

# Centro de Investigación en Alimentación Y Desarrollo, A. C.

CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LA HDL/BGBP DE  
CAMARÓN BLANCO (*Penaeus vannamei*)

POR

**CLAUDIA LUCÍA VARGAS REQUENA**

---

TESIS APROBADA POR LA

DIRECCIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

1.A.C.I., A.C.

REGISTRO DE LA TESIS  
EC/31:00

12/7/2001

HERMOSILLO, SONORA.

7 DE DICIEMBRE DEL 2001

# Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

ANÁLISIS QUÍMICO Y FÍSICO DE LA MIEL/BC3BP DE  
CAMARÓN BLANCO (I, Iweus vanna, nei)

Por

**L. ALIJA L. J. LA AR \_ ; AS RE () IJENA**

---

Tesis aprobada por In

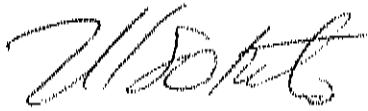
LA UNIV. DE SONORA, FAC. DE CIENCIAS, "J. J. LA AR \_ ; AS RE () IJENA"  
1) ORIGEN ANIMAL

Con el Requisito Parcial para Obtener el Grado de

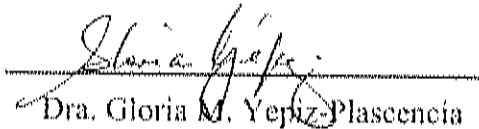
**MAESTRO EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Q. F. B. Claudia Lucía Vargas Requena, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, dentro del programa de Maestría de la Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal.



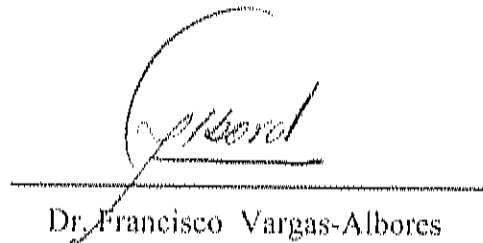
Dr. Rogerio R. Sotelo-Mundo  
Director de Tesis



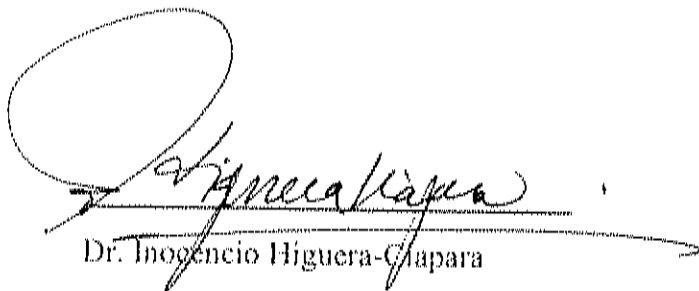
Dra. Gloria M. Yepiz-Plascencia



Dra. Alejandra Hernández-Santoyo



Dr. Francisco Vargas-Albores



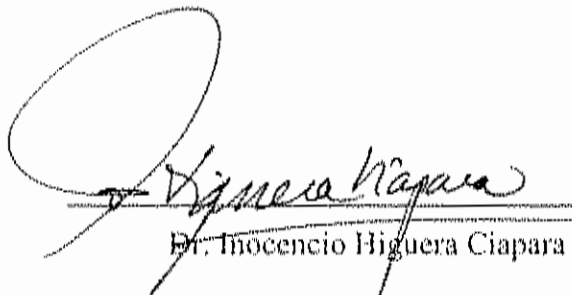
Dr. Inocencio Higuera-Guapara

## 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), Apto. Postal 1735, Hermosillo, Sonora.

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 o directora de tesis.

Firma



Dr. Inocencio Higuera Ciapara  
Director General



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca proporcionada para poder realizar mis estudios de posgrado y por el apoyo a través del proyecto J-31643-B No. 8220; "Estructura y función de la proteína HDL/BGBP de camarón blanco, *Penaeus vannamei*".

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., por haberme permitido alcanzar una meta más dentro de mi formación personal y profesional.

Al personal de Posgrado (Dr. Juan Pedro, Ana Isabel, Katy, Norma, y Héctor), por toda la ayuda brindada durante mis estudios.

A la Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal por proporcionarme su apoyo incondicional.

Al Laboratorio de Biotecnología Marina por el apoyo en la realización de esta tesis, en el uso de instalaciones, equipos, biblioteca, cómputo, servicios de fotocopiado, etc.

Al Dr. Rogerío Sotelo Mundo por permitirme trabajar a su lado y por contribuir en gran parte a mi formación profesional y humana. Su amistad, asesoría, tiempo y paciencia son cosas que siempre valorare.

A los doctores Alejandra Hernández, Inocencio Higuera, Gloria Yepiz y Francisco Vargas, por ser parte de mi comité de tesis. Sus comentarios enriquecieron en grande el presente trabajo.

A la Dra. Adela Rodríguez del Instituto de Química de la UNAM, por el apoyo brindado en la realización de este trabajo de tesis. Gracias por su confianza en mí.

A todos los maestros del programa de maestría por todos los conocimientos que con gran entusiasmo y empeño me transmitieron.

A los compañeros de generación por todos los momentos que pasamos juntos. Gracias por su apoyo.

A todos los integrantes del laboratorio de Biotecnología Marina por su amistad y apoyo moral en los momentos más difíciles.

A Don Hector por su apoyo en el presente trabajo.

A los bibliotecarios del CIAD (Magda, Luis y Fernando) por su invaluable ayuda.

A mis padres, hermanos y a Francisco por todo su amor.

A todos las personas que de una u otra forma hicieron posible la realización del presente trabajo de investigación. Les doy mi mas sincero y profundo agradecimiento.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>4</b>
<b>Lípidos y su transporte</b> .....	<b>4</b>
Ácidos grasos.....	4
Fosfolípidos.....	5
Colesterol.....	5
Lipoproteínas.....	5
<b>Sistema inmune</b> .....	<b>7</b>
Sistema profenoloxidasa.....	7
BGBP.....	8
<b>Técnicas bioquímicas y biofísicas empleadas en el estudio de la estructura de proteínas</b> .....	<b>9</b>
Determinación de estructura primaria mediante análisis de secuencia de ácidos nucleicos y mapeo peptídico.....	10
Determinación de estructura secundaria mediante espectroscopía de dicroísmo circular... 11	
Dispersión dinámica de luz.....	12
Constantes de afinidad mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC).....	13
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>15</b>
Objetivos particulares.....	15
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
Reactivos.....	17
Animales utilizados.....	17
Obtención de plasma.....	17
Purificación de HDL/BGBP.....	18
Determinación de la concentración de proteína.....	18
MicroBCA.....	18



Bradford .....	19
<b>Electroforesis .....</b>	<b>19</b>
Geles nativos .....	19
Geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) .....	19
Geles de tricina .....	20
Tinción con nitrato de plata .....	20
Tinción con aceite rojo O .....	21
<b>Digestión triptica .....</b>	<b>21</b>
Delipidación .....	21
Digestión con Tripsina .....	21
<b>Determinación de lípidos totales .....</b>	<b>22</b>
<b>Determinación de ácidos grasos totales .....</b>	<b>22</b>
Extracción de lípidos .....	22
Metilación de lípidos .....	23
Detección de ácidos grasos .....	23
<b>Determinación de puentes disulfuros .....</b>	<b>23</b>
<b>Dicroísmo circular .....</b>	<b>24</b>
<b>Dispersión Dinámica de Luz .....</b>	<b>24</b>
<b>Calorimetría .....</b>	<b>25</b>
<b><i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>Identificación de lípidos .....</b>	<b>26</b>
<b>Cuantificación de lípidos .....</b>	<b>26</b>
<b>Efecto de lípidos en la digestión enzimática .....</b>	<b>28</b>
<b>Determinación de ácidos grasos totales .....</b>	<b>29</b>
<b>Identificación de enlaces disulfuros .....</b>	<b>30</b>
<b>Constantes de afinidad mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) ...</b>	<b>32</b>
<b>Dispersión dinámica de luz .....</b>	<b>35</b>
a) Tiempo .....	36
b) Heparina .....	36
c) Temperatura .....	39

d) pH.....	39
e) Cloruro de Sodio.....	41
f) Polietilenglicol 6000 (PEG).....	41
<b>Dicroísmo circular.....</b>	<b>45</b>
<b><i>CONCLUSIONES</i>.....</b>	<b>49</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA</i>.....</b>	<b>51</b>

## TABLA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Detección de lípidos en la HDL/BGBP purificada por afinidad con heparina.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 2. Análisis Electroforético de Digestiones Tripticas de HDL/BGBP .....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 3. Determinación de enlaces disulfuros en la HDL/BGBP .....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 4. Titulación Calorimétrica Isotérmica de HDL/BGBP en complejo con Heparina.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 5. Cinética de agregación de HDL/BGBP mediante Dispersión Dinámica de Luz.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 6. Efecto de Heparina en la Cinética de Agregación de HDL/BGBP mediante Dispersión Dinámica de Luz .....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 7. Efecto de Temperatura en la valores hidrodinámicos de HDL/BGBP .....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 8. Efecto de pH sobre valores hidrodinámicos de HDL/BGBP .....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 9. Efecto de salinidad sobre valores hidrodinámicos de HDL/BGBP .....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 10. Efecto de PEG 6000 sobre valores hidrodinámicos de HDL/BGBP .....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 11. Espectro de Dicroísmo Circular de la BGBP/HDL nativa .....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 12. Espectro de Dicroísmo circular de la HDL/BGBP vs heparina .....</i>	<i>48</i>

## RESUMEN

La proteína HDL (lipoproteína de alta densidad)/BGBP (proteína que une beta glucanos), ha sido considerada como bifuncional ya que es una lipoproteína de alta densidad (1.14 g/mL), que participa en el transporte de lípidos desde el sitio de absorción y síntesis hacia los de utilización y almacenamiento. Además esta proteína une carbohidratos tipo beta-glucanos, lo cual favorece la activación del sistema profenoloxidasas, que es uno de los principales sistemas de defensa en crustáceos.

En el presente estudio se caracterizó estructuralmente la HDL/BGBP de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), mediante técnicas biofísicas. La HDL/BGBP purificada por cromatografía de afinidad a heparina contiene un 34% de lípidos, compuestos por los siguientes ácidos grasos: ácido caprílico (8:0); cáprico (10:0); laúrico (12:0); mirístico (14:0); pentadecanoico (15:0); palmítico (16:0); palmitoleico (16:1); heptadecanoico (17:0); esteárico (18:0); oleico (18:1); elaidico (18:1, trans-9); linoleico (18:2); araquídico (20:0); cis-11-eicosenoico (20:1); cis-11,14-eicosadienoico (20:2); araquidónico (20:4); cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (20:5); heneicosanoico (21:0); behénico (22:0); cis-13,16-docosadienoico (22:2); cis-4,7,10,13,19-docosahexaenoico (22:6); nervónico (24:1).

La HDL/BGBP nativa es parcialmente resistente a la degradación con tripsina, mientras que la proteína delipidada con acetona presenta una degradación total. ....

Es sugerido que: En proteínas, los lípidos los cuales la principal de la lipólisis; Un molécula, los lípidos lipídicos de la HDL/BGBP (HDL) p, rillió rk1.cmin:1r q1e la prn1cna 110 co1:11e11c plHillc:s disull'uru in1m11H1kcul:11'e",

tvlc:dianlc r:nlorimeirfa de 1.it11);ición isnt( rmicn S( ohsc.r\Ó k1 jneiwnc.ia d'. fa'Hs 1:Indut:n1'lic1s y c.;01.ónnic::1s, q11 sugi:(1\11 q111: se es'a Jll vando a c.:iho 11n proceso d -

agregación, lo cual no permitió determinar las constantes de afinidad ( $K_{dH}$ ) de HLL/BG-BI y el carbohidrato. Por otro lado, se corroboró este fenómeno mediante dispersión dinámica de luz. Se encontró que HLL/BG-BI de *Pellaea* „aunque se encuentra predominantemente monodispersa a un pH 4, temperatura de 5°C y baja concentración de cloruro de sodio,

Se determinó el contenido de estructura secundaria de HLL/BG-BI nativa, así como en presencia de heparina, mediante espectroscopia de dicroísmo circular. El análisis de los espectros indicó que la proteína contiene un 53 % de hélices  $\alpha$  (Y/  $\theta$ ), 11 % de  $\beta$ -hojas y 14 % de  $\beta$ -péptidos, 1120  $\text{\AA}$  de hélices  $\alpha$  y el polímero restante formado por lazos y estructura no ordenada. El espectro de dicroísmo circular de la agregación de HLL/BG-BI con heparina muestra que el contenido de hélices  $\alpha$  de la proteína se incrementa en un 10 % de heparina.

La agregación de HLL/BG-BI es similar estructuralmente a la lipoproteína de los insectos (lipoforina) y a lipoproteínas de alta kinesis (lipoforinas), por su contenido de  $\beta$ -hojas plegadas. Los cambios estructurales inducidos por heparina sugieren una interacción específica y conformacional que probablemente inducen un cambio conformacional en la proteína, posiblemente involucrando en su función.

## INTRODUCCIÓN

El transporte de lípidos así como el reconocimiento de partículas extrañas, son dos procesos bioquímicos de gran importancia para todos los organismos. La lipoproteína de alta densidad (HDL), fue inicialmente identificada en *Penaeus vannamei* (Sotelo-Mundo, 1993; Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1995), mientras que la proteína que se une a beta glucanos (BGBP), se identificó en camarón blanco, *Penaeus vannamei* (Vargas-Albores, *et al.*, 1996) y camarón café, *Penaeus californiensis* (Vargas-Albores, *et al.*, 1996). Posteriormente se reportó que tanto en langostino de agua dulce, *Pacifastacus leniusculus* (Hall, *et al.*, 1995; Duvic y Söderhäll, 1990), camarón blanco, (Vargas-Albores, *et al.*, 1996) y camarón café (Vargas-Albores, *et al.*, 1996), ambas funciones bioquímicas son realizadas por la misma proteína (Hall, *et al.*, 1995 ; Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1998).

En *Penaeus vannamei* así como en *Penaeus californiensis*, esta proteína tiene una masa molecular de aproximadamente 100 kDa y glicosilaciones formadas por manosa, glucosa y N-acetil glucosamina, además de que la secuencia del extremo amino terminal de la proteína es muy similar entre ellos y entre la de *Pacifastacus leniusculus* (Sotelo-Mundo, 1993; Vargas-Albores, *et al.*, 1997; Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1995; Ruiz-Verdugo, *et al.*, 1997)

Aún cuando existe información respecto a la descripción bioquímica de la HDL/BGBP en decápodos marinos y en langostino de agua dulce, a la fecha se desconocen las bases estructurales de la bifuncionalidad de esta proteína. Con ese fin, este trabajo aborda la caracterización biofísica y estructural de la HDL/BGBP de camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

## ANTECEDENTES

### Lípidos y su transporte

Los lípidos son componentes esenciales de la célula, dado que constituyen la membrana celular, también sirven como reserva energética y como constituyentes o precursores de hormonas (Mathews y van Holde, 1997). En crustáceos los lípidos son esenciales para el metabolismo, reproducción y almacenamiento energético de estos organismos (Muriana, *et al.*, 1995).

### **Ácidos grasos**

Existen cinco ácidos grasos que se consideran esenciales para el camarón: linoleico (18:2  $\omega$ -6), linolénico (18:3  $\omega$ -3), araquidónico (C20:4  $\omega$ -6), eicosapentanoico (20:5  $\omega$ -3) y docosahexanoico (22:6  $\omega$ -3), los cuales han sido reportados por tener una participación clave en la integridad y flexibilidad de la membrana celular (Dall, *et al.*, 1990; Dall y Moriarty, 1983). En el camarón *Penaeus japonicus*, los ácidos grasos presentes en la HDL de forma predominante son: palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), eicosamonoenoico (20:1 $\omega$ 9), eicosapentanoico (20:5 $\omega$ 3) y docosahexanoico (22:6 $\omega$ 3), (Teshima y Kanazawa, 1980). Mientras que en el camarón *Penaeus semisulcatus*, además de los mencionados para el *Penaeus japonicus* se encontraron a los ácidos 16:1 $\omega$ 7 y 18:2 $\omega$ 6 como componentes de los lípidos de la HDL (Lubzens, *et al.*, 1997).

## **Fosfolípidos**

Los fosfolípidos también son constituyentes fundamentales en el mantenimiento de la estructura e integridad de la membrana celular (Muriana, *et al.*, 1995). Además tienen una función importante en la digestión, absorción y transporte de lípidos en la hemolinfa de los crustáceos (Akiyama y Dominy, 1992; Teshima, *et al.*, 1986). En el caso específico del camarón los fosfolípidos promueven el crecimiento (Alava, *et al.*, 1993; Kanazawa, *et al.*, 1979), por lo que la deficiencia de éstos compuestos en la dieta puede resultar en una subutilización de otros lípidos dietarios (Teshima, *et al.*, 1986).

## **Colesterol**

El colesterol es un componente importante de las membranas celulares de todos los organismos. Es importante en la formación de nuevo tejido y es un precursor de hormonas esteroideas que son esenciales para el crecimiento, maduración y reproducción (Tsa, *et al.*, 1984; Mathews y Van Holde, 1997). Los crustáceos como el camarón, son incapaces de sintetizar esteroides *de novo* por lo que estos deben ser suministrados en la dieta (Teshima y Kanazawa, 1983; Zandec, 1964). El camarón juvenil puede sobrevivir con otros esteroides como ergosterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, 22-dehidrocolesterol, fucosterol y lanosterol, pero su crecimiento es inferior si se compara con el que se obtiene con colesterol (Dall, *et al.*, 1993; Teshima y Kanazawa, 1983).

## **Lipoproteínas**

Los lípidos se encuentran en la hemolinfa como un complejo soluble en medio acuoso mediante la interacción apoproteína – lípido, constituyendo así las lipoproteínas. Las lipoproteínas 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 (liproteína de alta densidad), 1.06 - 1.21 g/mL y VHDL (lipoproteína de muy alta densidad), > 1.21 g/mL, (Lee, 1991; Teshima y Kanazawa, 1980), siendo la HDL y la VHDL las más abundantes en crustáceos (Komatsu, *et al.*, 1993; Lee, 1991; Spaziani y Wang, 1991; Stratakis, *et al.*, 1992).

Las lipoproteínas de invertebrados a diferencia de las de vertebrados están constituidas máximo de tres polipéptidos, por lo que se les clasifica como apolipoproteínas simples (Kanost, 1990). En crustáceos existen dos clases de lipoproteínas, las relacionadas con la reproducción y las involucradas con 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. Las lipoproteínas que se presentan en organismos de ambos sexos, cumplen la función nutricional de transporte de lípidos del hepatopáncreas a 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 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 como el *Penaeus vannamei* y *Penaeus californiensis* en donde la HDL también ha sido identificada como BGBP (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1998).

La HDL en camarón blanco es una lipoglicoproteína con densidad de 1.15 g/mL, de aproximadamente 100 kDa, su punto isoeléctrico es de 5.8 (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1995; Sotelo-Mundo, 1993). 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 (Ruiz-Verdugo, *et al.*, 1997) y su contenido total de aminoácidos es muy

similar a la reportada para *Penaeus californiensis* (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1998) y *Pacifastacus leniusculus* (Cerenius, *et al.*, 1994).

### Sistema inmune

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 (Bach y Lesavre, 1983). 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 no ha sido detectada una respuesta inmune con inmunoglobulinas específicas (Vargas-Albores, *et al.*, 1997), sin embargo estos organismos cuentan con un rápido y eficiente sistema de defensa celular mediante fagocitosis, formación de nódulos y encapsulación (Söderhäll y Unestam, 1979; Vargas-Albores, *et al.*, 1997). También son capaces de detectar y responder a los antígenos de la pared celular de microorganismos como son lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos y  $\beta$ -glucanos, a través de proteínas de reconocimiento (Söderhäll y Unestam, 1979; Vargas-Albores, *et al.*, 1997).

Uno de los principales componentes de la inmunidad humoral en invertebrados es el sistema de la profenoloxidasa (Ashida, 1990; Johansson y Söderhäll, 1989; Yoshida, *et al.*, 1996).

### **Sistema profenoloxidasa**

El sistema de profenoloxidasa (proFO) está compuesto por una cascada enzimática la cual es estimulada por componentes de la pared celular de diversos microorganismos y culmina en la formación de melanina y sus precursores (Ratcliffe, *et*

*et al.*, 1985; Söderhäll, 1982). El componente principal de este sistema es la enzima proFO (Johansson y Söderhäll, 1989), se encuentra localizada en el interior de los hemocitos granulares de crustáceos (Gollas-Galván, *et al.*, 1999; Johansson y Söderhäll, 1989; Smith y Söderhäll, 1983), aunque en insectos también ha sido detectada de forma libre en plasma (Saul, *et al.*, 1987).

El sistema de la proFO puede ser activado por la presencia de LPS (Johansson y Söderhäll, 1992), o  $\beta$ -glucanos de la pared celular de hongos y microalgas (Ashida, 1990; Söderhäll, *et al.*, 1988). Estos favorecen la eliminación del contenido granular liberando así la proFO que, mediante la acción de la enzima activadora de la proFO (EaproFO), se transforma en fenoloxidasa (FO) (Ashida y Söderhäll, 1984; Gollas-Galván, *et al.*, 1999). La FO cataliza la oxidación de fenoles a quinonas las cuales continúan oxidándose hasta la formación de melanina. La melanina se puede depositar alrededor de objetos encapsulados, en nódulos de hemocitos y en sitios de infección causada por hongos en la cutícula, constituyendo de esta forma una importante barrera de defensa (Rowley y Rahmet-Alla, 1990; Söderhäll, *et al.*, 1994; Vargas-Albores, *et al.*, 1998).

## **BGBP**

La BGBP es una lipoglicoproteína que reconoce carbohidratos  $\beta$ -1,3-glucanos de microorganismos (Söderhäll, 1981). Esta proteína ha sido purificada de dos insectos: *Blaberus craniifer* (Söderhäll, *et al.*, 1988) y *Bombyx mori* (Ochiai y Ashida, 1988) y tres crustáceos: *Pacifastacus leniusculus* (Duvic y Söderhäll, 1990), *Penaeus californiensis*, (Vargas-Albores, *et al.*, 1996) y *Penaeus vannamei*, (Vargas-Albores, *et al.*, 1997). Este tipo de proteína también ha sido identificada en otros crustáceos como los langostinos de agua dulce, *Astacus astacus* y *Procambarus clarkii* (Duvic y Söderhäll, 1993), así como el cangrejo marino, *Carcinus maenas* (Thörnqvist, *et al.*, 1994).

Después de que la proteína reacciona con los beta-glucanos, el complejo tiene la capacidad de unirse a un receptor en la membrana celular de los hemocitos (Barracco, *et al.*, 1991), aumentando la activación de la profenoloxidasa (Hernández-López, *et al.*, 1996), así como la degranulación de hemocitos y actividades opsónicas (Johansson y Söderhäll, 1992; Vargas-Albores, 1995). El receptor para el complejo proteína-carbohidrato se propone que está más involucrado en la respuesta inmune, que con el transporte de lípidos (Vargas-Albores y Yepíz-Plascencia, 2000).

La BGBP de *Penaeus vannamei* y de *Penaeus californiensis*, pesan aproximadamente 100 kDa y la composición de aminoácidos es similar entre ellas. Además son glicoproteínas que contienen manosa, glucosa y N-acetil glucosamina (Vargas-Albores, *et al.*, 1997). Esta proteína también tiene la capacidad de unirse a heparina, por lo que se le considera una HBP (del inglés "*Heparin Binding Protein*", Jiménez-Vega, *et al.*, 2001)

### Técnicas bioquímicas y biofísicas empleadas en el estudio de la estructura de proteínas

La función de las proteínas dependen 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, fosforilación, entre otros. Esta secuencia se puede determinar mediante el mapeo peptídico o deducción

mediante el análisis de la secuencia de los ácidos nucleicos que lo codifican (Baxevanis y Quелlette, 1998; Madsudaira, 1993).

La determinación de estructura secundaria y terciaria de las proteínas, requiere del uso de técnicas experimentales, debido a que computacionalmente aun 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 en forma recombinante. La combinación de la calorimetría diferencial de barrido, el diroísmo circular, la fluorescencia y la resonancia magnética nuclear, han servido para evaluar la estabilidad conformacional de proteínas (Madsudaira, 1993).

#### **Determinación de estructura primaria mediante análisis de secuencia de ácidos nucleicos y mapeo peptídico**

El mapeo peptídico es la separación de los fragmentos producidos por la digestión enzimática o química de una proteína por HPLC-FR (cromatografía de líquidos de alta resolución, en una columna de fase reversa) y en base a sus propiedades fisicoquímicas como masa molecular y polaridad (Madsudaira, 1993). Posteriormente los péptidos son secuenciados por espectrometría de masas o degradación de Edman, para finalmente al traslapar las secuencias parciales se obtiene la secuencia total de la proteína. Estas dos técnicas son utilizadas para validar la fidelidad de la secuencia en la síntesis de proteínas en sistemas biológicos, especialmente en el caso de la deducción de secuencia de aminoácidos a partir de proteínas recombinantes (Honcock, 1996; Madsudaira, 1993).

Existen otras técnicas para llegar a conocer la estructura primaria de una proteína, una de las actualmente más utilizada es a través de la deducción de la secuencia aminoacídica partiendo de la región codificante del cDNA (Mathews y Van Holde, 1997). Sin embargo esta técnica tiene el inconveniente de que no permite

conocer la ubicación de las modificaciones postraduccionales que pudiese tener la proteína, teniendo que determinarse experimentalmente (Honeock, 1996).

### **Determinación de estructura secundaria mediante espectroscopía de dicroísmo circular**

La aplicación de espectroscopía de dicroísmo circular (DC), en la determinación de la estructura secundaria de proteínas, se basa en la quiralidad del enlace peptídico entre los residuos de aminoácidos que la conforman. Esta técnica está basada 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 diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz. Estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo  $\alpha$  y la distorsión de este plano genera una elipse. La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda incidente, pudiéndose obtener un espectro de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda ( $\lambda$ ). (Alder y Fasman, 1973; Greenfield, 1996; Johnson, 1990).

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

obtenidas son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación (Alder y Fasman, 1973; Greenfield, 1996; Johnson, 1990).

Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces peptídicos que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presente, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices alfa, beta plegados, giros y lazos), (Alder y Fasman, 1973; Greenfield, 1996; Johnson, 1990).

Para realizar este análisis, Hennessey y Johnson utilizaron como base de datos, los espectros de un conjunto de proteínas cuya estructura tridimensional era conocida y determinada. A partir de estos espectros, se demostró que basta la combinación lineal de 5 espectros base, para describir perfectamente los espectros experimentales. Además, se determinó que a cada uno de los 5 espectros base puede asignársele un contenido de estructura secundaria (Alder y Fasman, 1973; Greenfield, 1996; Johnson, 1990).

El análisis del espectro de dicroísmo circular de una proteína cualquiera consiste en encontrar la combinación lineal de los 5 espectros base que logra reproducir el perfil de la mejor manera posible del espectro experimental. 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 problema (Alder y Fasman, 1973; Greenfield, 1996; Johnson, 1990).

### Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de la luz (DLS), es una técnica que permite medir el coeficiente de difusión traslacional ( $D_T$ ), de una molécula o agregados en solución. Con técnicas de DLS es posible determinar el coeficiente de difusión, el radio hidrodinámico, el peso molecular y la polidispersidad de la proteína. Se ha encontrado que soluciones de proteína monodispersas tienen más probabilidades de cristalizar que una solución polidispersa (Pusey, 1975; Van De Hulst, 1981).

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. Iluminando la partícula con un rayo láser, la intensidad de la luz dispersada a un ángulo dado puede ser seguida en el tiempo. Como la partícula se mueve, la señal medida fluctuará. Midiendo las fluctuaciones y el camino en el cual ellas cambian, el coeficiente de difusión de las partículas y a partir de éste, el radio de la partícula pueden ser determinados con la ecuación de Stokes-Einstein. La dispersión de luz monocromática causada por las partículas en movimiento presentará fluctuaciones en su intensidad debido al movimiento browniano de las moléculas o agregados en solución (Pusey, 1975; Van De Hulst, 1981).

El análisis del decaimiento de la función de autocorrelación, es decir la medición de las fluctuaciones de la intensidad en función del tiempo correspondiente a la señal de la intensidad dispersada, proporcionará información cuantitativa acerca del comportamiento en solución de los agregados moleculares.  $D_T$  se relaciona con el radio hidrodinámico ( $R_H$ ), a través de la ecuación de Stokes-Einstein:  $D_T = k_B T / 6\pi\eta R_H$ , donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $\eta$  es la viscosidad de la solución,  $T$  es la temperatura absoluta y  $R_H$  el radio hidrodinámico.

También es posible determinar el peso molecular por medio de la ecuación de Mark Houwink:  $D_T = A_0 M^a$ . Ésta considera la relación directamente proporcional del



coeficiente de difusión traslacional con el peso molecular  $M$ , elevado a una potencia específica. Así, la constante de proporcionalidad que surge de esta ecuación toma en cuenta las propiedades del disolvente y se representa por  $A_0$ . Esta ecuación requiere de una estimación adecuada del factor de estructura ( $\nu$ ), 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).

### **Constantes de afinidad mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC)**

La calorimetría de titulación isotérmica tiene aplicaciones en la caracterización de interacciones receptor-ligando. En esta interacción se genera o absorbe calor y la medición de esta energía de una forma exacta permite determinar las constantes de afinidad, las reacciones estequiométricas y un perfil termodinámico de la reacción, la cual incluye entalpía ( $\Delta H$ ) y entropía ( $\Delta S$ ). A diferencia de otros métodos, la ITC no requiere inmovilización y/o modificación de reactantes, debido a que el calor de unión es un fenómeno que ocurre naturalmente (Haynie, 2001).

La ITC es una técnica que sirve para medir el cambio debido a la interacción entre dos moléculas. En el ITC una jeringa conteniendo el “ligando”, es titulado dentro de una celda conteniendo una solución de la “macromolécula” o “receptor”. Cuando los dos elementos interactúan, el calor liberado o absorbido es proporcional a la afinidad de la interacción. Conforme se llega a la saturación con la adición del ligando, 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. Cuando éste es graficado contra el radio molar del ligando añadido a la macromolécula en la celda, una isoterma de unión completa para la interacción es obtenida (Haynie, 2001).

El ITC es rutinariamente usado para estudiar todos los tipos de reacciones de unión incluyendo: antígeno – anticuerpo, proteína – ligando, DNA – proteína, unión a receptor, fármaco – DNA, lípido – proteína (Haynie, 2001).

## OBJETIVO GENERAL

Caracterizar biofísicamente la proteína HDL/BGBP del camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

### Objetivos particulares

- 1.- Identificar los ácidos grasos que componen la fracción lipídica de HDL/BGBP de *Penaeus vannamei*.
- 2.- Aplicar la digestión triptica e identificación de fragmentos mediante HPLC para determinar la presencia de puentes disulfuro de la HDL/BGBP.
- 3.- Determinar el contenido de estructura secundaria de la HDL/BGBP, en presencia y ausencia de heparina, mediante técnicas de dicroísmo circular.
- 4.- Caracterizar el proceso de interacción entre HDL/BGBP y heparina mediante calorimetría isotérmica.
- 5.- Estudiar el comportamiento en solución y la conducta de agregación de la HDL/BGBP mediante dispersión dinámica de luz.

## JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha incrementado notablemente el estudio de la estructura y función de proteínas, es un área que cada vez está siendo más explorada. Tal es el caso de este trabajo el cual permitió identificar características biofísicas que nunca antes se habían explorado para la HDL/BGBP de crustáceos. Todo con la finalidad de que estas herramientas biofísicas ayuden a una mejor comprensión de la bifuncionalidad que presenta la molécula. A este trabajo se le puede considerar como el puente de unión entre la caracterización bioquímica que hasta el momento se ha realizado y la deducción de la estructura terciaria de la HDL-BGBP, lo cual después de la realización de estos estudios cada día está más cercano. El camarón es una especie económicamente importante y es posible que un mayor entendimiento de estos procesos de lugar en un futuro a una serie de aplicaciones biotecnológicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

El metanol y los ácidos sulfúrico y clorhídrico fueron adquiridos de Merck, México (Naucalpan de Juárez, Edo. de México). El etanol y el acetonitrilo de JT-Baker (Mallinckrodt Baker, Xalostoc Edo. de México, México). La columna y precolumna de octadecil silano (C18), de Supelco México. Las membrana de diálisis de Spectra/Por (Spectrum Medical Industries, Los Ángeles, CA, USA). El ácido trifluoroacético (TFA) de B&J Brand (Burdick & Jackson Division, Muskegon, MI, USA) y la urea de Life Technologies, Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA). Los estándares de masa molecular de proteínas, la acrilamida, heparina, laminaribiosa y el resto de los reactivos utilizados se adquirieron de Sigma Chem., Co. (St. Louis MO., USA).

### Animales utilizados

Se utilizaron ejemplares adultos de camarón blanco (*Pen. vannamei*), de ambos sexos y aparentemente sanos, los cuales se obtuvieron de las granjas de cultivo de KINO Acuacultores en Bahía de Kino, Sonora y del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), campus Guaymas, Sonora.

### 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 una jeringa de 3

mL estéril. Se utilizó solución isotónica anticoagulante para camarón con EDTA (SIC-EDTA 850 mOsm/Kg; 450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.3) previamente enfriada a 10°C, en una proporción de 2:1 (2 volúmenes de SIC-EDTA por cada volumen de hemolinfa extraída), (Vargas-Albores, *et al.*, 1993). La hemolinfa se centrifugó a 800 *x 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.

### Purificación de HDL/BGBP

El plasma (30 mL) se dializó dos veces contra dos litros de agua desionizada por 16 h a 10°C con agitación constante (Vargas-Albores, *et al.*, 1996). Posteriormente se centrifugó a 3000 *x g* por 20 min a 4°C y el precipitado de color naranja se resuspendió en Tris 50 mM, pH 7.5 y fue la fuente para purificar HDL/BGBP por cromatografía de afinidad por heparina, de acuerdo a la metodología descrita por Jiménez-Vega (2000).

### Determinación de la concentración de proteína

Para la cuantificación de proteínas se utilizaron los métodos de:

#### **MicroBCA**

La cuantificación de proteína utilizando el kit de MicroBCA (PIERCE 23235) fue adaptada para microplaca (Hernández López, comunicación personal), como sigue: en una microplaca para ELISA (Nunc), se incubaron 25  $\mu$ L de la muestra con 200  $\mu$ L de la mezcla reactiva a 50:2:48 partes de los reactivos MA (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 2 N):MC (sulfato cúprico pentahidratado 4 % en agua):MB (ácido bicinconínico 4 % en agua), respectivamente. Se calculó el volumen total de líquido en la microplaca y en un vaso de precipitado se

colocó la cantidad faltante de agua para completar 100 mL. En un horno de microondas se expuso la placa y el vaso a una radiación de 2.45 GHz durante 30 seg. Transcurrido este tiempo, se enfrió la placa a 10°C por 3 min, para posteriormente leer la absorbancia a 550 nm en un lector de placas (BioRad Model 550 microplate reader, BioRad Richmond VA, USA).

### **Bradford**

Esta técnica se realizó en microplaca de la siguiente forma: se colocaron en un amicroplaca 25 µL de muestra y 200 µL del reactivo de Bradford (azul de Coomassie G 0.01 %, 5 % de etanol al 95 %, 10 % de ácido ortofosfórico al 85 %), (Bradford, 1976). La placa se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, al cabo de este tiempo se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas

## Electroforesis

### **Geles nativos**

Se utilizaron geles homogéneos de acrilamida con tamaño de poro al 7 y 7.5 % (8 x 10 x 0.1 cm). Se aplicó una corriente constante de 15 mA, con una solución amortiguadora de Tris (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3). La muestra fue diluida con solución amortiguadora muestra 2X (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, glicerol 20 %, azul de bromofenol 0.5 %) y aplicada a geles homogéneos. Para esta separación se utilizó una cámara de electroforesis vertical MiniProtean II de BioRad (Laemmli, 1970).

### **Geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

En esta electroforesis se utilizaron geles homogéneos de poliacrilamida con tamaño de poro al 7 y 7.5 % (8 x 10 x 0.1 cm). Se aplicó una corriente constante de 50

V, con una solución amortiguadora de Tris (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1 %, pH 8.3) y con solución amortiguadora muestra 2X (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %, azul de bromofenol 0.5 %) (Laemmli, 1970).

### **Geles de tricina**

Para el análisis de péptidos se utilizaron geles de gradiente del 10 al 22 % de poliacrilamida (8 x 10 x 0.1 cm). Se utilizó solución cátodo (Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M, SDS 0.1 %) y ánodo (Tris 0.2 M, pH 8.9), a corriente constante de 30 mA, utilizando solución amortiguadora muestra para tricina 2X (Tris-HCL 125 mM, pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %, azul de bromofenol 0.5 %, 2-mercaptoetanol 5 %) (Schagger y Von Jagow, 1987).

### **Tinción con nitrato de plata**

Después de terminada la electroforesis los geles se fijaron con una solución de (ácido acético 10 %, etanol 40 % en agua), por 30 min. Después de descartar la solución fijadora, el gel se colocó en solución incubadora (etanol 30 %, 4.1 % de acetato de sodio, tiosulfato de sodio 0.2 % y glutaraldehído 0.52 %, adicionado al momento de usar), 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 usar), a una temperatura de 42°C. Para detener la reacción se añadió EDTA dihidratado 1.46 %, etanol 20 % en agua (Merril, *et al.*, 1981).

### **Tinción con aceite rojo O**

El gel se sumergió en una solución saturada de aceite rojo "O" (aceite rojo O disuelto en metanol 50 % y ácido tricloroacético 10 %), durante toda la noche y se destiñó con ácido acético al 7.5 %. Los geles se almacenaron en ácido acético al 7 % a 4 °C (Venugopal y Kumar, 1999).

### Digestión triptica

#### **Delipidación**

La HDL/BGBP purificada se mezcló con 3 volúmenes de acetona a -20°C, se agitó suavemente y la mezcla fue centrifugada a 5000  $\times$  g por 5 min. El sobrenadante fue descartado y la proteína precipitada se secó con aire para eliminar los residuos de solvente (Arturo Sierra, comunicación personal).

#### **Digestión con Tripsina**

A 7  $\mu$ g de proteína se le adicionaron 5  $\mu$ L de urea 8 M (disuelta en bicarbonato de amonio 0.4 M), 5  $\mu$ L de ditiotreitól 45 mM (DTT) y se incubó a 50°C durante 15 min. Se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 5  $\mu$ L de iodoacetamida 100 mM y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente se agregó tripsina en relación 1:50 p/p, proteína-enzima (tripsina disuelta en HCl 1 mM). La reacción se detuvo congelando la solución a -70 °C (Colighan, 1995; Coperland, 1994; Stone, 1993; Madsudaira, 1993). En otros experimentos se utilizaron condiciones no reductoras (en ausencia de DTT y iodoacetamida).



### Determinación de lípidos totales

Se utilizó el método de sulfofosfovainillina, con un juego de reactivos para determinación de Lípidos Totales Test-Combination (Boehringer Mannheim 124303). Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  (1.63 mg/mL) de la muestra y se le añadió 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Se digirió por 10 min en baño de agua hirviendo y posteriormente se dejó enfriar en baño de agua a temperatura ambiente. Se tomaron 40  $\mu\text{L}$  de la anterior reacción y se le adicionó 1 mL del reactivo de color (ácido fosfórico 14 mol/L, vainillina 13 mmol/L). Se incubó por 30 min a temperatura ambiente para posteriormente leer absorbancia a 530 nm en un equipo UV/Vis/NIR Spectroscopy Lambda Bio 20 de Perkin Elmer (Frings y Dunn, 1970).

### Determinación de ácidos grasos totales

#### **Extracción de lípidos**

A 400  $\mu\text{L}$  de muestra (652  $\mu\text{g}$ ) se le añadió 1 mL de metanol y se agitó por 30 seg. Posteriormente se adicionaron 2 mL de diclorometano y se agitó por 1 min. Se dejaron separar las dos fases y se agregó 1/4 de su volumen de KCl 0.88 % en agua y se agitó por 1 min para después dejar que se separaran las dos capas. Se descartó la capa superior, y se repitió el lavado al añadir nuevamente 1/4 de su volumen de metanol-diclorometano 1:1 y se agitó por 30 segundos. La capa inferior conteniendo los lípidos se sometió a un flujo de nitrógeno para evaporar el cloroformo, este paso puede también realizarse con ayuda de un rotavapor (William, 1982).

### **Metilación de lípidos**

Al residuo obtenido de la extracción de lípidos se le agregó 1 mL de hidróxido de sodio (NaOH 0.5 N preparado en metanol). Se colocó a reflujo por 2 min y posteriormente se añadió 1 mL de trifluoruro de boro y se reflujo por 1 min. Se adicionaron 2 mL de heptano y se reflujo por 1 min, al cabo de este tiempo se retiró del calor y se adicionó NaCl saturado y se agitó suavemente. Se separó la capa de heptano (superior) y esta es la que se utilizó para el análisis (AOAC, 1988).

### **Detección de ácidos grasos**

Mediante la utilización de un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas como detector (GC STAR 3400 CX y MS SATURN 3, VARIAN), se realizó la identificación de los ácidos grasos usando las siguientes condiciones de corrida: inyector 200°C; horno 80°C por 3min, 210°C a 12°C/min, 260°C a 2.5°C/min por 6.17 min, línea de transferencia a 180°C. Se utilizó el espectrómetro de masas en modo de ionización electrónica con corriente de 70 eV y en un rango de detección de 30 a 450 m/z.

### Determinación de puentes disulfuros

Para determinar la presencia de puentes disulfuros intramoleculares se utilizó un equipo de HPLC-FR (HPLC Thermo Separation Products, Spectra system P400, UV 1000, SN 4000), para analizar las digestiones realizadas en condiciones reducidas y no reducidas. La columna se acondicionó con 100 % TFA (trifluoroacético al 0.1 % en agua) por 15 min, posteriormente este porcentaje bajó hasta el 40 % TFA – 60 % acetonitrilo (acetonitrilo con 0.05 % de TFA), en un lapso de 130 min y finalmente se lavó con acetonitrilo al 100 % por 5 min. Se usó un flujo de 0.5 mL/min y para la detección de los peptidos a una longitud de onda de 214 nm.

### Dicroísmo circular

La estructura secundaria se determinó mediante espectroscopía de DC. Estos espectros se obtuvieron a 25°C en un espectropolarímetro Jasco J-700, el cual se calibró con ácido (+)-10-canforsulfónico. Una alícuota de HDL/BGBP (0.25 mg/mL), se colocó en una celda de 1 cm y se lee en la región del ultravioleta (UV) lejano (183-260 nm). La elipticidad por residuo medio  $[\theta]$ , se calculó utilizando una masa molecular de 110 g/mol por residuo. Se obtuvieron curvas múltiples independientes, variando la concentración de la heparina para evaluar el efecto de ésta en la conformación y contenido de estructura secundaria de la HDL/BGBP. Los espectros fueron analizados por medio de tres programas de desconvolución: CCA (algoritmo de constreñimiento convexo), Hennessey-Johnson y Varselec, esto con el fin de estimar la composición de estructura secundaria de la proteína.

### Dispersión Dinámica de Luz

En este estudio se evaluó el comportamiento de la proteína en solución, analizando los cambios en polidispersidad y masa molecular con respecto a factores como el pH, temperatura, concentración de NaCl y el efecto de agentes como el polietilenglicol 6000 (PEG-6000) y la heparina. Se utilizó un equipo de dispersión dinámica de luz ("Dynamic Light Scattering" DLS) DynaPro-801 (Protein Solutions, Co.) y el paquete computacional Dynamics. Cada uno de los aditivos en combinación con la proteína pura (400  $\mu$ l), se inyectaron a través de filtros Anotop 10 de 0.02  $\mu$ m (Walthman) en el equipo mencionado.

### Calorimetría

Los análisis se realizaron en un calorímetro de titulación isotérmica (Microcal), a una temperatura constante de 25°C y con una concentración de 15.65 mg/mL de heparina y 1.13 mg/mL de HDL/BGBP. Las soluciones fueron degasificadas y colocadas lentamente en el equipo, cuidándose de no formar burbujas en el momento de colocar la proteína dentro de la celda para su titulación.

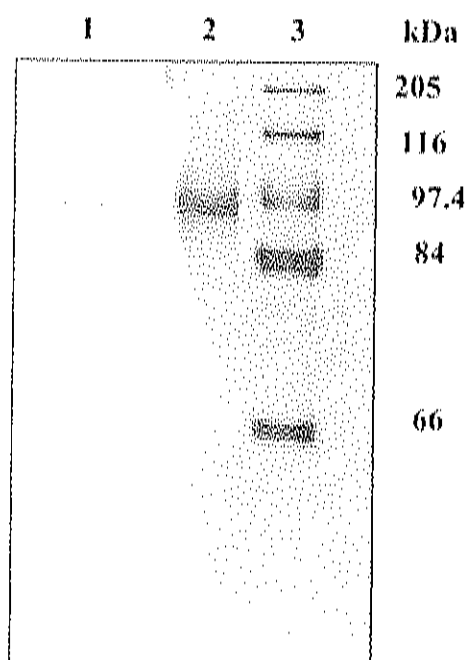
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación de lípidos

La HDL/BGBP purificada por afinidad a heparina, fue analizada por electroforesis en condiciones nativas (5 y 10  $\mu\text{g}$  de proteína) y sometida a la tinción lipofílica del aceite rojo "O". Esto con la finalidad de identificar de forma rápida si la proteína aún conservaba su componente lipídico, después de que el plasma del cual se extrajo fue sometido a procesos de congelado y descongelado. Como control para corroborar la migración electroforética de la proteína, una sección del gel fue sometido a tinción de plata (Figura 1). Esta tinción lipofílica indicó que HDL/BGBP aún conservaba lípidos en su estructura y se procedió a cuantificarlos para su comparación con resultados anteriormente reportados (Ruiz-Verdugo, *et al.*, 1997). Esta característica de seguir conservando su componente lipídico aún después de someterse a un proceso de purificación cromatográfico partiendo de plasma previamente congelado, fue también reportado para la proteína VHDL/CP del camarón blanco (Yepiz-Plascencia, *et al.*, submitted).

### Cuantificación de lípidos

Las lipoproteínas de humano han sido reportadas como moléculas frágiles y que no toleran el congelamiento previo a su purificación ya que se dice repercute en su capacidad de asociarse a los lípidos (Bachorik, 1982). Debido a que el plasma de *Penaeus vannamei* utilizado en este trabajo había sido congelado, se cuantificó el



**Figura 1.** Detección de lípidos en la HDL/BGIP purificada por afinidad con heparina. Proteína 10  $\mu\text{g}$ , 1) tinción con aceite rojo, 2) tinción con nitrato de plata, 3) marcadores de alto peso molecular.

---

contenido de lípidos y se comparó con los reportados para la misma proteína obtenida de plasma fresco y purificada mediante ultracentrifugación (Ruiz-Verdugo, *et al.*, 1997), para determinar si el congelamiento había afectado la interacción lípido – HDL/BGBP.

La cuantificación de lípidos por la técnica de sulfosfovanilina se hizo en cuadruplicado con alícuotas de 50  $\mu$ L de la proteína a una concentración de 1.63 mg/mL. La curva de calibración utilizada se encuentra en un intervalo de 0.5 mg/mL a 10 mg/mL. Al realizar los cálculos se determinó que HDL/BGBP contiene en promedio  $34 \pm 2$  % de lípidos totales. Este valor se encuentra dentro del rango que va de 32 a 43 % de lípidos totales reportado previamente para esta lipoproteína aislada de plasma fresco (Ruiz-Verdugo, *et al.*, 1997). Por lo que lo observado en lipoproteínas de humano con respecto al proceso de congelado – descongelado, no se cumple para esta lipoproteína de camarón. Lo cual indica que la molécula no está sufriendo daños en su estructura nativa por este efecto. Además de que el hecho de que la molécula conserve la totalidad de su composición lipídica nos da una idea de la estrecha y fuerte interacción que existe entre la proteína y sus componentes lipídicos.

#### Efecto de lípidos en la digestión enzimática

En estudios previos, se reportó que una digestión enzimática parcial de la HDL/BGBP con tripsina produce 11 péptidos con pesos entre 76 y 11 kDa y que el patrón electroforético de las digestiones no se modificó al incrementarse el tiempo de incubación (Jiménez-Vega, 2000). Esta digestión parcial se ha observado también en digestiones con tripsina de lipoforinas AL<sub>1</sub> y AL<sub>2</sub> de los insectos *Periplaneta americana* y *Locusta migratoria* (Kashiwazaki y Ikaí, 1985). Estos resultados indican posiblemente que los lípidos impiden que la enzima tenga un libre acceso a ella y por lo tanto no pueden fragmentarla en su totalidad. Para comprobar esto, la proteína fue delipidada usando acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se digirió con tripsina durante 0, 1, 4, 8, 18 y 24 h. Como referencia se utilizó HDL/BGBP no delipidada. Las muestras digeridas fueron

analizadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida con amortiguador de tricina, tamaño de poro en gradiente del 10 al 22 % y se revelaron con nitrato de plata (Figura 2).

La HDL/BGBP con lípidos presenta el patrón de fragmentación parcial ya previamente reportado. Sin embargo, el bandeo de la HDL/BGBP delipidada sí muestra cambios asociados a la delipidación a que se sometió la proteína. A tiempos posteriores a las 4 h de incubación con tripsina, se dejó de observar la presencia de bandas correspondientes a péptidos de la HDL/BGBP y solo se observa la banda correspondiente a la enzima. Esto indica que la muestra está fragmentada y que los péptidos son menores de 6.5 kDa que es el estándar de más bajo peso molecular, ya que no se logran apreciar en el gel. Sin embargo, sí pudieron ser detectados mediante HPLC-FR. Este resultado nos permite corroborar que la presencia de lípidos en la molécula le está otorgando una protección especial, además de que esta interacción es bastante fuerte ya que ni el proceso de congelación logra hacer que se rompa esta unión.

#### Determinación de ácidos grasos totales

Con el fin de poder profundizar en el conocimiento de los lípidos que constituyen la lipoproteína y que, como hemos visto, forman una barrera protectora para la HDL/BGBP, se realizó la esterificación de ácidos grasos. Esta determinación identifica tanto los ácidos grasos libres, como los que componen a fosfolípidos y acilglicerol, dado que los procesos de extracción - digestión y derivatización utilizados no son específicos para ácidos grasos provenientes de un solo tipo de moléculas. La fase lipídica de una muestra de HDL/BGBP (650 µg), fue extraída con solventes y se inyectó en un cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas (Saturno 3 de Varian) para su análisis. Mediante la ayuda de la librería NIST 92 y de un estándar de ácidos grasos (Lípid Standard Fatty Acid Methyl Mixture L9405 de Sigma), se lograron



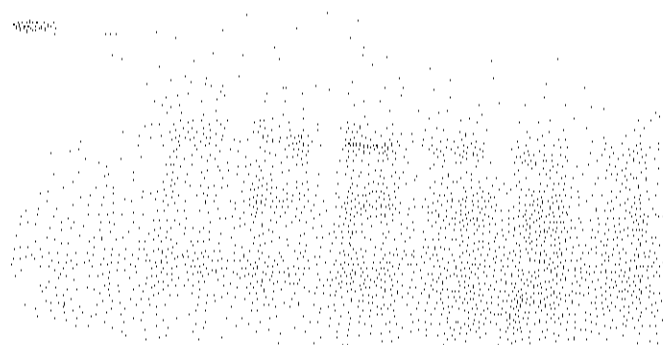
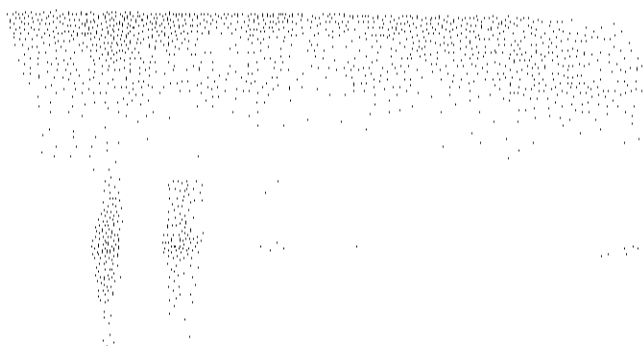
identificar los ácidos grasos que componen a estos lípidos, los cuales se mencionan a continuación:

ácido caprílico (8:0); cáprico (10:0); laurico (12:0); mirístico (14:0); pentadecanoico (15:0); palmítico (16:0); palmitoleico\* (16:1); heptadecanoico (17:0); esteárico\* (18:0); oleico\* (18:1); eláidico (18:1, trans-9); linoleico\* (18:2); araquídico (20:0); cis-11-eicosenoico (20:1); cis-11,14-eicosadienoico (20:2); araquidónico (20:4); cis - 5,8,11,14,17 - eicosapentaenoico\* (20:5); heneicosanoico (21:0); behénico (22:0); cis - 13,16 - docosadienoico (22:2); cis - 4,7,10,13,16,19 - docosahexaenoico\* (22:6); nervónico (24:1).

Los ácidos grasos marcados con un asterisco coinciden con los identificados para la HDL de *Penaeus japonicus* (Teshima y Kanazawa, 1980) y *Penaeus semisulcatus* (Lubzens, *et al.*, 1997). Dentro de estos ácidos grasos se encuentran presentes los  $\omega$ 3 y  $\omega$ 6, los cuales son importantes por tener una participación clave en la integridad y flexibilidad de la membrana (Dall, *et al.*, 1990; Dall y Moriarty, 1983).

#### Identificación de enlaces disulfuros

Los enlaces disulfuros son un componente importante de la estructura de proteínas, proporcionando estabilidad estructural y térmica a estas moléculas (Mathews y Van Holde, 1997). La composición de aminoácidos de HDL/BGBP en *Pacifastacus leniusculus*, indica un contenido de aproximadamente 5 cisteínas (Duvic y Söderhäll, 1990), por lo que es posible que estos enlaces pudieran estar presentes en la proteína nativa. La identificación de los puentes disulfuros se hizo a través de una comparación entre los cromatogramas de HPLC-FR de HDL/BGBP digeridas con tripsina en presencia y ausencia de agentes reductores. Se utilizó DTT como agente reductor y iodoacetamida para bloquear las cisteínas libres y prevenir la formación de nuevos enlaces disulfuros.

**A) HDL/BGBP Nativa****BGBP      0h    1h    4h    8h    18h    24h****B) HDL/BGBP delipidada****0h    1h    4h    8h    18h    24h    Tripsina**

**Figura 2.** Análisis Electroforético de Digestiones Tripticas de HDL/BGBP en Geles de Tricína teñidos con tinción de nitrato de plata.

---

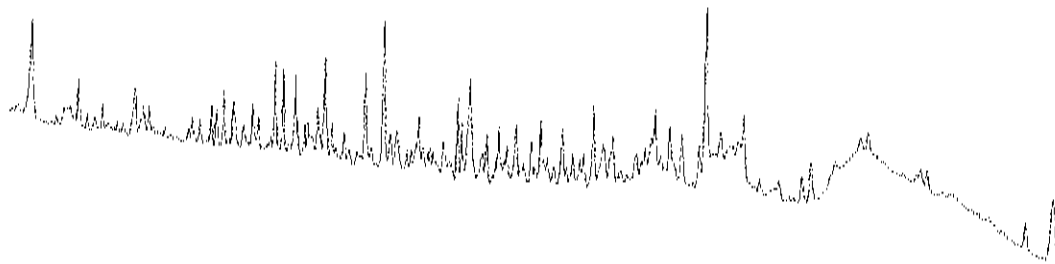
No se encontraron diferencias entre los tamaños de los fragmentos obtenidos, por lo que se puede concluir que no se encuentran puentes disulfuros presentes en la HDL/BGBP nativa (Figura 3). Un análisis detallado de los tiempos de retención de los cromatogramas de los péptidos obtenidos permitió identificar la presencia o ausencia de fragmentos entre una y otra muestra. De existir disulfuros, se observaría la desaparición y aparición de picos alrededor del tiempo de retención del complejo covalente. En la bibliografía no hay reportes sobre la presencia de este tipo de enlaces en la HDL/BGBP. Estos resultados coinciden con la migración en SDS-PAGE reductor y no reductor del polipéptido de aproximadamente 100 kDa en estudios anteriores (Ruiz-Verdugo, *et al.*, 1997; Vargas-Albores, *et al.*, 1997).

#### Constantes de afinidad mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

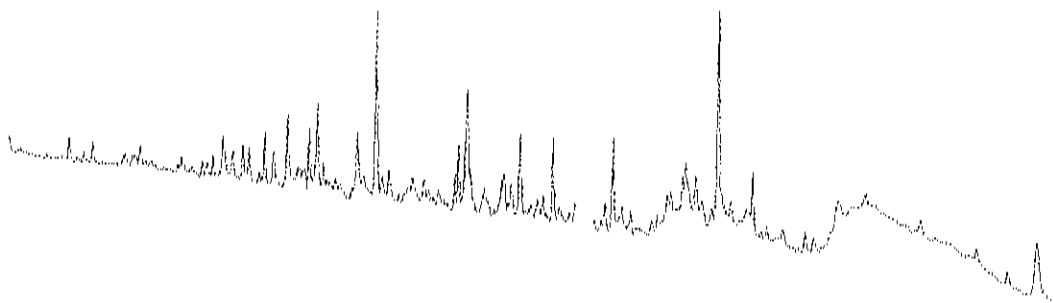
La calorimetría de titulación isotérmica es utilizada para cuantificar la interacción entre dos moléculas diferentes y se basa en que la asociación de moléculas implica una ganancia o pérdida de calor. La cuantificación de este flujo de calor permite estimar la afinidad del proceso de unión. Se aplicó esta técnica para cuantificar la interacción de HDL/BGBP con heparina. Recientemente se ha reportado que HDL/BGBP es una proteína unidora de heparina ("*heparin binding protein*"), aunque se desconoce aún el mecanismo de interacción con este carbohidrato (Jiménez-Vega, *et al.*, 2001). Esta característica ha sido utilizada para purificar la HDL/BGBP en forma preparativa utilizando cromatografía de afinidad a heparina (Jiménez-Vega, 2000).

No fue posible determinar la constante de afinidad de HDL/BGBP a heparina ya que se observaron fases endotérmicas y exotérmicas a lo largo de la titulación, además de que nunca se logró obtener una saturación de la molécula (Figura 4). Esto indica que la adición del ligando no lleva a una saturación de la molécula, se vio que se incrementa

A)

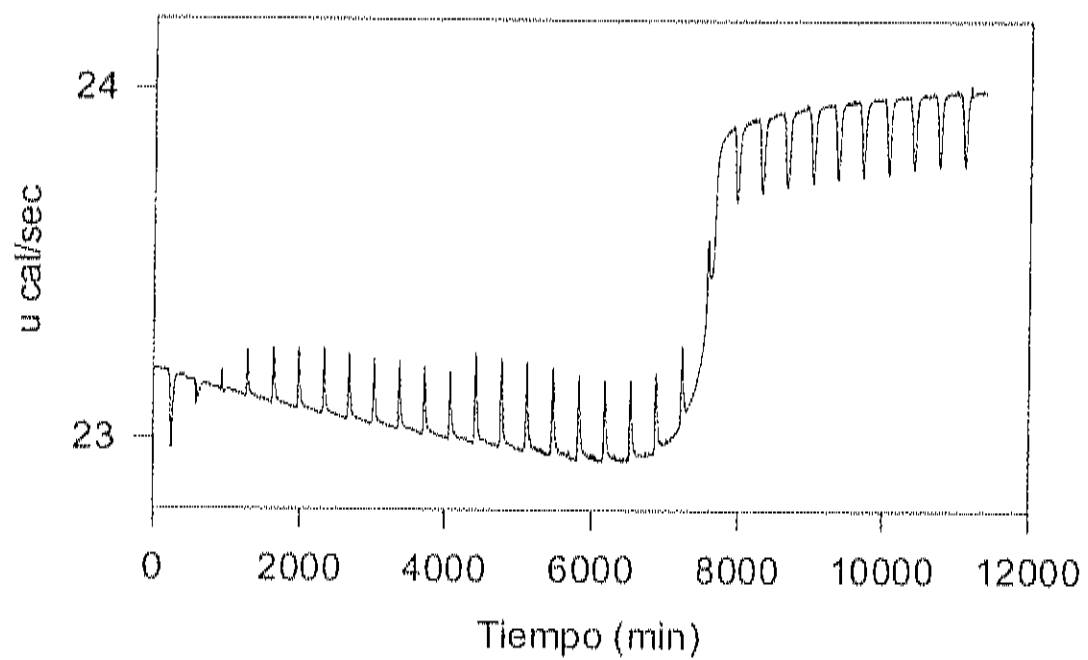


B)



**Figura 3.** Determinación de enlaces disulfuros en la HDL/BGBP A) condiciones reductoras, B) condiciones no reductoras

---



**Figura 4.** Titulación Calorimétrica Isotérmica de HDL/BGBP en complejo con Heparina

---

el número de sitios de interacción, posiblemente debido a un proceso de agregación de la HDL/BGBP. Este proceso de agregación puede estar provocando cambios conformacionales en la molécula, por lo que el calor requerido para la interacción pasa de endotérmico a exotérmico sin lograrse la saturación de la proteína de forma gradual, lo que dificulta el poder calcular las constantes de afinidad. Con el fin de determinar si la unión de heparina produce agregación de la HDL/BGBP, se utilizó la dispersión dinámica de luz (DLS).

#### Dispersión dinámica de luz

El fenómeno de agregación en HDL/BGBP fue observado anteriormente usando entrecruzamiento químico con suberimidato de dimetilo (DMSU). En ese estudio se observaron especies de alto peso molecular (aproximadamente 460 kDa) unidas covalentemente con DMSU posiblemente debido a la presencia de isoformas (Sotelo-Mundo, 1993; Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1995). En las lipoforinas AL<sub>1</sub> y AL<sub>2</sub> de los insectos *Periplaneta americana* y *Locusta migratoria* también observaron esta agregación (agregados de hasta 650,000 kDa) al realizar el mismo experimento de entrecruzamiento químico (Kashiwazaki y Ikaí, 1985). Por lo que en esta ocasión se utilizará una técnica tan sensible como lo es la DLS para tratar de estudiar este fenómeno.

La dispersión dinámica de la luz es una técnica que permite medir el coeficiente de difusión traslacional, de una molécula o agregados en solución (Pusey, 1975; Van De Hulst, 1981). Mediante DLS es posible estimar la masa molecular y la distribución de tamaños medida como polidispersidad de la HDL/BGBP. Además esta técnica permite

determinar las condiciones en que la proteína se encuentra en un solo estado de agregación de mayor estabilidad. La agregación de la proteína se investigó como una función de los siguientes parámetros: tiempo, pH, temperatura, PEG 6000, NaCl y heparina.

#### **a)Tiempo.**

El efecto del tiempo sobre la polidispersidad y masa molecular de la HDL/BGBP se analizaron a 18°C, pH 7, NaCl 300 mM y con una concentración de proteína de 1 mg/mL. Esto se toma como referencia ya que a este pH, concentración de sal y concentración de proteína la muestra fue transportada hasta el Instituto de Química en la UNAM en donde se realizaron estos estudios.

Los valores de polidispersidad y masa molecular de la HDL/BGBP se incrementan notablemente respecto al tiempo (Figura 5). Esto indica que se está presentando un notable y creciente fenómeno de agregación, que continúa hasta que llega el momento en que la formación de los agregados es tan grande que incluso se produce la precipitación. Esto también permitió identificar que las condiciones en que la muestra es obtenida después de ser purificada favorece la agregación. El resto de los análisis se realizaron con la muestra dializada exhaustivamente contra buffer de fosfatos 100 mM a pH 7.

#### **b)Heparina**

Se utilizó una solución stock de 15.65 mg/mL de heparina (6000 kDa), la proteína a 0.96 mg/mL y una temperatura de 18°C. El análisis de DLS para estas dos moléculas muestra al principio de la titulación, una clara tendencia a la formación de agregados conforme se incrementa la concentración de heparina (Figura 6). Al aumentar más la concentración del carbohidrato se presenta en la molécula el efecto de asociación y disociación constante. Esto ayuda a explicar y a confirmar que el fenómeno de fases

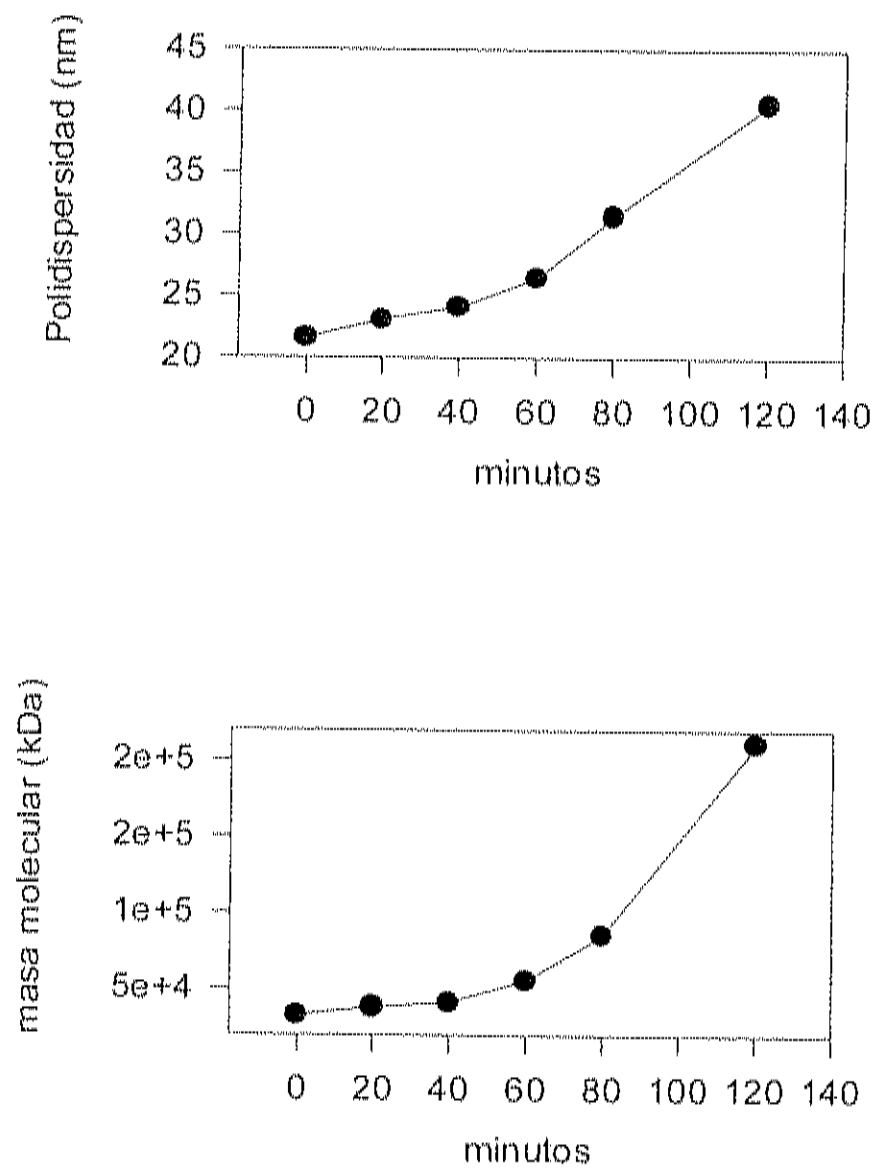
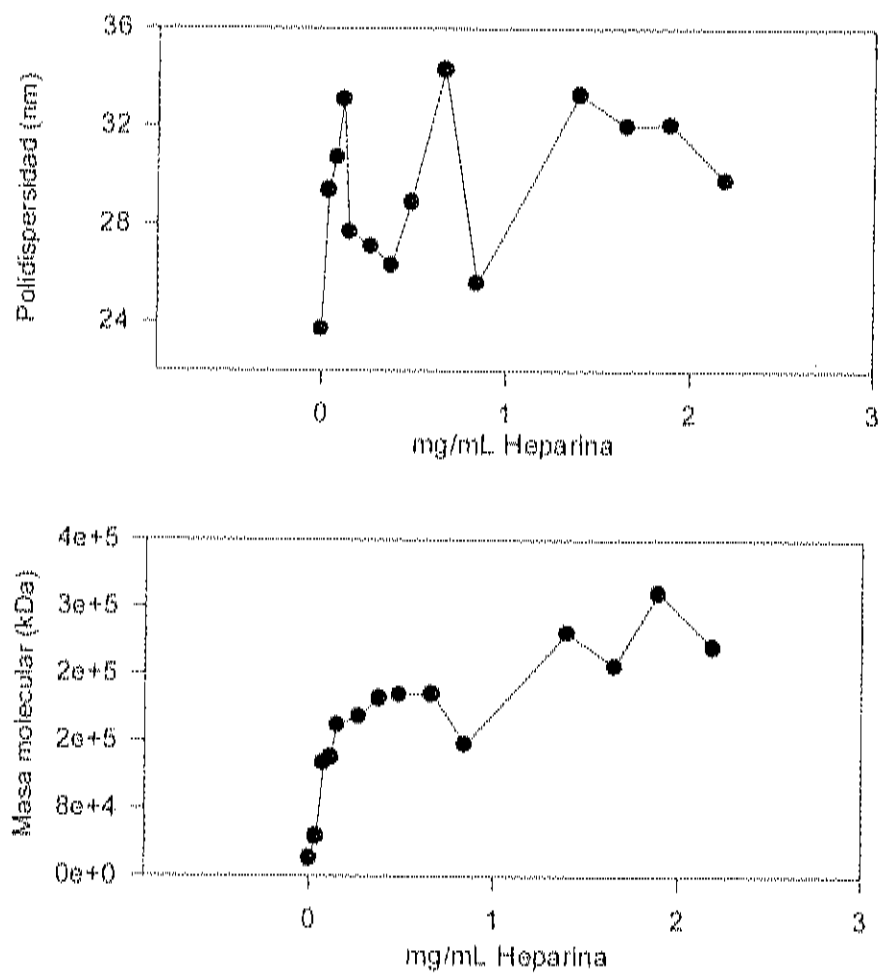


Figura 5. Cinética de agregación de HDL/BGIP mediante Dispersión Dinámica de Luz

---





**Figura 6.** Efecto de Heparina en la Cinética de Agregación de HDL/BGBP mediante Dispersión Dinámica de Luz

---

endotérmicas y exotérmicas observadas utilizando la técnica de calorimetría, corresponde a un proceso de formación de agregados de HDL/BGBP provocado por la presencia de heparina, lo cual dificultó la titulación de sitios de interacción. Por esta razón, se probaron diferentes soluciones con la finalidad de obtener las condiciones en las cuales la proteína se encuentra en su estado monomérico y así poder determinar las constantes de afinidad por calorimetría.

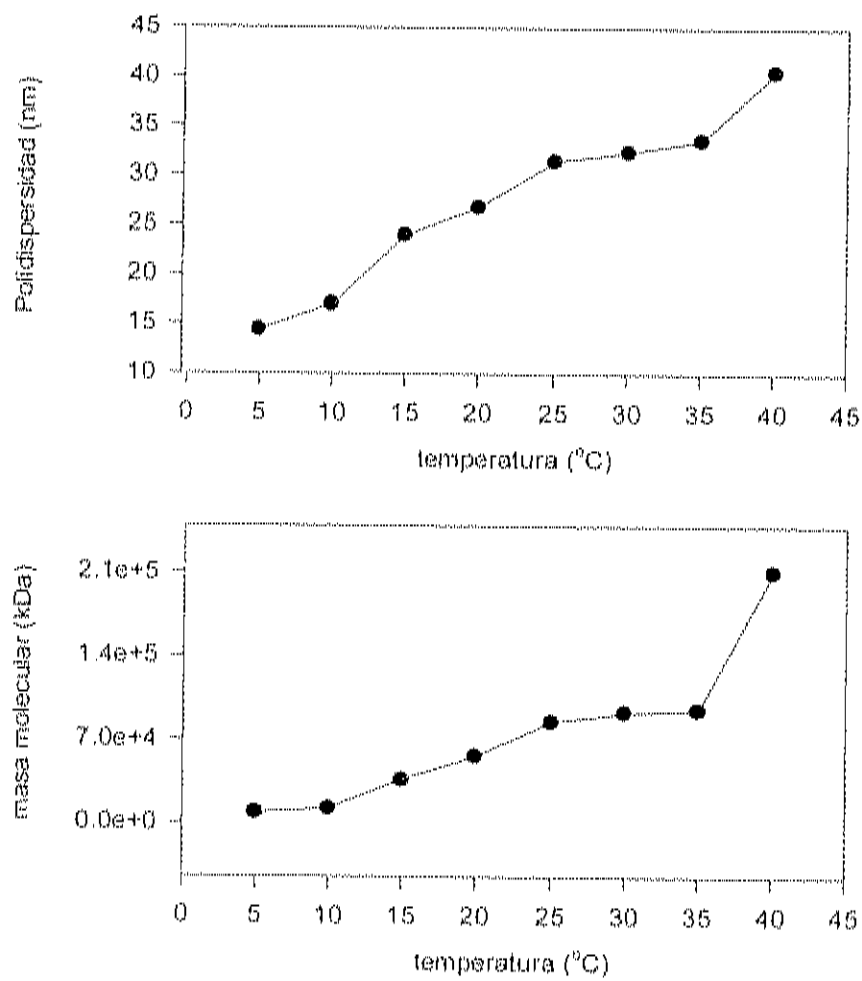
### **c) Temperatura**

Se determinó el efecto de la temperatura sobre la polidispersidad y la masa molecular de la HDL/BGBP a una concentración de 0.8 mg/ml y pH 7. Al analizar los resultados se aprecia que la agregación de la molécula se incrementa conforme se incrementa la temperatura, sin embargo este proceso es reversible, ya que al disminuir la temperatura también se disminuye la agregación (Figura 7). Esto indica que la proteína debe de manejarse a bajas temperaturas para que mantenga su estabilidad.

### **d) pH**

Se estudio el efecto del pH sobre la HDL/BGBP en un intervalo de 3 a 9. Los amortiguadores empleados fueron: glicina-HCl (pH 2.5-3.5), citrato de sodio-ácido cítrico (pH 3.0-6.0), Tris-HCl (pH 7.0-8.0) y glicina-NaOH (9.0-10.0). Las muestras de proteína (0.8 mg/mL), se dializaron contra los diferentes amortiguadores y se inyectaron en el equipo de dispersión dinámica de luz. Estas pruebas se realizaron a 18°C.

Los parámetros hidrodinámicos muestran que el mayor efecto de agregación de la HDL/BGBP se presenta a pH en el rango de 7 a 9. En el valor de pH 4 se aprecia una notable disminución de la masa molecular y la polidispersidad de los agregados, esto



**Figura 7.** Efecto de Temperatura en la valores hidrodinámicos de HDL/BGBP

---

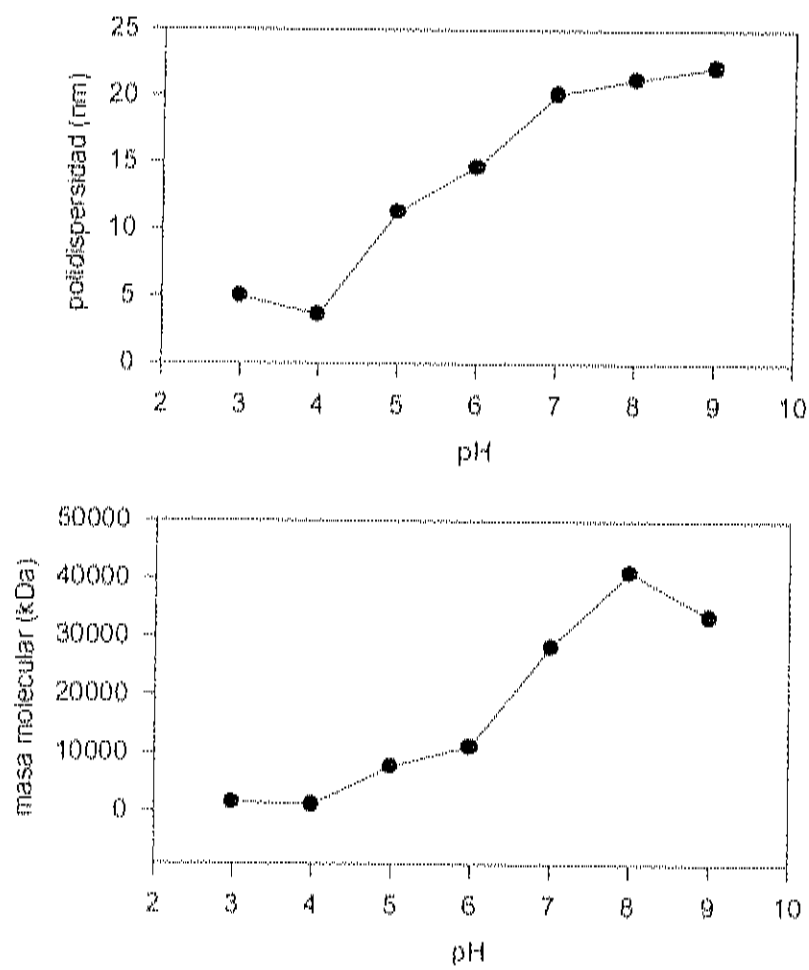
significa que en este punto la proteína presenta una mayor disociación (Figura 8). Cabe resaltar que el rango de pH en el que se presenta la mayor agregación es también al que se maneja y mantiene a la proteína desde su proceso de purificación (7.5) y en el que se analizó mediante calorimetría.

#### **e) Cloruro de Sodio**

El efecto de la salinidad sobre la HDL/BGBP se estudió utilizando una solución 2.5 M de NaCl, a una temperatura constante de 18°C y con una concentración de 0.6 mg/mL de proteína. Los valores de polidispersidad, así como la masa molecular de la HDL/BGBP, se incrementan de manera directamente proporcional al incremento de la salinidad de la proteína (Figura 9). Al correlacionar esto con la forma en la que se obtiene a la proteína pura, se deduce que para evitar que la proteína interactúe entre ella formando agregados macroscópicos se deben de manejar concentraciones bajas de NaCl una vez que ya ha sido purificada esta molécula.

#### **f) Polietilenglicol 6000 (PEG)**

La HDL/BGBP (0.8 mg/mL), se sometió a concentraciones variables de una solución base de PEG 6000 al 50 %, utilizando 18°C como una temperatura constante de análisis. La agregación de la HDL/BGBP aumenta paralelamente con la concentración del PEG, sin embargo esta agregación se lleva a cabo lentamente (Figura 10). La agregación lenta de HDL/BGBP en presencia de PEG 6000 puede ser ventajosa para estudios de cristalización, ya que esto favorece la formación de centros de nucleación.



**Figura 8.** Efecto de pH sobre valores hidrodinámicos de HDL/BGBP

---

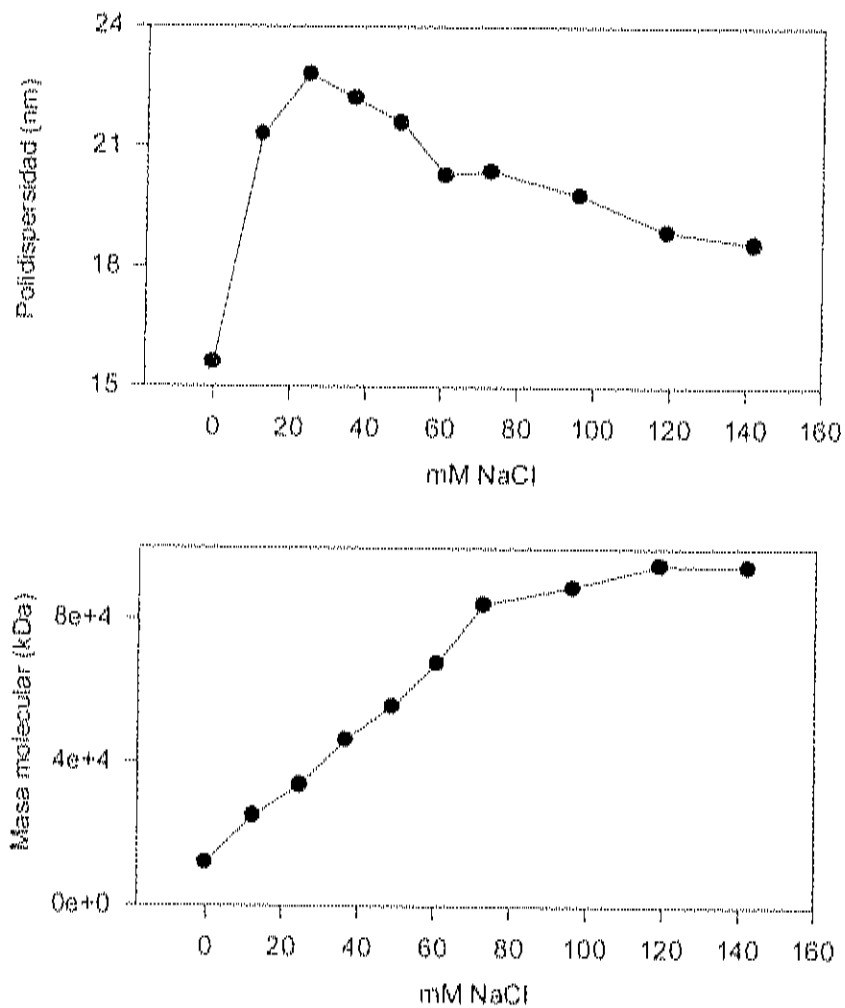


Figura 9. Efecto de salinidad sobre valores hidrodinámicos de HDL/BGBP

---

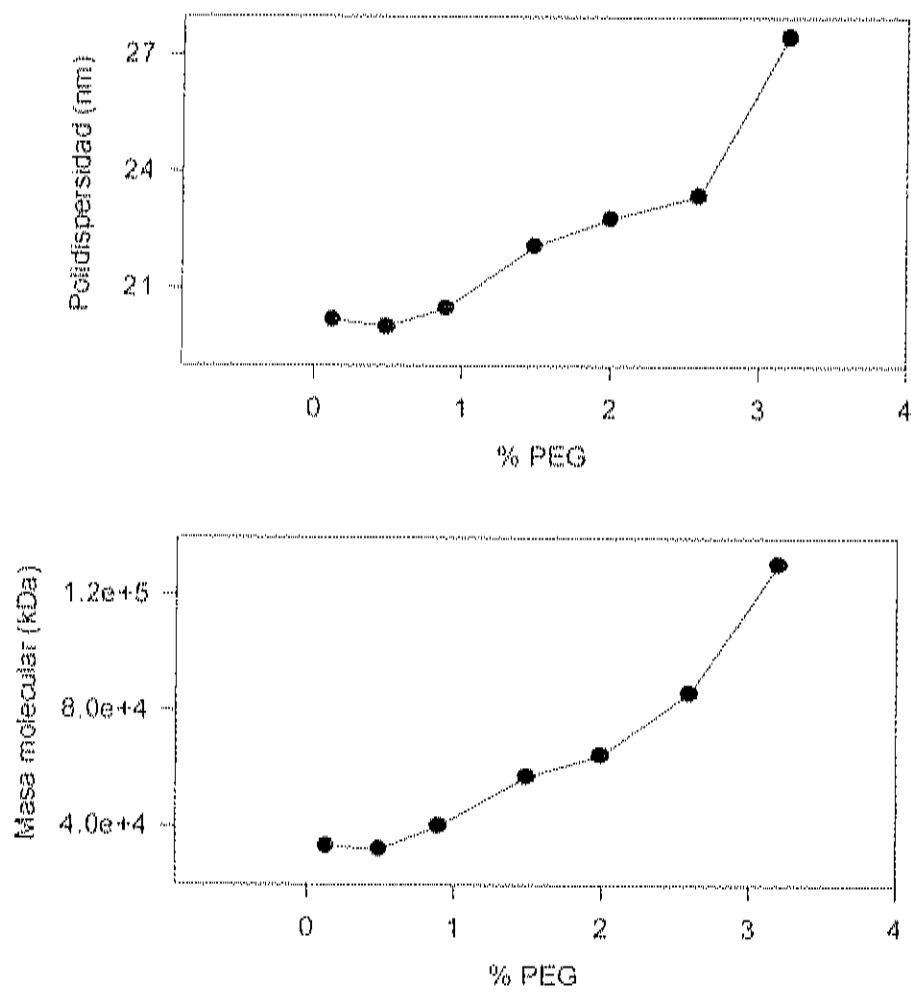


Figura 10. Efecto de PEG 6000 sobre valores hidrodinámicos de HDL/BGBP

---

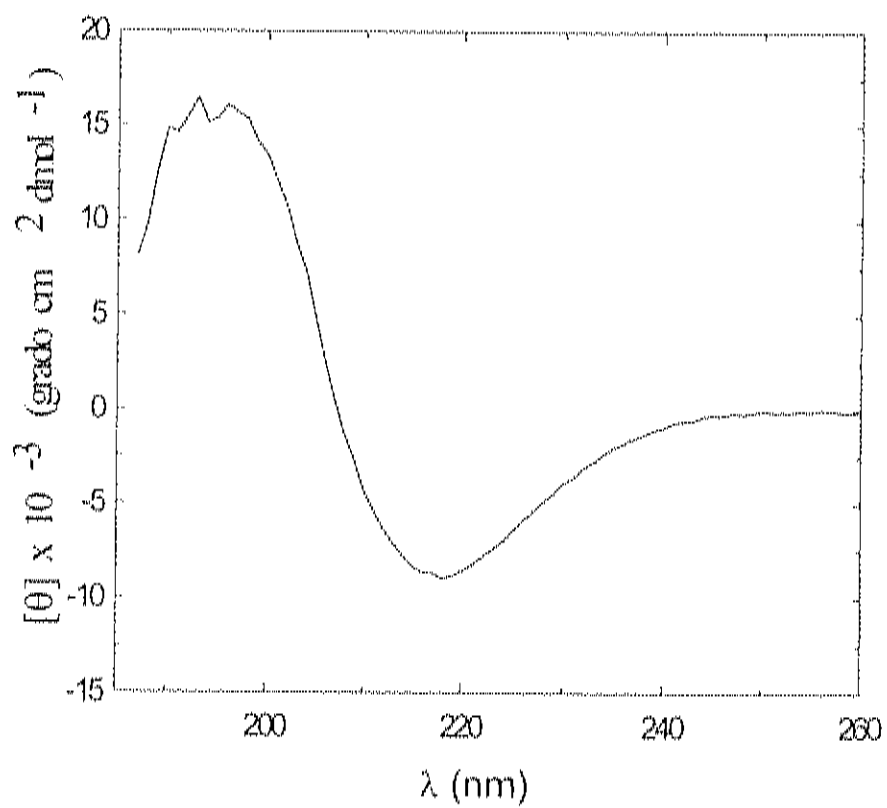
### Dicroísmo circular

Dicroísmo circular es una técnica espectroscópica utilizada para la determinación del contenido de la estructura secundaria de proteínas. Esta basada en las propiedades de la luz polarizada y la quiralidad del enlace peptídico (Unneberg, *et al.*, 2001). Esta técnica ha sido utilizada para caracterizar la proteína de coagulación de *Penaeus monodon* (Yeh, *et al.*, 1999), VHDL/CP de *Penaeus vannamei* (Yepiz-Plascencia, *et al.*, submitted) y las lipoforinas AL1 y AL2 de *Locusta migratoria* y *Periplaneta americana* (Kashiwazaki y Ikai, 1985).

Los datos de elipticidad se analizaron mediante el uso de los programas computacional como CCA, Hennessey-Johnson y VARSELEC (Compton y Johnson, 1986). Los programas usan como datos las elipticidades residuales molares vs. longitud de onda, para obtener el contenido porcentual de estructura secundaria. Estos métodos se basan en un análisis de correlación entre valores de elipticidad en el rango lejano del espectro de ultravioleta para proteínas de las cuales se conoce su estructura. Aplicando estos programas para los datos de HDL/BGBP se deduce que el contenido de estructura secundaria corresponde a: 53 % de beta plegados (37 % anti paralelas y 16 % paralelas), un 20 % de hélices-alfa y el resto formado por lazos y estructura no ordenada. (Figura 11). De forma importante, es muy significativa la similitud de estructura secundaria entre la HDL/BGBP de camarón blanco y las lipoforinas de los insectos *Locusta migratoria* y *Periplaneta americana* (Kashiwazaki y Ikai, 1985), debido a que ambas presentan un alto contenido de estructura tipo beta-plegado.

Es aún más interesante el hecho de que HDL/BGBP presenta un espectro de dicroísmo circular similar al de lipoproteínas humanas de baja densidad (LDL), (Gotto y Fredrickson, 1968). Por lo que se infiere que la conservación de la estructura es importante para que este tipo de proteínas realicen su función en el transporte de lípidos.





**Figura 11.** Espectro de Dicroísmo Círcular de la BGBP/HDL nativa

---

Mediante dicroísmo circular también se analizó la interacción entre la HDL/BGBP y la heparina, con la finalidad de determinar las modificaciones en la estructura secundaria que se presentan en la proteína al ponerla en contacto con este carbohidrato. Se utilizaron 40 y 50  $\mu\text{L}$  de una solución de heparina de 15.65 mg/mL y esto permitió observar que la proteína al interactuar con la heparina tiende primero a formar mayor cantidad de hojas beta. Sin embargo conforme se incrementa la concentración de heparina la proteína pasa de ser predominantemente hojas beta a predominantemente helices alfa (figura 12).

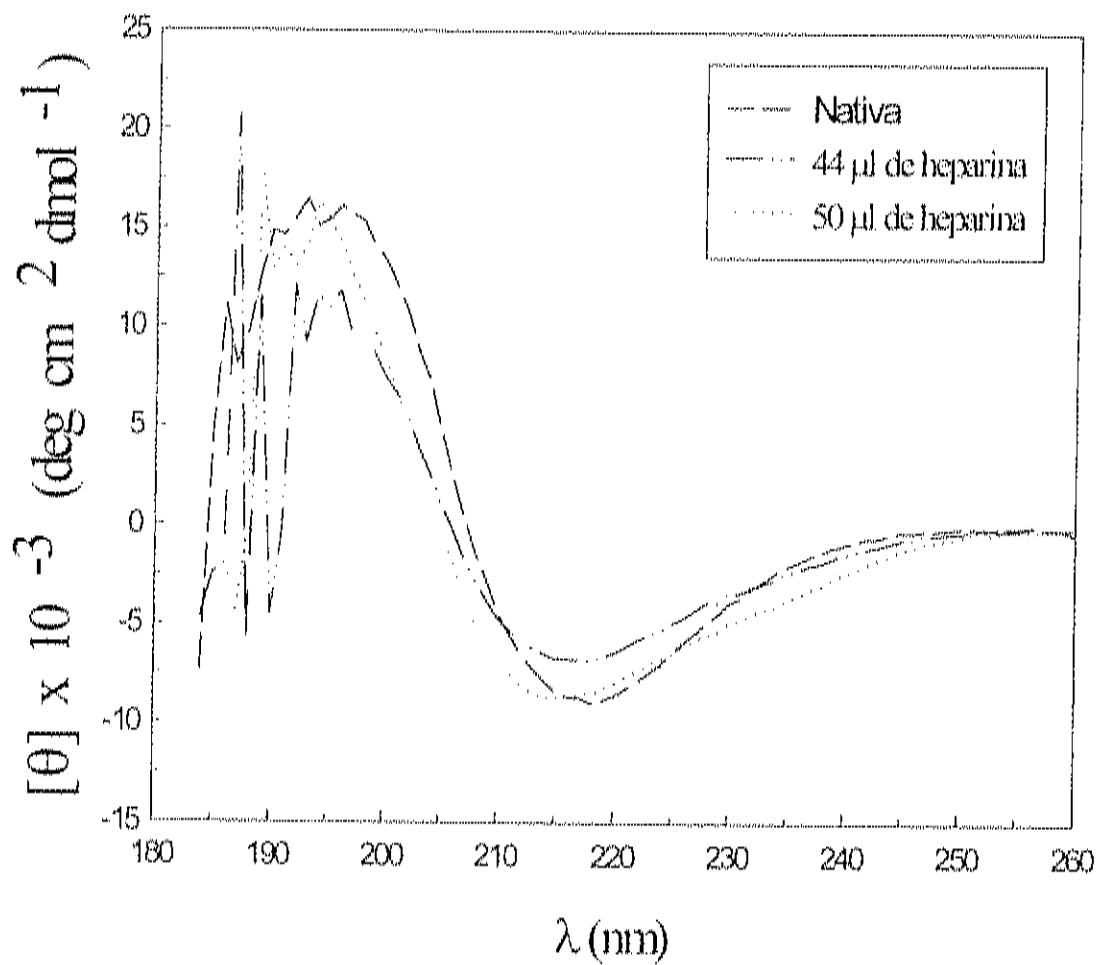


Figura 12. Espectro de Dicroísmo circular de la HDL/BGBP vs heparina

---

## CONCLUSIONES

La HDL/BGBP al igual que la VHDL/CP ((Hall, *et al.*, 1995), es un ejemplo de la bifuncionalidad observada en proteínas de crustáceos, que asocia los procesos de nutrición e inmunidad. En este trabajo se abordó una caracterización estructural de sus componentes protéico y lipídico como base a estudios estructurales futuros. Los cuales nos puedan permitir llegar a entender su función como transportadora de lípidos y activadora de respuestas celulares de defensa.

La HDL/BGBP es más estable que su contraparte lipoprotéica en humanos, ya que se mantiene intacta después de procesos como la congelación, descongelación y diálisis. HDL/BGBP conserva la totalidad de su contenido lipídico (34 %), aun después de ser sometida a un proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad a heparina. El análisis cualitativo de los ácidos grasos que constituyen los lípidos de la HDL/BGBP nos permitió identificar a los ácidos grasos que componen los lípidos de esta lipoproteína, los cuales concuerdan con los reportados para otras especies de penaeidos (Lubzens, *et al.*, 1997; Teshima y Kanazawa, 1980). Los lípidos que componen a la HDL/BGBP están fuertemente asociados con la proteína e impiden que la molécula sea degradada completamente por proteasas y confirma la importancia de los lípidos en la estabilidad estructural de esta proteína. La HDL/BGBP no contiene enlaces disulfuro intramoleculares, por lo que la estabilidad de la molécula se debe probablemente a interacciones de tipo puente de hidrógeno, iónicas e hidrofóbicas.

Mediante calorimetría de titulación isotérmica se analizó la interacción entre HDL/BGBP y el carbohidrato heparina. No fue posible determinar las constantes de afinidad debido a que la molécula presentó un efecto de agregación que imposibilitó el cálculo de estas constantes. La agregación se corroboró usando DLS, mediante el cual se pudieron establecer las condiciones en las que la proteína se encuentra en un mayor

grado de disociación, para basados en esto comenzar la búsqueda de las condiciones de cristalización de la proteína.

El espectro de DC de la HDL/BGBP nativa nos permitió identificar que la proteína presenta un mayor porcentaje de hojas beta y que comparte gran similitud a nivel de estructura secundaria con lipoproteínas de otros organismos estudiados (Kashiwazaki y Ikaí, 1985; Gotto, 1968). Se utilizó esta técnica también para apreciar los cambios estructurales que ocurren en la molécula al ponerla en contacto con la heparina, observándose que conforme se incrementa la cantidad de heparina, la molécula presenta un mayor número de estructura secundaria tipo hélices alfas. La interacción con carbohidratos como la heparina, induce cambios conformacionales los cuales se propone promueven in vivo la activación celular. Esto explicaría la vía como los carbohidratos complejos pueden activar el sistema profenoloxidasa en el camarón.

## BIBLIOGRAFIA

- Akiyama, D. M. y Dominy, W. G. (1992). Penaeid Shrimp Nutrition for the Comercial Feed Industry En Texas Shrimp Farming Manual, Corpus Christy, Texas. 50
- Alava, V. R., Kanazawa, A., Teshima, S. y S., K. (1993). Effect of Dietary Phospholipids and n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids on Ovarian Development of Kuruma Prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 345-351.
- Alder, A. J. y Fasman, G. D. (1973). Circular Dichroism and Optical Rotary Dispersion of Proteins and Polypeptides. *Methods of Enzymology* 27: 675.
- AOAC. (1988). Fatty Acids in Oils and Fats, preparation of methyl esters; Boron Trifluoride Method (H. Kenneth). En *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Association of Official Analytical Chemists, Inc., 963
- 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. 3-6
- Bachorik, P. S. (1982). Collection of Blood Samples for Lipoproteins. *Analysis. Clin. Chem.* 28: 1375-1378.
- Barracco, M. A., Duvic, B. y Söderhäll, K. (1991). The b-1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a b-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* (I. P. A. John Wiley and Sons).

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 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.
- Dall, W., Chandumpai, A. y Smith, D. M. (1993). The Fate of the Some <sup>14</sup>C-Labelled Dietary Lipids in the Tiger Prawn *Penaeus esculentus*. *Mar. Biol.* 115: 39-45.
- Dall, W., Hill, B. J., Rothlisberg, P. C. y Staples, D. J. (1990). The Biology of the Penaeidae. En *Advances in Marine Biology* (E. B. J. H. S. a. S. A. J.), 489
- Dall, W. y Moriarty, D. J. (1983). Functional Aspects of Nutrition and Digestion en *The Biology of Crustacea* (D. E. Bliss). En *Internal Anatomy and Physiological Regulation*, Academic Press, New York, 215-251
- Duvic, B. y Söderhäll, K. (1993). B-1,3-glucan-binding proteins from plasma of the fresh-water crayfishes *Astacus astacus* and *Procambarus clarkii*. *J. Crust. Biol.* 13: 403-408.
- Duvic, B. y Söderhäll, K. (1990). Purification and characterization of a b-1,3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 265: 9327-9337.
- Frings, C. S. y Dunn, R. T. (1970). A Colorimetric Method for Determination of Total Serum Lipids Based on the Sulfo-phospho-vainillin Reaction. *Am. J. Clinic Pathology* 53: 89-91.
- 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.
- Gotto, A. M. y Fredrickson, S. D. (1968). Observations on the conformation of human beta lipoprotein: evidence for the occurrence of beta structure. *Biochemistry* 60: 1436-1441.

- Greenfield, N. (1996). Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry* 8: 4108.
- 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.
- Haynie, D. T. (2001). Binding equilibria. En *Biological Thermodynamics*, Editorial Cambridge, 223-231
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. y Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 113C: 61-66.
- Honcock, S. W. (1996). Peptide maps as protein fingerprints (S. W. Honcock). En *New Methods in Peptide Mapping for the Characterization of Proteins*, CRC Press, Palo Alto California.
- 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.
- Jiménez-Vega, F., Sotelo-Mundo, R., Ascencio-Valle, F. y Vargas-Albores, F. (2001). BGBP (1,3-b-D glucan binding protein) from white shrimp *Penaeus vannamei*, is also an heparin binding protein. *Self and selfish immunology* In press:
- 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.
- Johansson, M. W. y Söderhäll, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitol. Today* 5: 171-176.
- Johnson, W. C. (1990). Protein Secondary Structure and Circular Dichroism: A Practical Guide. *PROTEINS* 7: 205-214.



- Kanazawa, A., Teshima, S., Tokiwa, S., Endo, M., Razek, A. y Fatma, A. (1979). Effects of Short-Necked Clam Phospholipids on the Growth of Prawn. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish 45: 961-965.
- Kanost, M. R. (1990). Isolation and characterization of four serine proteinase inhibitors (serpins) from hemolymph of *Manduca sexta*. Insect Biochem. 20: 141-147.
- Kashiwazaki, Y. y Ikai, A. (1985). Structure of Apoproteins in Insect Lipophorin. Archives of Biochemistry and Biophysics 237: 160-169.
- 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.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lee, R. F. (1991). Lipoproteins from the Hemolymph and Ovaries of Marine Invertebrates. Adv. Comp. Environ. Physiol. 7: 187-207.
- Lubzens, E., Ravid, T., Khayat, M., Daube, N. y Tietz, A. (1997). Isolation and Characterization of the High-Density Lipoproteins From the Hemolymph and Ovary of the Penaeid Shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan): Apoproteins and Lipids. J. Exp. Zool. 278: 339-348.
- Madsudaira, P. (1993). A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing (Academic Press). 15 - 41
- Mathews, C. K. y van Holde, K. E. (1997). Biochemistry. Redwood City, CA.
- 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.
- Muriana, F. J. G., Ruiz-Gutierrez, V., Blaya, J. A. y Bolufer, J. (1995). Phospholipid fatty acid composition of hepatopancreatic brush-border membrane vesicles from the prawn *Penaeus japonicus*. Biochimie 77: 190-193.

- Ochiai, M. y Ashida, M. (1988). Purification of a  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Biol. Chem. 263: 12056-12062.
- Pusey, P. N. (1975). Dielectric and Related Molecular Processes. En Light Scattering and Intensity Fluctuation Spectroscopy., The Chemical Society, London,
- 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.
- 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.
- 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.
- Schagger, H. y von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379.
- 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.
- Söderhäll, K. (1981). Fungal cell wall  $\beta$ -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, I., 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  $\beta$ -1,3-glucan. *Insect Biochem.* 18: 323-330.
- 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. "pp."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.
- 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. (1983). Digestibility of Dietary Lipids in the Prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 49: 963-966.
- Teshima, S. y Kanazawa, A. (1980). Lipid constituents of serum lipoproteins in the prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 46: 57-62.
- Teshima, S., Kanazawa, A. y Kakuta, Y. (1986b). Effects of Dietary Phospholipids on Lipid Transport in the Juvenile Prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 52: 159-163.
- Teshima, S., Kanazawa, A. y Kakuta, Y. (1986d). Role of Dietary Phospholipids in the Transport of <sup>14</sup>C-Cholesterol in the Prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 52: 719-721.
- Thörnqvist, P. O., Johansson, M. W. y Söderhäll, K. (1994). Opsonic activity of cell adhesion proteins and  $\beta$ -1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. *Develop. Comp. Immunol.* 18: 3-12.
- Tsai, D., Hoa-Chia, C. y Tsai, C. F. (1984). Total Lipid and Cholesterol Content in the Blue Crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 78B:

- Unneberg, P., Merelo, J. J., Chacón, P. y Morán, F. (2001). SOMCD: Method for Evaluating Protein Secondary Structure from UV Circular Dichroism Spectra. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* 42: 460-470.
- van de Hulst, H. C. (1981). *Light Scattering by Small Particles*. Dover Publications.
- Vargas-Albores, F. (1995). Sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia* 46: 33-45.
- Vargas-Albores, F. y Yepiz-Plascencia, G (2000). Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191: 13-21.
- 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. y Söderhäll, K. (1996). A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by b-1,3-glucan. *Develop. Comp. Immunol.* 20: 299-306.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F. y Yepiz-Plascencia, G. (1997). Purification and comparison of b-1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.* 116B: 453-458.
- Venugopal, K. J. y Kumar, D. (1999). Vitellins and vitellogenins of *Dysdercus koenigii* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) — identification, purification and temporal pattern. *Comp. Biochem. Physiol.* 124B: 215–223.
- William, W. C. (1982). The isolation of lipids from tissues (H. R. Institute). En *Lipid Analysis*, Great Britain. 22-23
- Yeh, M.-S., Huang, C. J., Leu, J. H., Lee, Y. C. y Tsai, J.-H. (1999). Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Eur. J. Biochem.* 266: 624-633.

- Yepiz-Plascencia, G., Jimenez-Vega, F., Romo-Figueroa, M. G., Sotelo-Mundo, R. R. y Vargas-Albores, F. (submitted). Molecular characterization of the bifunctional VHDL-CP from the hemolymph of white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology*
- Yepiz-Plascencia, G., Sotelo-Mundo, R., Vazquez-Moreno, L., Ziegler, R. y Higuera-Ciajara, 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 b-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.
- Zandee, D. I. (1964). Absence of Sterol Synthesis in some Arthropods. *Nature* 202: 1335-1336.