



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIA BÁSICAS E INGENIERÍA

**EFFECTO DE LA FUERZA IÓNICA EN LA AFINIDAD
DEL COMPLEJO CISTATINA–QUIMOPAPAÍNA**

Tesis que presenta
Q. Viviana Guadalupe Casillas Sánchez
Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Química)

Departamento de Química

Área de Biofísicoquímica

Asesor: Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna

Jurado calificador:

Presidente: Dr. Andrés Hernández Arana.

Secretario: Dr. Alberto Rojas Hernández

Vocal: Dra. Georgina Garza Ramos

México, D.F. Marzo 2014



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIA BÁSICAS E INGENIERÍA


**EFFECTO DE LA FUERZA IÓNICA EN LA AFINIDAD
DEL COMPLEJO CISTATINA-QUIMOPAPAÍNA**

Tesis que presenta
Q. Viviana Guadalupe Casillas Sánchez
Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Química)

Departamento de Química

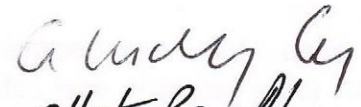
Área de Biofísicoquímica

Asesor:


Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna

Jurado calificador:


Presidente:

Dr. Andrés Hernández Arana. 

Secretario:

Dr. Alberto Rojas Hernández 

Vocal:

Dra. Georgina Garza Ramos 

México, D.F. Marzo 2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca de maestría con N.º. de registro 268010.

Y también por el apoyo en el proyecto **Bases Moleculares de la Afinidad en el Complejo Cistatina-Quimopapaína. Estudio termodinámico y estructural de la asociación.** Financiado por el CONACyT

Al Dr. Rafael Zubillaga por ser un excelente profesor, por compartir conmigo sus conocimientos, por tener siempre tiempo para aclarar mis dudas, y por apoyarme en momentos difíciles. Gracias por ser una maravillosa persona y un ejemplo a seguir, pero sobre todo, muchísimas gracias por permitirme trabajar con usted.

A los sinodales: Dr. Andrés Hernández Arana, Dra. Georgina Garza Ramos y al Dr. Alberto Rojas Hernández por todas las valiosas sugerencias y comentarios en la etapa de revisión de la tesis.

Al M. en C. Francisco Reyes Espinoza por su generoso apoyo en las etapas de purificación de las proteínas trabajadas en este proyecto.

A todos los profesores, compañeros y ex-compañeros del área de Biofísicoquímica, por todos los momentos tan divertidos que vivimos, y por hacer agradable mi estancia en el laboratorio. Me llevo muy gratos recuerdos de ustedes.

DEDICATORIAS

A Dios. Por darme la vida y por el amor de toda mi familia, la cual me ha apoyado en momentos difíciles y ha sonreído conmigo en los felices.

A mis padres. Quiero que sepan que mi principal motivación a lo largo de todo este tiempo han sido ustedes que confiaron en mí y me alentaron a seguir adelante. Gracias por su cariño, apoyo y por toda la orientación que siempre me han otorgado. Muchas gracias por ser unos padres maravillosos.

A mi hermano. Siempre fuiste y serás mi mayor ejemplo, siempre te admire y te admiraré por tu forma de ser y pensar, y, aunque no creas, siempre te observo y se cómo te sientes a pesar de que no te lo digo. Gracias por tus consejos y por todo el apoyo que siempre me has brindado. Te quiero mucho hermanito.

A Juan Carlos. Gracias por tu incondicional apoyo, comprensión y amor que me permite sentir poder lograr lo que me proponga; gracias por tus explicaciones, por tus consejos, por compartir y superar conmigo esos momentos difíciles que se nos han presentado. Gracias por ser parte de mi vida. **Te amo.**

A mis amigas.

Bere. Que, aunque estés lejos siempre me has apoyado, siempre has estado pendiente de mí y siempre me echas porras, TE EXTRAÑO AMIGA.

Alma. Aunque ya no te veo como en la licenciatura, siempre que te necesito tienes tiempo para mí, siempre me escuchas y siempre me das consejos. Gracias amiga.

Ángeles. Te convertiste en una gran amiga y doy gracias por haberte conocido. Gracias amiga por todos tus consejos y por hacerme reír en momentos tristes.

Marina. Sabes escuchar, sabes que decir en momentos difíciles, eres una lindísima persona, gracias por ser mi amiga.

Mariana. Te conozco desde hace tiempo y sin embargo es poco el tiempo que nos hemos tratado, pero eso ha servido para convertirte en una de mis mejores amigas. Gracias.

Yare y Caro. Gracias por haber permitido conocerlas son dos chicas increíbles, las considero dos grandes amigas y espero que esta amistad crezca con el paso del tiempo.

A todos mis amigos Ana, Manuel, Cristina, Reyna, Aurelia, Laurita, muchas gracias por estar conmigo en todo este tiempo, durante el cual hemos vivido momentos felices y tristes, gracias por ser excelentes amigos y recuerden que siempre los llevaré en mi corazón.

A todas las chicas del Fútbol. Gracias por esos partidos inolvidables en la Universidad, nunca las olvidaré.

A todas las personas especiales que me han acompañado hasta esta etapa de mi vida y que por diversas causas hemos tomado rumbos diferentes; les deseo lo mejor. Gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 PROTEASAS.....	1
1.1.1 Proteasas cisteínicas.....	1
1.1.1.1 Quimopapaína.....	3
1.2 Inhibidores de proteasas cisteínicas.....	4
1.2.1 Cistatina.....	5
2. JUSTIFICACIÓN.....	6
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 Objetivo General.....	7
3.2 Objetivos particulares.....	7
4. MATERIALES Y METODOS.....	8
4.1 MATERIALES.....	8
4.1.1 Aislamiento y purificación de la quimopapaína.....	8
4.1.2 Aislamiento y purificación de la cistatina.....	10
4.1.2.1. Primera etapa de purificación.....	11
4.1.2.2. Segunda etapa de purificación.....	12
4.1.2.3. Tercera etapa de purificación.....	13
4.2 MÉTODOS.....	14
4.2.1 Determinación de las Constantes de Disociación (Kd) del complejo CM-Quimopapaína—Cistatina a diferentes fuerzas iónicas.....	14
4.2.1.1 Preparación de las muestras.....	14
4.2.1.2 Espectros de Fluorescencia.....	15
4.2.1.3 Titulaciones Fluorimétricas.....	15
4.2.2 Modelado del complejo Quimopapaína—Cistatina.....	17
5. RESULTADOS.....	19
5.1 Homogeneidad de las preparaciones de CM-quimopapaína y cistatina.....	19
5.2 Espectros de emisión.....	21

5.3 Titulaciones fluorométricas a diferentes fuerzas iónicas.	23
5.4 Estructura del complejo Quimopapaína–Cistatina.....	24
6. DISCUSIÓN	29
7. CONCLUSIONES.....	32
8. PERSPECTIVAS.....	33
APENDICE I	34
APENDICE II	37
APENDICE III	38
APENDICE IV.....	41
APENDICE V.....	43
9. REFERENCIAS.....	44

ABREVIATURAS

CM	Carboximetil
CME	Centro de Masa Espectral
ϵ	Coefficiente de absorción específica
I_0	Concentración de inhibidor en la solución titulante
I_T	Concentración total de ligando (o inhibidor)
E_T	Concentración total de proteína (o enzima)
c	Concentración total de sitios de unión antes de la titulación
K_d	Constante de disociación
K_u	Constante de unión o asociación
ΔG_u	Energía libre de unión
FPLC	Fast protein liquid chromatography
I	Fuerza iónica
GE	General Electric
IF	Intensidad de fluorescencia
F_{EI}	Intensidad de fluorescencia del complejo (CM-quimopapaína-cistatina)
F_E	Intensidad de fluorescencia de la enzima (CM-quimopapaína)
F_I	Intensidad de fluorescencia del inhibidor (cistatina)
λ	Longitud de absorción o emisión
OPLS/AA	Optimized Potentials for Liquid Simulations.
PS	Proteasas sulfhidrúlicas o cisteínicas

PDB	Protein Data Bank
pI	Punto isoeléctrico
RMSD	Root-mean-square deviation
SCM-papaína	S-Carboximetil

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Proteasas

Las enzimas constituyen un grupo especializado y diverso de proteínas que tienen varios papeles en muchos procesos fisiológicos. Las enzimas proteolíticas, o proteasas, están implicadas en el control de múltiples procesos biológicos y en todos los organismos vivos. Por lo tanto, las proteasas regulan el destino, la localización y la actividad de muchas proteínas^[1].

Las proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Estas se clasifican inicialmente en endopeptidasas, los cuales catalizan la hidrólisis de los enlaces internos peptídicos, y exopeptidasas que hidrolizan enlaces peptídicos situados en el extremo amino y carboxilo terminal (NH_2 y COOH)^[2].

En 1960, Hartley sugirió que era conveniente dividir a las proteasas, con base en su mecanismo de acción en 4 grupos (Whitaker 2004)^[3]:

- a) proteasas serínicas
- b) proteasas cisteínicas, también llamadas proteasas sulfhidrúlicas o tiol proteasas
- c) proteasas aspárticas
- d) metaloproteasas

1.1.1 Proteasas cisteínicas

En las proteasas sulfhidrúlicas (PS) o cisteínicas el nucleófilo es el grupo sulfhidrilo (-SH) que se encuentra en un residuo de cisteína localizado en el sitio activo de estas enzimas.

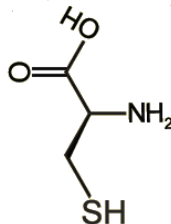


Figura 1. Residuo de cisteína con su grupo sulfhidrilo ubicado en la cadena lateral.

Las (PS) son proteínas responsables de muchos procesos bioquímicos que ocurren de manera reversible o irreversible en organismos vivos, por lo que se han visto implicadas en el desarrollo y progresión de varias enfermedades que incluyen el cáncer y el recambio proteico anormal ^[4]. De las PS que se han descubierto, casi la mitad de ellas son encontradas en virus. Pero se puede presentar en una gran variedad de organismos como son: mamíferos, aves, peces, insectos, plantas y algunos protozoarios ^[5]. Son abundantes en las células y juegan papeles importantes en procesos de proteólisis intracelular tales como el catabolismo de proteínas, péptidos y en el procesamiento de hormonas y zimógenos o en la degradación extracelular de colágeno. Ahora es bien conocido que una deficiente regulación de la actividad enzimática de estas proteasas causa serias enfermedades tales como distrofia muscular y osteoporosis^[6]. La familia de proteasas mejor caracterizada, corresponde por supuesto a las proteasas cisteínicas de la familia de la papaína.

La actividad de las PS se encuentra regulada por dos factores principales; por un lado está la señal que indica la producción de enzima activa, al organismo en turno; y por otro la síntesis de inhibidores específicos de estas proteasas. De manera muy particular, las PS que forman parte de la familia C1A tienen inhibidores naturales muy específicos como son las cistatinas cuya proteína modelo es de origen aviar, la cistatina de pollo ^[7]. La afinidad de la cistatina de pollo por la proteasa quimopapaína, previamente inactivada con un grupo carboximetilo en su cisteína catalítica (CM-quimopapaína), se ha estudiado anteriormente en el laboratorio de Biofísicoquímica de la UAM-I y se observó que a partir de medios ácidos la constante de unión aumenta con la alcalinidad del medio, obteniéndose un máximo a un valor de pH de 7.4, por lo que en este trabajo se decidió realizar los experimentos en esta condición.

La papaína es la enzima modelo dentro de su familia C1A, de tal manera que también es común mencionar a este grupo de enzimas con el nombre alternativo de “la familia de la papaína”. La característica común de este grupo de PS es que comparten homología estructural; un ejemplo de ello es la caracterización por rayos X de la estructura de la papaína y otras PS como las

catepsinas K, L y S de humano, lo cual ha permitido observar una gran similitud estructural a pesar de que la papaína tiene origen vegetal; por otro lado en el fruto de la papaya no solamente se encuentra la proteasa mencionada sino que la acompañan otras como la quimopapaína y la caricaína, las cuales además de compartir la forma estructural, presentan alta identidad en secuencia y por consecuencia propiedades fisicoquímicas y biológicas muy similares ^[5].

Todas las PS mencionadas anteriormente tienen una masa molecular promedio de 21-30 kDa ^[6]. Dentro de sus condiciones óptimas para desarrollar actividad hidrolítica, las PS de origen animal regularmente muestran un intervalo de pH óptimo entre 4 y 6.5, mientras que las de origen vegetal se mantienen activas entre valores de pH 5 y 8. Debido a la alta tendencia del grupo tiol a la oxidación, el medio ambiente de la enzima debe contener un componente reductor para evitar su inactivación.

1.1.1.1 Quimopapaína.

La quimopapaína es una proteasa homóloga de la papaína que se encuentra también en el látex de papaya (*Carica papaya*). Tiene 218 residuos de aminoácido, tres enlaces disulfuro y una masa molecular de 24 kDa. Su estructura cristalográfica se determinó por estudios de difracción de rayos X ^[8], que muestran una cadena con dos dominios estructurales, uno predominantemente de hélices α y el otro de hebras β antiparalelas. El sitio catalítico se localiza en la hendidura del interdominio y consta de tres residuos esenciales: **Cys25**, **His159** y **Asn179**.

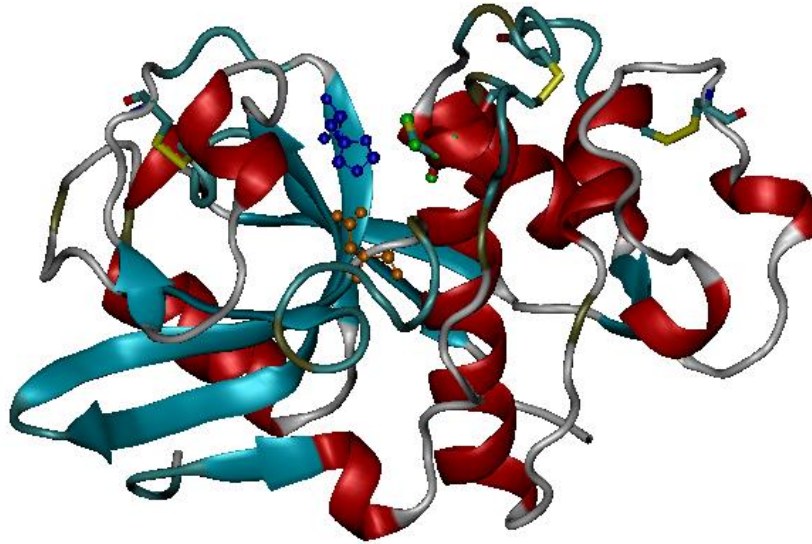


Figura 2. Estructura de la quimopapaína. Se resalta la estructura secundaria de hojas β (azul claro) y hélices α (rojo).

1.2 Inhibidores de proteasas cisteínicas

Los inhibidores son importantes en el estudio de las proteasas; dan la evidencia más clara en cuanto al tipo de sitio catalítico, información que constituye la base para la clasificación de las enzimas y facilitan la investigación de las funciones biológicas de las proteasas ^[9].

El término cistatina se refiere a proteínas que inhiben específicamente la actividad de la papaína y proteasas cisteínicas relacionadas (catepsina B, H y L, ficina y bromelaina). Estas proteínas están relacionadas por la estructura y la función de un inhibidor de proteasa cisteínicas, que fue descrita por primera vez en la clara de huevo, la cistatina. Las cistatinas han evolucionado formando la “superfamilia de la cistatina”. Los miembros de la superfamilia pueden ser divididos en tres grupos o familias de proteínas más estrechamente relacionadas que comprenden las cistatinas animales y una familia de cistatinas de plantas ^[10].

La gran familia de inhibidores de cistatina se ha subdividido en tres familias de acuerdo a su localización, masas moleculares, número de enlaces disulfuro y complejidad de su cadena polipeptídica:

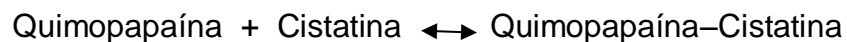
Tipo 1, como las cistatina A y B, son de tipo intracelular, son llamadas comúnmente estefinas, sus miembros constan de un dominio, tienen alrededor de 100 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 11 kDa; carecen de enlaces disulfuro.

Tipo 2, llamadas comúnmente cistatínas, son proteínas que tienen un solo dominio y una masa molecular de 13 kDa, contienen alrededor de 115 residuos de aminoácidos y dos enlaces disulfuro, no contienen carbohidratos; a este grupo pertenecen la cistatina de pollo y la cistatina C de mamíferos ^[1].

Tipo 3, conocidos como quinínógenos, tienen enlaces disulfuro, se localizan en el plasma sanguíneo, son más grandes que los miembros de las otras dos familias; su masa molecular es de aproximadamente 100 kDa y contienen alrededor de 355 aminoácidos. ^[11].

1.2.1 Cistatina

La cistatina de pollo consta de 116 residuos de aminoácido, tiene dos puentes disulfuro y una masa molecular de 13.1 kDa; su estructura tridimensional ya ha sido determinada por difracción de rayos X ^[12] y RMN ^[13] y consiste básicamente de una hoja β antiparalela de cinco hebras que está torcida y envuelve a una α -hélice de cinco vueltas (Figura 3). Esta proteína se presenta en dos formas, una de ellas fosforilada en el residuo Ser80 que está en una zona flexible, poco estructurada ^[8] y alejada de la zona que contacta con las proteasas, por lo que la afinidad por estas no se modifica significativamente con la fosforilación.



$$K_u = \frac{[\text{Quimopapaína-Cistatina}]}{[\text{Quimopapaína}][\text{Cistatina}]}$$

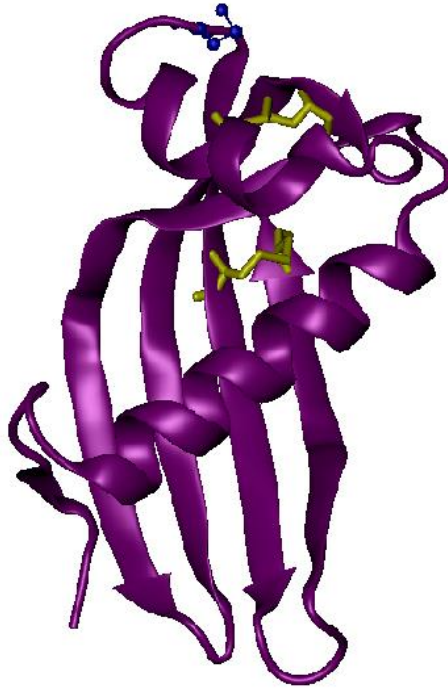


Figura 3. Estructura de la Cistatina de pollo. Se resaltan los dos puentes disulfuro en color amarillo y el sitio de fosforilación Ser80 en azul.

2. JUSTIFICACIÓN

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado a proteasas cisteínicas de la familia C1 como la papaína, la actinidina y la quimopapaína, y su interacción con la cistatina de pollo. La actividad proteolítica de estas enzimas es requerida en una gran variedad de procesos fisiológicos y un conocimiento detallado de su inhibición podría ayudar en la búsqueda de nuevos fármacos que regulen la actividad de estas proteasas, con aplicaciones potenciales en enfermedades tales como la artritis, alergia, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y el cáncer.

El propósito de este estudio es conocer la estabilidad del complejo CM-quimopapaína—cistatina en medios con diferente fuerza iónica y evaluar así la importancia que tienen las interacciones electrostáticas en la formación de este asociado macromolecular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

Determinar la importancia de las interacciones electrostáticas en la afinidad de la cistatina por la CM-quimopapaína a pH 7.4

3.2 Objetivos particulares.

- ❖ Aislar y purificar la quimopapaína y la cistatina de pollo.
- ❖ Determinar la afinidad del complejo CM-quimopapaína-cistatina mediante titulaciones fluorimétricas, a diferentes fuerzas iónicas.
- ❖ Obtener un modelo estructural del complejo CM-quimopapaína-cistatina por modelado computacional.

4. MATERIALES Y METODOS.

4.1 MATERIALES.

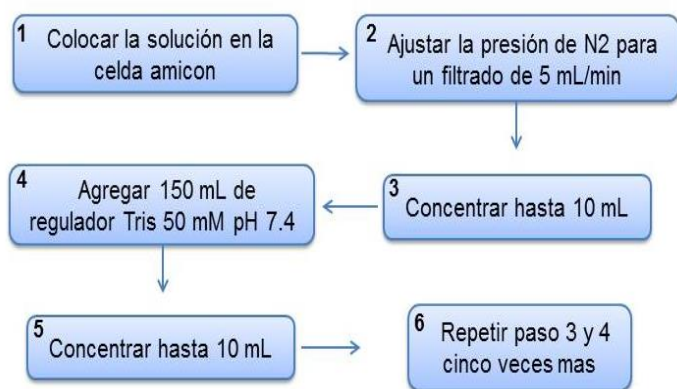
4.1.1 Aislamiento y purificación de la quimopapaína.

La purificación de quimopapaína se realizó a partir de un extracto comercial de Sigma, Chemical Co., inactivando primero la proteasa por tratamiento con ácido yodoacético para formar el derivado carboximetilado de la Cys catalítica. Las etapas de la purificación (Figura 4) se realizaron de acuerdo al procedimiento reportado por Solís-Mendiola y colaboradores (1992) ^[14]. La concentración de quimopapaína se determinó a partir de la medida de absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de absorción específica $\epsilon^{(0.1\%,1\text{cm})}$ de 1.87 ^[15] y una masa molar de 23,657 g/mol^[16].

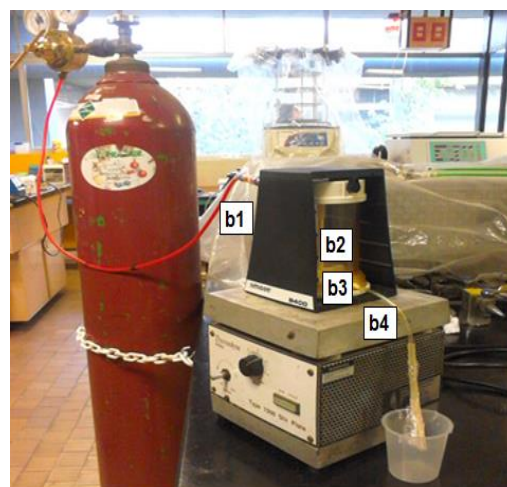


Figura 4. Procedimiento de inactivación y purificación de la quimopapaína.

Se pesaron 100 mg de quimopapaína doblemente cristalizada de Sigma, Chemical Co., con un porcentaje de proteína de 90%, y se disolvieron en 50 mL de regulador de fosfatos ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 50 mM pH 7.0. La cisteína catalítica de la quimopapaína se activó adicionando cisteína libre como agente reductor a una concentración final de 20 mM. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente se adicionaron 0.32 g de ácido yodoacético disueltos en 10 mL de agua desionizada, para alcanzar una concentración final de 30 mM. La mezcla anterior se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 60 min; pasado este tiempo se ultrafiltró con regulador de fosfatos 50 mM pH 7.0, durante 12 h a 5°C (ver Figura 5) usando una membrana de 10 kDa de corte en un sistema Amicon de 350 mL a una presión de Nitrógeno de 1.4 atmosferas. Posteriormente la solución se filtró a través de una membrana con tamaño de poro de 0.45 μm .



(a)



(b)

Figura 5. (a). Proceso de ultrafiltración de la CM-quimopapaína contra regulador de fosfatos 0.050 M, pH 7.0, durante 12h a 5°C. **(b).** Celda Amicon Millipore con capacidad de 300 mL (**b1**: entrada de nitrógeno bajo presión; **b2**: cámara con la solución de proteína; **b3**: membrana de corte 12 kDa; **b4**: salida de solución reguladora con polipéptidos menores a 12 kDa).

Pasado este tiempo se procedió a purificar mediante cromatografía de líquidos utilizando un equipo de tipo FPLC, marca AKTA Prime Plus y una columna GE Healthcare de intercambio catiónico HiLoad 16/60; 5.0 mL de solución con aproximadamente 0.5 mg/mL de proteína fueron inyectados a la columna, equilibrada con el regulador de fosfatos 50 mM pH 7.0, eluyendo con el mismo regulador.

Los componentes cromatográficos fueron eluidos de la columna a una velocidad de flujo de 0.2 ml/min y a una presión de 0.77 MPa, el comportamiento del gradiente se muestra en la Tabla 1.

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
20	100	0
25	70	30
43	0	100
45	0	100
46	100	0

Tabla 1. Programa del gradiente salino usado para la cromatografía de intercambio catiónico de CM-quimopapaína. Donde %A y % B son la fase móvil de la cromatografía y corresponden al regulador Tris 50 mM pH 7, a 0 M de NaCl y 1.0 M de NaCl respectivamente.

La muestra obtenida de la cromatografía contenía NaCl al 80% aproximadamente, por lo tanto fue necesario ultrafiltrarla diluyendo con regulador de Tris 50 mM pH 7.4 hasta 150 mL y concentrando a un volumen en la celda de 40 mL. Este paso se repite 5 veces utilizando una membrana de corte de 10 kDa.

4.1.2 Aislamiento y purificación de la cistatina.

La cistatina se aisló a partir de clara de huevo de gallina de acuerdo con la modificación de Lindahl *et al.* ^[17] al procedimiento original de Anastasi *et al.* ^[18]. La concentración de cistatina se determinó a partir de la medida de absorbancia a

280 nm utilizando el coeficiente de absorción específica de $\epsilon^{(0.1\%,1\text{cm})}$ de 0.87 [19] y una masa molar de 13,148 g/mol [16].

El diagrama mostrado en la figura 6 muestra con mayor detalle los pasos realizados durante la purificación de la enzima.

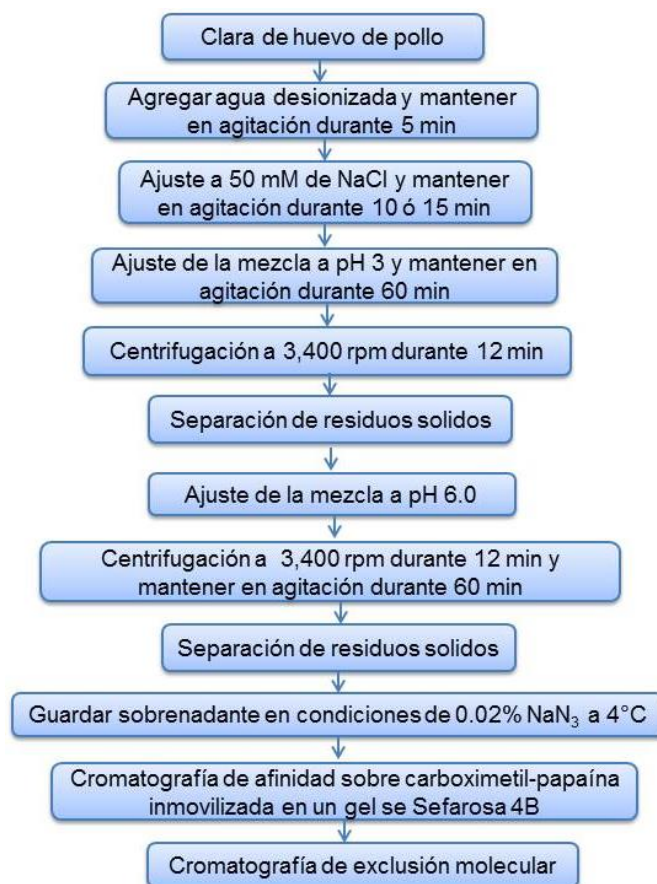


Figura 6. Procedimiento de purificación de la cistatina de pollo a partir de la clara de huevo.

4.1.2.1. Primera etapa de purificación.

Se utilizaron 2.0 kg de huevo (28 huevos medianos), de los cuales se utilizaron solo las claras (600 mL). A esta solución se le adicionó agua para obtener el doble de volumen, la mezcla se mantuvo en agitación durante 5 min a temperatura ambiente hasta homogenizar. Una vez hecho esto, se procedió a la precipitación de proteínas mediante la adición de NaCl y el ajuste de pH; como primer paso se agregó 50 mM de NaCl (3.5064 g) y se mantuvo en agitación por 15 min, posteriormente se ajustó el pH a un valor de 3.0 con HCl concentrado, y

se mantuvo en agitación durante 60 min a temperatura ambiente. A este valor de pH se favorece la precipitación de algunas proteínas que no son de interés, las cuales fueron removidas de la solución por centrifugación a 3,400 rpm durante 12 min; posteriormente se decantó y separó el precipitado del sobrenadante. En el segundo paso el sobrenadante obtenido se ajustó con NaOH 1.0 M para obtener un valor de pH 6, precipitando en esta ocasión a las proteínas conalbúmina y globulina; la mezcla se mantuvo en agitación durante 60 min a temperatura ambiente; las proteínas precipitadas fueron removidas por centrifugación a 3,400 rpm durante 12 min. Nuevamente se decantó y separó el precipitado del sobrenadante. Las proteínas precipitadas en el segundo paso tienen un punto isoeléctrico entre 5 y 6.

4.1.2.2. Segunda etapa de purificación.

Al sobrenadante obtenido en el paso anterior, el cual contiene cistatina, se le realizó una separación por lotes aprovechando la gran afinidad de la cistatina por la enzima modificada S-carboximetil-papaína (SCM-papaína) inmovilizada en un gel de Sefarosa B. El gel de Sefarosa se encuentra en regulador de fosfatos 30 mM, pH 7.0, con NaCl 50 mM y NaN_3 0.02%. Se utilizaron 4 tubos con 15 mL de Sefarosa en cada uno y se lavó con regulador de fosfatos 25 mM, pH 7.0, adicionado con 0.1% de detergente Brij 35 y NaN_3 0.02%, hasta llegar a un volumen de 25 mL. Los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min. Posteriormente se decantó la fase líquida de la sólida, y la Sefarosa contenida en los tubos se mezcló con 20 mL de regulador de fosfatos 30 mM, pH 7, NaCl 50 mM y NaN_3 0.02%. Una vez lista la Sefarosa se adicionaron aproximadamente 10 mL del sobrenadante proveniente de la primera etapa a cada uno de los 4 tubos. La mezcla se dejó reposar durante 10 o 15 min con agitación constante, pasado este tiempo se centrifugó a 2,200 rpm durante 10 min, y después se decantó. El sobrenadante, que aún contenía algo de cistatina, se guardó para una segunda purificación en lote para aumentar el rendimiento de la cistatina. El gel de Sefarosa recuperado en cada tubo, que contiene la cistatina pura inmovilizada, se lavó con 20 mL de regulador de fosfatos 25 mM, NaN_3 0.02%, Brij 35 (0.1%) para después

centrifugar a 3,000 rpm durante 10 min. Se decantó una vez más y se agregaron al gel 15 mL de regulador de fosfatos 30 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0 y se centrifugaron nuevamente los tubos a 3, 000 rpm durante 11 min. Este último paso se repitió tres veces más.

Posteriormente toda la Sefarosa 4B contenida en los 4 tubos se colocó en un embudo Büchner conectado al vacío, esto para retirar residuos de agua. Para la separación del complejo (CM-papaína)-cistatina se depositó el gel en otro matraz erlenmeyer y se agregó regulador de fosfatos 40 mM, pH 11.7, NaCl 50 mM, NaN₃ 0.02%, glicerina 10%. A este pH la cistatina puede polimerizar, y para evitarlo se ajustó el pH de la solución a un valor entre 6 y 7 agitando la solución con una varilla de vidrio y agregando rápidamente (menos de 1 min) de 5 a 6 gotas de HCl al 10%. Para volver a utilizar el gel de Sefarosa se realizaron 3 lavados alternados para liberar proteínas adsorbidas en el gel que no estuviesen unidas a la papaína. Esto se realizó con 20 mL de regulador de acetatos (40 mM pH 4.0, NaCl 50 mM, NaN₃ 0.02%) contra lavado de 20 mL de regulador de Tris (40 mM pH 8.4, NaCl 50 mM, NaN₃ 0.02%).

La cistatina obtenida se juntó y se ultrafiltró en una celda Amicon de 350 mL, utilizando el regulador de fosfatos 30 mM, pH 7.0, NaCl 50 mM, NaN₃ 0.02%, haciendo ciclos de dilución a 150 mL seguido de concentración a 10 mL (ver Figura 7).

4.1.2.3. Tercera etapa de purificación.

Se realizó una cromatografía de filtración en gel con un equipo de FPLC AKTA Prime Plus, a través de una columna HiLoad Superdex 200 10/300 GL, equilibrada con regulador de fosfatos 30 mM, NaCl 50 mM, NaN₃ 0.02%, pH 7.0, con un flujo de 0.7 mL/min y a una presión de 0.78 MPa.

Para determinar la pureza de la muestra de cistatina se realizó una electroforesis de acuerdo al método de Laemmli^[20], utilizando un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes.

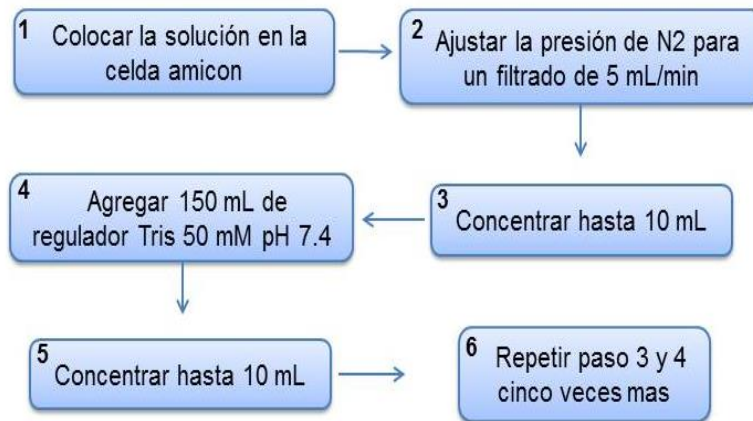


Figura 7. Diagrama de ultrafiltración de la cistatina contra regulador de fosfatos 0.030 M pH 7,0 durante 12 h a 5°C.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Determinación de las Constantes de Disociación (Kd) del Complejo

CM-Quimopapaína—Cistatina a diferentes fuerzas iónicas.

4.2.1.1 Preparación de las muestras

Para realizar los estudios de fluorescencia se tomaron 2.0 mL de CM–quimopapaína y 5.0 mL de cistatina que se equilibraron en 6 mL y 3 mL de regulador Tris 50 mM, 0.02% NaN₃, pH 7.4 respectivamente con diferentes concentraciones de NaCl: 0 M, 0.25 M, 0.5 M, y 0.75 M. Las soluciones se centrifugaron a 6,000 rpm durante 30 min a 8°C en tubos Amicon Ultra 10K–NMWL, con lo cual el volumen se redujo a 350 µL. Posteriormente se diluyó la solución con regulador fresco hasta 2.0 mL y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Este proceso de dilución/concentración se repitió 3 veces. Al finalizar la última centrifugación se midió la absorbancia a 280 nm y se hicieron las diluciones necesarias para llegar a la concentración deseada. Una vez hecho esto las soluciones se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.45 µm de tamaño de poro, se etiquetaron y se guardaron en el refrigerador.

4.2.1.2 Espectros de Fluorescencia.

El efecto de la fluorescencia intrínseca de la cistatina por un lado, y de la CM-quimopapaína por otro lado, fue estudiado utilizando diferentes concentraciones de proteína y observando la emisión de fluorescencia obtenida a 340 nm; la excitación se hizo a una longitud de onda de 280 nm.

Para obtener los espectros de fluorescencia se utilizó la misma longitud de onda de excitación (280 nm), pero en este caso los valores de fluorescencia se registraron en el intervalo de 300 a 400 nm. Los espectros se pueden visualizar en las figuras 12 y 13.

Los estudios fueron realizados en un espectrofluorómetro ISS modelo K2, (Urbana, IL, USA) a 25 °C. El solvente utilizado fue regulador de Tris 50 mM, pH 7.4, con diferentes concentraciones de NaCl: 0 M, 0.25 M, 0.50 M y 0.75 M.

A fin de evaluar si existe un corrimiento en las longitudes de onda de emisión de un espectro, se acostumbra calcular el centro de masa espectral (CME) a través de la siguiente formula:

$$CME = \frac{\sum_i F_i \lambda_i}{\sum F_i} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde F_i representa la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda λ_i .

4.2.1.3 Titulaciones Fluorimétricas

A partir de una solución de CM-quimopapaína 31 μM se prepararon 2.50 mL a una concentración de 2.0 μM directamente en una celda de cuarzo de 3 mL y se mantuvo en agitación constante con un magneto. Posteriormente, se realizó la titulación agregando alícuotas de una solución de cistatina 75 μM de acuerdo al programa de adiciones mostrado en la Tabla 2, hasta llegar a un exceso molar de 2.19 veces sobre la CM-quimopapaína. La temperatura del compartimento de muestra estuvo regulada a 25.0 °C con un sistema Peltier. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm, la emisión se registró a 340 nm y el tiempo de promediado de la intensidad de fluorescencia fue de 2.0 min después de cada adición.

Número de adición	Volumen _{cistatina} (μL)	Volumen _{cistatina} total (μL)	[CM-quimopapaína] (μM)	[cistatina] (μM)
0	0	0	2.0	0
1	4.9	4.9	2.0	0.15
2	5.1	10.0	1.99	0.30
3	5.3	15.3	1.99	0.46
4	5.6	20.9	1.98	0.62
5	5.9	26.8	1.98	0.80
6	6.3	33.1	1.97	0.98
7	6.7	39.8	1.98	1.17
8	7.3	47.1	1.96	1.38
9	8.1	55.2	1.96	1.62
10	9.1	64.3	1.95	1.88
11	10.4	74.7	1.94	2.17
12	12.2	86.9	1.93	2.51
13	14.8	101.7	1.92	2.93
14	18.8	120.5	1.91	3.44
15	25.3	145.8	1.89	4.13

Tabla 2. Programa de inyecciones. El programa se utilizó con las muestras de 0, 0.25, 0.50 y 0.75 M de NaCl.

Posteriormente se realizó el mismo procedimiento de titulación anterior sustituyendo la solución de quimopapaína por regulador de Tris 50 mM, NaCl (0 M, 0.25 M, 0.50 M y 0.75 M) pH 7.4, para determinar la fluorescencia de la cistatina libre (F_I) en cada paso de la titulación. La intensidad de fluorescencia de la quimopapaína libre (F_E) se calculó considerando el efecto de dilución debido el aumento de volumen provocado por la adición de cistatina. Para su análisis, los datos de fluorescencia se expresan de la siguiente forma:

$$Y = (F_E + F_I - F_{E,I}) / F_E$$

F_E = fluorescencia por unidad de concentración de la enzima libre

(CM- quimopapaína)

F_I = fluorescencia por unidad de concentración del inhibidor libre (cistatina)

$F_{E,I}$ = fluorescencia por unidad de concentración de la mezcla enzima/inhibidor

A partir del cambio de esta variable Y en función de la concentración total de cistatina (x) se determinaron las constantes de disociación (K_d) a través de un ajuste no lineal a una ecuación de dos parámetros (a, K_d) y una constante (c')^[21].

$$Y = \frac{a}{2c'} \{c' + x + K_d - [(c' + x + K_d)^2 - 4c'x]^{1/2}\} \quad \text{Ec. 2}$$

$$a = \lim_{x \rightarrow \infty} (F_E + F_I - F_{E,I}) / F_E$$

K_d = constante de disociación

$c' = c(l_0 - x) / l_0$ donde c = concentración total de sitios de unión antes de la titulación

x = concentración total de inhibidor.

4.2.2 Modelado del complejo Quimopapaína–Cistatina

Las estructuras tridimensionales de la cistatina de pollo y de la quimopapaína se encuentran depositadas en el banco de datos de proteínas (Protein Data Bank, PDB) ^[1,3] con los códigos 1A67 y 1YAL, respectivamente, pero no la del complejo cistatina-quimopapaína. Solamente se cuenta con las estructuras de los complejos homólogos de estefina B–papaína (1STF) y estefina A–catepsína H (1NB5). Por un lado, tanto la papaína como la catepsína H presentan homología estructural con la quimopapaína y por otro lado, los inhibidores estefina A y B son homólogos estructurales de la cistatina de pollo; esto hace posible generar un modelo confiable para el complejo cistatina–quimopapaína utilizando como referencia las estructuras de los complejos homólogos.

El primer paso fue obtener los archivos pdb con la estructura de todas las proteínas involucradas, en la página web <http://www.rcsb.org/pdb>. A partir de esos archivos se tomaron las secuencias de aminoácidos de cada proteína y se transformaron al formato FASTA con una utilidad disponible en la red, que cambia la secuencia del código de tres letras al de una sola letra (http://molbiol.ru/eng/scripts/01_17.html). Finalmente se hicieron los alineamientos por pares de secuencias para obtener el grado de similitud y porcentaje de identidad entre las proteínas homólogas utilizando el programa clustalw del sitio web de Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Para nuestro caso alineamos quimopapaína y papaína; quimopapaína y catepsína H; cistatina y estefina B y cistatina contra estefina A. Se eligió la estructura del complejo homólogo con mayor identidad en secuencia como estructura de referencia (1STF.pdb) para el modelado por acoplamiento molecular (*docking*) de la quimopapaína y la cistatina de pollo. Utilizando el programa pyDock (<http://life.bsc.es/servlet/pydock/home>) en

su versión RST (que impone restricciones en cuanto a posible contactos interfaciales) se obtuvieron 10,000 diferentes poses, registrando los archivos .pdb de los 100 mejores modelos. De estos se compararon los primeros 25 con la estructura de referencia, determinando el valor de *RMSD*, para seleccionar al que tuviese la orientación más parecida a ella. Por último, al modelo seleccionado se le hizo una minimización de energía, se introdujo en una caja de agua con una distancia mínima de 1.0 nm desde cualquier átomo del complejo hasta la pared de la caja y se realizó una simulación de dinámica molecular en un sistema NPT a 1 bar de presión y 300 K, durante 100 ns utilizando el programa GROMACS 4.5.4 y el campo de fuerzas OPLS/AA.

5. RESULTADOS.

5.1 Homogeneidad de las preparaciones de CM-quimopapaína y Cistatina

Se obtuvo una muestra de CM-quimopapaína homogénea en la fracción central del pico (A) detectado por absorbancia a 280 nm en el eluyente de la columna de cromatografía de intercambio catiónico (Figura 8). La pureza se verificó en un gel PAGE-SDS al 12% de poliacrilamida (Figura 9).

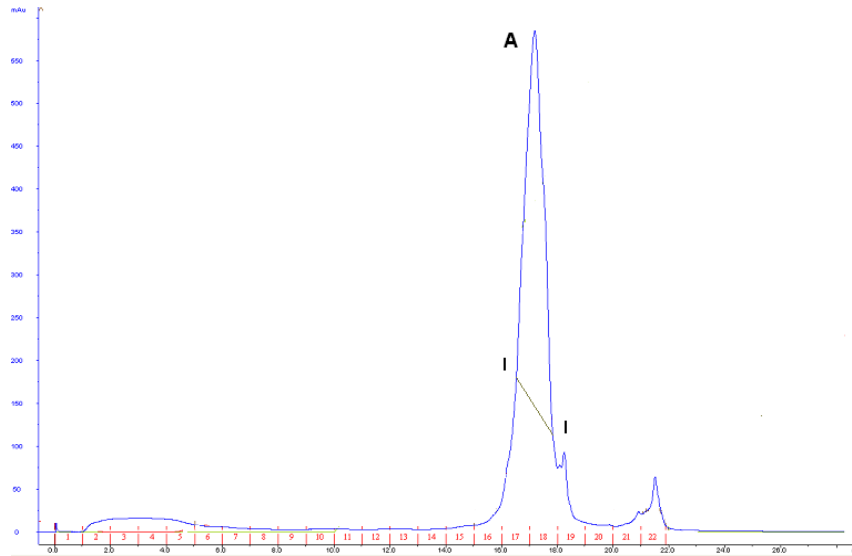


Figura 8. Purificación de la CM-quimopapaína por cromatografía de intercambio catiónico, (I) fracción colectada de CM-quimopapaína.

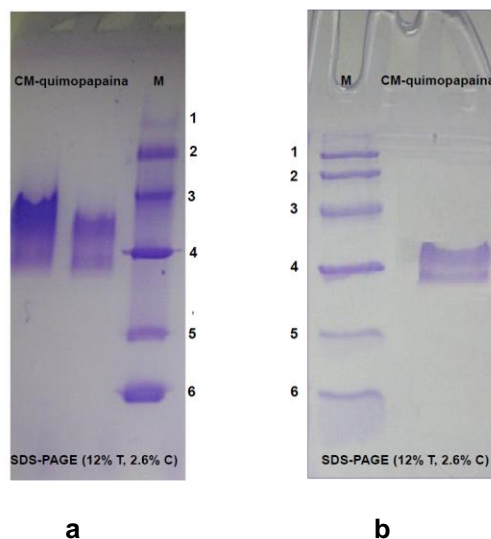


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) de la muestra de CM-quimopapaína. (a) Análisis después de la primera etapa de purificación, (b) Análisis después de la etapa final de la purificación. **M:** Marcadores de peso molecular de Amersham (1: fosfolipasa B, 97 kDa. 2: albumina, 66 kDa. 3: ovoalbúmina, 45 kDa. 4: anhidrasa carbónica 31 kDa. 5: inhibidor tripsina 21.5 kDa. 6: Lisozima 14.4 kDa. La CM-quimopapaína (izquierda en **a** y derecha en **b**) corresponde con el marcador número 4.

Por otra parte, se obtuvo una muestra homogénea de cistatina después de la cromatografía de filtración en gel (Figura 10 (C)). Su pureza se verificó en un gel PAGE-SDS al observarse una sola banda (Figura 11).

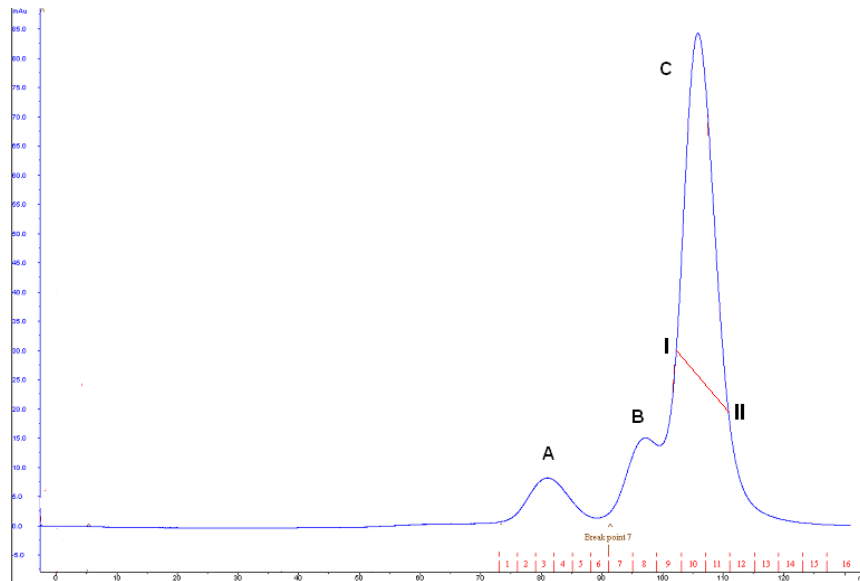


Figura 10. Purificación de la cistatina por cromatografía de filtración en gel. (I) Primera fracción colectada, (II) segunda fracción colectada después del pico máximo.

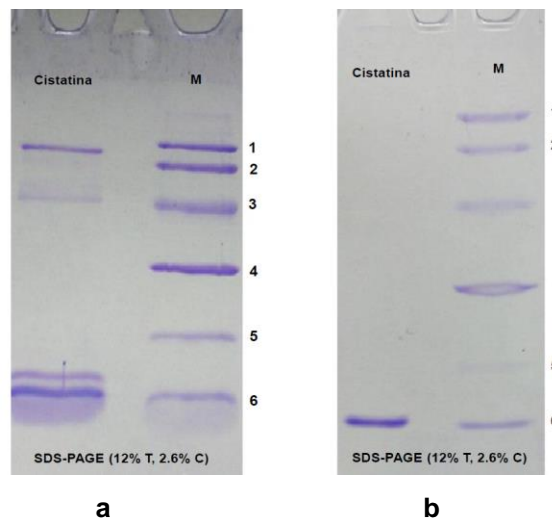


Figura 11. Análisis Electroforético (PAGE-SDS) de la muestra de cistatina. (a) Cistatina en la etapa de purificación con Gel de Sefarosa 4B. (b) Cistatina durante la etapa final de la purificación por cromatografía de filtración en gel. **M:** Marcadores de peso molecular de Amersham (1: fosfolipasa B, 97 kDa. 2: albumina, 66 kDa. 3: ovoalbúmina, 45 kDa. 4: anhidrasa carbónica 31kDa. 5: inhibidor tripsina 20.1 kDa. 6: Lisozima 14.4 kDa. La cistatina a la izquierda de ambos geles corresponde con el marcador número 6.

5.2 Espectros de emisión.

Los espectros de emisión del complejo de cistatina y CM–quimopapaína, en la región de 300 a 400 nm, a pH 7.4 en ausencia y presencia de 0.75 M de NaCl se muestran en las Figuras 12 y 13, respectivamente. Estos espectros muestran una disminución en la intensidad de fluorescencia respecto a los espectros de las proteínas aisladas corregidos por efecto de dilución. Por otro lado el centro de masa del espectro del complejo (341 nm) muestra un pequeño corrimiento al rojo respecto del CME del espectro suma de las proteínas libres (340 nm).

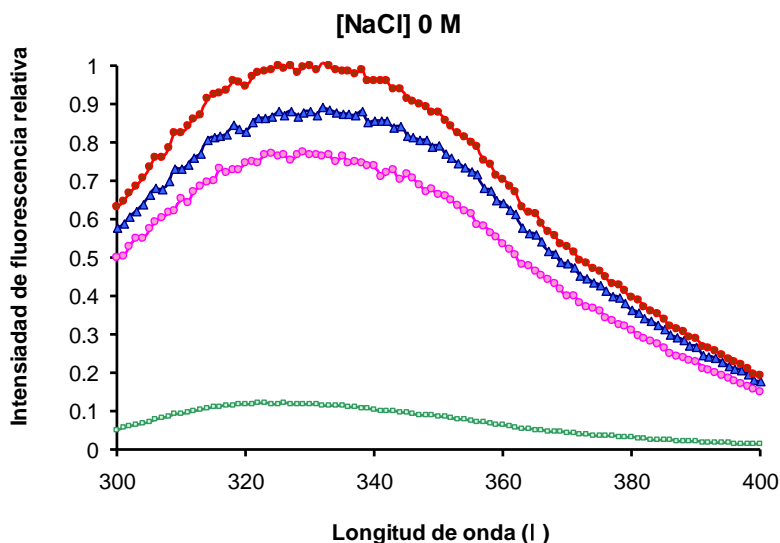


Figura 12. Espectros de fluorescencia. La curva de color rosa es la mezcla de quimopapaína (1.89 μM) y cistatina (4.13 μM). La curva azul es la muestra de quimopapaína (2.0 μM), la verde es la muestra de cistatina a 4.13 μM y la curva roja corresponde a la suma de los espectros de quimopapaína y cistatina que equivaldría a un sistema no interaccionante.

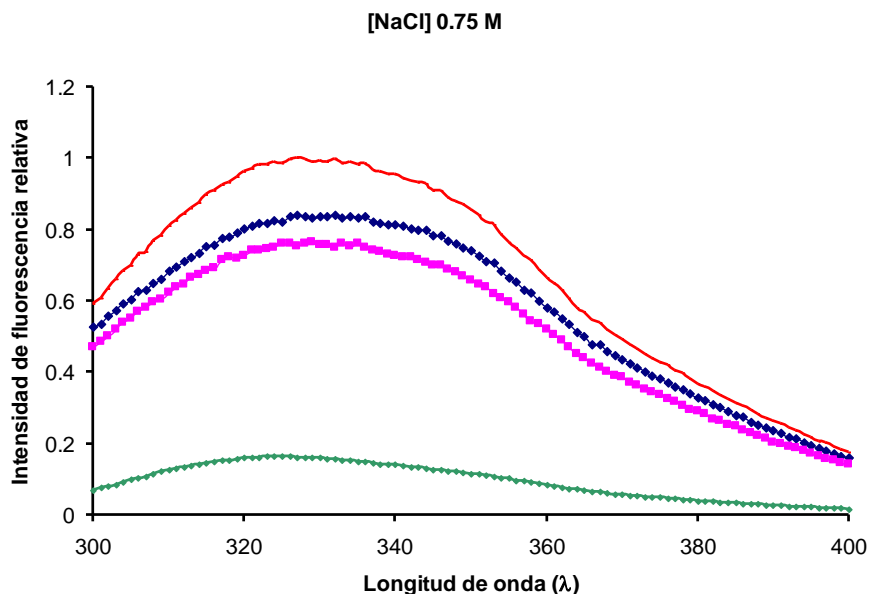


Figura 13. Espectros corregidos de fluorescencia La curva de color rosa es la mezcla de quimopapaína (1.89 μM) y cistatina (4.13 μM). La curva azul es la muestra de quimopapaína (2.0 μM), la curva verde es la muestra de cistatina a 4.13 μM y la curva roja corresponde a la suma de los espectros de quimopapaína y cistatina que equivaldría a un sistema no interaccionante.

Para determinar la constante de unión fluorométrica del complejo CM-quimopapaína–cistatina es necesario que el cambio en la intensidad de fluorescencia sea proporcional a la concentración de complejo formado. Por ello, es indispensable trabajar en un intervalo de concentraciones donde la intensidad de fluorescencia sea proporcional a la concentración del fluoróforo, para ambas proteínas. Para verificar que esta relación fuese lineal en el intervalo de concentraciones a trabajar, se hicieron curvas estándar para la CM-quimopapaína y la cistatina aisladas. La Figura 14 muestra que tanto la fluorescencia de la cistatina como la de la CM-quimopapaína mantienen una tendencia lineal con la concentración de proteína en un intervalo de hasta 4.0 μM , a todas las concentraciones de NaCl ensayadas. Las lecturas de fluorescencia se tomaron a una longitud de onda de emisión de 340 nm, manteniendo una excitación a 280 nm.

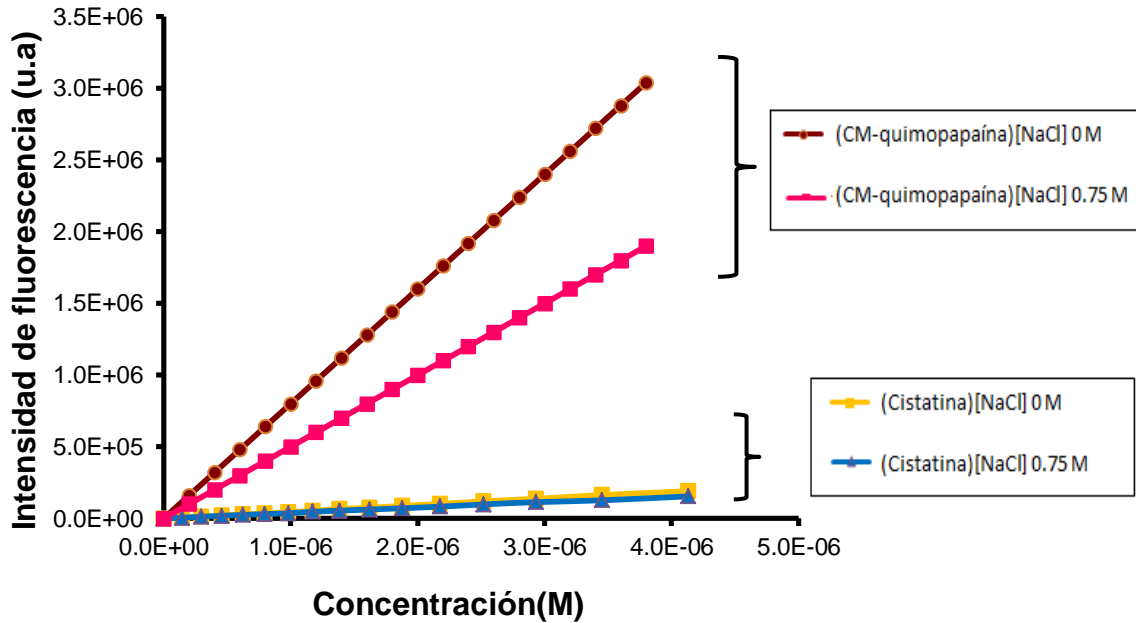


Figura 14. Linealidad de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de proteína (CM-quimopapaína y cistatina) a 0.0 M y 0.75 M de NaCl.

5.3 Titulaciones fluorométricas a diferentes fuerzas iónicas

En el siguiente gráfico (Figura 15) se muestran las titulaciones fluorimétricas de la CM-quimopapaína con cistatina en ausencia y presencia de NaCl 0.75 M.

A partir del cambio de la variable Y en función de la concentración de cistatina (x) se determinaron las constantes de disociación a través de un ajuste no lineal a la ecuación 2 utilizando el programa comercial Origin (ver apéndice I). Mediante estos ajustes se obtienen los valores de la constante de disociación (K_d) con los cuales calculamos los valores de la constante de unión ($K_u = 1 / K_d$) para cada una de las titulaciones. En la Tabla 3 se presentan los valores obtenidos a las diferentes concentraciones de NaCl ensayadas.

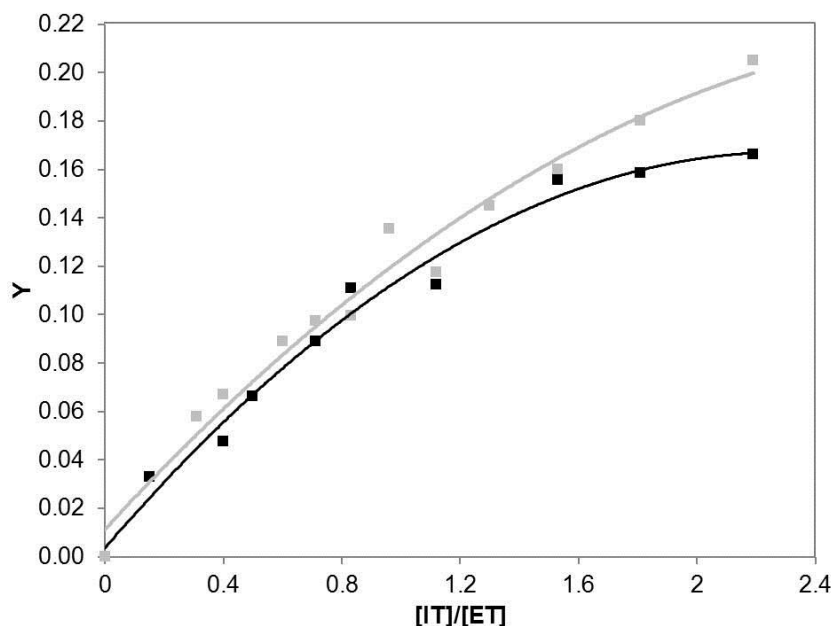


Figura 15. Titulación de una solución de quimopapaína 2.0 μM con cistatina hasta un exceso molar de 2.19. Los experimentos fueron realizados en Tris 50 mM, pH 7.4 a 0 M de NaCl (en color negro) y 0.75 M NaCl (en color gris).

[NaCl] (M)	Ku
0	$2.38 \times 10^6 \pm 3.01 \times 10^5$
0.25	$1.43 \times 10^6 \pm 1.44 \times 10^5$
0.50	$1.36 \times 10^6 \pm 2.22 \times 10^5$
0.75	$1.11 \times 10^6 \pm 2.99 \times 10^5$

Tabla 3. Constantes de unión del complejo cistatina-CM–quimopapaína.

5.4 Estructura del complejo Quimopapaína–Cistatina

De los alineamientos por pares realizados, las secuencias de proteasas que presentan mayor homología en secuencia, son la quimopapaína y la papaína; y para el alineamiento entre los inhibidores, hay una mayor identidad en secuencia entre la cistatina y la estefina B. Los alineamientos se presentan en las Figuras 16, 17, 18 y 19 y las comparaciones están con detalle en la Tabla 4. En cada alineamiento por pares se resaltan los aminoácidos idénticos (*), los de mayor similitud (:), los de menor similitud (·) y los que no presentan nada en común. Los alineamientos se muestran con los códigos de una letra para cada uno de los aminoácidos (ver apéndice II).

```

quimo  YPQSIDWRAKG-AVTPVKNQGACGSCWAFSTIATVEGINKIVTGNLLELSEQELVDCDK- 58
catH   YPPSMDWRKKGNFVSPVKNQGSCGSCWTFSTTGALES AVAIATGKMLSLAEQQLVDCAQN 60
      ** *:*:*:* * *:*:*:*:*:*:*:*:*:* * .:*:*:*:*:*:*:*:*:* *
quimo  -HSYGCKGGYQTTSLQYVANN-GVHTSKVYPYQAKQYKCRATDKPGPKVKITGYKRVPSN 116
catH   FNNHGCQGLPSQAFEYIRYNKGIMGEDTYPYKQDDHCKFQPK-AIAFVKDVANITMN 119
      ::*:*:* * ::*:* * * * : .:*:*:*:*:* * : * . . . . . : : *
quimo  CETSFLGALAN-QPLSVLVEAGGKPFQLYKSGVFDG-PCG---TKLDHAVTAVGYGTS DG 171
catH   DEEAMVEAVALYNPVSFAFEVTN-DFLMYRKG IYSSTSCHKTPDKVNHAVLAVGYGEENG 178
      * : : * : * : * : * . * . * : * : * : . . * * : * * * * * : *
quimo  KNYII IKNSWGPNWGEKGYMRLKRQSGNSQGT CGVYKSSYYPFKGFA 218
catH   IPYWIWVKNWGPQWGMNGYFLIER----GKNMCGLAACASYPIPLV- 220
      * * : * * * * * : * * : * . . . * * : . : * * : .

```

Figura 16. Alineamiento de quimopapaína (código PDB 1YAL) con catepsina H (código PDB 1NB5), obteniéndose 82 posiciones idénticas y 75 posiciones similares.

```

quimo  YPQSIDWRAKGAVTPVKNQGACGSCWAFSTIATVEGINKIVTGNLLELSEQELVDCDKHS 60
papa   IPEYVDWRQKGA VTPVKNQGSCGSCWAFSAVVTIEGIIKIRTGNLNQYSEQLLDCDRRS 60
      * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
quimo  YGCKGGYQTTSLQYVANNGVHTSKVYPYQAKQYKCRATDKPGPKVKITGYKRVPSNCETS 120
papa   YGCNGGYPWSALQLVAQYGIHYRNTYPYEGVQRYCRSREKGPYAAKTGVRQVQPNQGA 120
      * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * *
quimo  FLGALANQPLSVLVEAGGKPFQLYKSGVFDGPCGTKLDHAVTAVGYGTS DGKNYII IKNS 180
papa   LLYSIANQPVSVVLQAAGKDFQLYRGGIFVGPCKNKVDHAVA AVGYGP----NYILIKNS 176
      * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
quimo  WGPNWGEKGYMRLKRQSGNSQGT CGVYKSSYYPFKGFA 218
Papa   WGTGWGENGYIRIKRGTGNSYGVCGLYTSSFY PVKN-- 212
      * * . * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

```

Figura 17. Alineamiento de quimopapaína (código PDB 1YAL) con papaína (código PDB 9PAP), obteniéndose 123 posiciones idénticas y 51 posiciones similares.

```

cist   ---GAPVPVDENDEGLQRALQFAMA EYNRASNDKYSSRVVRVISAKRQLVSGIKYILQVE 57
estA   MIPGGLSEAKPATPEIQEI VDKVKPQLEEKTNETYGK--LEAVQYKTQVVAGTNYIYIKVR 58
      * . . . . : * . : : . : : : * : * . . . . . * * * * * : * : * .
cist   IGRITCPKSSGDLQSCFEFHDEPEMAKYTTCTFVVYSIPWLNQIKLLESKCQ 108
estA   AGDNKY-----MHLKVFKSLP--GQNE DLVLTGYQVDKNKDELDTGF--- 98
      * . . . . : : * . * . : . . * . : : : *

```

Figura 18. Alineamiento cistatina de pollo (código PDB 1A67) con estefina A (código PDB 1NB5), obteniéndose: 14 posiciones idénticas y 37 posiciones similares.

```

cist   ---GAPVPVDENDEGLQRALQFAMA EYNRASNDKYSSRVVRVISAKRQLVSGIKYILQVE 57
estB   MMSGAPSATQPATAETQHIADQVRSQLEEKYNKKFP--VFKAVSFKSQVVAGTNYFIKVH 58
      * * * . . : * : . . : : . * * . . * . : * * * * * : * : * .
cist   IGRITCPKSSGDLQSCFEFHDEP-EMAKYTTCTFVVYSIPWLNQIKLLESKCQ 108
estB   VGDEDFVHLR-VFQSLPHENKPLTLSNYQTNKAKHDELTYF----- 98
      : * : : * * . . . : * * . . . : :

```

Figura 19. Alineamiento cistatina de pollo (código PDB 1A67) con estefina B (código PDB 1STF), obteniéndose: 20 posiciones idénticas y 25 posiciones similares.

	Papaína	Catepsina H	Estefina B	Estefina A
Quimopapaína	56.42 %	36.123 %		
Cistatina			17.54 %	11.29 %

Tabla 4. Porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos.

Como se muestra en la Tabla 4, el porcentaje de identidad obtenido entre los pares de secuencias quimopapaína-papaína, quimopapaína-catepsina H, cistatina-estefina B y cistatina-estefina A, nos permite deducir que el complejo homólogo con mayor identidad en secuencia respecto a nuestro sistema de interés cistatina-quimopapaína, es el complejo reportado para estefina B-papaína; por lo que decidimos utilizar este último complejo como referencia para construir el modelo de cistatina-quimopapaína.

Stubbs y colaboradores^[22] analizaron la estructura del complejo estefina B-papaína y determinaron los aminoácidos de ambas proteínas que interactúan en la interface. Con esta información y utilizando los alineamientos de las Figs. 17 y 19, obtuvimos la siguiente lista de aminoácidos que posiblemente hacen contacto en el complejo formado por la quimopapaína (receptor) y la cistatina (ligando):

Receptor: Asn 18, Gln 19, Gly 20, Ala 21, Cys 22, Gly 23, Cys 63, Gly 64, Gly 66, Tyr 67, Gly 142.

Ligando: Gly 9, Ala 10, Pro 11, Gln 53, Leu 54, Val 55, Ser 56, Gly 57.

N _o de clasificación	N _o de pose	RMSD (Å)		N _o de clasificación	N _o de pose	RMSD (Å)
1	2800	>11		14	1831	>11
2	161	>10		15	4758	7.8
3	4780	3.4		16	791	>11
4	3191	>11		17	9677	7.6
5	1515	>10		18	3890	>11
6	4168	>10		19	1039	>12
7	8469	>12		20	2625	>10
8	5836	>10		21	8002	>10
9	5048	>10		22	3653	10
10	5082	>12		23	2288	>10
11	4770	10		24	6239	>11
12	3661	5.19		25	1408	>11
13	3424	>11				

Tabla 5. Comparación de los 25 primeros modelos con la estructura de referencia (1STF.pdb).

Usando el programa **pyDock** (<http://life.bsc.es/servlet/pydock/home>), se obtuvieron 100 modelos del complejo cistatina-quimopapaína; de los cuales se tomaron los 25 modelos con mejor puntaje. Cada uno de estos modelos se sobrepuso con el complejo estefina B- papaína y se calculó su RMSD; los valores obtenidos se muestran en la Tabla 5. Se resalta en color azul el modelo con menor RMSD, que fue el más indicado para nuestros estudios. Posteriormente se sometió a una minimización de energía y se realizó una simulación de dinámica molecular con agua explícita en un conjunto NPT a 1 bar y 300 K durante 100 ns. La estructura equilibrada en estas condiciones, que representa nuestro modelo final, se muestra en la Figura 20.



Figura 20. Modelo computacional del complejo formado entre la **cistatina de pollo** y la **quimopapaína**. Una lista de los aminoácidos que hacen contacto en la interface se presenta en el Apéndice III.

6. DISCUSIÓN

Después del proceso de aislamiento y purificación de la cistatina a partir de la clara de huevo de pollo y de la purificación de la CM—quimopapaína de un fuente comercial, se observó que ambas muestras son homogéneas al analizarlas por electroforesis en presencia de SDS (ver Figuras 9 y 11, respectivamente).

El espectro de emisión de una solución de quimopapaína en presencia de un exceso molar de cistatina (relación molar de 2.19), tiene una intensidad menor que la suma de los espectros de las proteínas aisladas. A 330 nm, la intensidad de fluorescencia de la mezcla es 23.5% menor que la suma de las fluorescencias individuales (Figura 12), lo que indica que la enzima y el inhibidor interactúan entre sí modificando el ambiente de algunos triptófanos (ver apéndice IV), que conducen a una disminución del rendimiento cuántico. El modelo estructural que se obtuvo para el complejo CM-quimopapaína—cistatina muestra que este apagamiento de fluorescencia podría deberse a la interacción directa de los triptófanos W181 y W185 de la quimopapaína con el único Trp de la cistatina (W104) en la interfase del complejo (Figura 21), tal como sugirieron que ocurre de forma análoga en el modelo estructural de papaína—cistatina propuesto por Bode y colaboradores ^[6].

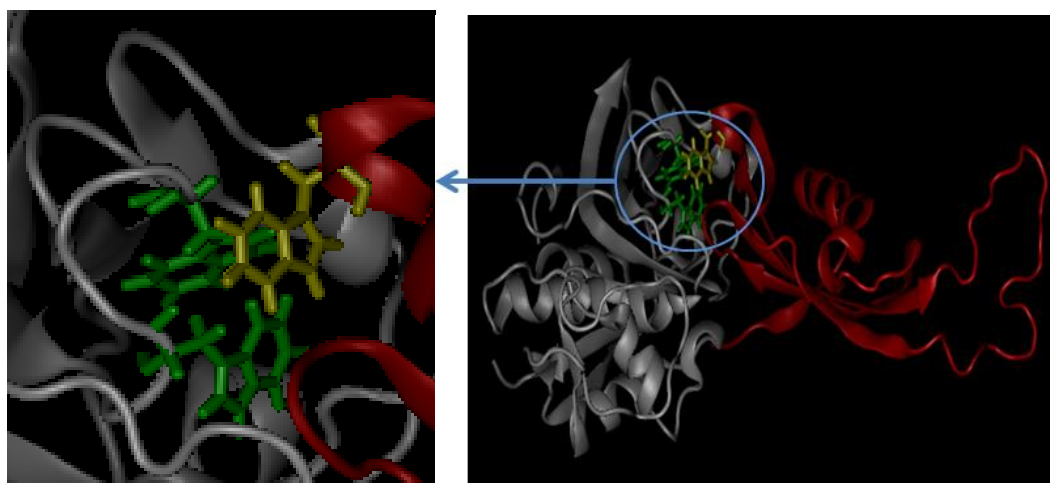


Figura 21. Estructura del complejo de **CM-quimopapaína—cistatina**, mostrando los triptófanos presentes en la interfase, **W181 y W185** de la quimopapaína y **W104** de la cistatina.

Como se mencionó anteriormente para determinar las constantes de unión (K_u) del complejo CM-quimopapaína–cistatina es necesario trabajar en un intervalo de concentraciones en el que la intensidad de fluorescencia intrínseca sea lineal respecto a la concentración de proteína, lo que se cumplió en nuestro caso (Figura 14).

Se realizaron titulaciones fluorométricas de la CM-quimopapaína con cistatina a pH 7.4, 25 °C y con diferentes concentraciones, de NaCl. Esto permitió determinar los valores de K_u , y se comprobó que la afinidad disminuye con la fuerza iónica, como se puede observar en la Figura 22. (Apéndice V)

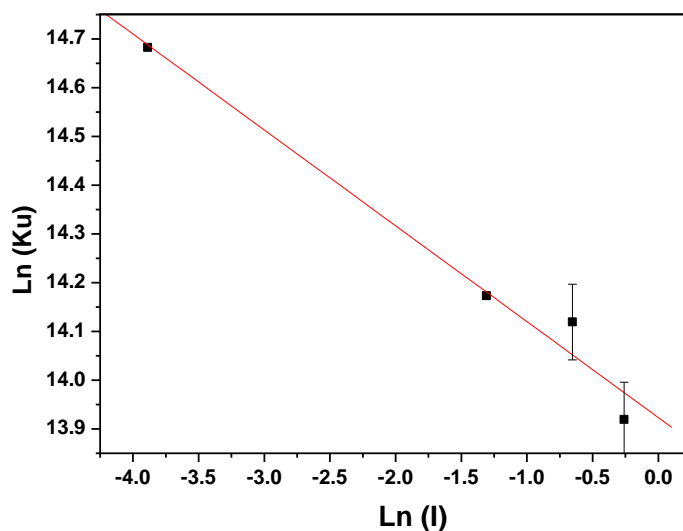


Figura 22. Variación de K_u en función de la fuerza iónica (I). Los valores de K_u se obtuvieron de las titulaciones fluorométricas, como las mostradas en las Figuras 14 y 15. El medio utilizado fue regulador Tris 50 mM, pH 7.4 a 25 °C.

En la Tabla 6 se observa que la energía libre de unión se hace menos favorable con la presencia de una fuerza iónica creciente. Sin embargo, el efecto de aumentar desde 0 hasta 0.75 M la concentración de NaCl produce apenas una desestabilización del 5.2% en la ΔG_u del complejo CM-quimopapaína—cistatina. Esto indica que las interacciones electrostáticas contribuyen mínimamente a la estabilidad del complejo enzima—inhibidor.

Fuerza iónica (I)	$K_u (10^6)$	ΔG_u (kJ/mol)	% ΔG_u
0.021	2.38	-36.4	100.0
0.271	1.43	-35.1	96.5
0.521	1.36	-35.0	96.2
0.771	1.11	-34.5	94.8

Tabla 6. Variación de ΔG_u con la fuerza iónica del medio, Todos los experimentos se realizaron a 25°C.

La energía libre de unión se obtuvo utilizando la siguiente ecuación

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u$$

Donde:

R = constante de los gases (8.314 J/mol K)

T = temperatura absoluta (298.15 °K)

K_u = constante de unión del complejo **EI** mostrado en la ecuación A1.1

7. CONCLUSIONES.

- La disminución en la emisión de fluorescencia que acompaña la unión de la cistatina de pollo a la CM-quimopapaína podría explicarse por la interacción de los triptófanos 181 y 185 de la proteasa con el triptófano 104 de la cistatina, de acuerdo con nuestro modelo molecular.
- La afinidad de la cistatina de pollo por la CM-quimopapaína disminuye al aumentar la fuerza iónica. Por lo tanto las interacciones electrostáticas contribuyen favorablemente a la formación del complejo enzima–inhibidor.
- A pH 7.4 dicha contribución es pequeña, un aumento de 0.0 a 0.75 M de NaCl sólo disminuye la energía libre de unión un 5.2 %.

8. PERSPECTIVAS.

- ❖ Realizar experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) para:
 - Medir directamente la entalpía de unión (ΔH_u) a diferentes fuerzas iónicas.
 - Determinar la capacidad calorífica de unión (ΔC_p).

- ❖ Realizar estudios de estabilidad térmica de la CM-quimopapaína y de la cistatina, haciendo barridos térmicos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) a diferentes fuerzas iónicas.

- ❖ Estudiar el efecto de la fuerza iónica en la estabilidad del complejo a diferentes valores de pH.

APENDICE I

Determinación fluorométrica de una constante de asociación proteína-ligando.^[23]

A continuación se presenta la deducción de la ecuación que relaciona los valores de intensidad de fluorescencia y concentración de ligando en una titulación de proteína, con su constante de unión.



El siguiente desarrollo es válido para sistemas donde la intensidad de fluorescencia tanto del ligando como de la proteína son importantes a la longitud de onda de emisión analizada, como podría ser el caso en complejos proteína-proteína. La notación se particulariza para un sistema Enzima (E) – Inhibidor (I).

La fluorescencia experimental observada está dada por:

$$F = F_E [E] + F_I [I] + F_{EI} [EI] \quad \text{Al.2}$$

Dónde: F_E , F_I y F_{EI} son las fluorescencias por unidad de concentración de la enzima, el inhibidor y el complejo, respectivamente.

Las concentraciones totales de enzima e inhibidor están dadas por:

$$[ET] = [E] + [EI] \quad \text{e} \quad [IT] = [I] + [EI] \quad \text{Al.3}$$

Entonces:

$$\begin{aligned} F &= F_E ([ET] - [EI]) + F_I ([IT] - [EI]) + F_{EI} [EI] \\ \text{o} \quad F &= F_E [ET] + F_I [IT] + (F_{EI} - F_E - F_I) [EI] \end{aligned} \quad \text{Al.4}$$

Sea la fluorescencia de la enzima y el inhibidor:

$$F_{TE} = F_E [ET] \quad y \quad F_{TI} = F_I [IT] \quad \text{Al.5}$$

Ahora:

$$F - F_{TE} - F_{TI} = (F_{EI} - F_E - F_I) [EI] \quad \text{Al.6}$$

$$\therefore [EI] = (F - F_{TE} - F_{TI}) / (F_{EI} - F_E - F_I) = (F_{TE} + F_{TI} - F) / (F_E + F_I - F_{EI}) \quad \text{Al.7}$$

Si a la expresión anterior la multiplicamos y dividimos por $1 / F_{TE}$ que es igual $1 / F_E [ET]$, obtenemos la siguiente expresión:

$$[EI] = [ET] \left\{ (F_{TE} + F_{TI} - F) / F_{TE} \right\} / (F_E + F_I - F_{EI}) / F_E \quad \text{Al.8}$$

Sean:

$$Y = (F_{TE} + F_{TI} - F) / F_{TE} \quad y \quad a = (F_E + F_I - F_{EI}) / F_E \quad \text{Al.9}$$

$$[EI] = \{ [ET] Y \} / a \quad \text{Al.10}$$

La constante de disociación del proceso es:

$$K_d = [E] [I] / [EI] \Rightarrow [I] = (K_d [EI]) / [E] = (K_d [EI]) / ([ET] - [EI]) \quad \text{Al.11}$$

Rearreglando

$$[I] = K_d / \{ [ET] / [EI] \} - 1 \quad \text{Al.12}$$

$$[ET]/[EI] = a/Y \Rightarrow [I] = K_d / \{ a/Y \} - 1 = K_d / \{ (a - Y)/Y \} \quad \text{Al.13}$$

$$\therefore [I] = (K_d Y) / (a - Y) \quad \text{Al.14}$$

Sean:

$$K_d = b \quad \text{y} \quad [ET] = c'$$

Sustituyendo en

$$[EI] = c' Y / a \quad \text{y} \quad [I] = bY / (a - Y) \quad \text{Al.15}$$

Sea: $x = [EI] + [I]$ la concentración total de inhibidor

Entonces:

$$x = \{c' Y / a\} + \{b Y / (a - Y)\} \quad \text{Al.16}$$

Realizando el algebra

$$x - \{c' Y / a\} = b Y / (a - Y)$$

$$(a x - c' Y) (a - Y) = a b Y$$

$$a^2 x - a c' Y - a x Y + c' Y^2 = a b Y$$

$$c' Y^2 - a Y (c' + x + b) + a^2 x = 0 \quad \text{Al.17}$$

Por lo tanto:

$$Y = a / 2c' \{ c' + x + b - [(c' + x + b)^2 - 4c'x]^{1/2} \} \quad \text{Al.18}$$

Dado que $c' = E_T$, tenemos que:

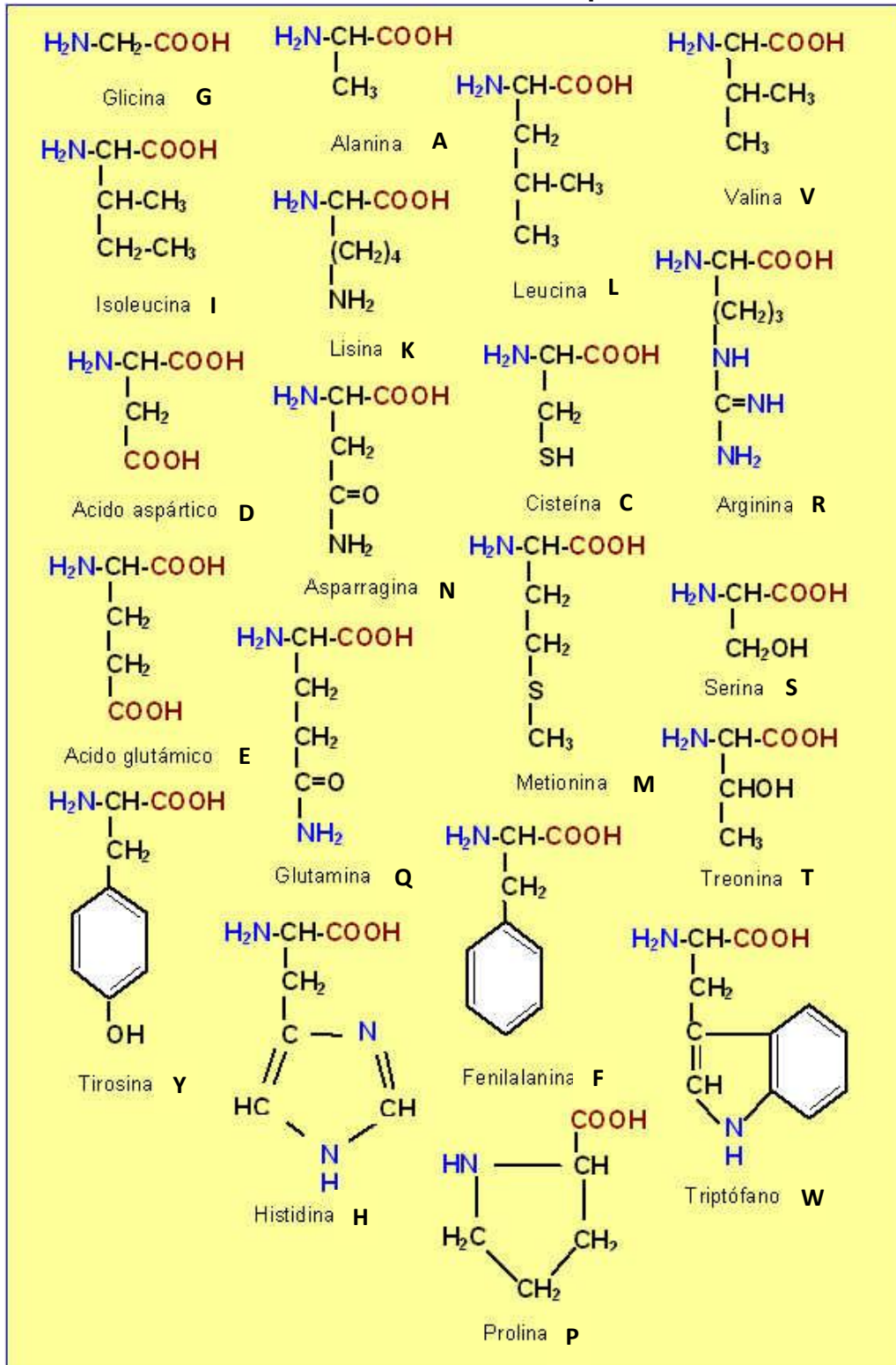
$$Y = (a/2E_T)[E_T + x + b - ((E_T + x + b)^2 - 4E_T x)^{1/2}] \quad \text{Al.19}$$

$$Y = (a/2E_T)[E_T + I_T(E_T / E_T) + b - ((E_T + I_T(E_T / E_T) + b)^2 - 4E_T I_T(E_T / E_T))^{1/2}]$$

$$Y = (a/2E_T) [E_T + E_T(I_T / E_T) + b - ((E_T + E_T(I_T / E_T) + b)^2 - 4E_T E_T(I_T / E_T))^{1/2}] \quad \text{Al.20}$$

APENDICE II

Aminoácidos formadores de proteínas



APENDICE III

Propiedades de la interface del complejo CM-quimopapaína-Cistatina

Resumen de propiedades	
Área de interface total (Å ²)	1591.3
% Residuos cargados	16.7
Número total de segmentos	10
Número de contactos no unidos	86
Número de enlaces de hidrogeno	2
Número de puentes de sal	1
Número total de enlaces disulfuro	0

CONTACTOS ATÓMICOS INTERFACIALES

<----- CM-quimopapaína ----->						<----- Cistatina ----->				
	Atom	Atom	Res	Res		Atom	Atom	Res	Res	
	no.	name	name	no.	Chain	no.	name	name	no.	Chain
1.	296	NE2	GLN	19	A <-->	4015	CG1	VAL	55	B
2.	294	CG	GLN	19	A <-->	4031	OG	SER	56	B
3.	306	N	GLY	20	A <-->	4031	OG	SER	56	B
4.	309	O	GLY	20	A <-->	4030	CB	SER	56	B
5.	309	O	GLY	20	A <-->	4031	OG	SER	56	B
6.	308	C	GLY	20	A <-->	4031	OG	SER	56	B
7.	316	O	ALA	21	A <-->	4071	NZ	LYS	59	B
8.	316	O	ALA	21	A <-->	4070	CE	LYS	59	B
9.	314	CA	ALA	21	A <-->	4704	CE1	TYR	100	B
10.	316	O	ALA	21	A <-->	4707	OH	TYR	100	B
11.	317	CB	ALA	21	A <-->	4707	OH	TYR	100	B
12.	326	O	CYS	22	A <-->	4015	CG1	VAL	55	B
13.	325	C	CYS	22	A <-->	4015	CG1	VAL	55	B
14.	334	CA	GLY	23	A <-->	4016	CG2	VAL	55	B
15.	334	CA	GLY	23	A <-->	4015	CG1	VAL	55	B
16.	333	N	GLY	23	A <-->	4015	CG1	VAL	55	B
17.	937	O	LYS	64	A <-->	3299	CA	ALA	10	B
18.	939	CG	LYS	64	A <-->	3314	CD	PRO	11	B
19.	939	CG	LYS	64	A <-->	3313	CG	PRO	11	B
20.	937	O	LYS	64	A <-->	3314	CD	PRO	11	B
21.	937	O	LYS	64	A <-->	3982	OE1	GLN	53	B
22.	937	O	LYS	64	A <-->	3981	NE2	GLN	53	B
23.	937	O	LYS	64	A <-->	3980	CD	GLN	53	B
24.	936	C	LYS	64	A <-->	3981	NE2	GLN	53	B
25.	958	C	GLY	65	A <-->	3292	O	GLY	9	B
26.	957	CA	GLY	65	A <-->	3292	O	GLY	9	B
27.	966	O	GLY	66	A <-->	3292	O	GLY	9	B
28.	966	O	GLY	66	A <-->	3289	N	GLY	9	B

29.	965	C	GLY	66	A	<-->	3289	N	GLY	9	B
30.	964	CA	GLY	66	A	<-->	3292	O	GLY	9	B
31.	963	N	GLY	66	A	<-->	3292	O	GLY	9	B
32.	976	CD1	TYR	67	A	<-->	3289	N	GLY	9	B
33.	978	CE1	TYR	67	A	<-->	3289	N	GLY	9	B
34.	2057	CB	ALA	136	A	<-->	3997	CD1	LEU	54	B
35.	2056	O	ALA	136	A	<-->	3997	CD1	LEU	54	B
36.	2055	C	ALA	136	A	<-->	3997	CD1	LEU	54	B
37.	2064	CA	GLY	137	A	<-->	3998	CD2	LEU	54	B
38.	2064	CA	GLY	137	A	<-->	3997	CD1	LEU	54	B
39.	2063	N	GLY	137	A	<-->	3997	CD1	LEU	54	B
40.	2085	NZ	LYS	139	A	<-->	3429	OE2	GLU	19	B
41.	2085	NZ	LYS	139	A	<-->	3428	OE1	GLU	19	B
42.	2085	NZ	LYS	139	A	<-->	3427	CD	GLU	19	B
43.	2084	CE	LYS	139	A	<-->	3429	OE2	GLU	19	B
44.	2141	OE1	GLN	142	A	<-->	4038	CA	GLY	57	B
45.	2141	OE1	GLN	142	A	<-->	4040	O	GLY	57	B
46.	2141	OE1	GLN	142	A	<-->	4039	C	GLY	57	B
47.	2140	NE2	GLN	142	A	<-->	4040	O	GLY	57	B
48.	2140	NE2	GLN	142	A	<-->	4039	C	GLY	57	B
49.	2139	CD	GLN	142	A	<-->	4040	O	GLY	57	B
50.	2140	NE2	GLN	142	A	<-->	4049	CG1	ILE	58	B
51.	2141	OE1	GLN	142	A	<-->	4753	CD	PRO	103	B
52.	2141	OE1	GLN	142	A	<-->	4752	CG	PRO	103	B
53.	2137	CB	GLN	142	A	<-->	4751	CB	PRO	103	B
54.	2136	O	GLN	142	A	<-->	4749	C	PRO	103	B
55.	2136	O	GLN	142	A	<-->	4751	CB	PRO	103	B
56.	2136	O	GLN	142	A	<-->	4762	CA	TRP	104	B
57.	2136	O	GLN	142	A	<-->	4767	CD1	TRP	104	B
58.	2136	O	GLN	142	A	<-->	4766	CG	TRP	104	B
59.	2136	O	GLN	142	A	<-->	4765	CB	TRP	104	B
60.	2136	O	GLN	142	A	<-->	4761	N	TRP	104	B
61.	2157	CD2	LEU	143	A	<-->	4749	C	PRO	103	B
62.	2157	CD2	LEU	143	A	<-->	4750	O	PRO	103	B
63.	2157	CD2	LEU	143	A	<-->	4751	CB	PRO	103	B
64.	2198	NZ	LYS	145	A	<-->	4764	O	TRP	104	B
65.	2197	CE	LYS	145	A	<-->	4764	O	TRP	104	B
66.	2712	CD1	TRP	181	A	<-->	4027	CA	SER	56	B
67.	2711	CG	TRP	181	A	<-->	4027	CA	SER	56	B
68.	2716	NE1	TRP	181	A	<-->	4026	N	SER	56	B
69.	2715	CE3	TRP	181	A	<-->	4037	N	GLY	57	B
70.	2713	CD2	TRP	181	A	<-->	4037	N	GLY	57	B
71.	2718	CZ3	TRP	181	A	<-->	4771	NE1	TRP	104	B
72.	2715	CE3	TRP	181	A	<-->	4772	CZ2	TRP	104	B
73.	2715	CE3	TRP	181	A	<-->	4771	NE1	TRP	104	B
74.	2715	CE3	TRP	181	A	<-->	4769	CE2	TRP	104	B
75.	2709	O	TRP	181	A	<-->	4774	CH2	TRP	104	B
76.	2710	CB	TRP	181	A	<-->	4774	CH2	TRP	104	B
77.	2710	CB	TRP	181	A	<-->	4772	CZ2	TRP	104	B
78.	2753	C	ASN	184	A	<-->	4773	CZ3	TRP	104	B
79.	2753	C	ASN	184	A	<-->	4770	CE3	TRP	104	B
80.	2754	O	ASN	184	A	<-->	4773	CZ3	TRP	104	B

81.	2754	O	ASN	184	A	<-->	4770	CE3	TRP	104	B
82.	2771	CD1	TRP	185	A	<-->	4767	CD1	TRP	104	B
83.	2771	CD1	TRP	185	A	<-->	4766	CG	TRP	104	B
84.	2769	CB	TRP	185	A	<-->	4770	CE3	TRP	104	B
85.	2765	N	TRP	185	A	<-->	4770	CE3	TRP	104	B
86.	2769	CB	TRP	185	A	<-->	4768	CD2	TRP	104	B

APENDICE IV

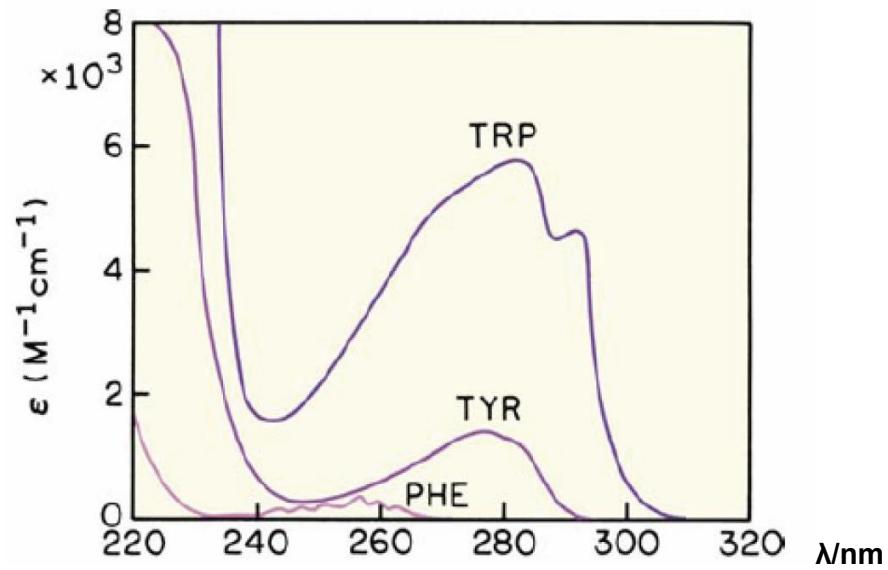


Figura AIII.1. Espectros de absorción UV de los aminoácidos triptofano (TRP), tirosina (TYR) y fenilalanina (PHE).

IF

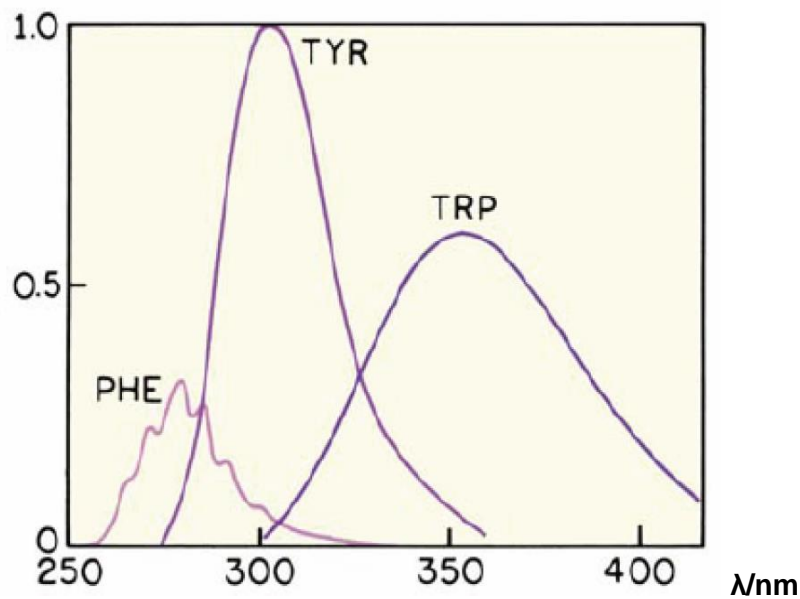


Figura AIII.2. Espectros de emisión de los aminoácidos triptofano (TRP), tirosina (TYR) y fenilalanina (PHE). Las longitudes de onda de excitación son 295 nm, 275 nm y 260 nm respectivamente.

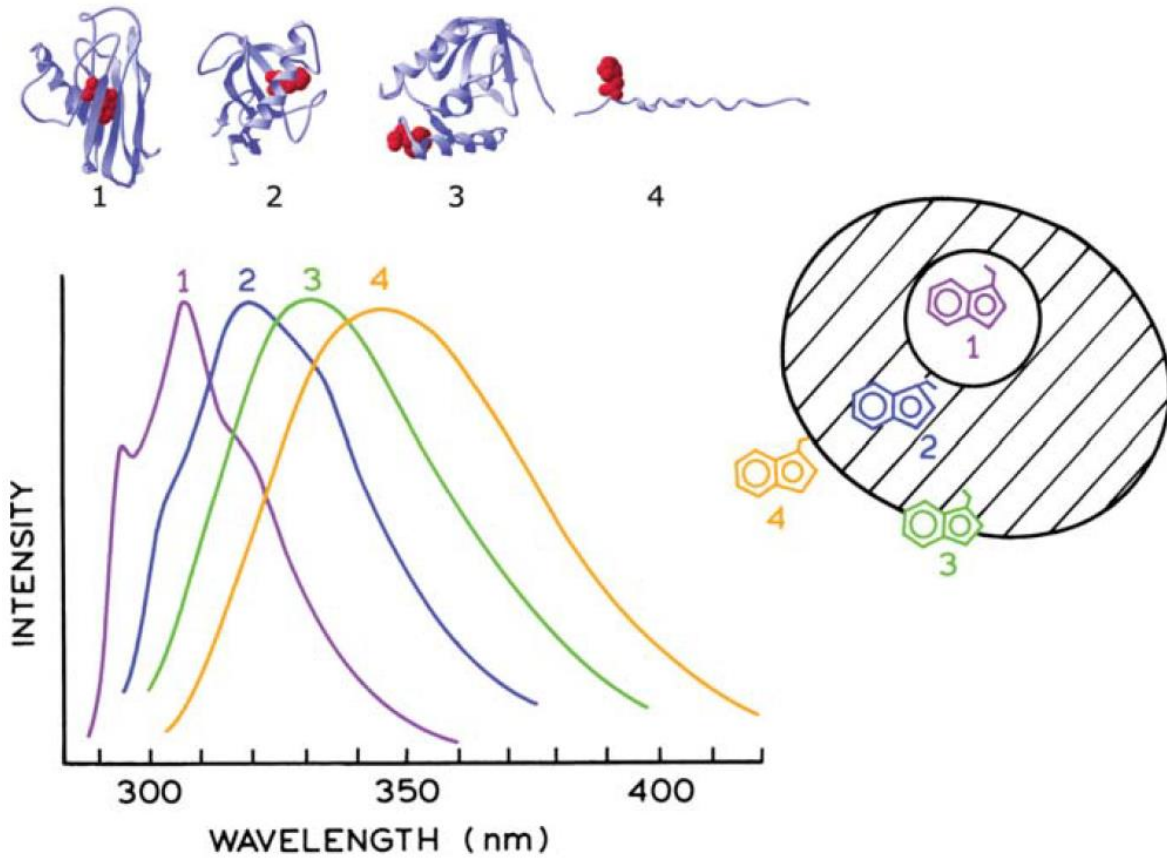


Figura AIII.3 Efecto del ambiente del triptofano sobre su espectro de emisión. Dependiendo del grado de exposición al solvente, el máximo de emisión se mueve a longitudes de onda mayores. En 1 se encuentra un ambiente totalmente hidrofóbico y en 4 está completamente expuesto al solvente.

APENDICE V

La fuerza iónica (I) se obtuvo utilizando la siguiente ecuación

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i Z_i^2$$

Donde:

I = Fuerza iónica

C_i = concentración molar de cada uno de los iones

Z_i = carga del ion

n= número de especies iónicas presentes en el medio

La solución reguladora de pH 7.4 contiene las siguientes cantidades de iones:

[Tris base] = 8.97mM

[Tris ácido] = 41.02mM

$[Cl^-] = 3.97 \times 10^{-8} \text{ M}$

$[H^+] = 3.98 \times 10^{-8} \text{ M}$

De tal manera que la fuerza iónica total en la solución puede verse como

$I_{\text{total}} = I_{\text{regulador}} + I_{\text{NaCl}}$

[NaCl] (M)	I_{NaCl} (M)	I_{Total} (M)
0.0	0	0.021
0.75	0.75	0.77

Tabla... Fuerza iónica de cada una de las soluciones usadas durante los estudios de afinidad. La única variable es la fuerza iónica debida a las especies Na^+ y Cl^- . La fuerza iónica debido a las especies del regulador es constante y tiene un valor de 0.021

9. REFERENCIAS.

1. Oliveira, Adelianna S. *et al.* (2003). Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46: 91-104.
2. Suarez Rendueles P. y Wolf D.H. (1988). Proteinase function in yeast: Biochemical and genetic approaches to a central mechanism of posttranslational control in the eukaryotic cell. *FEMS. Microbiol. Lett.* 54:17-46.
3. <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/18430/Antecedentes.pdf>
4. Grzonka, Z., Jankowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Lankiewicz, L., Wiczak, W., Wieczerzak, E., Ciarkowski, J., Drabik, P., Janowski, R., Kozak, M., Jaskólski, M., and Grubb, A., (2001). Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica*; 48: 1-20.
5. Otto, Hans-Hartwing and Schirmeister, Tanja. (1997). Cystatin, proteases and their inhibitors. *Chemical Reviews* 97: 133-172.
6. Yamamoto, D, Tsuboi, S. Okamoto, H. y Okada, Y. (1992) *Biochemistry* 31, 11305-11309.
7. Rawlings, N.D., Barret, A.J. y Bateman, A. (2012). MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 40: D343-D350.
8. Maes, D., Bouckaert, J., Poortmans, F., Wyns, L. y Looze, Y. (1996). Structure of chymopapain at 1.7 Å resolution. *Biochemistry* 35: 16292-16298.
9. Barret A.J, Kambhavi A.A, Broen M, Hekirschke H (1982). L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* 201, 189-198.
10. Lindahl, P., Alriksson, E., Jornvall, H. y Björk, I. (1988). Interaction of the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin with papain. *Biochemistry* 27: 5074-5082.
11. Rita Colella Sg, Yoshiaki Sakaguchi, Hideaki Nagase, and John W. C. Bird (1989). Chicken Egg White Cystatin. *J. Biol. Chem.* 264(29): 17164-17169.
12. Bode, W. (1988). The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J.* 7: 2593-2599.

13. Dieckmann, T. (1993). The structures of native phosphorylated chicken cystatin and of a recombinant unphosphorylated variant in solution. *J. Mol. Biol.* 234: 1048-1059.
14. Solís-Mendiola, S., Arroyo-Reyna, A. y Hernández-Arana, A. (1992). Circular dichroism of cysteine proteinases from papaya latex. Evidence of differences in the folding of their polypeptide chains. *Biochim. Biophys. Acta* 1118: 288-292.
15. Robinson, G.W. (1975). Isolation and characterization of papaya peptidase A from commercial chymopapain. *Biochemistry* 17: 3695-3700.
16. UniProt <http://www.uniprot.org>, ExpASY: SIB Bioinformatics Resource Portal - Home www.expasy.org
17. Lindahl, P., Alriksson, E., Jornvall, H. y Björk, I. (1988). Interaction of the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin with papain. *Biochemistry* 27: 5074-5082.
18. Anastasi et al. (1983). Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. *Biochem. J.* 211: 129-138.
19. Björk, I. y Ylinenjärvi, K. (1990). Interaction between chicken cystatin and the cysteine proteinases actinidin, chymopapain A, and ficin. *Biochemistry* 29: 1770-1776.
20. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
21. Neria-Ríos, M., Padilla-Zúñiga, J., García-Hernández, E., Tello-Solís, S.R. y Zubillaga, R.A. (2003). Binding energetics of the inhibitor cystatin to the cysteine proteinase actinidin. *Protein and Peptide Letters* 10(2): 139-145.
22. Stubbs, M.T., Laber, B., Bode, W., Huber, e., Jerala, R., Lenarcic. B. and Turk, V. (1990). The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO J.* 9: 1939-1947.
23. Neria-Ríos, M. (1999). Caracterización termodinámica de la asociación actinidina-cistatina. Tesis de maestría