- Meyuhas, D. y Lichtenberg, D. (1996) Effect of water-soluble polymers on the state of aggregation, vesicle size, and phase transformations in mixtures of phosphatidylcholine and sodium cholate. *Biophysical Journal.* 71: 2613-2622.
- Mohrig, W. y Messner, B. (1968) Lysozyme as antibacterial agent in honey and bees venom. *Acta Biol. Med. Ger.* 21(1):85-95.
- Morsky, P. y Aine, E. (1983) Determination of lysozyme in tears by immunoturbidimetric and optimised kinetic bacteriolytic methods. *Clin. Chim. Acta.* 129:201-209.
- Mulnix, A. B. y Dunn, P.E. (1994) Structure and induction of a lysozyme gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol Biol.* 24(3):271-81.
- Nangia-Makker, P., Conklin, J., Hogan V., y Raz, A. (2002) Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *TRENDS in Molecular Medicine* 8 (4) 187-192.
- Noga, S. J., Davis, J. M. y Donnenberg, A. D. (1996) Using mislabeled medium: who is at fault? *J. Hematother.* 5(5):445-7.

- Ochiai, M. y Ashida, M. (1988) Purification of a β -1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 263: 12056-12062.
- Otálora, F., Gavira, J. A., Capelle, B. y García-Ruiz, J. M. (1999) In-situ measurement of rocking curves during lysozyme crystal growth. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography.* 650-655.
- Phillips, D. C. (1966) The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci. Am.* 215(5):78-90.
- Pipe, R. K. (1990) Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal.* 22(11):595-603.
- Popescu, O., Checiu, I., Gherghel, P., Simon, Z. y Misevic, G. N. (2003) Quantitative and qualitative approach of glycan-glycan interactions in marine sponges. *Biochimie.* 85: 181-188.
- Powe, A. M., Fletcher, K. A., St. Luce, N. N., Lowry, M., Neal, S., McCarroll, M. E., Oldham, P. B., McGown, L. B. y Warner, L. M., (2004) Molecular fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence spectrometry. *Anal. Chem.* 76:4614-4634.
- Powning, R. F. y Davidson, W. J. (1976) Studies on insect bacteriolytic enzymes-II. Some physical and enzymatic properties of lysozyme from haemolymph of *Galleria mellonella*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 55(2):221-228.
- Powning, R. F. y Davidson, W. J. (1973) Studies on insect bacteriolytic enzymes. I. Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 45(3):669-86.
- Pusey, P. N. (1975) Dielectric and related molecular processes. En Light scattering and intensity fluctuation spectroscopy., The Chemical Society. London.
- Qasba, P. K. (2000) Involvement of sugars in protein-protein interactions. *Carbohydrate Polymers* 41: 293-309.
- Quijcho, F. A. (1989) Protein-carbohydrate interactions: basic molecular features. *Pure Appl. Chem.* 61, 1293-1306.
- Raag, R., Appelt, K., Xuong, N. H. y Banaszak, L. (1988) Structure of the lamprey yolk lipid-protein complex lipovitellin-phosvitin at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 200(3):553-69.
- Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W. y Rhodes, C. P. (1985) Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology.* 97: 183-350.
- Regel, R., Matioli, S. R. y Terra, W. R. (1998) Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 28(5-6):309-19.
- Rini, J. M. (1995) Lectin structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 551-577.
- Romo-Figueroa, M. G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundo, R. R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Soderhall, K. y Yepiz-Plascencia, G. (2004) Molecular cloning of a beta-glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Dev. Comp. Immunol.* 28(7-8):713-26.
- Rossignol, P. A. y Lueders, A. M. (1986) Bacteriolytic factor in the salivary glands of *Aedes aegypti*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 83(4):819-22.

- Rowley, A. F. y Rahmet-Alla, M. (1990) Prophenoloxidase activation in the blood of *Leucophaea maderae* by microbial product and different strains of *Bacillus cereus*. *J. Insect. Physiol.* 36: 931-937.
- Ruiz-Verdugo, L. M., García-Bañuelos, M., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I. Y Yepiz-Plascencia, G. M. (1997) Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B: 91-96.
- Sagne, C., Isambert, M., Henry, J. y Gasnier B. (1996) SDS-resistant aggregation of membrane proteins: application to the purification of the vesicular monoamine transporter. *Biochem. J.* 316: 825-831.
- Samaranayake, Y. H., Samaranayake, L. P., Pow, E. H., Beena, V. T. y Yeung, K.W. (2001) Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. *J. Clin. Microbiol.* 39:3296-3302.
- Sangki, B. y Yonggyun, K. (2003) Lysozyme of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*: activity induction and cDNA structure. *Comp. Biochem. and Physiol. Part B.* 135:511-519.
- Saul, S. J., Bin, L. y Sugumaran, M. (1987) The majority of prophenoloxidase in the hemolymph of *Manduca sexta* is present in the plasma and not in the hemocytes. *Develop. Comp. Immunol.* 11: 479-486.
- Segrest, J. P., Jones, M. K., Klon, A. E., Sheldahl, C. J., Hellinger, M., De Loof, H. y Harvey, S. C. (1999) A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 274:31755-8.
- Shugar, D. (1952) The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 8(3):302-309.
- Smith, P. K., Krohn, R. L., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Garther, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1):76-85. Erratum in: *Anal Biochem.* (1987) May 15;163(1):279.
- Smith, V. J. y Söderhäll, K. (1983) Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. *Cell Tissue Res.* 233: 295-303.
- Smith, V. J., Fernandes, J. M., Jones, S. J., Kemp, G. D. y Tatner, M. F. Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Fish Shellfish Immunol.* 10:243-260.
- Söderhäll, K. y Unestam, T. (1979) Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. *Can. J. Microbiol.* 25(3):406-14.
- Söderhäll, K. (1981) Fungal cell wall β -1,3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surface of crayfish hemocyte lysate. *Develop. Comp. Immunol.* 5: 565-573.
- Söderhäll, K. (1982) Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition system of arthropods? A review. *Develop. Comp. Immunol.* 6: 601-611.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. y Johansson, M. W. (1994) The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 712: 155-161.
- Söderhäll, K., Rögner, W., Söderhäll, L., Newton, R. P. y Ratcliffe, N. A. (1988) The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a β -1,3-glucan. *Insect Biochem.* 18: 323-330.

- Sotelo-Mundo, R. R., Islas-Osuna, M. A., de-la-Re-Vega, E., Hernandez-Lopez, J., Vargas-Albores, F. y Yepiz-Plascencia, G. (2003) cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 15(4):325-31.
- Sotelo-Mundo, R. R. (1993) Aislamiento y caracterización parcial de la lipoproteína en la hemolinfa del camarón blanco (*Penaeus vannamei* Boone). CIAD, A. C. Hermosillo, Sonora. 1-25.
- Spaziani, E. y Wang, W. L. (1991) Serum high-density lipoproteins in the crab, *Cancer antennarius*. 3. Density-gradient profiles and lipid composition of subclasses. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B: 555-561.
- Spies, A. G., Karlinsey, J. E. y Spence, K. D. (1986) Antibacterial hemolymph proteins of *Manduca sexta*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 83(1):125-133.
- Stratakis, E., Fragkiadakis, G. y Carpelí, M. E. (1992) Isolation and characterization of a non-sex-specific lipoprotein from hemolymph of fresh water crab *Potamon potamios*. *Biological Chemistry Hoppe Seyler.* 373: 665-674.
- Teshima, S. y Kanazawa, A. (1980) Lipid constituents of serum lipoproteins in the prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46: 57-62.
- Thörnqvist, P. O., Johansson, M. W. y Söderhäll, K. (1994) Opsonic activity of cell adhesion proteins and β -1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. *Develop. Comp. Immunol.* 18: 3-12.
- van Bueren, L. y Boraston, A. B. (2004) Binding sub-site dissection of a carbohydrate-binding module reveals the contribution of entropy to oligosaccharide recognition at "non-primary" binding subsites. *J. Mol. Biol.* 340, 869-879.
- van de Hulst, H. C. (1981) Light scattering by small particles. Dover Publications.
- Vargas-Albores, F. Sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia.* 46: 33-45.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M. A. y Ochoa, J. L. (1993) An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 299-303.
- Vargas-Albores, F., Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Montaña-Pérez, K., Jiménez-Vega, F. y Yepiz-Plascencia, G. (1998) Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products (T. W. Flegel). En *Advances in Shrimp Biotechnology*, Bangkok. 26-30.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Söderhäll, K. (1996) A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Develop. Comp. Immunol.* 20: 299-306.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F. y Yepiz-Plascencia, G. (1997) Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.* 116B: 453-458.
- Vargas-Albores, F. y Yepiz-Plascencia, G. (2000) Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture.* 191: 13-21.
- Vargas-Requena, C. L., Hernandez-Santoyo, A., Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Rodriguez-Romero, A., Soulages, J. L. y Sotelo-Mundo, R. R. (2002) Biophysical evidence of lipid and carbohydrate binding activities of shrimp high density lipoprotein/beta glucan binding protein. *Protein Pept. Lett.* 9(4):337-44.
- Vargas-Requena, C. L. (1992) Caracterización biofísica de la HDL/BGBP de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Tesis de maestría CIAD, A. C. Hermosillo, Sonora.
- Voet, D. y Voet, J.G. (1992) *Bioquímica*. Ed. Omega. 154-206.

- Walstra Pieter. (1990) On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.* 73: 1965-1979.
- Weis, W. I. (1996) Structural basis of recognition lectin-carbohydrate. *Ann. Rev. Biochem.* 65:441-473.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Jimenez-Vega, F., Ruiz-Verdugo, L. M. y Romo-Figueroa, G. (1998) Comparison of shrimp high density lipoprotein and beta glucan binding protein. In: Flegel T. W., editor. *Advances in Shrimp Biotechnology*. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. 153-158.
- Yepiz-Plascencia, G., Sotelo-Mundo, R., Vazquez-Moreno, L., Ziegler, R. e Higuera-Ciapa, I. (1995) A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B: 181-187.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Jimenez-Vega, F., Ruiz-Verdugo, L. M. y Romo-Figueroa, G. (1998) Shrimp plasma HDL and β -glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. *Comp. Biochem. Physiol.* 121B: 309-314.
- Yoshida, H., Kinoshita, K. y Ashida, M. (1996) Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 271: 13854-13860.

- Walstra Pieter. (1990) On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.* 73: 1965-1979.
- Weis, W. I. (1996) Structural basis of recognition lectin-carbohydrate. *Ann. Rev. Biochem.* 65:441-473.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Jimenez-Vega, F., Ruiz-Verdugo, L. M. y Romo-Figueroa, G. (1998) Comparison of shrimp high density lipoprotein and beta glucan binding protein. In: Flegel T. W., editor. *Advances in Shrimp Biotechnology*. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. 153-158.
- Yepiz-Plascencia, G., Sotelo-Mundo, R., Vazquez-Moreno, L., Ziegler, R. e Higuera-Ciapara, I. (1995) A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B: 181-187.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Jimenez-Vega, F., Ruiz-Verdugo, L. M. y Romo-Figueroa, G. (1998) Shrimp plasma HDL and β -glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. *Comp. Biochem. Physiol.* 121B: 309-314.
- Yoshida, H., Kinoshita, K. y Ashida, M. (1996) Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 271: 13854-13860.