



UNIVERSIDAD DE SONORA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Caracterización Bioquímica y Estructural de una Enzima Tipo Lipasa de Camarón Blanco
(*Litopenaeus vannamei*)

M.C. Karina Dalila García Orozco

Doctorado en Ciencias

Tesis requisito parcial para la Obtención del Grado

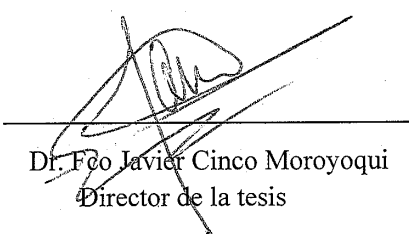
Hermosillo, Sonora

Diciembre 2019

APROBACIÓN

Caracterización Bioquímica y Estructural de una Enzima Tipo Lipasa de Camarón Blanco
(*Litopenaeus vannamei*)

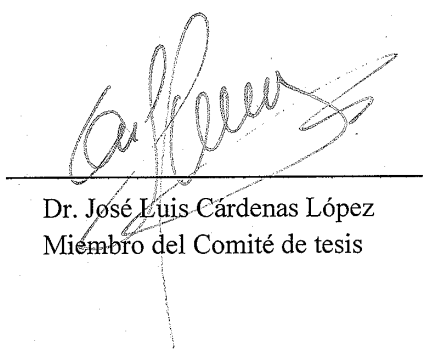
M.C. Karina Dalila Garcia Orozco



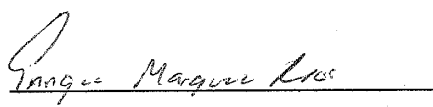
Dr. Fco Javier Cinco Moroyoqui
Director de la tesis



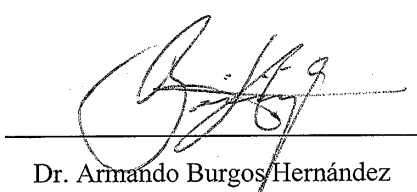
Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo
Co-Director de la tesis



Dr. José Luis Cárdenas López
Miembro del Comité de tesis



Dr. Enrique Márquez Ríos
Miembro del Comité de tesis



Dr. Armando Burgos Hernández
Miembro del Comité de tesis

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2019

Hermosillo, Sonora a Noviembre de 2019.

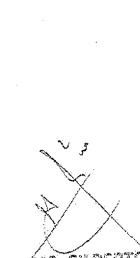
Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada Caracterización Bioquímica y Estructural de una Enzima Tipo Lipasa de Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*) en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Doctorado en Ciencias, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.


LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

ATENTAMENTE


Karina Dalila García Orozco
Nombre y Firma del Autor

AGRADECIMIENTOS

Esto será largo:

Hay tanto y a tantos a quién agradecer que no sabia por dónde empezar he visto que generalmente se inicia por las instituciones, sin embargo a mi me gustaría empezar por las personas, pero es muy difícil porque son muuuuuuuuuuchas así que:

Quiero agradecer infinitamente a todas las personas involucradas en este trabajo, si tu estas leyendo esto y sientes que de alguna manera fuiste parte, ten por seguro que agradezco inmensamente tu ayuda, aportación o cualquier cosa que te hayas involucrado.

Mi agradecimiento al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD A.C.) por permitirme hacer lo que amo, pagarme un sueldo!! y apoyarme para cumplir esta meta.

Mi más profundo agradecimiento a la Universidad de Sonora MI *alma máter* que me ha nutrido de conocimientos desde la licenciatura y hasta ahora para obtener el Grado de Doctor. Soy parte de tu esencia misma y un aguilucho en tu honor!!!

Al Departamento de Investigación en Posgrado en Alimentos, por aceptarme en su Programa y considerarme digna de obtener el Grado de Doctor. Especialmente al Dr. Enrique Márquez y Maria del Socorro Favela-Coty, muchas gracias por todo.

A mí Director de tesis Dr. Francisco Cinco Moroyoqui por aceptarme como alumna, subirse a este barco conmigo, apoyarme en todo el desarrollo del Posgrado, por la paciencia, confianza y fe que me ha tenido espero no haberle defraudado Mil Gracias!!!

A mi Co-Director, Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo, Gracias por apoyarme siempre e impulsarme a seguir adelante, siempre lo he dicho que he sido afortunada y que gran parte de mis logros han sido por la gente con la que me ha tocado trabajar, sin tu apoyo no hubiera llegado hasta aquí ni obtenido las satisfacciones y distinciones profesionales que he tenido, por siempre Gracias!!!.

A los integrantes de mi comité de tesis Dr. José Luis Cárdenas López, Dr. Enrique Márquez Ríos y Dr. Armando Burgos Hernández, por su apoyo académico, paciencia y disponibilidad.

Quiero agradecer al Laboratorio de Estructura Biomolecular por todo su apoyo con reactivos, infraestructura, equipos, libros, etc.; pero sobre todo agradezco a todos los integrantes y estudiantes que lo han conformado desde siempre, pero sobre todo a los de Septiembre de 2014 a la fecha muchas gracias por el apoyo, paciencia y sobre todo su tolerancia a las ausencias.

Quiero agradecer especialmente y dar los créditos a quienes fueron parte de este proyecto: M.C. Lucia Ángulo Sánchez, M.C. Cristóbal Joel González Pérez, Biol. Carolina Gómez Aguilar "Tiburón", Técnico, estudiante de Maestría y estudiante de Licenciatura, respectivamente.

Un agradecimiento a la Dra. Ana Maria Calderón de la Barca y a QBC Rene Valenzuela por el apoyo en la parte de producción de los anticuepos e inmunoensayos.

Al Dr. David Corona, así como a la Dra. Karen Ochoa del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora por el apoyo en la parte de los ensayos enzimáticos.

Al proyecto Ciencia Básica CB-2014-01-237963 "Estructura de proteínas objetivo (diana) para la búsqueda de antibacterianos contra *Vibrio parahaemolyticus* patógeno a invertebrados".

A mis amigos y compañeros de generación: Ricardo "Clausius-Clapeyron", Daniel, Odilia, Alfonso, Machuy we did it!!!; y muy especialmente a Andrea, Carolina, Ricardo, Uriel y Ana Gaby "- yo nomas venia a hacer el doctorado".

A todos mis amigos, amigas, compadres, comadres con los que he tenido la fortuna de coincidir y que son la familia elegida muchas Gracias por su apoyo, cariño, porras y momentos compartidos. Especialmente a: La Tia Guille amiga sabes que sin ti no soy nada muchas gracias por ser como MI hermana, Ely, Lupita, Pame, Libertad, Tere, Compadre Alonso, Comadre Gaby, Silvia, Geo, Adriana Muhlia, Ma Elena, Paulina y Adrian, Fernando, Enrique de la Re y Mariana, MELLS, Pepe.

Quiero agradecer a la Familia Ocaño Higuera muy especialmente a Doña Chava (t) y Don Hector (t) (Papá y Mamá) por el tiempo que me acogieron en su familia, y a Victor por todo el apoyo, por amar y cuidar por sobre todas las cosas a nuestra hija, muchas gracias!!!!

Finalmente pero no menos importante sino al contrario quiero agradecer desde lo más profundo de mi alma a:

Toda MI Familia García Orozco A MIS amados Padres, Hermanos y Sobrinos los amo profundamente, son parte de mi y los llevo siempre conmigo en mi mente y corazón son mi esencia.

Y QUIERO AGRADECER POR SOBRE TODAS LAS COSAS A MI HIJA MI AMADA ANA VICTORIA MI "SOL", MOTOR Y VIDA, POR TODO EL APOYO PACIENCIA QUE A SU CORTA EDAD ME HA TENIDO, POR LAS AUSENCIAS Y TODO EL AMOR QUE ME DEMUESTRA HIJA TE AMO, ESTO ES UN LOGRO DE LAS DOS Y ES PARA TI!!!!

GRACIAS Dios por todo!!!

DEDICATORIA

A mis motores:

Mi hija Ana Victoria, a "La muchacha" y Toda MI Familia.

RESUMEN

La camaronicultura alcanza cada día mayores niveles de importancia, destacándose como una actividad de gran crecimiento y expansión a nivel mundial. La disminución en la producción de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), se ha asociado a la presencia de enfermedades de origen bacteriana y/o viral. Por lo que, es prioritario resolver los problemas que afectan e influyen de manera negativa a esta industria. Los estudios de estructura-función de proteínas que participan en las rutas metabólicas de los organismos permiten entender los procesos de crecimiento y desarrollo, así como desarrollar nuevas técnicas de mejoramiento, tratamiento y sobre todo de prevención de enfermedades. Un genoma o un transcriptoma codifica muchas proteínas funcionales que pueden validarse bioquímicamente mediante identificación proteómica o caracterización bioquímica de la proteína recombinante. Por otro lado, no siempre es posible predecir la función de una proteína a partir de su identidad de secuencia. Sin embargo, esto y el uso de modelos teóricos identificando sitios de unión a ligando y/o sitios catalíticos pueden proporcionar información sobre su función bioquímica. El análisis bioinformático nos llevó a identificar una nueva hidrolasa α/β . La secuencia LvFSH se encontró en el transcriptoma de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). La función del producto génico se estudió utilizando la expresión recombinante y caracterización bioquímica y estructural. La enzima mostró actividad esterasa con alta afinidad (bajo K_m) por un sustrato lipídico de cadena larga (pNPL). La secuencia de aminoácidos sugiere que LvFSH es una proteína intracelular y se basa en similitudes moleculares y estructurales (27 % de identidad) con la proteína YHR049W/FSH1, esta lipasa podría ser parte de la familia serina hidrolasa (FSH) de eucariotes. Proponemos que la función de LvFSH está más relacionada con la transducción de señales que con la función digestiva, ya que la secuencia de aminoácidos no contiene un péptido señal que permita la secreción al hepatopáncreas o al intestino. El volumen del sitio activo parece contener lípidos con cadenas de hasta doce carbonos, y el camarón metaboliza preferiblemente grasas con cadenas de 14 carbonos y más. Además, las múltiples interacciones proteína-proteína predichas por los métodos bioinformáticos serían más relevantes en el espacio intracelular con un rango más amplio de interacciones. LvFSH es similar al oncogén OVCA2, una proteína presente en los procesos de proliferación tumoral,

biológicamente en crustáceos se sugiere una función de movilización de lípidos para la producción de energía y participar en las interacciones proteína-proteína. Se requiere más investigación para dilucidar la función en invertebrados marinos.

ABSTRACT

Shrimp farming is more important every day, standing out as an activity of significant growth and expansion worldwide. The decrease in the production of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), has been associated with the presence of diseases of bacterial and viral origin. Therefore, it is a priority to solve the problems that affect and negatively influence this industry. The structure-function studies of proteins that participate in the metabolic pathways of organisms help to understand the processes of growth and development, as well as develop new techniques for improvement, treatment, and, above all, disease prevention. A genome or transcriptome encodes many functional proteins that can be biochemically validated by proteomic identification or biochemical characterization of the recombinant protein.

On the other hand, it is not always possible to predict the function of a protein from its sequence identity. However, this and the use of theoretical models identifying ligand binding sites and catalytic sites can provide information on their biochemical function. The bioinformatic analysis led us to identify a new α/β hydrolase. The LvFSH sequence was found in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) transcriptome. The function of the gene product was studied using recombinant expression and biochemical and structural characterization. The enzyme showed esterase activity with high affinity (low K_m) for a long chain lipid substrate (pNPL). The amino acid sequence suggests that LvFSH is an intracellular protein and is based on molecular and structural similarities (27 % identity) with the YHR049W/FSH1 protein, this lipase could be part of the eukaryotic serine hydrolase (FSH) family. We propose that the function of LvFSH is more related to signal transduction than to digestive function since the amino acid sequence does not contain a signal peptide that allows secretion to the hepatopancreas or intestine. The volume of the active site appears to contain lipids with chains of up to 12 carbons, and the shrimp preferably metabolizes fats with chains of 14 carbons and more. Besides, the multiple protein-protein interactions predicted by bioinformatic methods would be more relevant in the intracellular space with a broader range of interactions. LvFSH is similar to the OVCA2 oncogene, a protein present in tumor proliferation processes, biologically in crustaceans, a function of lipid mobilization for energy production and participation in protein-protein interactions is suggested. More research is required to elucidate the role of LvFSH in marine invertebrates.

CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN	ii
DERECHOS DE AUTOR	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	vi
RESUMEN	vii
CONTENIDO	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABLAS	Xviii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
Importancia Económica del Camarón Blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	3
Estudio de Proteínas.....	6
Estructura de Proteínas.....	7
Estructura Primaria.....	9
Estructura Secundaria.....	13
Estructura Terciaria.....	18
Estructura Cuaternaria.....	19
Enzimas.....	20
Enzimas α/β hidrolasas.....	21
Esterasas.....	26
Lipasas.....	28
Importancia Biológica de las Lipasas en Invertebrados.....	34
Importancia de las Lipasas Como Moléculas Blanco en el Control de Crecimiento Bacteriano.....	36
HIPÓTESIS	42
OBJETIVOS	43
General.....	43
Particulares.....	43
DIAGRAMA DE FLUJO	44
MATERIALES Y MÉTODOS	45
Análisis Bioinformático de la Secuencia.....	45
Alineamientos.....	45
Búsqueda de Dominios.....	45
Interacciones Proteína - Proteína.....	45
Péptido Señal y Modificaciones Post-Traduccionales.....	46
Localización Subcelular.....	46
Modelación de la Estructura Tridimensional.....	46
Sobreexpresión Recombinante y Purificación de la Proteína LvFSH.....	47
Diseño de Gen Sintético.....	47
Transformación de Bacterias <i>E. coli</i> . BL21-SI.....	47

	Página
Cinética de Sobreexpresión de la Proteína LvFSH Recombinante.....	48
Sobreexpresión de la Proteína LvFSH Recombinante.....	48
Purificación de la Proteína Recombinante.....	49
Caracterización Bioquímica de la Proteína LvFSH Recombinante.....	50
Análisis de la Estructura Secundaria por Dicroísmo Circular.....	50
Determinación del Peso Molecular y de la Estructura Cuaternaria.....	50
Actividad Enzimática.....	50
Determinación de Constantes Cinéticas.....	51
Determinación de la Estructura Tridimensional de la Proteína LvFSH.....	51
Obtención de Cristales.....	51
Colecta de datos de Difracción de Rayos X.....	52
Procesamiento y Análisis de los Datos de Difracción de Rayos X.....	54
Detección de la Proteína LvFSH en Tejidos de Camarón.....	54
Producción de Anticuerpos Policlonales contra la Proteína LvFSH en Conejo.....	54
Purificación de los Anticuerpos (IgG) Anti-LvFSH.....	55
Titulación de los anti-LvFSH Mediante Inmunoensayo de Manchas (Dot Blot).....	55
Inmunodetección de Proteína LvFSH en Tejidos de Camarón Blanco.....	57
Obtención De Extractos Proteicos De Tejidos De Camarón.....	57
Inmunodetección Mediante Western Blot.....	60
Ensayo Por Inmunoabsorción Ligado A Enzimas (ELISA).....	61
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
Análisis Bioinformático de la Secuencia de LvFSH Obtenida de Transcritoma de Camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	65
Alineamientos.....	65
Comparación de Dominios Conocidos.....	66
Interacciones Proteína- Proteína.....	72
Péptido Señal y Modificaciones Post-Traduccionales.....	72
Localización Subcelular.....	73
Modelación de la Estructura Tridimensional.....	73
Sobreexpresión Recombinante y Purificación de la Proteína LvFSH.....	79
Diseño del Gen sintético para la Sobreexpresión de la Proteína en <i>E. coli</i> ...	79
Transformación de Bacterias <i>E. coli</i> . BL21-SI.....	79
Cinética de Sobreexpresión de la Proteína LvFSH Recombinante.....	79
Sobreexpresión de la Proteína LvFSH Recombinante.....	82
Purificación de la Proteína Recombinante.....	82
Caracterización Bioquímica de la Proteína LvFSH Recombinante.....	84
Análisis de la Estructura Secundaria por Dicroísmo Circular.....	84
Determinación del Peso Molecular y de la Estructura Cuaternaria.....	84
Actividad Enzimática Específica de la Proteína LvFSH Recombinante.	86
Determinación de Constantes Cinéticas.....	86
Determinación de la Estructura Tridimensional de la Proteína LvFSH.....	89

	Página
Obtención de Cristales de Proteína LvFSH por el Método de Microbatch...	89
Colecta de datos de Difracción de Rayos X.....	89
Procesamiento y Análisis de los Datos de Difracción de Rayos X de los Cristales de Proteína LvFSH.....	91
Detección de la Proteína LvFSH en Tejidos de Camarón.....	97
Immunización y Purificación de Anticuerpos Policlonales anti-LvFSH.....	97
Titulación de los anti-LvFSH Mediante Inmunoensayo de Manchas (Dot Blot)	98
Inmunodetección de la Proteína LvFSH en Tejidos de Camarón	100
Blanco.....	
Extractos Proteicos de Tejidos de Camarón.....	100
Inmunodetección de la Proteína LvFSH Mediante Western Blot.....	103
Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)	106
CONCLUSIONES.....	112
REFERENCIAS.....	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Fórmula general de los α -aminoácidos (//nutricionanimal.mx/glosario-nutricion-animal/aminoacido ; www.significados.com/aminoacidos/ ; www.asturnatura.com/articulos/proteinas/aminoacidos-estereoisomeria.php).....	8
2	Niveles de organización estructural de las proteínas (Cajamarca, 2017).....	11
3	Enlace peptídico (https://medium.com/@Rogerloaeza/amino%C3%A1cidos-44766664f9f8).....	12
4	Estructura en α -hélice presente en las proteínas. (Lehninger, 2013)...	14
5	Estructura secundaria β -plegada o láminas β . (Lehninger, 2013).....	15
6	Isometría y ángulos del enlace peptídico y mapa de Ramachandran, con las regiones correspondientes a los tipos de estructura secundaria α hélices y láminas β . (Lehninger, 2013; www.asturnatura.com/articulos/proteinas/isomeria-enlace-peptidico.php ; Cajamarca, 2017).....	17
7	Diagrama general del plegamiento α/β -hidrolasa característico presente en algunas proteínas. Hojas β , flechas verdes; hélices α , cilindros en azul; líneas discontinuas, posibles inserciones; círculos rojos, residuos catalíticos (nucleófilo, ubicado después de la hoja β 5; aspartato o glutamato situado a continuación de la hoja β 7 y la histidina altamente conservada ubicado al final de la última hoja β) (Mercado, 2014).....	24
8	Esquemmatización de el mecanismo de reacción de la hidrólisis de un éster de ácido butírico catalizado por una serina hidrolasa (Holmquist, 2000).....	27

		Página
FIGURA		
9	Esquema de reacción catalizada por lipasas. Lipasa hidroliza un triglicérido de cadena larga (> 10 carbonos), liberando en una reacción completa un glicerol y tres ácidos grasos libres (González-Pérez, 2016).....	30
10	Mecanismo de hidrólisis de ésteres llevado a cabo por lipasas (Jaeger et al., 1994).....	33
11	Similitud de ciclipostina con monoacilglicerol. A) Monoacilglicerol. B) Ciclipostina. El resto de los miembros de esta familia difieren en sustituyentes en la cadena carbonada pero conservan su similitud con monoacilglicerol. Adaptado de Seibert et al. (2008).....	39
12	Esquema de cristalización de proteínas por el método de Microbatch (https://sine2020.eu/about/the-road-to-the-ess/phase-diagram.html)...	53
13	Diagrama de flujo de procesamiento y análisis de datos de difracción de rayos X (Garcia Lopez, 2017).....	55
14	Esquema de inmunoensayo “Dot Blot”. TBS (blanco), C (Proteína LvFSH purificada) y diluciones seriadas de la misma.....	58
15	Anatomía interna y externa de camarón. Las estructuras marcadas con asterisco fueron los tejidos diseccionados para la obtención de extractos proteicos (músculo, pleópodos, branquias, intestino, intestino posterior, estómago y hepatopáncreas) y pruebas de inmunodetección. Modificado de FAO (2001).....	59
16	Esquema de placa madre y construcción de la curva estándar para la detección de LvFSH mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Dilución seriada de proteína (1-11, 12 sin LvFSH) de forma horizontal y dilución seriada de primer anticuerpo (anti-LvFSH) de forma vertical en la placa (A-G, H sin primer anticuerpo).	62
17	Alineamiento de la secuencia LvFSH y otros miembros de la familia FSH α/β hidrolasas. XP_027218885.1 esterasa OVCA2-like [<i>Penaeus vannamei</i>], AAB68901.1 Yhr049wp [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>], CAA20877.1 dihidrofolato reductasa Dfr1 [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>].....	67

18	Plegamiento característico α/β hidrolasa/FSH. A, CE: 3.1.1.1 carboxilesterasa (3cn7); B, CE: 3.1.1.3 triacilglicerol lipasa (2qxt); y C, CE: 3.1.1.74 cutinasa (3esc).....	68
19	Modelación de la estructura de la proteína LvFSH de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>). a) Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de LvFSH contra la proteína de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizada por Phyre ² como molde (FSH1/YHR049W PDB 1YCD); b) modelo teórico LvFSH (α -hélices cyan, hojas β magenta y lazos naranja); c) alineamiento estructural con la proteína (FSH1/YHR049W/1YCD (azul) con el modelo LvFSH (magenta); d) tríada catalítica Ser111 (rojo), Asp169 (amarillo) e His196 (blanco)...	74
20	Alineamiento estructural utilizando el servidor MSD (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/de) del modelo de LvFSH con estructuras de otras enzimas α/β hidrolasas. a) estructuras de esterasas (RMSD 2.24, Q-score 0.2836 para 137 C α); b) estructuras de lipasas (RMSD 1.127, Q-score 0.4678 para 149 C α). Modelo teórico de LvFSH en color verde.....	77
21	Dimensiones de sitio de unión de sustrato en el modelo LvFSH. En rojo se observa la cavidad con mayor volumen (309 Å ³) donde una variedad de sustratos podrían acomodarse.....	78
22	Características del plásmido recombinante para la expresión de la proteína LvFSH en bacterias <i>Escherichia coli</i> BL21 SI inducibles con sal. En rojo, cola de histidinas; en azul, sitio de corte de la proteasa PPS y en negrita la metionina inicial de la secuencia deducida de <i>aa</i> de la proteína LvFSH.....	80
23	Cinética de sobreexpresión de la proteína LvFSH recombinante en bacterias <i>Escherichia coli</i> BL21 SI. MW, marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad); UI, antes de la inducción y 4, 6, 24 h post-inducción a concentración final de IPTG y NaCl de 1 mM y 0.3 M, respectivamente.....	81
24	Purificación cromatografica de la proteína LvFSH recombinane. a) cromatografía de afinidad a metales (IMAC); b) Cromatografía de Hifrofobicidad (HIC); c) SDS-PAGE, M marcador de peso molecular de amplio rango (BioRad); EC, extracto crudo de bacterias; HIC fracción obtenida de IMAC y sometida a HIC y LvFSH, fracción de HIC conteniendo la proteína pura (* banda de 27 kDa).....	83

25	Análisis de estructura secundaria y cuaternaria de la proteína LvFSH recombinante. a) espectro de dicroísmo circular de ultravioleta lejano. Datos experimentales (línea discontinua); espectro reconstruido (línea continua) calculados por el algoritmo K2D; b) cromatografía de exclusión molecular. Inserto, curva de calibración utilizando los estándares de peso molecular; conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ribonucleasa A (13.7 KDa) y aprotinina (6.5 kDa).....	85
26	Efecto de la concentración de sustrato [S] en la actividad enzimática de LvFSH . <i>p</i> -nitrofenil ésteres se usaron como sustratos. a) <i>p</i> -nitrofeil laureato (0.05 - 0.2 mM); b) 0.05 - 2 mM de <i>p</i> -nitrofenil acetato.....	87
27	Cristales de proteína LvFSH recombinante obtenidos en la condición 54 de Index (cloruro de calcio di-hidrato 0.05 M, bis-Tris 0.1 M pH 6.5, 30 % v/v poli etilenglicol monometil éter 550).....	90
28	Estructura critalográfica de LvFSH de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>). a) estructura 3D de LvFSH se observaron dos monómeros en unidades asimétricas; b) dominio de la tapa cubiendo el sitio activo y tríada catalítica; c) tríada catalítica Ser111 Asp169 e His196 (color naranja, verde y blanco, respectivamente); d) topología y entorno de los sitios de unión del sustrato y catalítico.....	92
29	Comparación estructural de LvFSH de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) con otras enzimas de la familia de las α/β -hidrolasas (PDB: 4f21: G; 4ftw: A; 6bje: B; 2qjw: A; 3cn7: B; 5dwd: A); círculo rojo indicando el dominio de la tapa con mayor variabilidad en el contenido de estructura secundaria.....	95
30	Titulación de los anticuerpos anti-LvFSH mediante ensayo de manchas Dot blot. A: sin ningún anticuerpo (N); B: sin primer anticuerpo Anti-LvFSH; C: sin segundo anticuerpo Goat anti-rabbit-AP; D, E, F, dilución del anticuerpo anti-LvFSH (1:500, 1:1,000 y 1:1,500, respectivamente). TBS, 2 μ L de buffer tris salino; LvFSH a 0.228 mg/mL y diluciones de la misma desde (1:10 hasta 1:1,000,000).....	99

FIGURA

Página

31	Análisis electroforético de los extractos de proteína de los diferentes tejidos de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>). M, Marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad); Mu, músculo; He, hepatopáncreas; Pl, pleópodos; In, intestino; Br, branquias; Ip, intestino posterior; Es, estómago.....	102
32	Western Blot de los extractos proteicos de tejidos de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>). M, marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad); Pl, de pleópodos; Mu, músculo; In, intestino; He, hepatopáncreas; Ip, intestino posterior; Es, estómago; Br, branquias; Lv, 10 µg de LvFSH como control positivo; a y d, SDS-PAGE; b y e, membranas teñidas con azul de Coomasie; c y f, Western Blot utilizando el anti-LvFSH como primer anticuerpo. Se cargaron 40 µg de proteína en cada carril.....	104
33	Inmunodetección de LvFSH en extracto de músculo (Mu) de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) mediante Western Blot. A, SDS-PAGE; B, membrana teñida con azul de Coomasie; C, Western blot utilizando anti-LvFSH como primer anticuerpo. M, Marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad); Lv, control positivo 10 µg de LvFSH. Se cargaron de 200 a 20 µg de proteína.....	105
34	Curva estándar de inmunodetección de la proteína LvFSH para ensayos ELISA.....	107
35	Niveles de proteína LvFSH en los tejidos de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	109

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Clasificación química de los α -aminoácidos que conforman las proteínas.....	10
2	Clasificación de las enzimas con base en su actividad catalítica general.....	22
3	Sitios ELM de posible interacción proteica.....	71
4	Constantes cinéticas de la enzima LvFSH calculadas para sustratos <i>p</i> -nitrofenil ésteres.....	88
5	Valores estadísticos obtenidos en la colección y procesamiento de los datos cristalograficos de la estructura 3D de LvFSH de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	93
6	Concentración de proteína de los extractos proteicos de los diferentes tejidos de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	101
7	Concentraciones de proteína LvFSH en tejidos de camarón blanco mediante ensayos de ELISA.....	108

INTRODUCCIÓN

El camarón blanco (*Litopennaeus vannamei*) ha tomado relevancia por su gran aporte económico a nivel global debido su adaptación a los procesos de cultivo intensivo, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2019) a nivel mundial esta especie se encuentra ubicada en el tercer lugar de las más cultivadas por técnicas de acuicultura con una producción de alrededor 4.5 millones de toneladas para el año 2017.

En México, las áreas de cultivos acuícolas han aumentado significativamente, como respuesta a la creciente demanda del producto en los distintos mercados. Sin embargo, a partir del año 2010 se ha observado una caída en el volumen de producción anual. Lo anterior, debido principalmente a la aparición de enfermedades de origen bacteriano y/o viral que afectan a los organismos. Estas enfermedades han surgido como un serio problema y representan el reto más importante al que se enfrenta esta industria. Además, el camarón es un recurso que genera empleo y divisas, por lo tanto es de suma importancia mantener su bienestar y que no sea afectado por ningún tipo de enfermedad. Por tal motivo es importante realizar estudios encaminados a dilucidar los procesos metabólicos que permitan desarrollar nuevas técnicas de mejoramiento, tratamiento y prevención de enfermedades.

Existen diversos agentes patógenos para el camarón, los cuales de forma cíclica han afectado su producción. Las infecciones virales son de los principales problemas que afectan esta industria en todo el mundo, ya que pueden provocar mortalidades de hasta el 100 % de los organismos cultivados. El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), de la mancha blanca, Taura, han sido devastadores para la actividad. En 2013 y procedente de Asia, aparece un síndrome de mortalidad temprana o atípica asociado a cepas específicas de *Vibrio parahaemolyticus* (Tran et al., 2013).

En el año 2013 se observó un decremento en la producción de camarón en México, lo cual fue atribuido al síndrome de mortalidad atípica, a su vez asociado a *V. parahaemolyticus*. Este agente patógeno del camarón tomo gran importancia por las considerables pérdidas que provocadas, por lo que es importante la búsqueda de tratamientos para el combate y prevención de infecciones. En este sentido es importante el estudio y caracterización de las

proteínas propias de la bacteria, así como de los camarones, como potenciales sitios blanco para un posible tratamiento.

Los estudios de estructura-función de proteínas que participan en las rutas metabólicas de los organismos permiten entender los procesos de crecimiento y desarrollo de los mismos. El conocimiento de las características bioquímicas y estructurales de las enzimas responsables de llevar a cabo las reacciones metabólicas permite la búsqueda de mecanismos de regulación o desarrollo de fármacos para el control y/o ataque de patógenos.

Entre las proteínas que pueden utilizarse como objetivo de la sanidad acuícola se encuentran las lipasas. Estas enzimas poseen características y función bioquímica que las vuelven importantes sitios de ataque. La actividad funcional de las lipasas se sustenta en la tríada de aminoácidos clásica: nucleófilo-ácido-histidina, y su función es hidrolizar los enlaces ésteres de acilgliceroles *in vivo* (González-Bacerio et al., 2010). El nucleófilo serina (Ser) con ácido aspártico e histidina es la tríada catalítica conservada en las lipasas.

En particular, esta propuesta se enfoca a estudiar una proteína novedosa con similitud a una lipasa, la cual fue descubierta durante estudios de transcriptómica. La predicción de la actividad de lipasa a nivel de secuencia indica que es importante demostrar que la proteína tiene la actividad enzimática y además identificar en que tejidos se encuentra presente. La caracterización bioquímica y estructural de esta proteína permitirá principalmente la generar y ampliar el escaso de conocimiento básico acerca de estas enzimas en el camarón. Además, describir su estructura tridimensional y determinar en que tejidos del camarón para posiblemente proponer su función dentro del mismo. Todo lo anterior puede servir para la búsqueda y desarrollo de inhibidores y/o mecanismo específicos para estas proteínas, los cuales no permitirían realizar su función bioquímica lo que repercutiría en la proliferación de organismos patógenos para el camarón.

Por otro lado, el presente estudio proporcionará las bases para estudios posteriores de búsqueda y caracterización bioquímica y estructural de proteínas novedosas que pudieran funcionar como sitios diana para el desarrollo de fármacos de utilidad en la acuicultura.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Importancia Económica del Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*)

La acuicultura es una de las actividades económicas de mayor importancia, destacándose como una actividad de gran crecimiento y expansión a nivel mundial. Los volúmenes alcanzados por esta industria alcanzan los 80 millones de toneladas, equivalente a más del 40% de la producción total de este crustáceo (FAO, 2019). Hasta el 2017, China, India e Indonesia destacan entre los países con los mayores niveles de producción acuícola en el hemisferio oriental, mientras que en el occidental además de México destacan Chile, Brasil, Ecuador y Estados Unidos.

Dentro del consumo de productos marinos, el camarón es uno de los que más se consume en el mundo y al presentar un problema en cuanto al agotamiento de este de forma silvestre se ha recurrido a su cultivo. Debido a la gran adaptación del camarón blanco a los procesos de producción, es la especie que más éxito ha tenido a nivel mundial en la acuicultura, alcanzando en el 2017 hasta 4.5 millones de toneladas lo cual satisface de gran manera la demanda de este alimento (Rodríguez-Valencia et al., 2010; FAO, 2019). El camarón blanco es el producto pesquero que más auge ha tomado en cuanto a su producción en la actualidad y por ende, gran relevancia económica.

En México el cultivo de camarón se inició desde 1985, incrementándose de manera progresiva. En el ámbito mundial llegó a ocupar el noveno lugar en producción mundial, teniendo una producción de más de 125 mil toneladas y una derrama económica significativa, siendo los estados de Sinaloa, Sonora, Nayarit y Tamaulipas los principales productores (Alatorre, 1998; Córdova, 2002; CONAPESCA, 2013; Martínez-Córdova *et al.*, 2009). Sin embargo, debido a la aparición de enfermedades tanto de origen bacteriano como viral, la acuicultura de camarón se ha visto seriamente afectada, aun así esta sigue representado una importante actividad económica de fuerte derrama económica (CONAPESCA, 2017).

El camarón blanco es originario de las costas del océano Pacífico, extendiéndose por gran parte de la costa oriental del continente americano, abarcando desde México hasta las costas de Perú. Estas costas tienen la peculiaridad de tener aguas con temperaturas superiores a los 20 °C durante todo el año, permitiendo el desarrollo de este organismo, que normalmente pertenece a hábitats marinos tropicales; al alcanzar un peso de entre 30 a 40 g o una edad de 7 a 8 meses es cuando puede ser capturado en esta zona y posteriormente comercializado o utilizado para consumo (FAO, 2006). Por lo tanto, el camarón blanco en las costas del Pacífico mexicano puede alcanzar una producción muy importante a nivel nacional e internacional, lo cual beneficia al país en distintos ámbitos principalmente en economía.

El cultivo de camarón en el Golfo de California solo requirió de 20 años para representar el 90 % de la producción nacional de este crustáceo, tomando con ello gran importancia (Rodríguez-Valencia et al., 2010). En el año 2013 se produjeron 127,517 toneladas de camarón en México, destacando los estados de Sinaloa (61,002 ton) y Sonora (25,639 ton), como primer y segundo productor, respectivamente lo que muestra como se mencionó anteriormente, una disminución con respecto al 2011 donde se produjeron más de 184 mil toneladas (CONAPESCA, 2017).

México se ha convertido en la actualidad en uno de los principales exportadores de camarón a nivel mundial, siendo Estados Unidos de América (E.U.A.) el destino principal de este crustáceo (FAO, 2019). Estados Unidos de América es el principal importador de camarón en el mundo, en este contexto, México en el 2007 se convirtió en el cuarto país en cuanto a valor, exportando a esta nación (González, 2008). México al convertirse en un importante exportador de camarón debe prestar atención en este producto y desarrollar sistemas que dificulten la llegada de patógenos a este crustáceo, ya que existen varias enfermedades que le pueden afectar de gran manera y disminuir gravemente su producción. El virus de la mancha blanca, el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), las bacterias causantes de hepatopancreatitis necrotizante (NHP) pero principalmente el síndrome de mortalidad atípica (SMA), han causado pérdidas económicas importantes no solo en México sino en varios lugares del mundo. A pesar de los estudios estadísticos que se han realizado, aún faltan detalles acerca de las cifras exactas del camarón blanco en la actualidad,

ya que se mencionan cifras de todas las especies de camarón en conjunto. Debido a lo anterior, es prioritario el resolver los problemas que afectan e influyen de manera negativa en el desarrollo de este sector (Gómez-Gil, 2002).

El síndrome de mortalidad atípica es una enfermedad actual del camarón blanco, el cual en Norteamérica causó un decremento en la producción de este peneido muy importante en el 2013 (FAO, 2014). Este síndrome es causado por una bacteria emergente, *V. parahaemolyticus*, esta enfermedad presentó las primeras pérdidas importantes en la camaronicultura asiática (Tran et al., 2013). El síndrome se limita al hepatopáncreas del camarón, causando una atrofia del mismo y reduciendo su tamaño hasta 50% con respecto al sano. También, es característico que los camarones que presentan este síndrome tengan vacíos el estómago y el intestino medio, además de presentar manchas negras en la fase final de esta infección. Esta enfermedad es de suma importancia ya que está atacando de manera grave las granjas camaronícolas en los años recientes.

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria Gram negativa, que se puede encontrar en ambientes marinos por su capacidad de tolerar salinidad, además tiene la característica de producir toxinas, las cuales son de las moléculas más estudiadas de su patogénesis (Letchumanan et al., 2014). Esta bacteria es un patógeno emergente en Norteamérica (Makino et al., 2003). Tran et al. (2013) demostraron que un caldo de cultivo al que se le retiraron las bacterias provocaba el SMA, demostrando así la producción de toxinas y su posterior liberación al medio en el que se encuentra este microorganismo. Algunas de estas toxinas son hemolisinas y la toxina relacionada con insectos (Pir). Las hemolisinas pueden actuar formando poros en la membrana de las células del hospedero, así como pueden tener actividad de lipasa al degradar componentes de esta membrana (Joshi et al., 2014). Incluso con estas hemolisinas se puede diferenciar la cepa de *V. parahaemolyticus* que es patógeno para humano, de la cepa que afecta al camarón. Las tres hemolisinas que puede tener este patógeno son: hemolisina dependiente de lecitina (ldh), directa termoestable (tdh) y la relacionada con tdh (trh). La cepa patógena para humano es tdh+ y trh+, mientras que la patógena para camarón tiene un genotipo tdh-, trh- y ldh+. Por otra parte, Pir se ha investigado por su gran patogenicidad y se

ha implicado fuertemente con el SMA (Lee et al., 2015). Este hallazgo permite orientar estudios futuros a estas moléculas y a otras de la cepa patógena de *V. parahaemolyticus*.

En México, se logró determinar que grandes mortalidades en el camarón fueron debido al SMA, lo cual vuelve a este síndrome en un problema global para la camaronicultura. En 2013 se observó una caída en la producción de camarón blanco del 65 % en los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit, pero se desconocía la causa de esta disminución (Nunan et al., 2014). Después de estudios realizados en diferentes granjas de la región del Noroeste de México, Nunan et al. (2014) lograron demostrar que el SMA fue el causante del decremento en la producción de este organismo. Por tal motivo, se puede confirmar que este síndrome es un problema que aqueja al cultivo de camarón de manera global, ya que se ha extendido desde las costas de Asia hacia las costas de América.

Dentro de las enfermedades que afectan al camarón blanco existe mucha información, pero no así de los posibles tratamientos a los que se pudiera someter este peneido. Por lo anterior, resulta de gran importancia realizar estudios de posibles moléculas diana para atacar a los diferentes patógenos que afectan a este peneido y con esto, poder generar un tratamiento en contra del microorganismo infeccioso.

Los estudios estructura-función de proteínas han sido una herramienta útil en el de estudio y búsqueda de moléculas diana para el ataque y/o control de organismos patógenos. Lo anterior, debido a que las proteínas tienen una gran variedad de funciones fundamentales, regulan actividades primordiales e incluso, en algunas situaciones, son esenciales para algunas rutas metabólicas. Además, las proteína poseen características bioquímicas y estructurales que pueden ser específicas de cada organismo, lo cual ha sido trascendental para poder diferenciarlas e inhibirlas de manera específica, lo cual es la base de el estudio y desarrollo de fármacos.

Estudio de Proteínas

Las proteínas constituyen uno de los componentes fundamentales de las células. Químicamente son compuestos orgánicos muy grandes que tienen funciones esenciales a nivel

metabólico y estructural en la célula (Alberts, 1994). Dada la enorme complejidad de estas macromoléculas, en la búsqueda de el estudio de cómo se sintetizan en el organismo, los químicos han desarrollado diversos métodos para crear polipéptidos en el laboratorio (síntesis química). Sin embargo, estos métodos son complicados para fabricar una proteína entera de varios cientos de aminoácidos por su baja eficiencia y alto consumo de tiempo.

La naturaleza tiene un eficiente sistema para fabricar las proteínas. Este proceso ocurre en estructuras llamadas ribosomas; la mayoría de las proteínas se fabrican en ribosomas libres ubicados en el citoplasma de la célula. Los ribosomas están compuestos por varias decenas de proteínas y enzimas necesarias para la precisa coordinación y regulación de la síntesis, paso a paso (aminoácido por aminoácido) de las proteínas. Este proceso se conoce con el término de traducción. Las instrucciones acerca de cuáles aminoácidos deben agregarse para una dada proteína están codificadas en moléculas de ARN que llevan el mensaje desde ADN hasta los ribosomas (estas moléculas de ARN se denominan ARN mensajero). El código del ARN se traduce en el código de los aminoácidos (Morrison, 1992). Por lo tanto, cada proteína esta codificada en un fragmento específico de ADN llamado gen. De aquí que en cada organismo existen tantas proteínas como genes que las codifican y cada una de ellas desempeñan una función específica en los seres vivos.

Estructura de las Proteínas

Las proteínas son macromoléculas poliméricas constituidas de unidades monoméricas denominadas α -aminoácidos. En la Figura 1 se muestra la fórmula general de los α -aminoácidos. Un grupo amino y un grupo carboxilo estan unidos al carbono α ($C\alpha$), que a su vez también esta unido a un átomo de hidrógeno y una cadena lateral denominada grupo R, la cual diferencia a los distintos α -aminoácidos (Matthews, 2003). Los enlaces alrededor del $C\alpha$ son tetraédricos, cuando los cuatro sustituyentes son distintos se forma una molécula asimétrica o quiral, entonces tendremos dos imágenes especulares que no se

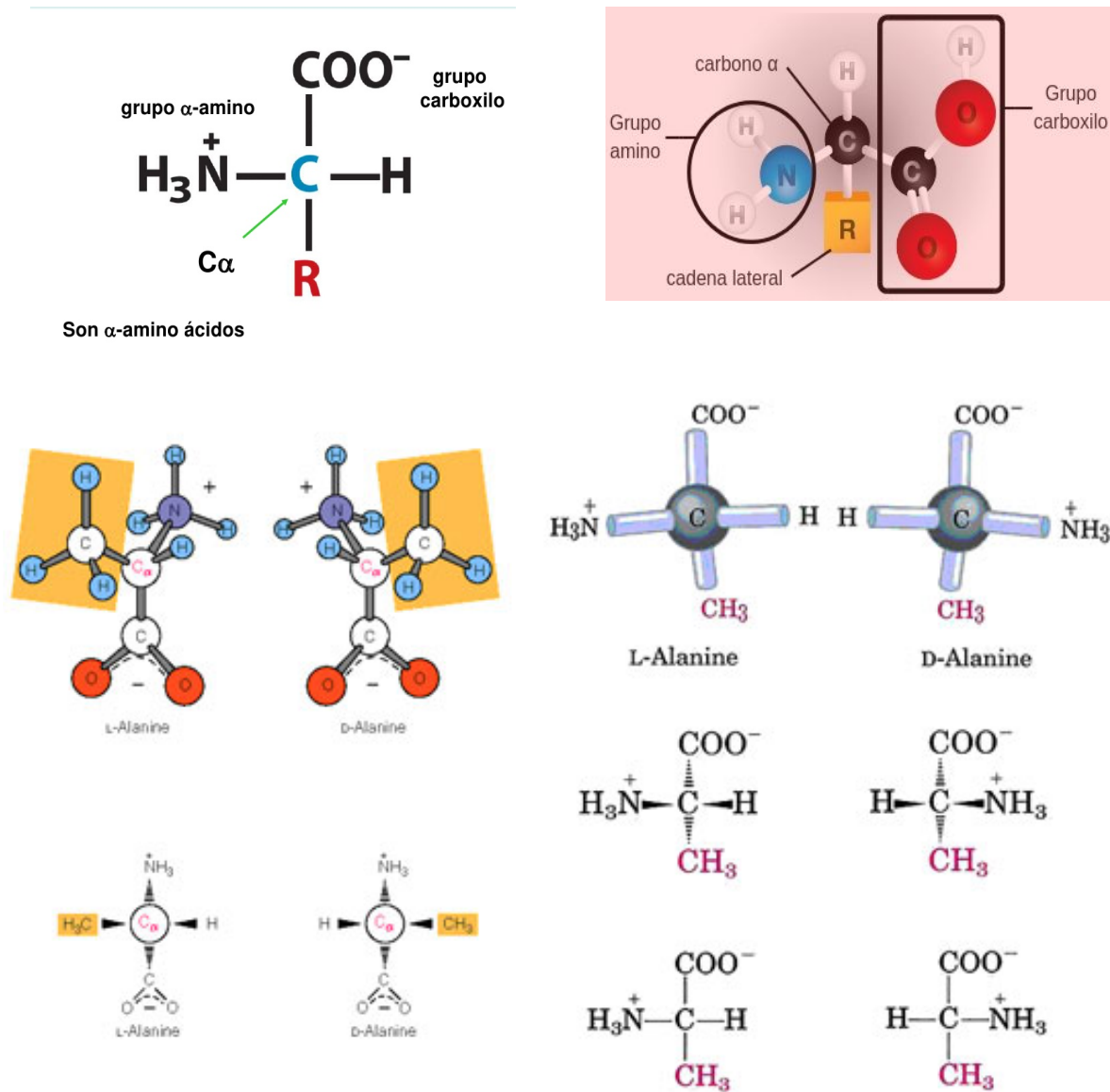


Figura 1. Fórmula general de los α-aminoácidos (<http://nutricionanimal.mx/glosario-nutricion-animal/aminoácido>; www.significados.com/aminoacidos/; www.asturnatura.com/articulos/proteinas/aminoacidos-estereoisomeria.php).

sobreponen denominadas enantiómeros L y D que son estereoisómeros. Los enantiómeros L y D sus soluciones rotan el plano de luz polarizada en dirección opuesta.

Todos los aminoácidos pueden existir en las formas D y L excepto la glicina. Las proteínas están constituidas por la forma L de los α -aminoácidos. Los 20 aminoácidos (*aa*) que constituyen a las proteínas se diferencian por la cadena lateral o grupo R unido al $C\alpha$. Con base en las características químicas de sus 20 cadenas laterales diferentes los *aa* pueden clasificarse según se muestra en la Tabla 1. La estructura tridimensional de una proteína reúne las propiedades de la disposición en el espacio de la molécula y es dependiente de la composición y secuencia de aminoácidos, las características físico-químicas de su entorno y la presencia de compuestos simples o complejos que las estabilicen y/o conduzcan a un plegamiento específico (Matthews, 2003).

La estructura de las proteínas puede jerarquizarse en cuatro niveles interdependientes que se muestran en la Figura 2 y se describen a continuación:

Estructura primaria

La estructura primaria de las proteínas se refiere a la secuencia de aminoácidos, es decir, la combinación lineal de los mismos mediante un tipo de enlace covalente, el enlace peptídico (Figura 3). El enlace peptídico es un enlace amida entre el grupo α carboxilo de un aminoácido y el grupo α amino de otro, para formar péptidos. Las cadenas que contienen algunos residuos *aa* (mono, di, tri, tetra, etc., péptido) se llaman oligopéptidos, mientras que las cadenas muy largas se denominan polipéptidos y/o proteínas. La cadena de aminoácidos formada conserva un grupo amino y un grupo carboxilo terminal y una serie de cadenas laterales o grupos R con características químicas diferentes proporcionado a la molécula polipeptídica propiedades únicas específicas (Matthews, 2003).

Una de las características más importantes del enlace peptídico es la coplanaridad de los radicales constituyentes del enlace C-N. Los enlaces ($-C=O$) y ($-N-H$) son aproximadamente paralelos de tal manera que los átomos C, H, O y N son coplanares. Alrededor del enlace C-N hay baja posibilidad de giro ya que el enlace peptídico tiene alto carácter de enlace doble por

Tabla 1. Clasificación química de los α -aminoácidos que conforman las proteínas.

AMINOÁCIDO			
Grupos R no polares, alifáticos			
	Glicina	Alanina	Valina
	Leucina	Metionina	Isoleucina
	Serina	Treonina	Cisteína
Grupos R polares, sin carga			
	Prolina	Asparagina	Glutamina
AMINOÁCIDO			
Grupos R cargados positivamente			
	Lisina	Arginina	Histidina
Grupos R carga negativa			
	Aspartato	Glutamato	
Grupos R no polares, aromáticos			
	Fenilalanina	Tirosina	Triptofano

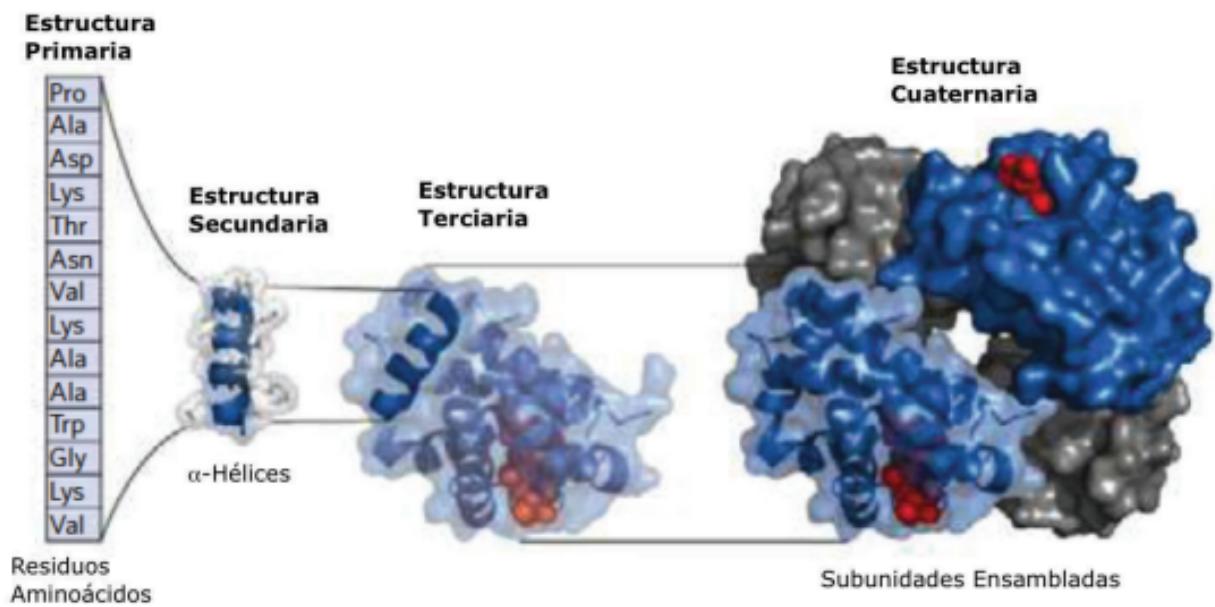


Figura 2. Niveles de organización estructural de las proteínas (Cajamarca, 2017).

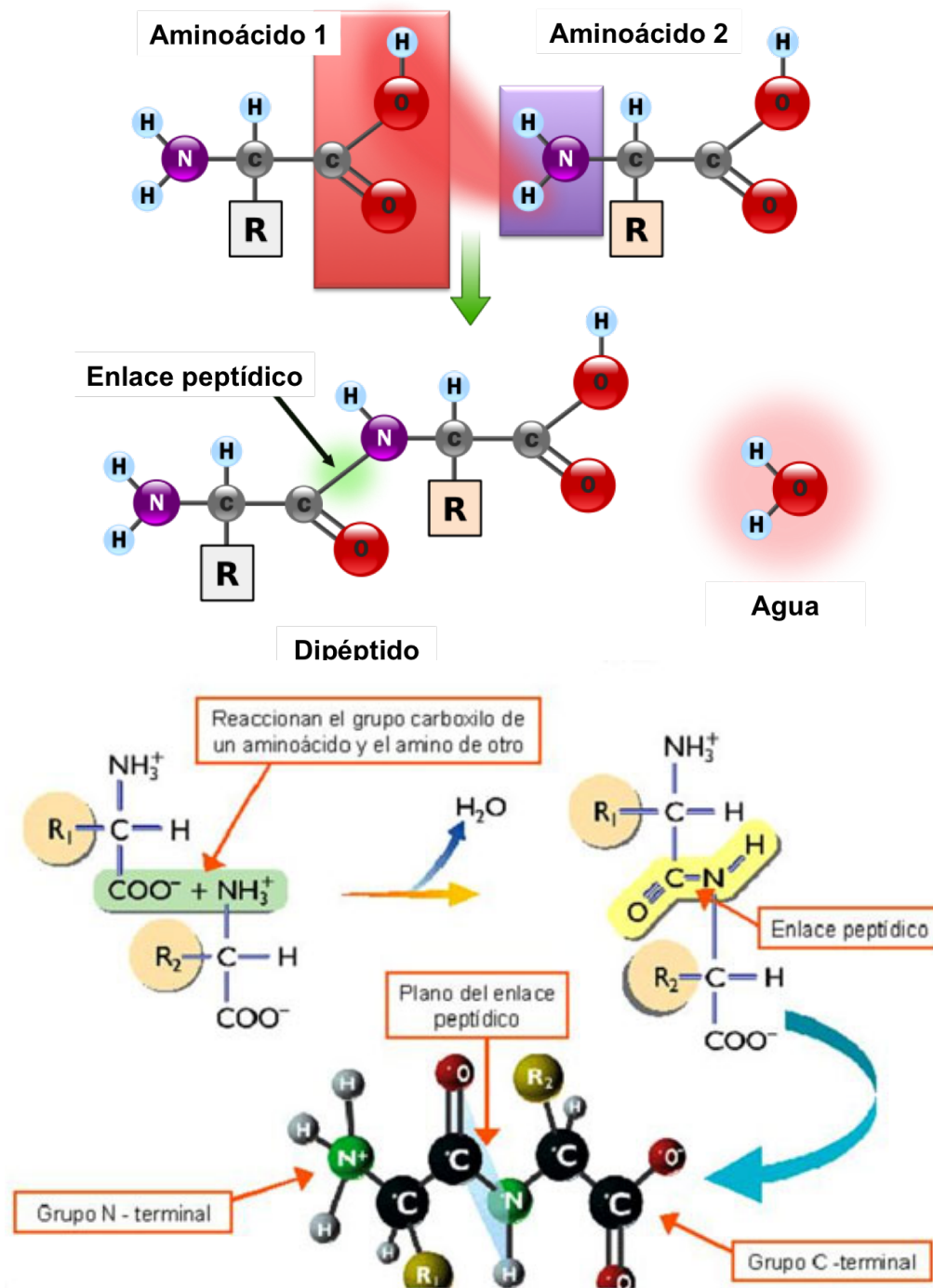


Figura 3. Enlace peptídico (<https://medium.com/@Rogerloaeza/amino%C3%A1cidos-44766664f9f8>).

lo que se considera un híbrido de dos formas de resonancia. Aunque siendo coplanares, los grupos de átomos alrededor del enlace pueden adquirir dos configuraciones *cis* o *trans*, esta última es la forma que se ve favorecida ya que presenta impedimento estérico de los grupos R de los C α adyacentes (Matthews, 2003).

El orden lineal definido de los *aa* constituye la estructura primaria de la proteína y definirá en gran medida las propiedades de los niveles de organización superiores de la proteína. Este orden es consecuencia de la información del material genético: Cuando se produce la traducción del ARN se obtiene el orden de aminoácidos que van a dar lugar a la proteína. Se puede decir, por tanto, que la estructura primaria de las proteínas no es más que el orden de aminoácidos que la conforman (Mathews, 2003).

Estructura secundaria

La estructura secundaria de las proteínas es la disposición espacial local del esqueleto proteico, gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico, es decir, un tipo de enlace no covalente, sin hacer referencia a la cadena lateral. Existen diferentes tipos de estructura secundaria: la hélice α y la lámina- β (Figura 4 y 5).

Como se muestra en la Figura 4, en una hélice α los aminoácidos están dispuestos en una estructura helicoidal dextrógira de 3.6 residuos por vuelta. Cada *aa* supone un giro en la hélice de unos 100° , y los carbonos α de los residuos contiguos están separados por $1.5\text{\AA}$. El grupo amino del aminoácido (n) puede establecer un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo del a (n+4). De esta forma, cada residuo (n) de la hélice forma dos puentes de hidrógeno con su enlace peptídico y el enlace peptídico del aminoácido en (n+4) y en (n-4). En total son 7 puentes de hidrógeno por vuelta, lo cual estabiliza la hélice (Pauling, 1964). La hélice está estrechamente empaquetada, de forma que no hay casi espacio libre dentro ella, y las cadenas laterales están dispuestas hacia el exterior.

Mientras que según se muestra en la Figura 5, la conformación de lámina- β o β -plegada se forma por el posicionamiento paralelo de dos cadenas de aminoácidos dentro de la misma

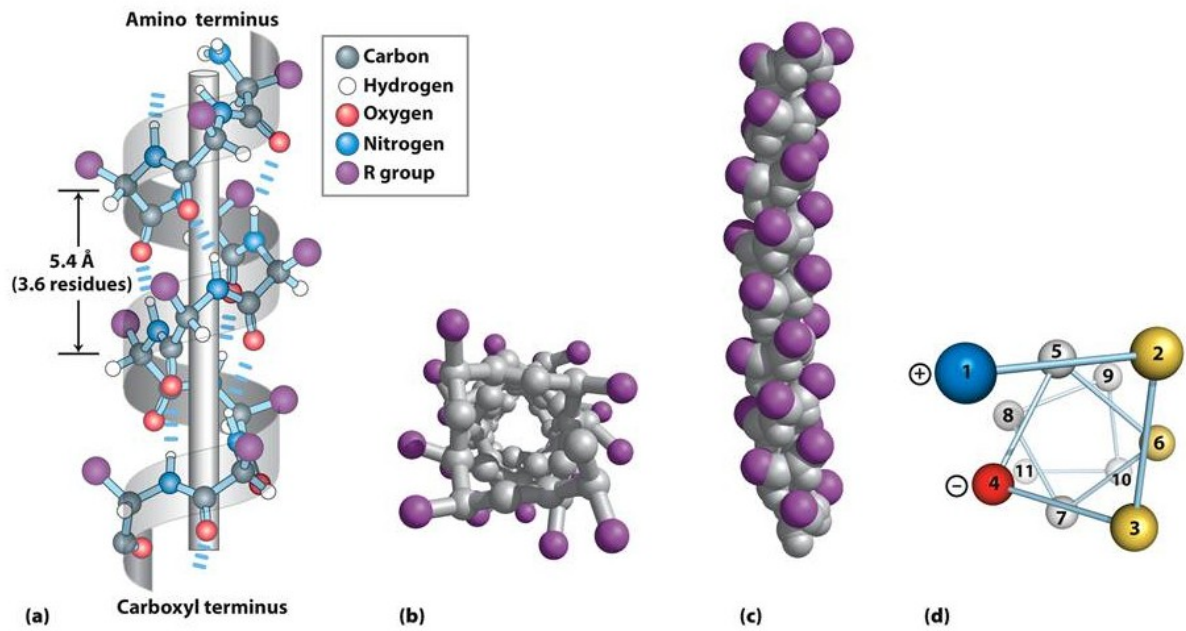


Figure 4-4
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company

Figura 4. Estructura en α -hélice presente en las proteínas. (Lehninger, 2013).

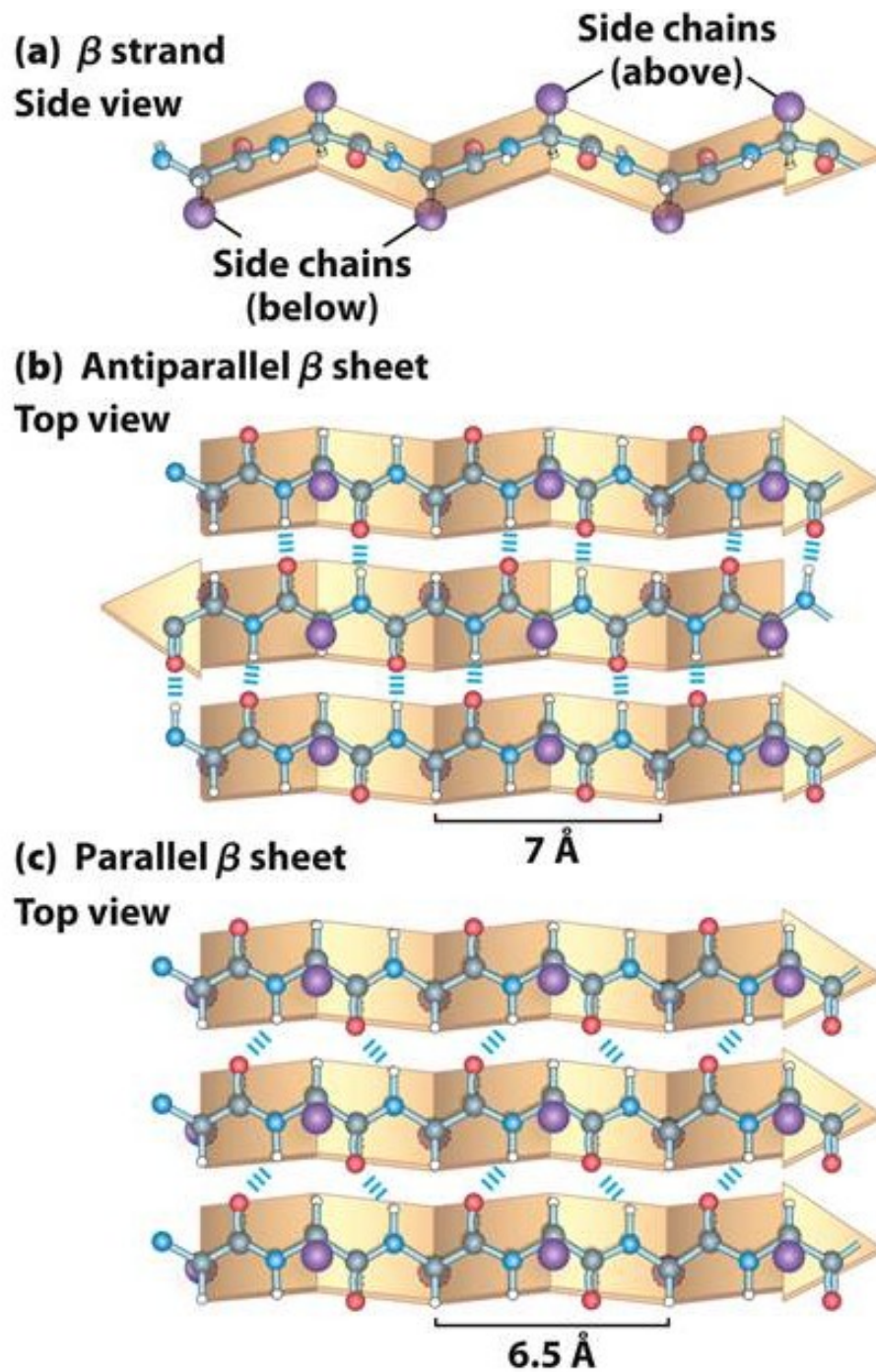


Figura 5. Estructura secundaria β -plegada o láminas β . (Lehninger, 2013).

proteína, en el que los grupos amino de las cadenas forman puentes de hidrógeno con los grupos carboxilo de la opuesta. Es una estructura muy estable que puede llegar a resultar de una ruptura de los puentes de hidrógeno durante la formación de la hélice- α . Las cadenas laterales de esta estructura están posicionadas sobre y bajo el plano de las láminas. Dichos sustituyentes no deben ser muy grandes, ni crear un impedimento estérico, ya que se vería afectada la estructura de la lámina.

Las dos posibles estructuras secundarias de las proteínas pueden dividirse al mismo tiempo en dos clases generales: diferentes hélices y como mínimo dos tipos de lámina plegada. Sin embargo, el hecho que un tipo de estructura pueda dibujarse y que pueda idealmente estabilizarse por puentes de hidrógeno claramente establecidos no significa que pueda formarse *in vivo*. Lo anterior debido a impedimento estérico de los átomos de la cadena de $C\alpha$ y/o de los grupos R. Estas restricciones solo pueden observarse construyendo un modelo de relleno espacial para cada caso. De ahí la necesidad de un procedimiento general para describir y evaluar las diferentes conformaciones posibles.

Como se muestra en la Figura 6a cada uno de los residuos aminoácido de una cadena polipeptídica tiene dos enlaces con posibilidad de rotación en el esqueleto de $C\alpha$. Los ángulos formados por la rotación del enlace N- $C\alpha$ se denomina Phi (ϕ), mientras que el ángulo de rotación formado por el enlace $C\alpha$ -O= es denominado Psi (ψ). Estos se ajustan para formar distintas estructuras de modo que se puede describir la conformación de cualquier residuo *aa* de la cadena polipeptídica mediante la determinación de la magnitud de dichos ángulos.

Los diagramas de Ramachandran describen la conformación de cualquier residuo *aa* de una cadena polipeptídica dentro de un gráfico con coordenadas ϕ y ψ , los cuales describen de manera simple y esquemática las estructuras estéricamente posibles. Cada punto en el diagrama corresponde a un par de ángulos de una estructura secundaria posible; sin embargo muchos de ellos implican una aproximación entre átomos mayor a los permitidos por sus radios de Van der Waals, de ahí que dichas conformaciones son estéricamente

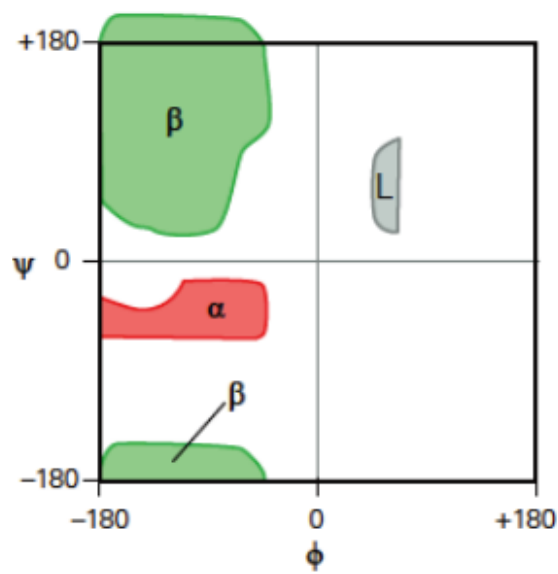
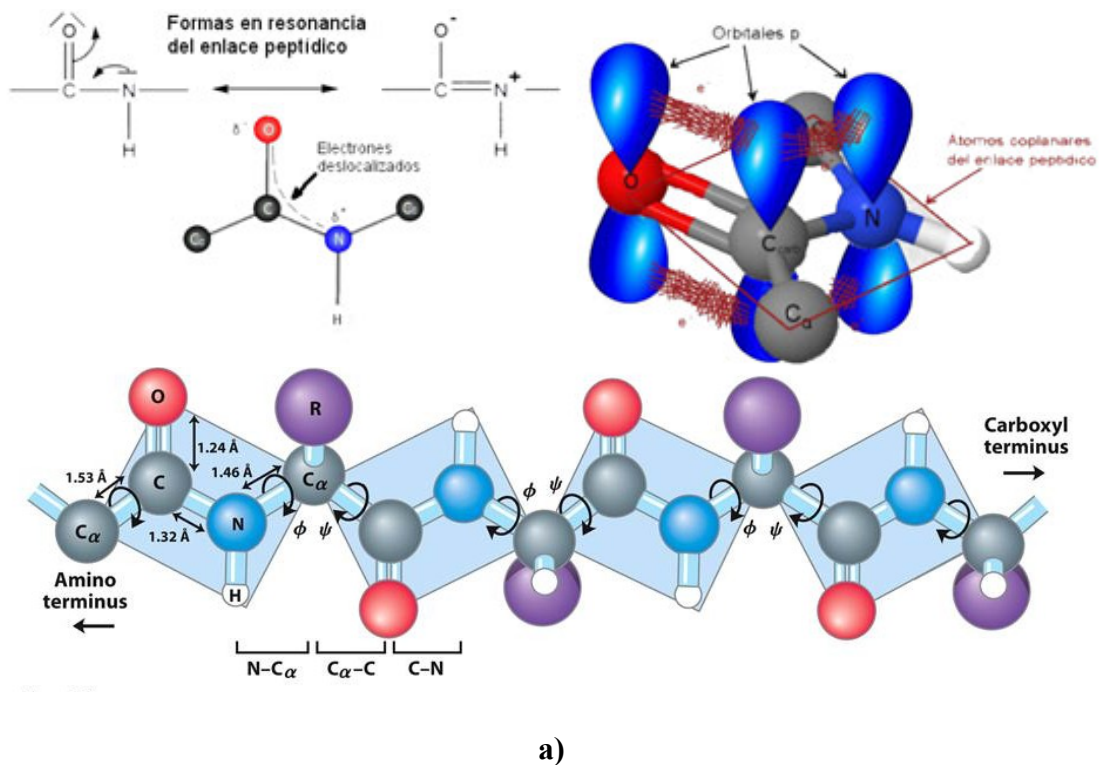


Figura 6. Isometría y ángulos del enlace peptídico y mapa de Ramachandran, con las regiones correspondientes a los tipos de estructura secundaria α hélices y láminas β . (Lehninger, 2013; www.asturnatura.com/articulos/proteinas/isomeria-enlace-peptidico.php; Cajamarca, 2017)

inexistentes. En la Figura 6b se muestran las posiciones dentro de el diagrama de Ramachandran de las estructuras secundarias descritas con anterioridad. Ramachandran (de ahí el nombre de estos diagramas) y otros investigadores mediante el uso de modelos y análisis computacional han determinado las conformaciones realmente posibles, las cuales se ubican en dentro de un mapa regiones identificadas. Es decir, por ejemplo la α hélice a izquierda aunque se encuentra ubicada en el límite de una región permitida, en realidad no es estéricamente permitida como la α hélice a derecha. Lo cual se debe a que como se mencionó anteriormente la configuración L de los aminoácidos que conforman la cadena polipeptídica.

Estructura terciaria

A medida que avanza la síntesis de la cadena polipeptídica el esqueleto de $C\alpha$ es plegado localmente en alguna de las estructuras secundarias anteriormente descritas. Posteriormente estas regiones se plegan o compactan unas sobre otras en el espacio formando la estructura terciaria de la proteína. La estructura terciaria se realiza de manera que los aminoácidos apolares se sitúan hacia el interior y los polares hacia el exterior en medios acuosos. Esto provoca una estabilización por interacciones hidrofóbicas, de fuerzas de van der Waals y puentes disulfuro (covalentes, entre aminoácidos de cisteína convenientemente orientados) y mediante enlaces iónicos. Actualmente, mediante la difracción de rayos X es posible conocer la estructura tridimensional de muchas proteínas, esta metodología ha logrado obtener niveles de resolución suficientes para la identificación de cada uno de los residuos *aa* y su conformación a lo largo del esqueleto de la $C\alpha$ de la proteína.

Mediante el análisis y estudio estructural de un gran número y variedad de proteínas se han encontrado motivos y principios comunes a nivel de estructura terciaria. Primeramente la estructura de la mayoría de las proteínas están constituidas por dominios unidos entre sí, los cuales suelen realizar funciones diferentes. Generalmente proteínas globulares grandes muestran múltiples dominios, mientras que las proteínas pequeñas suelen presentar dominios únicos. Un determinado tipo de dominio puede encontrarse en proteínas diferentes. Se han formulado algunas reglas generales que rigen la formación de la estructura terciaria de las proteínas:

- a) Todas las proteínas globulares muestran un interior y un exterior bien definidos. No se muestra un patrón de distribución de *aa* hidrófobos e hidrófilos específico, sin embargo en la estructura tridimensional los primeros se sitúan en su mayoría hacia el centro de la molécula, mientras que los segundos pueden ubicarse hacia el exterior en contacto con el medio acuoso.
- b) Las hojas β plegadas se acomodan generalmente formando estructuras cilíndricas con enrollamiento hacia la izquierda, esto último como consecuencia de la configuración L de los *aa*.
- c) La cadena polipeptídica hace giros o cambios de una estructura secundaria a otra mediante giro β , giro γ y por el *aa* la prolina.
- d) Existen regiones en el plegamiento de las proteínas que no pueden clasificarse dentro de las estructuras secundarias descritas a las cuales se les ha denominado “cadena al azar” (random strand). Sin embargo, esta estructura no es flexible sino que muestra un plegado particular y exactamente el mismo para la proteína donde se identifica. Algunas proteínas sí muestran “random strand” en los extremos amino y/o carbono terminal.

Estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria deriva de la conjunción de varias cadenas peptídicas que asociadas, conforman un ente, un multímero, que posee propiedades distintas a la de sus componentes monómeros. Dichas subunidades se asocian entre sí mediante interacciones no covalentes del mismo tipo que las que intervienen en la estructura terciaria, como pueden ser puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals, puentes salinos y algunas veces enlaces disulfuro.

La asociación cuaternaria puede ser de tipo homotípica cuando las cadenas polipeptídicas constituyentes llamados monómeros son idénticas o casi idénticas, mientras que cuando las subunidades son muy diferentes se denomina heterotípica. Para el caso de una proteína constituida por dos monómeros, un dímero, este puede ser un homodímero, si los monómeros constituyentes son iguales, o un heterodímero, si no lo son (Monod, 1965). Cada monómero

es una unidad asimétrica en el agregado proteico, y en función de la geometría de las interacciones la estructura cuaternaria global puede presentar una gran variedad de simetrías.

Enzimas

Un catalizador aumenta la velocidad de una reacción sin verse alterado. Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores para que muchas de las reacciones bioquímicas metabólicas se lleven a cabo en condiciones fisiológicas a velocidades útiles. Además, las enzimas son las encargadas de canalizar las reacciones metabólicas hacia las rutas esenciales. Así mismo, las enzimas son catalizadores modulables es decir su acción puede controlarse según las necesidades celulares de un organismo (Mathews, 2003).

El compuesto o sustancia sobre la que actúa una enzima se denomina sustrato. Una gran diversidad de enzimas su nombre son descriptivos del sustrato sobre el que actúa. Sin embargo, existe un sistema lógico de nomenclatura establecido por diseñado por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, siglas en Inglés), constituido de cuatro números, donde, los tres primeros definen la clase principal, la subclase y la sub sub clase, respectivamente. Las enzimas se clasifican en seis grandes clases con grupos y subgrupos definidos según la función (Tabla 2).

Para lograr la caracterización bioquímica de una enzima es de gran importancia determinar parámetros cinéticos los cuales explicarán detalles importantes de su actividad, entre estos valores cinéticos se encuentran la K_m y la V_{max} , donde la primera es la constante de Michaelis-Menten, que se relaciona con la afinidad de la enzima por el sustrato, mientras la segunda es la velocidad máxima que alcanza la reacción catalítica, siendo estos valores correspondientes a una cinética de Michaelis-Menten (Sharma et al., 2001). Por lo tanto, es importante determinar estos parámetros cinéticos de cualquier enzima que sea estudiada, para conocer su eficiencia catalítica, preferencia por sustrato, necesidad de iones o cofactores, entre otras características.

Las hidrolasas es un grupo constituido de más de 200 enzimas que catalizan la hidrólisis de un enlace covalente con la intervención de una molécula de agua

(<https://www.nature.com/subjects/hydrolases>), dividiendo una molécula grande en dos más pequeñas. Específicamente catalizan reacciones que rompen enlaces de éter (C-O), enlaces carbono-nitrógeno (C-N) que no sean enlaces peptídicos; enlaces de anhídrido de ácido, enlaces carbono-carbono (C-C) y/o enlaces fósforo-nitrógeno (P-N). Las enzimas hidrolasas realizan importantes reacciones de degradación en el organismo. Algunas digieren moléculas grandes en fragmentos de menor tamaño para ser utilizados para síntesis, excreción de materiales de desecho o como fuentes de carbono para la producción de energía. En algunas reacciones catalizadas por enzimas hidrolasas se da la liberación de energía. Los ejemplos de hidrolasas comunes incluyen esterasas, proteasas, glucosidasas, nucleosidasas y lipasas.

Las esterasas son un rompen los enlaces éster entre un ácido carboxílico y un alcohol. Las nucleasas, (fosfatasa) que hidrolizan ácidos nucleicos; las glucosidasas que cortan los enlaces entre las moléculas de azúcar en los carbohidratos; y las proteasas son enzimas hidrolasas que rompen entre el grupo ácido de un aminoácido y el grupo amino de otro (enlace peptídico) dentro de las moléculas de proteína mientras que las lipasas hidrolizan los lípidos.

De las enzimas hidrolasas más importantes destaca la acetilcolina esterasa (colinesterasa). La acetilcolina es un potente neurotransmisor que transporta y propaga los impulsos nerviosos. La colinesterasa detiene el impulso nervioso una vez transmitido, hidrolizando la acetilcolina a colina y ácido acético (<http://www.chemistryexplained.com/Ge-Hy/Hydrolase.html>).

Enzimas α/β hidrolasas

La estructura terciaria o empaquetamiento tridimensional proporciona el marco arquitectónico en el que se basan la función y especificidad de las enzimas. Se sabe que una gran cantidad de secuencias de proteínas diferentes pueden plegarse de manera similar, de tal manera que naturalmente pueden encontrarse núcleos estables de proteínas o plegamientos ancestrales, que han servido como moldes en el proceso evolutivo de adaptación molecular y ajuste fino de la función enzimática, lo anterior se conoce como evolución convergente; es decir, en un plegamiento característico dado, sustituciones de aminoácidos, inserciones o deleciones pueden conducir a enzimas con diversas funciones catalíticas y con solo unas pocas características secuenciales en común (Holmquist, 2000).

Tabla 2. Clasificación de las enzimas con base en su actividad catalítica general.

Clase	Función
Oxidorreductasas	Catalizan reacciones de óxido-reducción
Transferasas	Transfieren grupos funcionales de una molécula a otra
Hidrolasas	Realizan reacciones de hidrólisis.
Liasas	Catalizan la eliminación o adición de un grupo a un doble enlace, u otras hidrólisis que implican reordenamiento electrónico.
Isomerasas	Realizan el reordenamiento intramolecular.
Ligasas	Llevan a cabo la unión de dos moléculas.

El primer ejemplo claro de lo anterior, es la familia de las enzimas llamada α/β hidrolasa, descubierta a inicios de lo 90's con la resolución de la estructura tridimensional de enzimas con actividades catalíticas diferentes. El plegamiento canónico α/β hidrolasa, consiste de un arreglo generalmente paralelo de ocho láminas β , rodeadas de hélices α (Figura 7), tiene una hebra (β_2) anti paralela al resto. Las primeras y últimas hélices α_A y α_F se empaquetan en un lado de la hoja, mientras que el resto de las hélices se encuentran en el lado opuesto de la hoja. Muchos miembros de esta familia de enzimas contienen inserciones que se pliegan en subdominios, estas inserciones se producen en varios lugares, a menudo en el cadena que sigue a la lámina β_6 . Estos elementos de estructura secundaria forman tapas o brazos que participan de manera importante en la definición de sitios catalíticos, además en la accesibilidad e interacción de los sustratos. El residuo catalítico (Ser, Cis o Asp) que participa como nucleófilo durante la catálisis, se encuentra en ángulo agudo entre la hoja β_5 y la siguiente hélice $C\alpha$, esta geometría tensa permite la presentación eficiente del nucleófilo en el sitio de ataque al sustrato, este dominio es llamado codo nucleófilo. Las posiciones espaciales de los átomos de la tríada catalítica implicados en la catálisis están notablemente conservadas en todas las enzimas de la familia α/β hidrolasas (Holmquist, 2000).

Una parte importante del sitio activo de todas las α/β -hidrolasas es el llamado agujero de oxianión, que es la disposición espacial de los donadores de enlaces de hidrógeno que estabiliza el estado transición durante la catálisis. Una característica conservada del agujero de oxianión es la geometría del codo catalítico, que hace que la amida del residuo vecino al residuo nucleófilo actúa como protón. Además, esta formado por uno o más átomos de hidrógeno de la cadena principal y cadenas laterales de los aminoácidos que se encuentran generalmente entre la lámina β_3 y la hélice α_A .

Se han descrito muchas estructuras tipo α/β hidrolasa. Este plegamiento conservado se encuentra entre los más promiscuos. Toleran grandes inserciones al modelo canónico. Las enzimas resultantes varían de 25 a 65 kDa en masa molecular, operan en sustratos con propiedades químicas o fisicoquímicas completamente diferentes y actúan en diversos contextos biológicos. Se han estudiado las diferencias y similitudes estructurales dentro de las

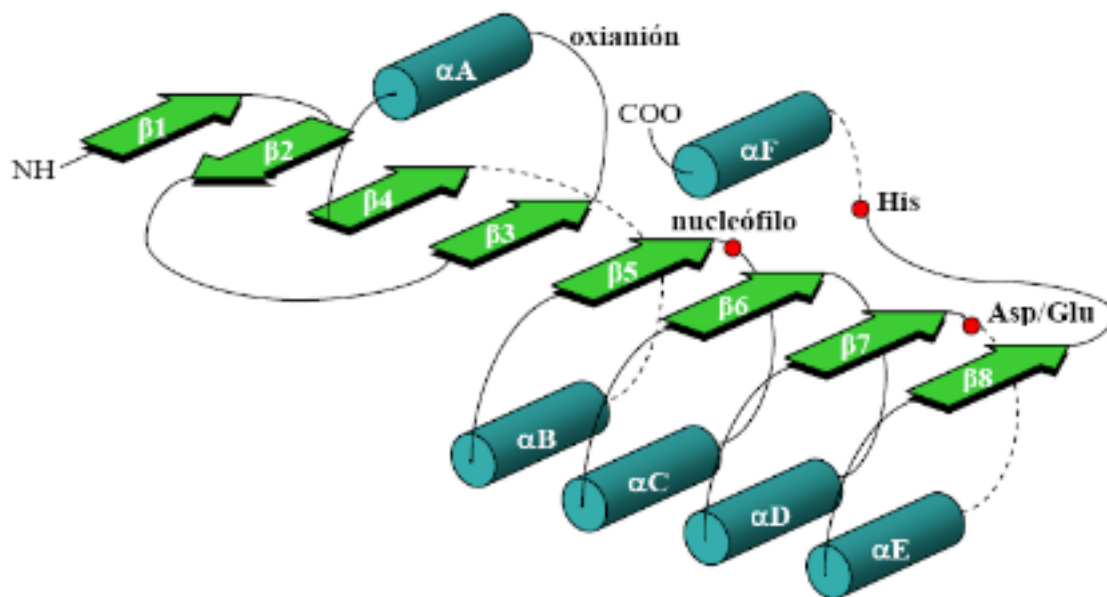


Figura 7. Diagrama general del plegamiento α/β -hidrolasa característico presente en algunas proteínas. Hojas β , flechas verdes; hélices α , cilindros en azul; líneas discontinuas, posibles inserciones; círculos rojos, residuos catalíticos (nucleófilo, ubicado después de la hoja $\beta 5$; aspartato o glutamato situado a continuación de la hoja $\beta 7$ y la histidina altamente conservada ubicado al final de la última hoja β) (Mercado, 2014).

enzimas α/β hidrolasa. Todas las enzimas tienen una tríada catalítica conformado por residuos His-nucleófilo-ácido colocados en lazos conservados. La histidina es invariante en las enzimas, el nucleófilo puede ser un residuo Ser, Cys o Asp, mientras que el residuo ácido puede ser Asp o Glu. Esto difiere de la invariablemente conservada tríada catalítica Ser-His-Asp, identificada por primera vez en las familias de proteasas. En las enzimas α/β hidrolasa en comparación con la de las familias de serina proteasas, la disposición y organización espacial de los residuos de la tríada catalítica y el agujero de oxianión es la imagen especular. Las α/β hidrolasas no requieren ningún cofactor para su función.

Un análisis estructural de las enzimas α/β hidrolasa conocidas identificó cuatro características principales a pesar de su diversidad catalítica:

- i) El orden de los residuos de la tríada catalítica es nucleófilo-ácido-histidina.
- ii) Una secuencia consenso Gli-X-Nuc-X-Gli define un elemento de "codo nucleófilo" mediante un giro apretado entre una lámina β y la siguiente de hélice α .
- iii) La estructura enzimática funcional empieza en la lámina β_3 y tiene al menos cinco cadenas de longitud.
- iv) El residuo ácido de la tríada catalítica se encuentra en un lazo o loop largo localizado después de la hoja β_7 lo cual permite la formación de un puente de hidrógeno durante la catálisis

Al menos tres de las anteriores características parecen aplicarse a todas las enzimas de tipo α/β hidrolasa conocidas, la primera y al menos dos de las últimas tres.

La diversidad estructural y química entre sustratos de enzimas del tipo α/β -hidrolasas es amplia. Los tipos de enzimas incluyen esterases, lipasas, tioesterasas, peptidasas, haloperoxidasas, haloalcano-deshalogenasa, epóxido hidrolasa y enzimas que rompen enlaces C-C. Se ha sugerido que proteínas con función no catalítica, tales como las moléculas de adhesión y los precursores hormonales también pueden presentar plegamiento α/β -hidrolasa. En la base de datos ESTHER (ESTerases, α/β -Hydrolase Enzymes and Relatives) pueden encontrarse las estructuras tridimensionales de todas las proteínas α/β -hidrolasa conocidas

(<http://www.ensam.inra.fr/cholinesterase/>). Además, contiene secuencias de proteínas filogenéticamente relacionadas con colinesterasas y de estas últimas se encuentran disponibles, datos cinéticos, sustratos, inhibidores y análisis de mutacionales (Hotelier et al., 2004).

Esterasas

Las esterasas (E.C. 3.1.1) son enzimas que rompen enlaces éster, son un diverso grupo de enzimas que están presentes en animales, plantas y en microorganismos. Dentro de las esterasas hay dos subgrupos principales, las lipasas (E.C. 3.1.1.1) y las esterasas verdaderas (E.C. 3.1.1.3). Las lipasas, también llamadas triacilglicerol hidrolasas, se diferencian de las esterasas verdaderas (carboxil éster hidrolasas) ya que sufren una activación interfacial (Brzozowski et al., 1991; Bornscheuer, 2002). Por otro lado, las esterasas siguen una cinética clásica de Michaelis-Menten, mientras que las lipasas para poder seguir este comportamiento requieren de baja concentración de sustrato. Además, las esterasas tienen una secuencia consenso G-X-X-L adicional en su secuencia de aminoácidos (Toke et al., 2007).

Estas enzimas catalizan la escisión de los enlaces éster como se muestra en la Figura 8. El mecanismo de reacción es similar al mecanismo clásico descrito para las serina proteasas, el cual procede a través de la formación de un intermediario acil-enzima, el cual es hidrolizado posteriormente por una molécula de agua.

Las enzima acetilcolina esterasa tienen un residuo Glu en la tríada catalítica en lugar del residuo Asp visto en α/β hidrolasas. La sustitución por mutagénesis dirigida de Glu por un residuo Asp conduce a una enzima inactiva, mientras que la mutación equivalente en un lipasa solamente reduce la actividad catalítica a la mitad. En la catálisis mediada por la tríada catalítica Ser-Asp-His, el residuo ácido forma un puente de hidrógeno corto y fuerte, con la histidina dando como resultado una mayor reactividad del nucleófilo (Ser). Probablemente, este puente de hidrógeno es más importante en las acetilcolinesterasas (ACE), lo que explicaría los diferentes efectos de la sustitución en las tríadas catalíticas de Glu a Asp.

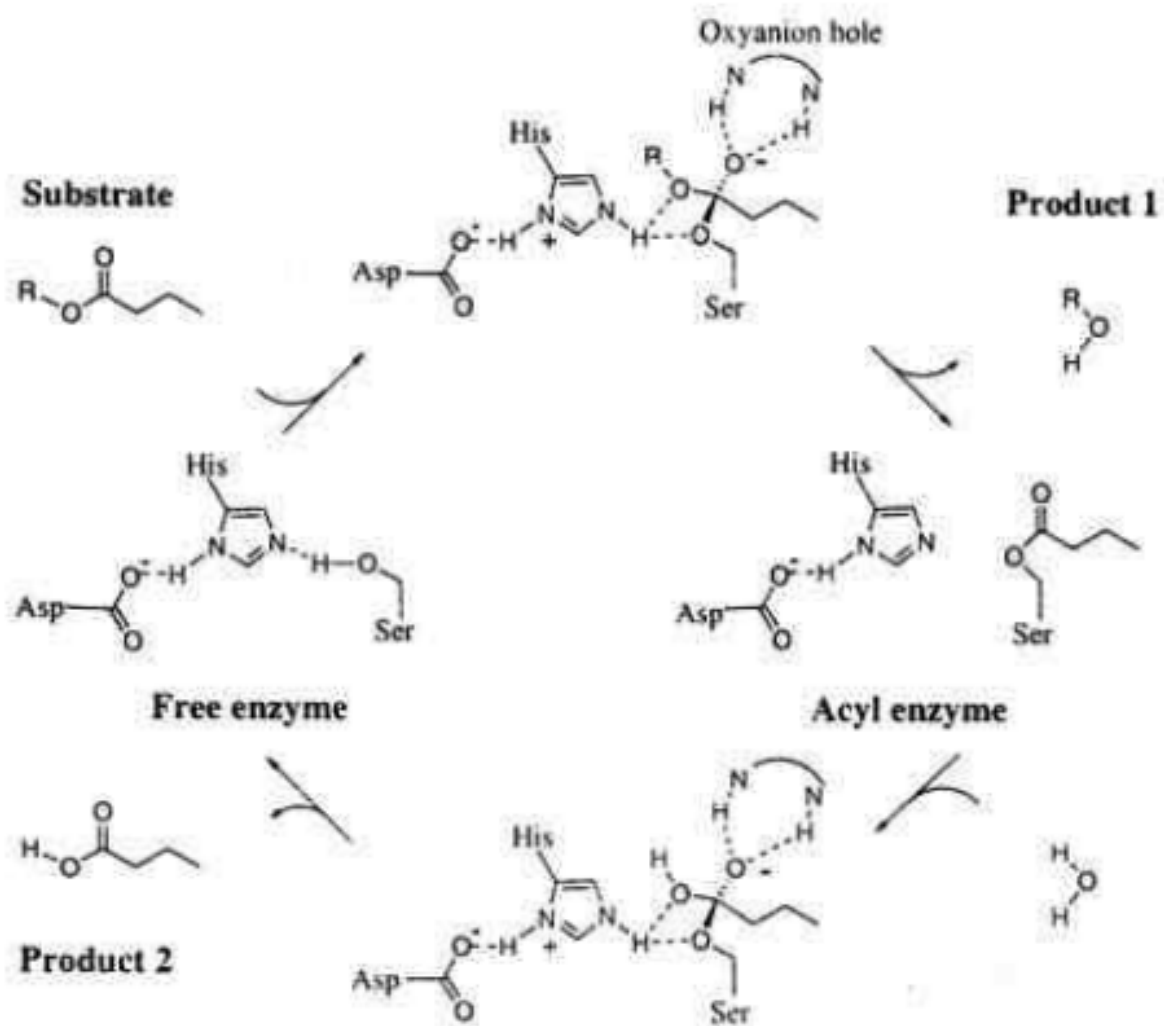


Figura 8. Esquematización de el mecanismo de reacción de la hidrólisis de un éster de ácido butírico catalizado por una serina hidrolasa (Holmquist, 2000).

Como se menciona anteriormente, las estructuras generales de las enzimas α/β hidrolasas son muy similares. Sin embargo, a diferencia de las enzimas lipasas que forman un lazo (tapa o lid) que cubre el sitio activo, las esterasas como la acetilcolina esterasa tiene un sitio activo profundo y estrecho de $\sim 20 \text{ \AA}$ accesible al solvente que llega hasta la mitad de la molécula de proteína. Las paredes del sitio activo están revestidas residuos aromáticos. Datos cinéticos sugieren que el sitio activo de ACE contiene los dos subsitios, el "esterático" y el "aniónico" correspondientes al sitio catalítico (tríada) y de unión a colina (agujero oxianiónico), respectivamente. Los residuos Phe y Trp suelen encontrarse en el sitio aniónico.

Además de los dos subsitios del sitio activo, la enzima tiene otros sitios de unión para sustrato y ligandos. Dichos sitios de unión son aniónicos y "periféricos" y claramente distintos del sitio activo y se ha sugerido que están involucrados en las sistemas de inhibición por sustrato y modulación alostérica de la enzima. Las acetilcolina y butirilcolina esterasas tienen especificidades claramente diferentes de sustrato para la porción de acilo. El papel en la conformación de el sitio de unión de acilo de algunos de los residuos aromáticos en ACE, fue evidente por la comparación de la estructura con la de butirilcolina esterasa humana. Esta última, carece de seis residuos aromáticos que recubren el fondo del sitio; de tal manera, que sustituciones por mutagénesis dirigida de dichos residuos aminoácidos en ACE puede lograr la hidrólisis de butirilcolina y acetilcolina a tasas casi similares. El lazo de la cavidad del grupo acilo define estéricamente el tamaño permitido del grupo acilo del sustrato y los inhibidores (Holmquist, 2000).

Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.) son enzimas que hidrolizan triacilglicerol a ácidos grasos libres de cadena corta o larga (Brady et al. 1990), estas juegan un importante papel en el metabolismo de los lípidos y en la homeostasis energética debido a que los ácidos grasos son almacenados en forma de triacilglicerol (TAG), estos a su vez son la principal fuente endógena de energía. En mamíferos, se han reportado lipasas de origen lisosomal y digestiva. Entre las lipasas digestivas las denominadas gástricas y pancreáticas son de interés fundamental debido

a que son las responsables de la hidrólisis de los TAG durante la digestión. Las lipasas pancreáticas de mamíferos requieren de co-lipasas como cofactor para la actividad enzimática.

Estas enzimas varían ampliamente en su estructura primaria, sin embargo todas pertenecen a la superfamilia de α/β hidrolasas, en las cuales una serina es parte de la tríada catalítica (His, Ser y Asp) y la secuencia consenso (Gli-X-Ser-X-Gli). El sitio activo de la enzima es abierto por un lazo (*loop*) llamado también llamado tapa (*lid*) el cual desplaza a la interface agua-aceite para permitir la entrada del sustrato hidrofóbico (Ollis *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1997; Rivera-Pérez *et al.*, 2011b; Verger, 1997).

Las lipasas (E.C.3.1.1.3) son enzimas esenciales para diferentes organismos cuando su única fuente de energía o de carbono es lipídica. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces éster de grasas y aceites con la posterior liberación de diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos grasos libres y/o glicerol, como se muestra en la Figura 9 (Arpigny y Jaeger, 1999; Zhang y Kim, 2010). Además, estas proteínas pueden realizar otras funciones como son la esterificación, transesterificación e interesterificación de grasas y aceites (Mala y Takeuchi, 2008). Las lipasas tienen tamaños que van desde 20 kDa a los 60 kDa y son estables en un amplio rango de pH, temperatura y solventes orgánicos, así como también, algunas son dependientes de iones como el calcio (Mala y Takeuchi, 2008; Nardini *et al.*, 2000; Navarro González y Periago Castón, 2012). También, se ha demostrado que existen lipasas indispensables en el catabolismo de lípidos, como *volA*, en *Vibrio cholerae*, la cual es independiente de iones metálicos (Pride *et al.*, 2014). Una característica fundamental de esta enzima es su activación en la interfase polar/no-polar, donde ocurre un cambio conformacional para poder ejercer su catálisis, este proceso ha sido ampliamente estudiado en enzimas de células eucariotas (Arpigny y Jaeger, 1999). Dentro de las lipasas existe una gran variedad, ya que pueden poseer características similares, pero también algunas que las diferencian fácilmente, algunas de estas muy diversas son los parámetros cinéticos.

Las enzimas lipolíticas se han logrado clasificar en función de su especificidad al sustrato, de la secuencia aminoacídica conservada y por la sensibilidad a diversos inhibidores de estas enzimas (Park *et al.*, 2006). En la actualidad, una clasificación que ha sido aceptada es la

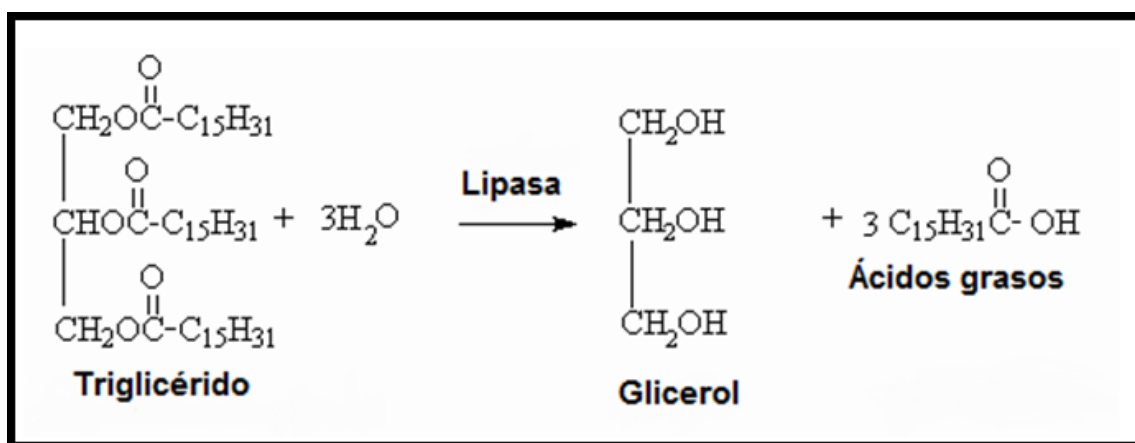


Figura 9. Esquema de reacción catalizada por lipasas. Lipasa hidroliza un triglicérido de cadena larga (> 10 carbonos), liberando en una reacción completa un glicerol y tres ácidos grasos libres (González-Pérez, 2016).

basada en la secuencia de aminoácidos y en sus propiedades biológicas (Arpigny y Jaeger, 1999). En dicho estudio se clasificaron estas enzimas en 8 familias. Cada una de estas familias tiene peculiaridades que se diferencia de las demás (Arpigny y Jaeger, 1999; Bornscheuer, 2002; Jaeger et al., 1994):

- La familia I de enzimas lipolíticas bacterianas, también llamada familia de lipasas verdaderas cuenta con 22 miembros, los cuales se han dividido en 6 subfamilias, teniendo la particularidad de ser secretadas al medio, siendo las subfamilia 1, 2 y 3 aquellas que conservan características muy similares y tener miembros de *Pseudomonas spp.*
- La familia II, se distingue por no preservar el pentapéptido característico de las lipasas, rodeando a la Ser catalítica una secuencia de GDSE, siendo no muy comprendida su función ya que en lugar de una tríada contiene una diada catalítica formada por Serina e Histidina.
- La familia III, contiene lipasas extracelulares.
- La familia IV son las lipasas adaptadas al frío y presentan una secuencia conservada muy similar a las lipasas sensibles a hormonas de mamíferos (HSL), lo cual pudiera ser la explicación de su actividad a bajas temperaturas.
- La familia V está conformada por lipasas de bacterias mesofílicas, tanto adaptadas al frío como al calor, además de presentar homología con enzimas no lipolíticas, como la haloperoxidasa.
- La familia VI está formada por las esterases más pequeñas conocidas, con un peso de 23-26 kDa y no se tiene mucha información acerca de ellas, solo que hidroliza pequeños sustratos pero no triglicéridos de cadena larga.
- La familia VII está formada por enzimas de alrededor de 55 kDa y tienen una identidad aproximada del 30% con esterases de células eucariotas.

- Y por último, la familia VIII es de las menos estudiadas, con pocos miembros y teniendo como característica principal un dominio S-X-X-L (X=cualquier aminoácido) en el sitio activo.

Las fosfolipasas son uno de los tipos de enzimas lipolíticas, correspondiendo su nombre por la afinidad a su sustrato, estas actúan hidrolizando enlaces ésteres de fosfolípidos y pueden diferenciarse dependiendo el sitio que hidrolicen en los fosfolípido. Estas enzimas pueden encontrarse ancladas a la membrana, como en el caso de las bacterias donde se han encontrado un gran número de estas. Es importante mencionar que las lipasas son esterasas, pero no todas las esterasas son lipasas (Pride et al., 2014)

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la hidrólisis de los ésteres por lipasas o esterasas es conservado. Primero ocurre un ataque nucleofílico de el oxígeno de la serina catalítica al carbono del grupo carbonilo del éster, formando un intermediario tetrahédrico que será estabilizado por la histidina y el aspartato catalíticos, así como por dos residuos que tengan una amida (aminoácidos del agujero oxianiónico) para que formen puentes de hidrógeno. Posteriormente el alcohol es liberado, formándose un complejo acil-enzima para que, por un ataque nucleofílico de un ion hidroxilo, sea liberado el ácido graso y la enzima quede libre (Figura 10) (Bornscheuer, 2002; Jaeger et al., 1994).

Para precisar detalles en cuanto a características bioquímicas de las lipasas se puede mencionar que los pH óptimos para estas enzimas se manejan entre 6 y 10, mientras que las temperaturas suelen estar entre 30 - 60°C (Hasan et al., 2009; Sharma et al., 2001). Se ha demostrado que los pH de 7 a 8 pueden favorecer la actividad catalítica de las lipasas ya que, a este pH, la histidina y el ácido aspártico o glutámico se cargan negativamente (debido al pK del grupo imidazol de la cadena lateral de la histidina y al del grupo carboxilo de la cadena lateral del aspartato o glutamato), permitiendo la liberación del ácido graso (Pride et al., 2014). También, las temperaturas entre los 35 y 40 °C favorecen la actividad de la mayoría de las lipasas, sin embargo existen lipasas que actúan a temperaturas mayores y menores (Hasan et al., 2009). Por estos rangos, tanto de pH como de temperatura, se puede inferir la flexibilidad de la enzima en su sitio catalítico pero se debe de estudiar la actividad específica de la lipasa de interés, para encontrar los parámetros idóneos de su actividad.

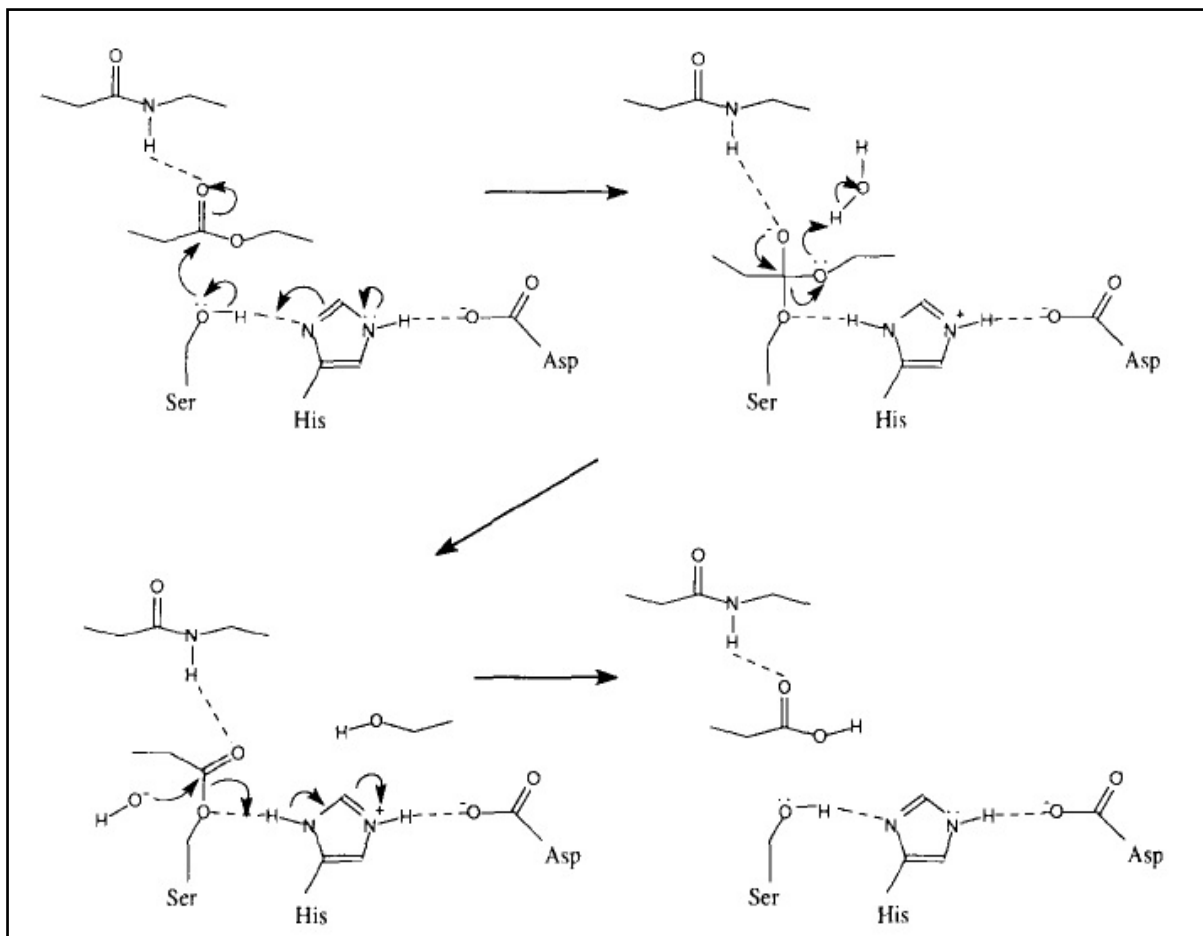


Figura 10. Mecanismo de hidrólisis de ésteres llevado a cabo por lipasas (Jaeger et al., 1994).

El estudio de las lipasas bacterianas ha retomado un gran auge. Se ha encontrado que estas proteínas tienen un peso molecular de 20 - 60 kDa así como también, las características estructurales mencionadas anteriormente (Navarro González y Periago Castón, 2012). Además se demostró que pueden catalizar: hidrólisis, esterificación, transesterificación e interesterificación de grasas y aceites (Mala y Takeuchi, 2008). Es por lo ya mencionado que el estudio de las lipasas bacterianas como un sitio diana para controlar a un microorganismo toma gran relevancia ya que existen pocos trabajos enfocados a este tema.

Los estudios acerca de estas enzimas han elucidado sus aplicaciones, su función bioquímica y sus características estructurales. Las lipasas se han estudiado debido a que hidrolizan a su sustrato en sitios específicos lo que ha llevado a muchas aplicaciones, entre estas se encuentra la síntesis de compuestos orgánicos, así como la formulación de detergentes, entre otras (Mala y Takeuchi, 2008).

El método más importante para la determinación de la actividad de la lipasa es la hidrólisis en emulsión de triacilglicerolos (tributirina, trioleína y aceite de oliva), mientras que, para la actividad de la esterasa, se utilizan ésteres solubles de ácidos grasos de cadena corta. Los ensayos de actividad espectrofotométricos de enzimas lipasas generalmente usan como sustratos *p*-nitrofenil ésteres de ácido láurico o palmítico. Algunas lipasas pueden hidrolizar sustratos de esterasa (actividad de esterasa), por lo tanto, sustratos como el *p*-nitrofenil butirato también pueden usarse en ensayos de actividad de lipasa. Los *p*-nitrofenil ésteres de cadena muy corta, como el *p*-nitrofenil acetato, también se usan para medir actividad esterasa en ensayos espectrofotométricos (Plou et al., 1998).

Importancia biológica de las lipasas en invertebrados. Estudios en invertebrados han demostrado la existencia de lipasas de carácter lisosomal y digestivo (Rivera-Pérez *et al.*, 2011b). Los camarones peneidos requieren de lípidos para llevar a cabo una gran variedad de funciones metabólicas. Se ha demostrado que estos tienen baja capacidad de sintetizar *de novo* los ácidos grasos saturados n-6 y n-3. De ahí, que los aceites de pescado y plantas ricos en linoleico y linolénico son los mejores usados por los crustáceos y poseen un mejor valor nutricional. Las enzimas responsables de hidrolizar los TAG presentes en la dieta a ácidos

grasos libres son las lipasas digestivas, mientras que las rigen lisozomal son responsables de hidrolizar los TAG almacenados como fuente de energía (González-Félix y Pérez-Velázquez 2002).

Existen algunos estudios de lipasas digestivas en crustáceos donde se han reportado que presentan características similares a las de mamíferos, reportándose pesos moleculares entre 40 - 50 kDa con puntos isoeléctricos alcalinos entre 6.8 – 7.8 (Moreau *et al.*, 1992; Miled *et al.*, 2000). Estas enzimas son liberadas por las células B de la glándula intestinal dentro del túbulo del lumen para posteriormente trasladarse a la glándula gástrica e iniciar la digestión de los lípidos presentes en el alimento. Debido a que los TAGs son de carácter hidrofóbico puede ser necesaria la acción de algunos emulsificantes, en invertebrados como *Pacifastacus leniusculus* y el cangrejo *Carcinus mediterraneus* que carecen de un hígado verdadero no se han reportado colipasas, lo cual representa una importante diferencia con las lipasas digestivas de mamíferos, pero se ha reportado que otros decápodos secretan acilaurinas que cumplen esta función. La primer lipasa digestiva reportada en crustáceos fue la de cangrejo *Carcinus mediterraneus*, la cual no requiere co-lipasa ni sales biliares para presentar la actividad en la glándula digestiva, lo cual también sucede con una lipasa intracelular de *Penaeus vannamei*. Esta fue localizada en músculo, pleópodos, urópodos y en la glándula digestiva, a diferencia a la lipasa digestiva no presenta glicosilaciones y tiene un peso molecular de 196 kDa.

Las enzimas lipasas de diferentes fuentes presentan una amplia especificidad a sustratos. Las lipasas de mamíferos muestran preferencia por ácidos grasos de cadena corta y dependen de las sales biliares así como de la colipasa. En crustáceos peneidos como *Penaeus schmitti*, *Penaeus vannamei*, *Farfantepenaeus californiensis* y *Farfantepenaeus notialis* presentan actividad preferente hacia TAG de cadena larga como trioleína, tripalmitina y triestearina, mostrando diferentes especificidades enzimáticas así como diferentes velocidades catalíticas (Forrellant Barrios *et al.*, 2004; Del Monte *et al.*, 2002).

La inhibición de las lipasas digestivas mediante las sales biliares se ha relacionado con cambios en la conformación durante la catálisis. Sin embargo, solo algunos inhibidores específicos se han identificado tales como el tetrahidrolipstatina y el di-isopropil fluorofosfato.

Estos inhibidores se han usado para caracterizar como serina lipasas a enzimas digestivas de escorpión *Scorpio maru* y del cangrejo *C. Mediterraneus* (Rivera-Pérez *et al.*, 2011b), (Rivera-Pérez y García-Carreño 2011), (Rivera-Pérez *et al.*, 2011a).

Por otro lado, las enzimas lipasas tienen la capacidad de catalizar un amplio espectro de reacciones de bioconversión debido a su capacidad de sintetizar ésteres de ácidos carboxílicos soluble o insolubles y otros compuestos con uniones éster uniones amido. Las lipasas (E.C.3.1.) tienen un alto potencial biotecnológico en la tecnología de alimentos, biomedicina e industria química. Sin embargo, su uso ha sido limitado por la inestabilidad de estas enzimas bajo las condiciones industriales, las cuales generalmente requieren el uso de solventes o temperaturas relativamente altas para disolver los sustratos; algunas de estas inconveniencias se han solucionado con el uso de lipasas de carácter termofílico, las cuales presentan resistencia a condiciones extremas, echo por el cual han sido de gran importancia en la investigación biotecnológica (Ruiz *et al.*, 2003); (Sánchez-Otero *et al.*, 2008), (Nawani *et al.*, 2006a; Nawani *et al.*, 2006b), (Nirupama *et al.*, 1998).

Importancia de las lipasas como moléculas "blanco" en el control de crecimiento bacteriano.

Las lipasas son enzimas que se estudian con varios objetivos, además del conocimiento básico se han buscado aplicaciones para controlar enfermedades humanas no infecciosas, mientras que el tema de enfermedades infecciosas ha sido poco estudiado desde este punto de vista. El objetivo de muchos estudios ha sido la lipasa pancreática, la cual se relaciona con temas de obesidad (Birari y Bhutani, 2007). Esta lipasa se ha estudiado con el fin de descifrar su acción específica y rol en el metabolismo lipídico en humanos. Al conocer detalles específicos de esta enzima como sus sustratos, se han estudiado inhibidores de la misma para evaluar su posible efecto contra de la obesidad, obteniendo resultados alentadores en este ámbito. Estas enzimas tienen una implicación en muchos procesos muy importantes, principalmente en los que involucran producción de energía. Por lo cual, si se dirige una mayor cantidad de estudios hacia las lipasas bacterianas, sería muy probable que se encontraran resultados novedosos y prometedores, como se ha hecho anteriormente.

Rivera-Pérez et al. (2011) purificaron y caracterizaron una lipasa de camarón por primera vez. En este trabajo se realizó la caracterización de una lipasa de camarón, encontrando que sus propiedades estructurales así como bioquímicas se han conservado en la familia de estas proteínas. Esta investigación toma relevancia ya que es la primera lipasa purificada del hepatopáncreas de camarón blanco, invertebrado de suma importancia a nivel mundial.

Por otro lado, se ha demostrado que existen lipasas que se encuentran en las bacterias, que tienen una implicación muy importante en su metabolismo. Entre estas se encuentra VolA, la cual es una lisofosfolipasa anclada a membrana, que le permite a *Vibrio cholerae* utilizar lisofosfatidilcolina como su única fuente de carbono e ingresar el ácido graso liberado y disponer energéticamente de este (Pride et al., 2014). De la misma manera, se han encontrado enzimas lipolíticas que juegan un rol muy importante en la patogénesis de *Mycobacterium tuberculosis* (Côtés et al., 2008). Dichos estudios demuestran que estas enzimas son muy relevantes para algunos microorganismos y que poseen características que pudieran utilizarse para la búsqueda de inhibidores específicos. Por lo tanto, se puede decir que existe un camino muy poco explorado en esta área, que se puede explotar y que muy probablemente arrojaría resultados muy prometedores. Por todo lo anterior, resulta importante el estudio estructural de las lipasas bacterianas para encontrar sitios conservados y posibles inhibidores específicos de estas.

Tsurumura y Tsuge (2014) proponen a una lipasa bacteriana como sitio de ataque promisorio de un antibiótico. Este estudio se basa en la cristalización de la lipasa monoacilglicerol de *Bacillus sp* con el fin de establecer claramente el sitio activo, su selectividad por sustrato y también mostrar características importantes de este. Esta estructura concuerda con la presentada por Rengachari et al. (2013) donde además, se muestra que la isoleucina 145 (I145) puede restringir el acceso al sitio de unión de esta lipasa. Los autores antes mencionados concluyen con la importancia de elucidar tanto la selectividad como el sitio activo de la enzima, ya que esto permitirá en un futuro desarrollar un fármaco con posible acción de antibiótico. Además de los trabajos mostrados anteriormente, se han desarrollado otros que se basan en el aspecto industrial en el que se pudieran utilizar las lipasas bacterianas. Entre los microorganismos que más se han estudiado en este ámbito están *Bacillus*, *Pseudomonas* y

Staphylococcus (Arpigny y Jaeger, 1999). Las lipasas aisladas de *Bacillus aerius* pudieran utilizarse para la síntesis de ésteres con una probable implicación como anticancerígeno (Saun et al., 2014). Incluso, existen más estudios acerca de lipasas relevantes para la industria química y farmacéutica, entre otras, que no se abordarán dentro de este trabajo. Sin embargo, es importante mencionar que estas enzimas tienen funciones muy particulares, así como conservan características tanto estructurales como bioquímicas muy similares dentro de la familia de las lipasas.

La investigación a fondo de estas proteínas tomaría gran relevancia, debido al importante uso que se le puede dar en la industria farmacéutica. Por lo tanto, sería interesante elucidar estructuras específicas de cada una de estas enzimas para analizar sus posibles sitios blancos y con esto, diseñar, sintetizar y estudiar compuestos que sean inhibidores específicos de las mismas. Lo anterior, con el fin de detener la proliferación de bacterias causantes de grandes mortalidades en el cultivo de camarón, siendo un ejemplo muy importante de la actualidad, *V. parahaemolyticus*.

Las pocas investigaciones que se han realizado en conocer las lipasas bacterianas y su inhibición han mostrado resultados prometedores. Estos trabajos se han dirigido hacia inhibidores conteniendo fósforo y en específico, con estructuras del ácido fosfónico, modificando solamente el hidrógeno por otros sustituyentes alifáticos. Se ha demostrado que la familia de ciclipostina son inhibidores prometedores de lipasas, ya que se ha logrado detener el crecimiento de micobacterias, con solo agregar este inhibidor al medio (Seibert et al., 2008). La ciclipostina (Figura 11) tiene una estructura muy similar a los monoacilglicerol, lo cual explica su acción inhibitoria, ya que puede competir con el sustrato por en el sitio activo y bloqueando su actividad catalítica. El descubrimiento de las características bioquímicas y estructurales de las lipasas micobacterianas permitió el desarrollo de este compuesto con acción inhibitoria.

Actualmente existe un gran número de estudios de inhibición en lipasas de humano (Cai et al., 2012; Gao y Mulberg, 2014; Hamzaoui et al., 2015). Los inhibidores deben de presentar una estructura que compatible y específica con el sitio catalítico de la enzima o en su defecto,

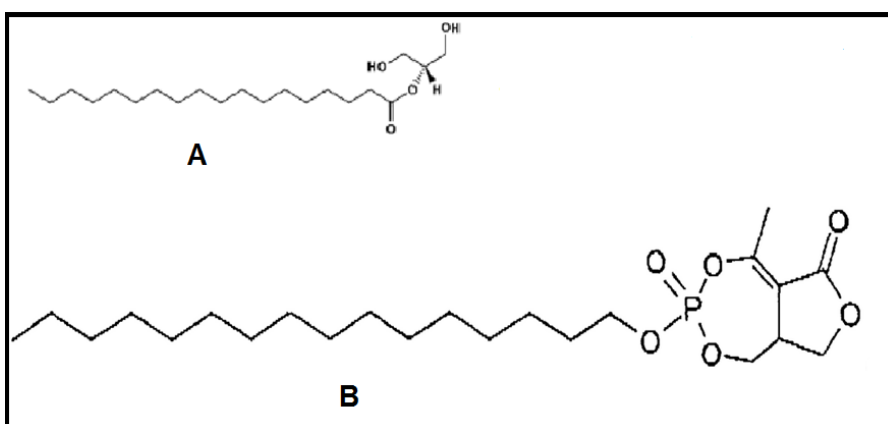


Figura 11. Similitud de ciclipostina con monoacilglicerol. A) Monoacilglicerol. B) Ciclipostina. El resto de los miembros de esta familia difieren en sustituyentes en la cadena carbonada pero conservan su similitud con monoacilglicerol. Adaptado de Seibert et al. (2008).

unirse a otro sitio de la misma provocando un efecto inhibitorio de la actividad catalítica. Lo anterior, se puede realizar conociendo la estructura tridimensional y las principales características bioquímicas de la enzima.

La genómica se ha convertido en una herramienta muy utilizada en la actualidad, ya que permite hacer estudios en gran escala de los genes de un organismo. A partir del surgimiento de la genómica y la transcriptómica, la cual surge con las técnicas que han permitido la secuenciación de genomas completos o de los transcritos expresados, se han desarrollado herramientas biotecnológicas que se pueden aprovechar en diversas áreas, con el propósito de estudiar aquellos genes que pudieran estar relacionados con la patogénesis de las bacterias e incluso en algunas vías metabólicas (Garza-Ramos et al., 2009; Stryjewska et al., 2013).

En la era post-genómica, la caracterización experimental de un gen o transcripción todavía se requiere para validar las predicciones hechas por algoritmos y bases de datos. Muchas transcripciones expresadas se traducen en polipéptidos de función desconocida, identificados como el proteoma oscuro (Perdigao et al., 2015; Bhowmick et al., 2016). El presente trabajo se centra en el estudio de una nueva proteína, que fue descubierta durante los estudios transcriptómicos del camarón del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). La predicción de la actividad de LvFSH basada solo en la secuencia de aminoácidos es un desafío. La presencia de una tríada catalítica canónica de Asp/His/Ser y el modelado teórico sugiere que pertenece a la familia de pliegues de hidrolasa α/β . La validación experimental adicional mostró que LvFSH es una esterasa intracelular funcional con una posible función de señalización.

Por otro lado, gracias a las nuevas técnicas de biología molecular que han permitido el manejo del ADN, ha sido posible la producción de proteínas recombinantes, las cuales son proteínas que se producen en un huésped diferente al que por naturaleza las produce. Las proteínas recombinantes han sido vitales en el análisis estructura-función y en algunas aplicaciones terapéuticas. Existen varios sistemas de expresión que han sido utilizados; sin embargo, la bacteria que se utiliza generalmente es *Escherichia coli*, la cual ha sido modificada para que adopte características específicas que pueden ayudar, a que se sintetice la proteína exógena de manera correcta y con una buena eficacia. La expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* ofrece varias ventajas, como es el bajo costo, alta densidad de cultivo, fácil manipulación, así

como obtener una buena cantidad de proteína en un corto plazo de tiempo. Sin embargo, es importante recalcar que para tener una buena sobreexpresión de una proteína recombinante, también es de relevancia la elección del vector de expresión correcto (García et al., 2013; Lara, 2011; Papaneophytou y Kontopidis, 2014; Rosano y Ceccarelli, 2014; Sørensen y Mortensen, 2005). Este tipo de técnicas traen grandes ventajas a los laboratorios que estudian estructuralmente proteínas, cuyo fin puede variar pero el objetivo siempre será el conocimiento de la estructura de una proteína. Es por estas razones que trabajar con proteínas recombinantes se ha convertido en una estrategia de gran impacto.

Por todo lo mencionado anteriormente, el presente estudio trata de la caracterización bioquímica y estructural de una proteína novedosa obtenida a partir de un transcriptoma de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), esta proteína presenta características estructurales a nivel de secuencia de aminoácidos de posible actividad lipasa.

HIPÓTESIS

La proteína obtenida a partir de la sobreexpresión en *Escherichia coli*, de una secuencia de amino ácidos que presenta una alta homología estructural con otras enzimas de la familia de las α/β hidrolasas del tipo serina hidrolasas (LvFSH) presentará actividad hidrolítica contra lípidos.

OBJETIVOS

General

Realizar la caracterización bioquímica y estructural de una proteína α/β hidrolasa con similitud a lipasa obtenida de un transcriptoma de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

Particulares

Sobreexpresar la proteína en bacterias *E. coli*.

Purificar la proteína recombinante mediante cromatografía preparativa.

Demostrar la actividad de enzimática mediante con sustratos específicos.

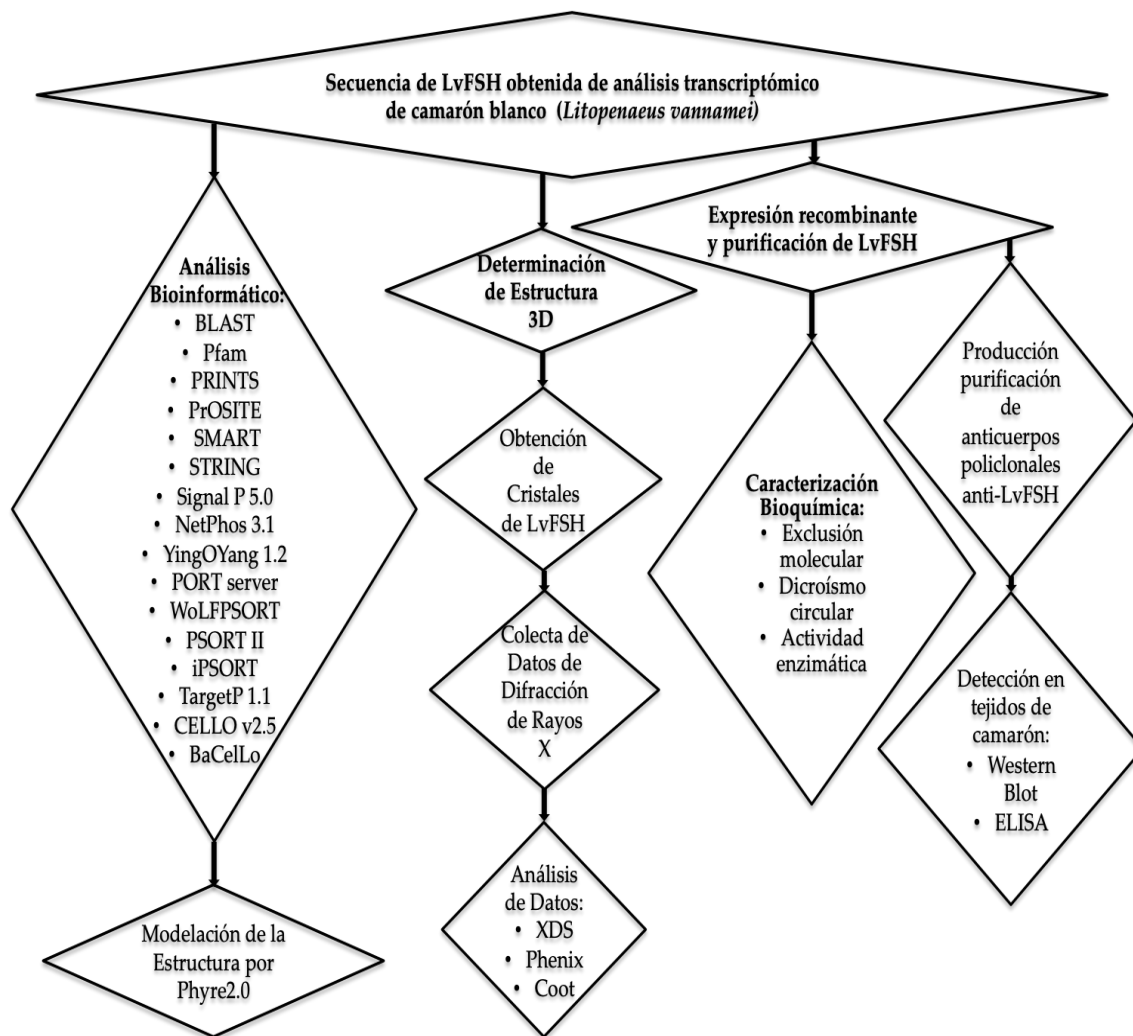
Determinar las constantes cinéticas K_m , V_{max} y k_{cat} de la enzima.

Inmunodetectar la proteína en diferentes tejidos de camarón.

Obtener cristales de proteína mediante algunos de los métodos de cristalización conocidos.

Determinar la estructura tridimensional de la proteína por cristalografía de rayos X.

DIAGRAMA DE FLUJO



MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico, bioquímico o biología molecular, según se requirió.

Análisis Bioinformático de la Secuencia

La secuencia de aminoácidos fue obtenida a partir de un transcrito de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) reportado por Ghaffari, et al (2014).

Alineamientos

La secuencia deducida de aminoácidos fue primeramente analizada utilizando la herramienta BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mediante el uso de herramientas web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Este análisis produjo múltiples hits BLAST para cada una de las bases de datos de proteínas, que se examinaron.

Búsqueda de Dominios

Herramientas como: Pfam (Protein Families Database of Alignments and HMM <http://pfam.xfam.org>; El-Gebali et al., 2019), InterPro (protein sequence PRINTS BLAST analysis & classification; www.ebi.ac.uk/interpro), (http://umbr.sbs.man.ac.uk/dbbrowser), PROSITE (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/prosite>; Sigrist et al., 2013), ProDom (<http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/home.php>; Bru et al., 2005), SMART (Simple Modular Architecture Research Tool; <http://smart.embl-heidelberg.de/>; Letunic et al., 2015; Letunic et al., 2018) y ELM (Eukaryotic Linear Motif <http://elm.eu.org>), este último especializado para eucariotes, se utilizaron para la búsqueda de dominios funcionales en la secuencia de estudio. Estas herramientas están basadas en el alineamiento y comparación con bases de datos de proteínas ya reportadas.

Interacciones Proteína - Proteína

La identificación de posibles sitios de interacción proteína-proteína se realizó mediante la herramienta STRING (<http://string-db.org>; Szklarczyk et al., 2019).

Péptido Señal y Modificaciones Post-Traduccionales

Para identificar la presencia de péptido señal y modificaciones post-traduccionales, la secuencia fue analizada en el portal SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Almagro et al., 2019) y NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>; Blom et al., 1999). Se realizó un análisis en el servidor YinOYang 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang>; Gupta, 2001; Gupta y Brunak, 2002) para predicciones de los sitios de unión O- β -GlcNAc.

Localización Subcelular

Para proponer la probable localización celular de la proteína la secuencia aminoacídica fue analizada en el sitio PORT WWW Server (Prediction of Protein Sorting Signals and mediante las herramientas: WoLFPSORT Prediction, PSORT II Prediction, iPSORT Prediction. También se utilizó TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>; Emanuelsson et al., 2000) y CELLO v.2.5 (subCELLular Localization predictor <http://cello.life.nctu.edu.tw>; Yu et al., 2004; Yu et al., 2006) y BaCelLo (Balanced Subcellular Localization Predictor (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/bacello/index.htm>; Pierleoni et al., 2006). TargetP 1.1 predice la ubicación subcelular de las proteínas eucariotas. La asignación de ubicación se basa en la predicción de cualquiera de las pre-secuencias N-terminales: péptido de tránsito de cloroplasto (cTP), péptido de orientación mitocondrial (mTP) o péptido señal de la vía secretora (SP). Para las secuencias que se predice que contienen una presencia de secuencia N-terminal, también se puede predecir un sitio de escisión potencial.

Modelación de la Estructura Tridimensional.

Así mismo, a partir de la secuencia de aminoácidos se llevó a cabo la modelación de la estructura, mediante el uso del sitio web Phyre² (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=índice)(Kelley et al., 2015). La calidad del

modelo obtenido en Phyre² se evaluó con la Herramienta ProQ2 dentro de la misma plataforma de Phyre², además del servidor ProSA ([//prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php](http://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php)) (Wiederstein & Sippl 2007; Sippl, 1993). Las figuras estructurales fueron creadas usando PyMol (Schrodinger, 2010). El volumen molecular medio de los sustratos *p*-nitrofenil acetato y *p*-nitrofenil laurato se calcularon utilizando el software de cristalografía Olex2 (Dolomanov et al., 2009) y se optimizaron en su estructura 3D utilizando el software Avogadro (Hanwell et al., 2012), aplicando los cálculos de la mecánica molecular.

Sobreexpresión Recombinante y Purificación de la Proteína LvFSH

Diseño de Gen Sintético

Para la sobreexpresión de la proteína en bacterias *E. coli* se diseñó un plásmido recombinante (gen sintético). La secuencia nucleotídica codificante de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés la cual fue optimizada para su expresión en bacterias, fue introducida dentro del plásmido de expresión pJExpress414, además se agregó una cola de histidinas para facilitar la purificación de la proteína, un gen de resistencia a ampicilina para la selección de colonias transformadas, y el sistema de expresión del operon *lac* para la inducción con IPTG de la expresión de la proteína. La obtención del gen sintético fue de manera comercial a la compañía DNA 2.0.

Transformación de Bacterias *E.coli* BL21 SI

Se utilizaron 10 ng del gen sintético obtenido comercialmente, para transformar bacterias de expresión *E. coli* BL21 inducibles con sal (SI) mediante shock térmico. 1 µl de plásmido se agregó a una alícuota de 50 µl de bacterias de expresión *E.coli* BL21-SI competentes, la mezcla se calentó 30 s a 42 °C e inmediatamente después se colocó en baño de hielo. Posteriormente se agregaron 250 µL de medio SOC y se incubó durante 1 h a 37 °C con agitación 225 rpm. Pasado el tiempo de incubación se extendieron 50, 100 y 150 µL en placas de medio agar Luria Broth sin sal, conteniendo ampicilina 100 µg/mL, las cuales fueron incubadas a 37 °C toda la noche (Sambrook, 1989).

Cinética de Sobreexpresión de la Proteína LvFSH Recombinante.

Una colonia aislada de las placas de transformación fue utilizada para inocular 100 mL de medio de cultivo líquido Luria Broth (LB) sin sal conteniendo 100 µg/mL de ampicilina y 30 µg/mL de cloranfenicol. Las bacterias se crecieron a 37 °C con agitación (225 rpm), el cultivo fue monitoreado espectrofotométricamente a 600 nm, cuando este llegó a 0.6 de densidad óptica se indujo la expresión de la proteína de interés agregando IPTG y NaCl a concentración final de 1 mM y 0.3 M, respectivamente. Se tomaron muestras de 2 mL al tiempo cero y a 2, 4, 6 y 24 h post inducción.

Las muestras se centrifugaron a velocidad máxima en una microcentrifuga refrigerada eppendorf 2415 R, el medio de cultivo fue descartado. Las bacterias se resuspendieron en 250 mL de buffer lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7.4 DTT 1mM, PMSF 0.5 mM, benzamidina 5 mM, NaCl 0.5 M) y sonicaron en baño de hielo mediante 4 pulsos de 10 s. El lisado se centrifugó a 6000 x g para separar la fracción soluble e insoluble. Estas fueron analizadas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Laemli, 1970). La fracción soluble se mezcló con buffer muestra para electroforesis 2X conteniendo Tris-HCl 0.125 M, SDS 4 %, glicerol 20 %, β-mercaptoetanol 355 mM, azul de bromofenol 0.05 %, mientras que la fracción insoluble se agregaron directamente 50 µl del buffer muestra 2X. Las proteínas fueron visualizadas por fluorescencia agregando 0.5 % de 2,2,2-tricloroetanol (TCE) a la mezcla de poliacrilamida en la preparación de los geles (Ladner et al., 2004).

Sobreexpresión de la Proteína LvFSH Recombinante

Un matraz con 25 ml de medio Luria Broth (LB) conteniendo 100 µg/mL de ampicilina y 30 µg/mL de cloranfenicol se inoculó utilizando un stock de glicerol de bacterias *E. coli* BL21 SI transformadas con el gen sintético conteniendo la región codificante para la proteína LvFSH este inóculo fue incubado toda la noche a 37°C con agitación constante 225 rpm. Al día siguiente, se utilizó para inocular 1 L de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina, 30 µg/mL de cloranfenicol y 20 ml de glucosa al 20 % estéril. El cultivo se creció a 37°C con agitación constante de 225 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm, para luego inducir

la expresión de la proteína añadiendo IPTG y NaCl a una concentración final de 1 mM y 0.3 M, respectivamente y se dejó incubando toda la noche en las mismas condiciones. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación a 3500 x g a 4°C por 20 min en una centrífuga Sorvall RC 5C Plus. Finalmente las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a la misma velocidad a 4°C por 20 min (Coligan, 2013).

Purificación de la Proteína LvFSH Recombinante

Para llevar a cabo la purificación de la proteína LvFSH recombinante de camarón, el pellet bacteriano fue resuspendido a una razón de 4 - 5 mL/g de bacterias, en buffer de lisis conteniendo Tris-HCl 20 mM pH 7.4, DTT 1mM, PMSF 0.5 mM, benzamidina 5 mM, NaCl 0.5 M y 0.1 mg/mL de lisozima de huevo. La suspensión bacteriana fue sonicada en baño de hielo con 5 pulsos de 10 s c/u, se centrifugó a 35000 xg por 30 min a 4 °C. Al sobrenadante obtenido se agregó estreptomicina al 0.7 % (p/v) para eliminar ADN contaminante se centrifugó nuevamente a 35000 xg por 30 min a 4 °C.

La purificación de la LvFSH recombinante se realizó mediante cromatografía de afinidad a metales, utilizando un cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare, Suecia). El extracto crudo clarificado obtenido de la lisis bacteriana fue aplicado a una columna His-Trap HP de 5 ml previamente equilibrada en buffer A conteniendo Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 500 mM. La elución de la proteína unida a la matriz se realizó con un gradiente del 0 al 500 mM de imidazol en buffer A. Se colectaron fracciones de 3 mL

Un segundo paso de purificación mediante cromatografía de hidrofobicidad fue necesario para obtener la proteína pura. Las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad a metales conteniendo la proteína de interés, fueron equilibradas con buffer de unión conteniendo fosfato de sodio 25 mM pH 7.4, NaCl 3M y cargadas a una columna de 5 mL de interacción hidrofóbica (Buthyl sepharosa HP) previamente equilibrada en este mismo buffer, la proteína unida a la matriz fue eluida mediante un gradiente inverso de NaCl utilizando el mismo buffer de unión sin sal. Se colectaron fracciones de 2 mL.

En ambas cromatografías las fracciones conteniendo proteína, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %, en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Laemli, 1970). Las proteínas fueron visualizadas por fluorescencia como se menciona anteriormente.

Caracterización Bioquímica de la Proteína LvFSH Recombinante

Análisis de la Estructura Secundaria por Dicroísmo Circular.

Los espectros de CD se adquirieron en un espectrofotopolarímetro Jasco J-810 CD en el rango de UV lejano (190 - 240 nm), utilizando una celda de longitud de trayectoria de 0.1 cm. Los espectros de CD se registraron a 25°C, cada 0.5 nm con un promedio de tiempo/punto de 4 segundos y un paso de banda de 1 nm con una velocidad de exploración de 100 nm/min. Los espectros se corrigieron para el buffer de fosfato 25 mM, pH 7.4 y se suavizaron. El contenido de la estructura secundaria se determinó mediante el análisis de las unidades delta épsilon ($\Delta\epsilon$) con el algoritmo SELCON disponible en el servidor DICHROWEB (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/>) en Birkbeck College, REINO UNIDO (Whimore y Wallace, 2004).

Determinación del Peso Molecular y de la Estructura Cuaternaria.

La estructura cuaternaria de la proteína se determinó mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superdex 75 (GE Healthcare, EE.UU.). El peso molecular se calculó mediante regresión lineal utilizando el tiempo de elución de los estándares como referencia. La columna se equilibró previamente con tres volúmenes de columna de buffer de corrida (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM) y luego se calibró con estándares de peso molecular: Conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), A ribonucleasa (13.7 kDa) y aprotinina (3.5 kDa). La proteína LvFSH se equilibro con buffer de corrida y se aplicaron 250 μ l a la columna.

Actividad Enzimática.

La actividad enzimática se determinó mediante la técnica reportada por Kademi et al., 2000 modificado, utilizando *p*-nitrofenil-ésteres como sustrato (*p*-nitrofenil acetato y *p*-nitrofenil laurato) los cuales al ser hidrolizados por la enzima, generan un compuesto colorido (*p*-nitrofenol), el cual fue monitoreado a 410 nm. En celdas de cuarzo de 2 mL y un 1 cm de paso de luz, se realizaron reacciones de 2 mL conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, 0.2 % (v/v) de Triton X-100, la enzima y el sustrato. El ensayo fue realizado con control de temperatura a 37 °C. Los ensayos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro multicelda (Agilent 8453) del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora, bajo la supervisión del Dr. David Corona. Las unidades de actividad fueron calculadas utilizando el coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol en las condiciones del ensayo ($12750 \text{ cm}^2\cdot\text{mmol}^{-1}$). Una unidad de actividad específica fue expresada como μmoles de *p*-nitrofenil por minuto por mg de proteína.

La actividad enzimática de dihidrofolato reductasa (DHFR) se determinó mediante ensayo espectrofotométrico (Blakley, 1995), utilizando ácido dihidrofólico y NADPH. La absorbancia se midió a 340 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Cary 50, Varian) en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. En todos los ensayos enzimáticos, se usó 60 μg de LvFSH recombinante por 1 mL de volumen de reacción final.

Determinación de Constantes Cinéticas

Mediante el análisis del efecto de la variación de sustrato, se determinaron las constantes cinéticas como: K_m , V_{max} , k_{cat} y eficiencia catalítica, para cada uno de los sustratos utilizados.

Determinación de la Estructura Tridimensional de la Proteína LvFSH

Obtención de Cristales

Para llevar a cabo la pruebas de cristalización, la proteína LvFSH purificada cromatográficamente como se mencionó con anterioridad, fue sometida a un “un tercer paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular, utilizando un sistema AKTA

Purifier equipado con una columna Superdex 75 G/300 previamente equilibrada con buffer de corrida conteniendo de fosfato de sodio 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM. Alrededor de 1 mL de muestra fue aplicada a la columna y se colectaron fracciones de 0.5 mL, las cuales fueron analizadas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Laemli, 1970). Las fracciones conteniendo únicamente la banda de alrededor de 27 kDa se mezclaron y fueron dializadas exhaustivamente contra buffer de fosfato de sodio 25 mM, pH 7.4 y posteriormente concentradas a 10 mg/mL de proteína por utilizando un centricon de 10 kDa (Amicon, Millipore, Billerica MA, EE. UU.). Previo a las pruebas de cristalización la muestra fue filtrada utilizando un filtro de 0.2 μ m.

Para encontrar las condiciones para obtener cristales de proteína se realizó un screening de condiciones precipitación utilizando tres kits comerciales de cristalización (Crystal Screen 1 y 2 e Index, Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA). En la Figura 12 se muestra un esquema del método de micro Bach utilizado, los experimentos se realizaron en microplacas Greiner (BioOne, USA). En cada pozo se mezcló 1 μ L de la proteína LvFSH concentrada (10 mg/mL) con 1 μ L de la solución de precipitante, posteriormente se colocaron 10 μ L de aceite de parafina para evitar evaporación para finalmente colocar las placas en una cámara a 16 °C. Al paso de 1 semana se revisaron periódicamente las placas y se documentó la formación de los cristales en las condiciones donde fue el caso.

Colecta de Datos de Difracción de Rayos X

Los cristales de proteína LvFSH recombinante obtenidos se colocaron el “loops” según el tamaño y se súper enfriaron (100 K) con nitrógeno líquido. Para evitar la formación de cristales hielo y por lo tanto daño a los cristales se utilizaron soluciones crioprotectantes previamente preparadas a partir de la solución de cristalización (condición precipitante) y glicerol (10 - 30 %).

La colecta de datos se llevó a cabo en la fuente de radiación sincrotrón de Stanfford (SSRL) San Francisco, CA, USA. Los experimentos se realizaron en la línea 14-1 (Beamline 14-1) provista de un detector MARmosaic325 CCD. Se utilizó una longitud de onda de 1.181 Å.

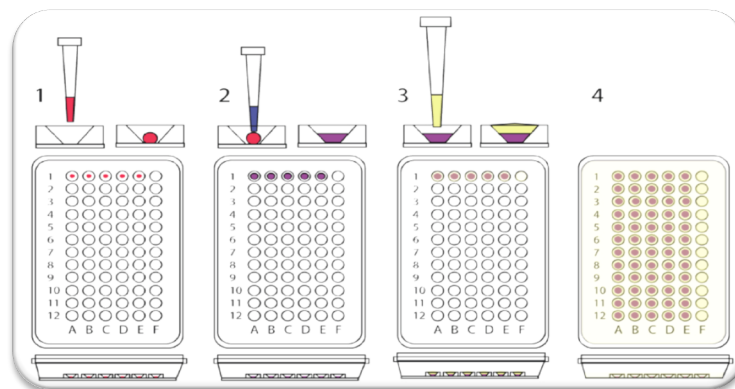


Figura 12. Esquema de cristalización de proteínas por el método de Microbatch (<https://sine2020.eu/about/the-road-to-the-ess/phase-diagram.html>).

Procesamiento y Análisis de los Datos de Difracción de Rayos X

Los datos se indizaron, fusionaron y escalaron utilizando el paquete de software XDS. Posteriormente se realizó el reemplazo molecular en la plataforma de PHENIX (Python-based Hierarchical ENvironment for Integrated Xtallography) (Liebschner et al., 2019), utilizando el modelo teórico obtenido por Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=índice>) basado en la estructura de la proteína FSH1/Yhr049wp de *Saccharomyces cerevisiae* (27 % identidad) depositada en el Protein Data Banck (PDB 1YCD). El refinamiento de la estructura obtenida se realizó con PHENIX y la construcción manual con COOT (Emsley et al. 2010) utilizando el mapa 2Fo-Fc a 0.5 Amstrong y omitiendo los mapas elaborados en PHENIX. La estructura se validó con MolProbity (Chen et al., 2010). Finalmente, las figuras fueron elaboradas con MacPyMOL (Schrödinger, 2010)(Figura 13).

Detección de la Proteína LvFSH en Tejidos de Camarón.

Producción de Anticuerpos Policlonales contra la Proteína LvFSH en Conejo.

La localización de la proteína LvFSH en el camarón se realizó mediante inmunodetección de la misma en diferentes tejidos de este organismo. Para lo anterior, se produjeron anticuerpos policlonales en conejo, para lo cual un conejo macho adulto previamente aclimatado al Bioterio del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (25 °C, alimentación diaria (Purina)) se inmunizó con la proteína LvFSH siguiendo la metodología de Leenaars y Hendriksen (2005). El trato y mantenimiento del conejo fue infringiendo el menor daño posible y sin culminar en el sacrificio del mismo.

La primera inmunización se realizó inyectando al conejo una mezcla de solución de proteína LvFSH recombinante pura de camarón (*Litopenaeus vannamei*) de 2 mg/mL en solución salina, con adyuvante Freund completo (Sigma-Aldrich Freund's Adjuvant complete) en proporción 1:1 (v/v), para obtener una concentración final de 1 mg/mL de proteína. Esta mezcla fue inyectada al conejo mediante cinco punciones subcutáneas. Después de 28 días, se realizó una re-inoculación ("booster") igual a la anterior, pero utilizando adyuvante Freund incompleto (Sigma-Aldrich Freund's Adjuvant incomplete). Transcurrida una semana, se



Figura 13. Diagrama de flujo de procesamiento y análisis de datos de difracción de rayos X (Garcia Lopez, 2017).

procedió a sangrar al conejo por medio de dos cortes en ambas orejas. La sangre colectada se mantuvo en reposo durante 2 h, posteriormente se centrifugó a 8000 xg, para separar el suero del paquete celular. El suero obtenido se almacenó a 4 - 10 °C hasta la purificación de los anticuerpos (Leenaars y Hendriksen 2005).

Purificación de los Anticuerpos (IgG) Anti-LvFSH

La purificación de los anticuerpos o inmunoglobulinas G, (IgG) se llevó a cabo en un cromatógrafo Pharmacia Biotech Optical Unit UV-1 y Pump P-1 (Amersham Bioscience, GE Healthcare Life Sciences) mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de proteína A (Calderón de la Barca et al., 2000) enlazada a MiniLeak (capacidad 20 mg de IgG/mL). Para lo anterior, el suero fue diluido en partes iguales (v/v) con buffer conteniendo Tris-HCl 0.2 M, NaCl 2 M pH 8.6 y equilibrado por 10 min, para posteriormente aplicarse a un flujo de 1.5 mL/min a la columna previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 0.1 M, NaCl 1M pH 8.6. Posteriormente se realizó un lavado con el mismo buffer hasta que el registro a 280 nm del detector fue estable colectando fracciones de 3 mL (fracción no unida). Para la elución de las IgG's, se utilizó buffer de citrato de sodio 0.1 M, pH 3, colectando las fracciones en partes iguales (v/v) de buffer frío de K₂HPO₄ 0.2 M, pH 9 para neutralizar el pH. Las fracciones conteniendo las IgG (anticuerpos anti-LvFSH) puras se diafiltraron con 2 volúmenes de solución salina y concentraron, utilizando una celda amicón en baño frío con una membrana de corte de 10 kDa (Amicón Inc). Finalmente a los anticuerpos anti-LvFSH purificados y concentrados fueron llevados a una concentración final de 10 mM de azida de sodio para su almacenamiento en refrigeración a 4 °C, hasta su caracterización y utilización en los ensayos de inmunodetección.

Titulación de los anti-LvFSH Mediante Inmunoensayo de Manchas (Dot Blot)

Los anticuerpos se caracterizaron mediante un ensayo “dot blot”, utilizando los buffers y protocolos descritos en Protein Blotting Guide (Bio-Rad) y Towbin et al., 1979. Se cortaron tiras de 1.5 x 10 cm de membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 2 µm (Inmun-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad). Las membranas se ambientaron en buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5 (TBS) y se aplicaron 2 µL una solución de 0.228 mg/mL de proteína

LvFSH pura y diluciones seriadas de: (1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000, 1:1,000,000). Se aplicaron 2 μ L de TBS como control en cada una de las tiras (Figura 14); una vez absorbidas las muestras las membranas se sumergieron en buffer de bloqueo (TBS, Blotting Grade Blocker Bio-Rad 5 %, Tween 20 2 %) y se incubaron toda la noche en agitación a temperatura ambiente.

Después de completar el bloqueo, se realizaron diluciones del anticuerpo anti-LvFSH (1:500, 1:1,000 y 1:1,500) en buffer de incubación conteniendo Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0.05 %, pH 7.5 las cuales se utilizaron para incubar una membrana cada una, durante una hora en agitación y temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación las membranas se lavaron 3 veces por 5 minutos con buffer de lavado Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0.05 %, pH 7.5 (TTBS). Posteriormente, se incubaron una hora con un segundo anticuerpo (Goat anti-rabbit-AP Bio-Rad), en una dilución de 1:5,000, en buffer de incubación. Después, se realizaron 3 lavados por 5 minutos con buffer de lavado; finalizando con un 1 lavado de 5 min con agua destilada. Las membranas se revelaron agregando el sustrato en buffer Tris/HCl 100 mM, 0.5 mM MgCl pH 9.5 (Kit Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Bio-Rad) de la enzima fosfatasa alcalina (AP) acoplada al segundo anticuerpo siguiendo las instrucciones del producto. La reacción colorida se detuvo lavando la membrana con agua destilada por 10 minutos en agitación y secando las membranas a temperatura ambiente. Se realizaron controles: sin ningún anticuerpo, sin primer anticuerpo (anti-LvFSH) y sin segundo anticuerpo (Goat anti-rabbit-AP).

Inmunodetección de Proteína LvFSH en Tejidos de Camarón Blanco

Obtención de extractos proteicos de tejidos de camarón

Diez ejemplares adultos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de 6 g donados por Laboratorio de Fisiología de Invertebrados Marinos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) fueron disectados para obtener muestras de músculo, pleópodos, branquias, intestino, intestino posterior, estómago y hepatopáncreas (Figura 15); los tejidos fueron almacenados a -80 °C hasta su uso para la extracción de proteínas según Rivera-Pérez et al., 2011a.

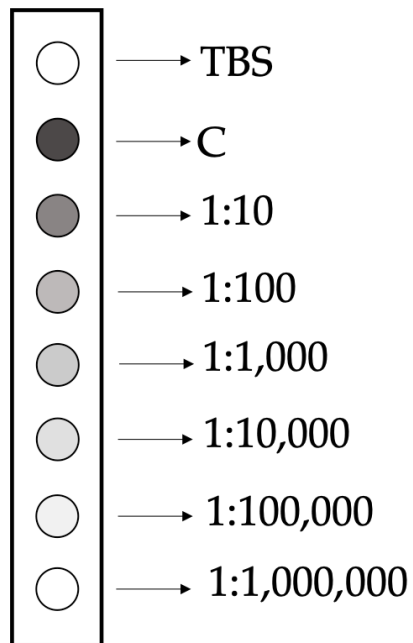


Figura 14. Esquema de inmunoensayo “Dot Blot”. TBS (blanco), C (Proteína LvFSH purificada) y diluciones seriadas de la misma.

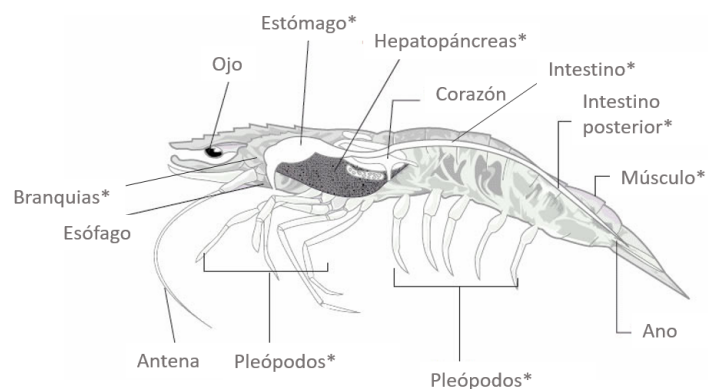


Figura 15. Anatomía interna y externa de camarón. Las estructuras marcadas con asterisco fueron los tejidos diseccionados para la obtención de extractos proteicos (músculo, pleópodos, branquias, intestino, intestino posterior, estómago y hepatopáncreas) y pruebas de inmunodetección. Modificado de FAO (2001).

Cada tejido se mezcló con buffer de homogenización (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, PMSF 0.5 mM pH 8) a razón de 1:1 (w/v) y se sonicaron en hielo mediante 4 pulsos de 10 segundos, intercalando 10 segundos de reposo para evitar desnaturalización. El homogenado se centrifugó a 6000 xg a 4 °C, separando sobrenadante de pellet. Tanto los sobrenadantes como los pellets se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Se determinó la concentración de proteína de los extractos mediante BCA y se prepararon muestras para su análisis electroforético SDS-PAGE utilizando buffer carga 2X; se cargaron 40 µg de cada muestra en el gel.

Inmunodetección mediante Western blot

La localización de la proteína LvFSH se llevó a cabo mediante inmunodetección por Western Blot haciendo uso de los anticuerpos policlonales producidos en conejo (anti-LvFSH) previamente obtenidos. Los reactivos, buffers y protocolos de transferencia fueron los descritos en Protein Blotting Guide (Bio-Rad, Third Edition) y Towbin et al. (1979).

Primeramente, las proteínas presentes en cada uno de los extractos de los diferentes tejidos fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida de 12 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y reductoras. En cada pozo se cargaron 40 µg de proteína, cada tejido se analizó por duplicado y cada gel fue replicado 3 veces, de los cuales uno fue utilizado para tinción con azul de Coomassie y los otros dos para transferencia a membrana de las cuales una fue utilizada para tinción con azul de Coomassie y la segunda para la inmunodetección. Además en cada gel, fueron incluidos un control de proteína LvFSH pura, un marcador de peso molecular de amplio rango (Broad Range WM, BioRad) y un marcador de transferencia (Kaleidoscopio Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards, Bio-Rad). Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a las membranas de PVDF de 0.2 µm. La transferencia se realizó en TransBlot SD Semi Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Los papeles filtro (Extra Thick Blot Paper, Filter paper, Bio-Rad) y membrana (2 µm, Inmun-Blot Membrane, Bio-Rad) se acondicionaron en buffer de transferencia Towbin con SDS (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, etanol 20 % (v/v), SDS 0.025–0.1 %, pH 8.3). La transferencia se realizó a 15 V por 20 min (Fuente de poder, VWR 300V). Terminada la transferencia una de las membranas fue teñida por 5 minutos con azul de

Coomasie y destañada 5 minutos con una solución de etanol al 50 %; por último se dejó secar en papel filtro para ser usada como referencia. Una segunda membrana fue usada para la inmunodetección de la LvFSH Primeramente, la membrana fue incubada toda la noche en solución de bloqueo (TBS, Blotting Grade Blocker Bio-Rad 5 %, Tween 20 2 %). Posteriormente, se realizó la inmunodetección siguiendo la metodología descrita para el Dot-Blot o ensayo de manchas, utilizando una dilución 1:1,000 de el anti-LvFSH como primer anticuerpo.

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Los ensayos ELISA fueron realizados en microplacas Falcon 3072 de 96 pozos (Becton Dickinson). Primeramente, se realizó una placa madre según el esquema mostrado en la Figura 16. A partir de una muestra pura de la proteína LvFSH a una concentración de 0.228 mg/mL se llevaron a cabo diluciones seriadas en buffer de carbonatos (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_2 35 mM pH 9.6). En una placa de ELISA fueron agregados 100 μL de cada dilución (1-11, 12 control sin LvFSH) y se incubó en agitación (VWR, Incubating Microplate Shaker) toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se descartó el exceso y se lavó la placa agregando 200 μL buffer de carbonatos/pozo por 3 minutos; nuevamente se descartó el exceso y se secó la placa con una secadora convencional sin calor. Se añadieron 200 μL de solución de bloqueo (Tris-HCl 0.10 M, Tween 20 0.05 %, rojo de fenol 0.05 %, azida de sodio 5 mM, Blotting Grade Blocker Bio-Rad 1 %, pH 7.3) y se dejó en agitación por 20 minutos. Se descarto el exceso y se realizaron cuatro lavados por 3 minutos con 200 μL buffer de lavado/dilución (Tris-HCl 0.10 M, Tween 20 0.05 %, rojo de fenol 0.05 %, azida de sodio 5 mM pH 7.3). Se añadieron 200 μL de una dilución (1:500) de el anticuerpo anti-LvFSH y se realizó una dilución seriada de forma vertical en la placa (A-G, H sin primer anticuerpo), y se incubo por 1 hora. Posteriormente se descarto el exceso y se realizaron cuatro lavados por 3 minutos con 200 μL buffer de lavado/dilución. Se agregaron 100 μL de un segundo anticuerpo (Goat anti-rabbit AP) en una dilución 1:2,000 en buffer de dilución y se incubó la

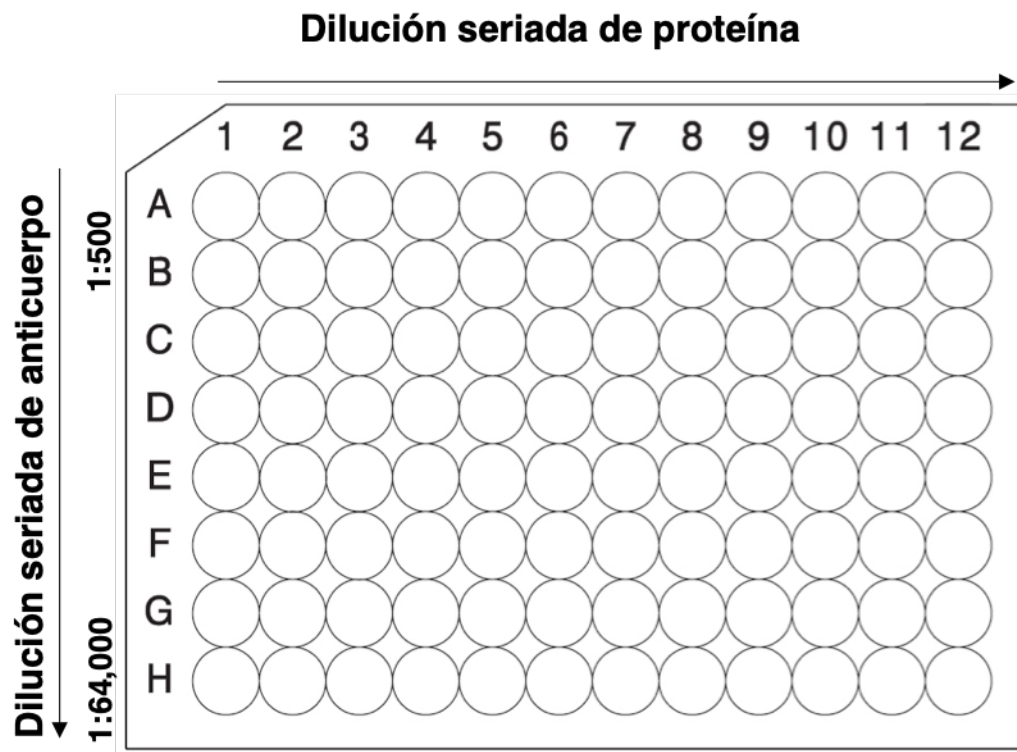


Figura 16. Esquema de placa madre y construcción de la curva estándar para la detección de LvFSH mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Dilución seriada de proteína (1-11, 12 sin LvFSH) de forma horizontal y dilución seriada de primer anticuerpo (anti-LvFSH) de forma vertical en la placa (A-G, H sin primer anticuerpo).

placa por 20 minutos. Se realizaron cuatro lavados por 3 minutos con 200 μ L buffer de lavado/dilución, además de un lavado por 3 minutos con 200 μ L buffer de fosfatos (fosfato de sodio 50 mM pH 7.4). Finalmente se desarrolló color agregando el sustrato de la enzima fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase Substrate Kit, Bio Rad), conjugada al segundo anticuerpo siguiendo las instrucciones del proveedor. La reacción enzimática se detuvo en la fase estacionaria con NaOH 0.4 mM. Finalmente, la placa fue leída a 415 nm en un lector de microplacas (iMark Microplate Reader, Bio-Rad) manejado con el programa Microplate Manager Software 6.3 (BioRad, 2017). A partir de el análisis de los datos obtenidos de la placa madre se determinaron: la dilución óptima de anti-LvFSH (1:5,000) así como los niveles de detección de la proteína LvFSH (0.227 - 0.0017734 μ g/mL).

Para la de inmunodetección por ELISA de la proteína en los tejidos de camarón se colocaron 100 μ L de el extracto proteico de los diferentes tejidos con 100 μ L de buffer de carbonatos, haciendo una dilución seriada de los mismos a lo largo de la placa; y se incubó toda la noche en agitación (VWR, Incubating Microplate Shaker) a temperatura ambiente. Al día siguiente, se descartó el exceso y se lavó con 200 μ L buffer de carbonatos por 3 minutos; se secó la placa con una secadora convencional sin calor. Se añadieron 200 μ L de buffer de bloqueo (Tris-HCl 0.10 M, Tween 20 0.05 %, rojo de fenol 0.05 %, azida de sodio 5 mM, Blotting Grade Blocker Bio-Rad 1 % pH 7.3) y se dejó en agitación por 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron cuatro lavados por 3 minutos con 200 μ L buffer de lavado/dilución (Tris-HCl 0.10 M, Tween 20 0.05 %, rojo de fenol 0.05 %, azida de sodio 5 mM, pH 7.3) y se añadieron 100 μ L de una dilución (1:5000) del anticuerpo anti-LvFSH, incubándose por 1 hora. Posteriormente se realizaron 4 lavados por 3 minutos con 200 μ L buffer de lavado/dilución y se agregaron 100 μ L de segundo anticuerpo (Goat anti-rabbit AP) en una dilución 1:2,000 y se incubó la placa por 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron 4 lavados por 3 minutos con 200 μ L buffer de lavado/dilución, además de un lavado por 3 minutos con 200 μ L buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4. Se eliminó el exceso y se desarrolló color agregando 100 μ L de el sustrato de la enzima fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase Substrate Kit, BioRad) siguiendo las instrucciones del proveedor; la reacción se detuvo en la fase estacionaria con NaOH 0.4 mM. Las placas fueron leídas bajo las

especificaciones mencionadas para la placa madre. Los obtenidos, se analizaron mediante comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) y análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Cada tejido se analizó por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Bioinformático de la Secuencia de LvFSH Obtenida de Transcriptoma de Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*)

Alineamientos

En el análisis de BLASTp de la secuencia deducida de aminoácido obtenida del transcriptoma del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), se encontró que mostró alta identidad con otras secuencias de proteínas hipotéticas o no caracterizadas, pertenecientes a la superfamilia de las α/β -hidrolasas, algunas de ellas con el con un dominio característico de las enzimas serina hidrolasas (FSH), específicamente con las de serina esterasas, donde están incluidas las carboximetil esterasas, lipasas y colinesterasas, sin embargo en ninguno de los reportes de las secuencias alineadas se demostró experimentalmente la actividad enzimática.

Por otro lado, la secuencia de estudio presentó identidad de 100 % con una secuencia obtenida de un genoma de camarón *Penaeus vannamei* denominada esterase OVCA2-like ([XP_027218885.1](#), (GenBank XP_027218885.1) (Zhang et al., 2019), y alta identidad con la secuencia de OVCA2 homóloga en diferentes organismos. En humanos la OVCA2, se ha estudiado y reportado como un importante supresor tumoral en diferentes tipos de cáncer. Mediante diferentes herramientas bioinformáticas y estructurales, tanto la proteína como el gen que la codifica, han sido ampliamente estudiados. Los reportes indican que la proteína pertenece a la súper familia de las α/β -hidrolasas y que muestra características estructurales conservadas en las serina hidrolasas (FSH), incluso se propone una posible actividad enzimática de esterasa, sin embargo no se han reportado datos experimentales de actividad enzimática (Azizi et al., 2006) (Figura 19). Otras herramientas utilizadas para el análisis de secuencia como FASTA, PSI-FASTA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/>), arrojaron resultados similares a los anteriormente mencionados. Quevillon et al. (2003, 2004 y 2005) llevaron a cabo un análisis combinado de proteómica computacional y experimental para detección de serina hidrolasas en levaduras. Ellos reportaron una proteína denominada FSH1 la cual, junto con otras dos serina hidrolasas de levaduras (FSH2 y FSH3), es miembro de una

nueva familia de serina hidrolasas de eucariontes a donde también pertenece la proteína 2 asociada a cáncer de ovario (OVCA2) y una dihidrofolato reductasa (DHFR) de *S. pombe*. La estructura contiene una tríada catalítica Ser/His/Asp característica de las α/β hidrolasas. La arquitectura del sitio activo putativo y las analogías con otras estructuras de proteínas sugiere que FSH1 puede ser una esterasa (Azizi et al., 2006). Al igual que con las FSH2 y FSH3, la FSH1 muestra un porcentaje de identidad de alrededor del 27 % con la secuencia del presente estudio.

Las enzimas esterasas actúan sobre los ésteres carboxílicos. El sistema catalítico involucra tres residuos de aminoácidos denominado tríada catalítica que incluye un residuo de serina, un glutamato o aspartato y una histidina. Estos residuos catalíticos son responsables del ataque nucleofílico en el átomo de carbono del carbonilo del enlace éster. En contraste con otros miembros de la súper familia α/β hidrolasa, las esterasas de tipo *p*-nitrobenzilo y acetilcolina tienen en la tríada catalítica un residuo Glu en lugar de Asp.

En la Figura 17 se muestra un alineamiento de la secuencia en estudio (LvFSH) con las secuencias que mostraron mayor identidad en los análisis de comparación de secuencias; las α/β hidrolasa de *S. pombe* y el like-OVCA2 esterasa de *Penaeus vannamei* reportada recientemente (Zhang et al., 2019; Di Tommaso et al., 2011; Moretti et al., 2007).

Comparación de Dominios Conocidos

El análisis de la secuencia de LvFSH con las herramientas InterPro y Pfam para la búsqueda de dominios comunes mediante comparación con proteínas conocidas mostró una alta homología (residuo 6-217) con proteínas de la superfamilia de las α/β -hidrolasas y un dominio característico de las enzimas serina hidrolasas (FSH) del residuo 8 al 202 y estos dominios fueron homólogos con los reportados en otras bases de datos de análisis y función de proteínas tales como: Superfamily 1.5 (HMM library and genome assignments server; <http://supfam.org/SUPERFAMILY/index.html>) (Gough et al., 2001) y CATH (Class, Architecture, Topology, Homology; <http://www.cathdb.info>; Dawson et al., 2017).



Figure 17. Alineamiento de la secuencia LvFSH y otros miembros de la familia FSH α/β hidrolasas. XP_027218885.1 esterasa OVCA2-like [*Penaeus vannamei*], AAB68901.1 | Yhr049wp [*Saccharomyces cerevisiae*], CAA20877.1 dihidrofolato reductasa Dfr1 [*Schizosaccharomyces pombe*].

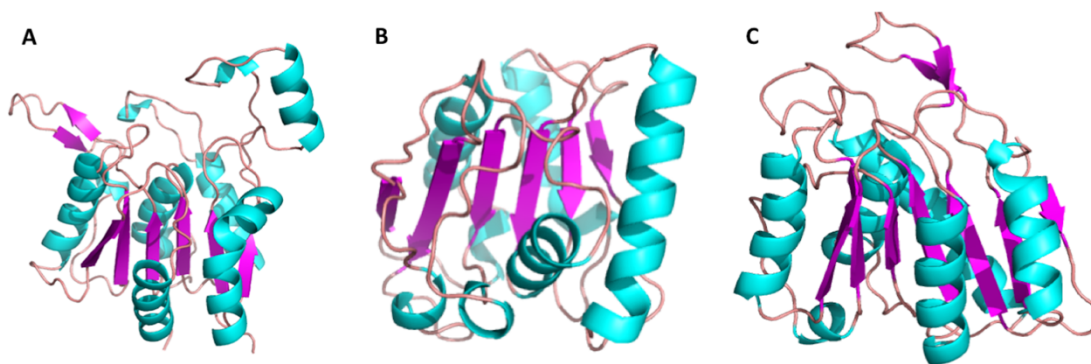


Figura 18. Plegamiento característico α/β hidrolasa/FSH. A, CE: 3.1.1.1 carboxilesterasa (3cn7); B, CE: 3.1.1.3 triacilglicerol lipasa (2qxt); y C, CE: 3.1.1.74 cutinasa (3esc).

El plegamiento α/β hidrolasa característico general consiste de un arreglo paralelo de láminas β rodeadas de α hélices (Figura 18). Enzimas como carboxiesterasas, tioesterasas y lipasas principalmente presentan este arreglo estructural característico y además del dominio común FSH (serina hidrolasa). Este arreglo estructural se ha observado también en proteínas hipotéticas o no caracterizadas como FSH1/YHR049wp, FSH2/YMR222cp, y FSH3/YOR280cp de *Saccharomyces*, la dihidrofolato reductasa DYR_SCHPO (SP36591) de *Schizosaccharomyces pombe* y el supresor tumoral de humano OVCA2 (Quevillon et al., 2005).

El plegamiento de α/β hidrolasa (Ollis et al., 1992) es común a varias enzimas hidrolíticas de origen filogenético y función catalítica muy diferentes, resultado probablemente de evolución de tipo convergente. Se cree que las enzimas se han separado de un ancestro común, conservando la disposición de los residuos catalíticos. En la mayoría de los miembros de esta superfamilia, las hojas beta del núcleo de la molécula son paralelas, pero en algunos casos se da una orientación anti paralela por la inversión de las primeras cadenas. Las enzimas pertenecientes a esta familia cuentan con una tríada catalítica, cuyos residuos se encuentran localizados en los lazos, uno de ellos denominado el codo nucleófilo, el cual es la característica estructural mejor conservada en el plegamiento α/β hidrolasa. Algunos miembros inactivos carecen de uno o todos los residuos catalíticos, pero otros pueden presentar residuos superficiales que participan en el reconocimiento del sustrato. En la base de datos ESTHER se encuentra recopilada información publicada relacionada con las secuencias de genes y proteínas de esta superfamilia (Lenfant et al., 2012).

Al utilizar la herramienta bioinformática SMART para analizar la secuencia de estudio, además de los dominios FSH, también se encontró homología estructural con las proteínas *dlauoa* de la base de datos de SCOP y Pfam (residuo 3–214; E-value $1e-8$) y 1ycd de PDB (residuo 11-199, E-value $8e-14$). Con menor significancia (E-value altos) fueron encontrados: el dominio DLH de la base de datos Pfam (residuo 71-202) y YccV-like de la base de datos SMART (residuo 107-192), el primero es característico de la familia de diene lactonas hidrolasas (Pathak y Ollis, 1990; Schlömann et al., 1993), mientras que el segundo de proteínas con afinidad a ADN (d'Alençone et al., 2003).

La búsqueda con ProDom identificó los mismos dominios que las bases de datos anteriores, sin embargo, este mostró un alineamiento estadísticamente significativo con una proteína tipo DHFR no caracterizada. Lo mismo sucedió en la búsqueda en la base de datos PRINTS, donde además de mostrar homología con alta significancia con la DHFR putativa, esta fue mayor con la dihidrofolato reductasa (DYR_SCHPO P36591) de *Schizosaccharomyces pombe* mencionada anteriormente (Bertani y Campbell, 1994). Sin embargo, cabe mencionar que en el presente estudio se determinó la actividad DHFR de la proteína LvFSH mediante ensayo espectrofotométrico de utilizando dihidrofolato como sustrato, y no se observó actividad catalítica de este tipo.

El análisis con la herramienta ELM (Eukaryotic Linear Motif ELM resource) consiste en la detección de arreglos lineales funcionales de aminoácidos, presentes en proteínas de eucariotes a partir de una base de datos de arreglos ya conocidos, la cual es utilizada como herramienta de búsqueda y predicción. Estos arreglos, son secuencias de aminoácidos lineales cortas (SLiMs, por sus siglas en Inglés) que son sitios de interacción de proteica. Están enriquecidos las regiones desordenadas (lazos) del proteoma y proporcionan un amplio rango de funcionalidad a las proteínas (Davey, 2011; Van Roey, 2014). Juegan un papel crucial en la regulación celular, por lo que pueden ser mimetizados por organismos hospederos patógenos para invadir y manejar las células huésped (Davey, 2011; Uyar, 2014). Los sitios funcionales ELM encontrados en el análisis de la secuencia y probablemente expuestos según el modelo estructural teórico, son enumerados en la Tabla 3. Es importante mencionar que dichos, *in vivo* pueden no ser funcionalmente verdaderos, ya que al ser lineales podrían estar ubicados hacia el núcleo de la proteína y no estar expuestos para su función en la estructura tridimensional. Azizi et al. (2006), reportaron un análisis bioinformática detallado de la proteína OVCA2 de humano, donde la herramienta ELM predijo 18 sitios proteicos funcionales de los cuales 4 fueron comunes con la proteína de estudio. Un sitio especie específico fue sugerido (DOC_PP2B_LxvP_1), el cual será importante describir en la estructura tridimensional experimentalmente obtenida.

Mediante PROSITE y Predict Protein, se identificaron un sitio de glicosilación (N-glicosilación), 5 sitios de fosforilación por proteína cinasa C (posiciones 2-4, 5-7, 24-26, 132-

Tabla 3. Sitios ELM de posible interacción proteica .

ELM	Secuencia	Posición	Descripción
CLV_C14_Caspase3-7	DDKDG	58-62	Sitio de rompimiento de Caspasa-3 y Caspasa-7
DOC_MAPK_DCC_7	KITLPTLHV	156-164	Sitio de acoplamiento de cinasas mediando la interacción de ERK1/2 y MAP cinasas de la subfamilia p38
DOC_MAPK_MEF2A_6			
DOC_MAPK_gen_1	RKLLKKQV	33-42	Las moléculas que interactúan con MAPK (por ejemplo, MAPKK, sustratos, fosfatasas) tienen un sitio de acoplamiento que ayuda a regular la interacción específica en la cascada de MAPK. El motivo clásico se aproxima (R/K) xxxx#x# donde # es un residuo hidrófobo.
	EF KLLKKQVE F	34-42	
DOC_PP1_RVXF_1	LKKQVEFE	36-43	El sitio de interacción de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 (PP1c) se une a las proteínas dirigidas que se acoplan al sustrato para la desfosforilación. El sitio definido es [RK] {0,1} [VI] [^P] [FW].
DOC_PP2B_LxvP_1	LEVP	49-52	Sitio de acoplamiento en sustratos de calcineurina que se une a la interfaz del CNA catalítico y las subunidades reguladoras del CNB.
DOC_WW_Pin1_4	FMTSPL	44-49	El sitio de interacción del dominio WW de clase IV se reconoce principalmente por la prolil isomerasa dependiente de fosforilación de Pin1.
LIG_CaM_IQ_9	ICGLQQQG KLSYSFKFA	120-136	El sitio del péptido helicoidal es responsable de la unión independiente de Ca ⁺² de la CaM. y se caracteriza principalmente por un residuo hidrofóbico en la posición 1, un Gln altamente conservado en la posición 2, cargas básicas en las posiciones 6 y 11, y una Gli variable en la posición 7
LIG_LIR_Gen_1	TGAFRKL	29-35	Sitio canónico LIR que se une a los miembros de la familia de proteínas Atg8 para mediar los procesos involucrados en la autofagia.
LIG_MYND_3	VPPE	51-55	Un sitio variante de unión de MYND encontrado en las co-chaperonas HSP90 p23 y FKBP38 que interactúan con el dominio PHD2 MYND.
LIG_PDZ_3	KMRELC	214-219	El sitio C-terminal de unión a PDZ clase 3 está representado clásicamente por un patrón (DE) X (VIL) *
LIG_SH2_STAT5	YFHD YVKF	183-186 208-211	Sitio de unión al dominio STAT5 Src homolog 2 (SH2).
MOD_CK2_1	NGSTFRE FMTSPLE	21-27 44-50	
MOD_NEK2_1	FEESLG LSYSFK	87-92 129-134	Sitio de fosforilación de NEK2 con preferencia por Phe, Leu o Met en la posición -3 para compensar los residuos menos favorables en la posición +1 y +2.
MOD_Plk_1	FEESLGA	87-93	Residuo Ser/Thr fosforilado por la cinasa Plk1
MOD_ProDKin_1	FMTSPLE	44-50	Sitio de fosforilación de cinasa dirigida por prolina (por ejemplo, MAPK) en eucariotas superiores.
TRG_ENDOCYTIC_2	YVKF	208-211	Señal de clasificación basada en tirosina responsable de la interacción con la subunidad mu del complejo AP (Adaptor Protein).

134); 4 sitios de fosforilación de la caseína cinasa II (24-27, 47-50, 56-59, 69-72) y 4 sitios de N-miristoilación (92-97 114-119 118-123, 202-207), será importante revisar la localización de estos sitios en la estructura tridimensional, ya sea a partir de la modelación teórica y/o experimental (Difracción de Rayos X y/o RMN).

Interacciones Proteína-Proteína

La identificación de posibles sitios de interacción proteína-proteína mediante la herramienta STRING (<http://string-db.org>) utilizando la homología de la secuencia con la proteína FSH3 de *Saccharomyces cerevisiae*, el resultado más relevante fue una posible interacción con el dominio LIDH hidrolasa (Pfam) presente en la proteína LDH1 (Lipid droplet hidrolase) la cual es una serina hidrolasa que presenta actividad esterasa además de una actividad lipasa débil hacia triacilglicerolos. Se ha propuesto que interviene en la homeostasis lipídica, regulando los niveles de fosfolípidos y lípidos no polares donde se encuentra localizada y que es requerida para la movilización los lípidos almacenados en pequeñas gotas. Esta enzima contiene la clásica tríada catalítica Ser-Asp-His y el dominio conservado GxSxG (Thoms et al., 2011). Por lo tanto, la posible interacción predicha puede indicar una colocación física de LvFSH y LDH1 que conduciría a una movilización de grasa más eficiente en los depósitos de lípidos.

Péptido Señal y Modificaciones Post-Traduccionales

La herramienta SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services>) no reportó presencia de péptido señal en la secuencia de estudio. Los posibles sitios de fosforilación predichos por NetPhos 3.1 se encontraron en nueve residuos de serina (posiciones 5, 23, 47, 56, 64, 90, 130, 132 y 177), 5 de treonina (2, 6, 24, 96 y 161) y tirosina 174. El análisis de sitios de unión de O- β -GlcNAc encontró una serina (140) susceptible a N-acetil glicosilación, así mismo encontró que la treonina 2 así como la serina 5 como probables sitios YinOYang es decir residuos que se predice que están O-glico-N-acetilados y/o fosforilados, es decir que tales sitios pueden ser modificados de forma reversible y dinámica por O-N acetilglicanos o grupos de fosfato en diferentes celulares (Gupta, 2001; Gupta y Brunak, 2002). Estos resultados sugieren que LvFSH podría ser susceptible a la regulación postraducciona por fosforilación.

Localización Subcellular

Tanto la predicción utilizando PSORT II como las herramienta CELLO y BaCelLo señalaron a la mitocondria como la probable sitio localización de la proteína de interés. Además, las herramientas iPSORT Prediction y TargetP 1.1 Server, aunque con baja probabilidad predijeron un péptido de orientación mitocondrial en el extremo N-terminal. La presencia de dentro de las mitocondrias una enzima lipolítica sugiere su potencial participación durante etapas de movilización de lípidos, como la inanición.

Modelación

En la Figura 19 se presenta la estructura obtenida de la modelación realizada en Phyre² a partir de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína LvFSH. Esta modelación esta basada en la estructura de el PDB 1YCD, la cual fue obtenida de datos cristalográficos de una proteína de 27 kDa con función desconocida codificada por el gen *Yhr049w* denominada FSH1, a partir de estudios de genómica estructural de serina hidrolasas de levadura (Quevillon et al., 2003, 2004) y que tiene alrededor de un 27 % de identidad (Figura 19a) con la proteína de interés. Phyre² también realizó modelos alternativos con estructuras de proteínas (PDB) con menor grado de identidad pero todas pertenecientes a la súper familia de las α/β hidrolasas.

En el modelo se identificó el plegamiento característico α/β hidrolasa (Figura 19b), así como la probable tríada catalítica según la comparación con otras enzimas del mismo tipo (Figura 19d). Como se observa, la estructura tendría un plegamiento del tipo α/β de seis hojas betas paralelas localizadas en el centro de la cadena polipeptídica ($\beta 2\beta 1\beta 3\beta 4\beta 5\beta 6$) las cuales están rodeadas de por seis hélices alfa mayores. Una hélice completa ($\alpha 2$) y dos más cortas que conectan la hoja $\beta 2$ y la hélice 3α forman un lazo tipo tapa (cap-like o lid) que cubre el probable sitio catalítico. El modelo no contiene el arreglo de hojas β antiparalelo ($\beta 5\beta 6$) ubicado frente a la tapa o lid (Figura 19c), lo cual ya se ha reportado en algunas enzimas de esta familia como lipasas (van Pouderoyen et al., 2001), cutinasas (Martínez et al., 1992) y

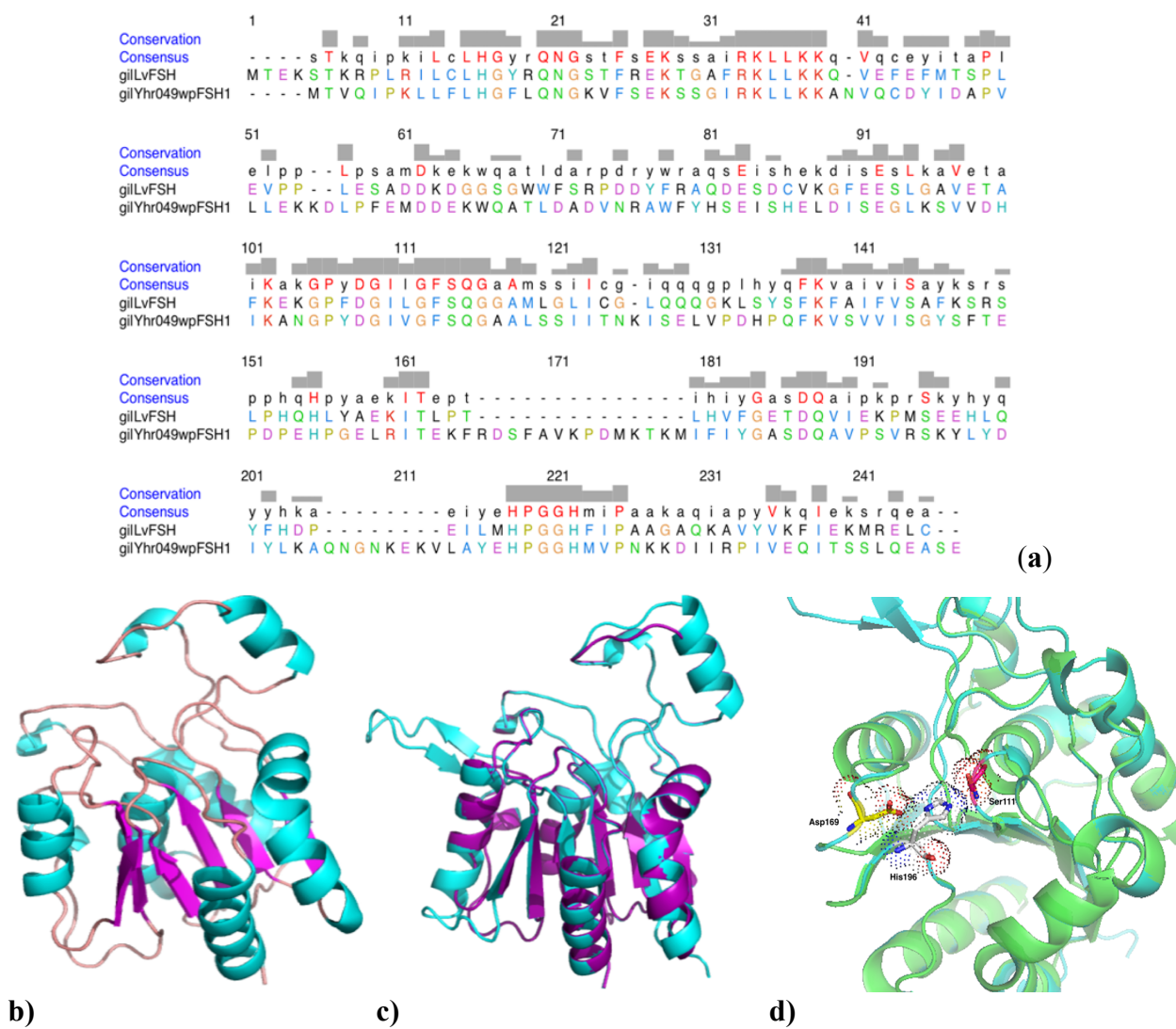


Figura 19. Modelación de la estructura de la proteína LvFSH de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). a) Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de LvFSH contra la proteína de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada por Phyre² como molde (FSH1/YHR049W PDB 1YCD); b) modelo teórico LvFSH (α -hélices cyan, hojas β magenta y lazos naranja); c) alineamiento estructural con la proteína (FSH1/YHR049W/1YCD) (azul) con el modelo LvFSH (magenta); d) tríada catalítica Ser111 (rojo), Asp169 (amarillo) e His196 (blanco).

esterasas de *Streptomyces scabies* (Wei et al., 1995), mientras que en enzimas de tipo carboxilasas y acil tioesterasas se ha encontrado más reducido. Este arreglo ($\beta 5\beta 6$) se encuentran localizadas frente a la tapa o lid formando un canal o saco donde se considera es el sitio activo de la enzima (Heikinheimo et al. 1999; Nardini y Dijkstra, 1999).

Todas las α/β hidrolasas tienen una tríada catalítica característica, conformada por un nucleófilo, una histidina y un ácido, pero la naturaleza del nucleófilos y el ácido varía entre las diferentes enzimas. El nucleófilo puede ser un residuo de cisteína, serina (en su mayoría) o incluso aspartato como es el caso de las acetilcolina esterasas y haloalcano deshalogenasas, mientras que como ácido se puede encontrar un residuo aspártico o glutámico. El análisis, alineamiento de la secuencia y comparación estructural del modelo obtenido con otras enzimas de la superfamilia α/β hidrolasas a la que a su vez pertenecen las enzimas serina hidrolasas, se puede proponer que los residuos Ser111, Asp169 e His196 se encuentran en el sitio activo de la LvFSH formando la tríada catalítica (Figura 19d) (Heikinheimo et al., 1999, Holmes y Cox 2012, Quevillon et al., 2005), donde el nucleófilo Ser111 ubicado al final de la hoja $\beta 3$, como se ha reportado se encuentra en un vértice agudo con ángulos de Ramachandran desfavorables (Ollis et al., 1992; Nardini y Dijkstra, 1999); Asp 169 se encuentra localizado al final de la hoja $\beta 5$ en el lazo que une a esta con la hélice $\alpha 5$, finalmente la His 196 se localiza al final de la hoja $\beta 6$ en el lazo que la une a la hélice $\alpha 6$ de el C-terminal. En la estructura molde PDB 1YCD (c1ycdA) dos átomos de nitrógeno correspondientes a los residuos Phe y Gln estabilizan el oxígeno de la Ser101 catalítica para formar un ambiente que óptimo para la catálisis de la enzima mediante la estabilización electrofílica de la carga negativa generada durante la catálisis, en el caso de el modelo de LvFSH en estudio será necesaria la estructura obtenida experimentalmente para conocer exactamente los residuos que forman el ambiente catalítico. Lo anterior debido a la desventaja de los métodos de modelación teórica de que su validez se acota a la cadena de carbonos alfa ($C\alpha$).

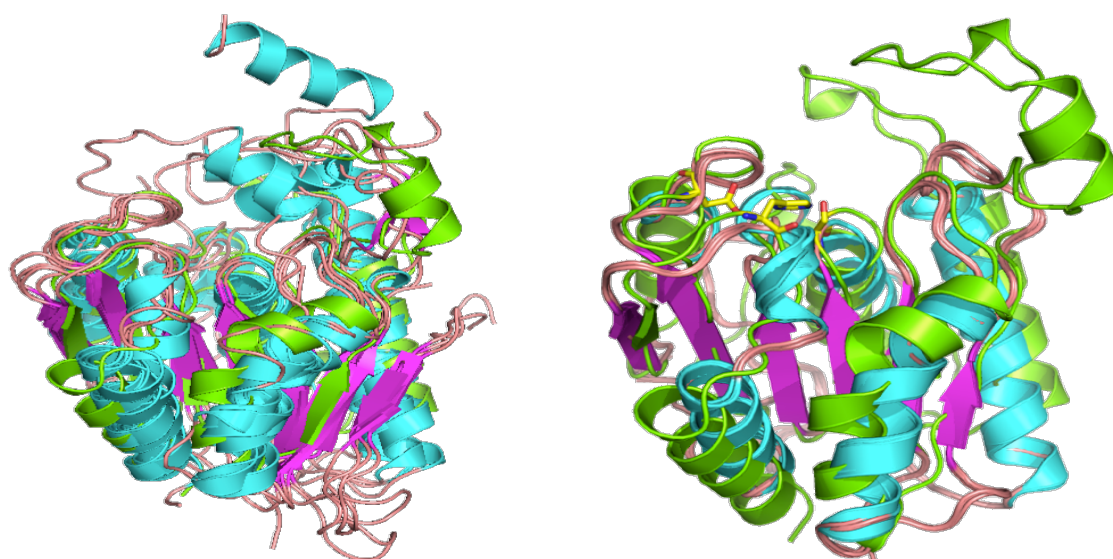
Como se menciona anteriormente, en el modelo estructural de LvFSH carece de una pared para formar un canal en el sitio activo, por lo cual este queda como un sitio abierto, que podría dar lugar a la interacción de sustratos de mayor tamaño como son las moléculas de carácter

lipídico. Al realizar un alineamiento estructural, se observa un loop alrededor del sitio activo el cual es más corto, lo cual se ha reportado en enzimas de el tipo de las carboxiesterasas, las acil tioesterasas y lipasas. Aún cuando la identidad entre las secuencias de *aa* de todas estas enzimas puede ser bajo (16 %) estas presentan una arquitectura molecular muy parecida. Se cree que este lazo presente en las enzimas lipasas representa la capacidad de las enzimas para actuar solo sobre sustratos lipídicos insolubles en agua emulsionados (Figura 20).

Con la herramienta CASTp (Computed Atlas of Surface Topography of protein) (Tian et al., 2018). Se encontró un posible bolsillo de unión (binding pocket) al sustrato dentro del modelo de LvFSH (Figura 21), con un volumen ($309 \text{ \AA}^3$) y conteniendo los residuos Ser111 e His196, lo que refuerza la hipótesis de que estos son residuos catalíticos. Por homología de las características estructurales del sitio de unión principal con la estructura cristalina 1ycd de la proteína FSH1 de levadura (Quevillon et al. 2005) y con la serina hidrolasa OVCA2 estudiada por Azizi et. al (2006) probablemente la función principal de LvFSH es la catálisis de una reacción de carboxilesterasa de un objetivo aun desconocido. Comparando la estructura de acetilcolina esterasa esta tiene un sitio activo profundo y estrecho ($20 \text{ \AA}$) que llega hasta la mitad de la molécula de proteína. El sitio catalítico se encuentra hacia el fondo ($4 \text{ \AA}$) del sitio activo y las paredes están revestidas por muchos residuos aromáticos (Holmquist, 2000).

Calculamos el volumen de los sustratos evaluados experimentalmente en este trabajo. Los volúmenes moleculares de *p*-NPA y *p*-NPL fueron $146 \text{ \AA}^3$ y $298 \text{ \AA}^3$, respectivamente. Ambos sustratos encajan en la cavidad de $309 \text{ \AA}^3$ del sitio activo y esto nos permite predecir que los sustratos con una cadena más larga que doce carbonos se unirían con baja afinidad.

A partir del modelo teórico obtenido para LvFSH no puede determinarse la actividad enzimática específica *in vivo* de la proteína ya que existen una gran variedad de reacciones que son catalizadas por enzimas α/β hidrolasas. Pese a lo anterior, las características estructurales, las dimensiones el sitio activo y la naturaleza de la tríada catalítica sugieren que esta proteína podría estar involucrada en la hidrólisis de los compuestos lipídicos tipo éster. Debido a lo anterior, se llevaron a cabo análisis de determinación de actividad enzimática con diferentes sustratos de esta naturaleza.



(a)

(b)

Figura 20. Alineamiento estructural utilizando el servidor MSD (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/de>) del modelo de LvFSH con estructuras de otras enzimas α/β hidrolasas. a) estructuras de esterasas (RMSD 2.24, Q-score 0.2836 para 137 C α); b) estructuras de lipasas (RMSD 1.127, Q-score 0.4678 para 149 C α). Modelo teórico de LvFSH en color verde.

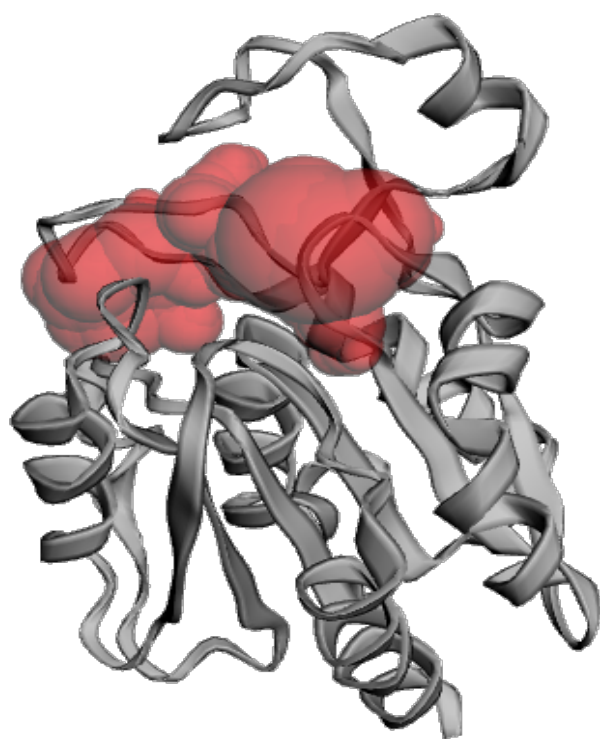


Figura 21. Dimensiones de sitio de unión de sustrato en el modelo LvFSH. En rojo se observa la cavidad con mayor volumen ($309 \text{ \AA}^3$) donde una variedad de sustratos podrían acomodarse.

Sobreexpresión Recombinante y Purificación de la Proteína LvFSH

Diseño del Gen sintético para la Sobreexpresión de la Proteína en *E. coli*.

En la Figura 22 se muestra un esquema detallado del gen sintético diseñado y enviado a sintetizar a la compañía DNA 2.0.

Transformación de bacterias *E. coli* BL21 SI

A partir de la transformación de las bacterias *E. coli* BL21 SI se obtuvieron 23 ufc en las tres placas de medio agar Luria Broth sin sal, conteniendo ampicilina 100 µg/mL donde fueron extendidos 50, 100 y 150 µL de la reacción de transformación.

Cinética de Sobreexpresión

En la Figura 23 se muestra el análisis electroforético de la fracción soluble e insoluble de las muestras tomadas al tiempo cero y a 2, 4, 6 y 24 h post inducción con IPTG y NaCl a concentración final de 1 mM y 0.3 M, respectivamente. A partir de las 2 h post-inducción se observó en la fracción soluble la banda de aproximadamente 27 kDa correspondiente a la proteína de interés LvFSH y esta fue en aumento con respecto al tiempo. En la fracción insoluble no se detectó ninguna banda de tamaño característico a ninguno de los tiempos, que indicara que la proteína estuviera formando cuerpos de inclusión. La obtención de las proteínas recombinantes en la fracción soluble de la lisis celular es lo más deseable durante la sobreexpresión de proteínas, ya que si bien la solubilización de cuerpos de inclusión con agentes caotrópicos y posterior plegamiento de la proteína, son herramientas útiles y disponibles para estos casos, estas representan mayor trabajo y riesgo de no obtener la proteína en estado óptimo, lo cual está altamente garantizado al obtener la proteína soluble. A partir de los resultados obtenidos de la cinética de sobreexpresión se determinó llevar a cabo la sobreexpresión de la proteína durante 24 h.

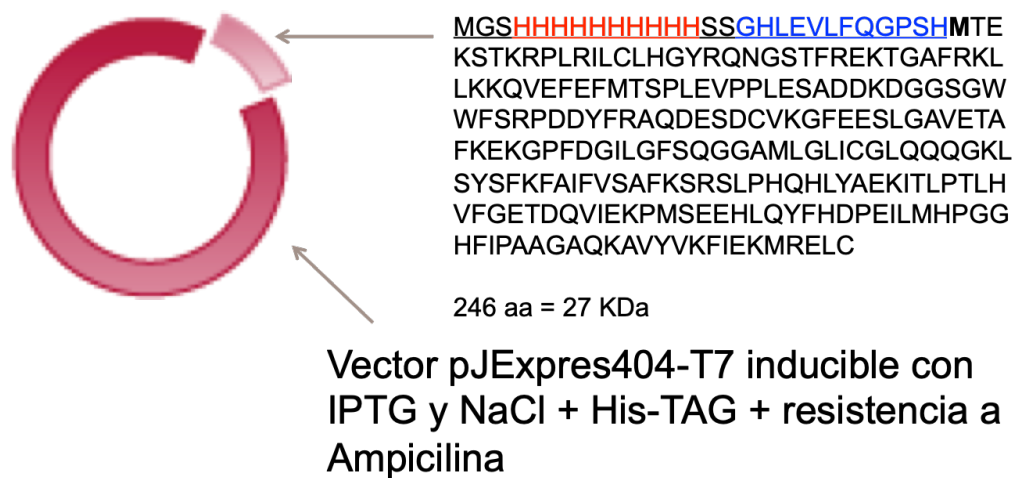


Figura 22. Características del plásmido recombinante para la expresión de la proteína LvFSH en bacterias *Escherichia coli* BL21 SI inducibles con sal. En rojo, cola de histidinas; en azul, sitio de corte de la proteasa PPS y en negrita la metionina inicial de la secuencia deducida de aa de la proteína LvFSH.

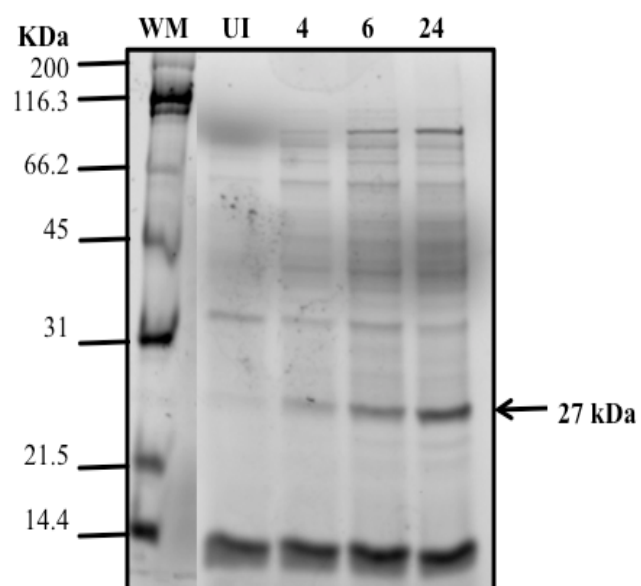


Figura 23. Cinética de sobreexpresión de la proteína LvFSH recombinante en bacterias *Escherichia coli* BL21 SI. MW, marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad); UI, antes de la inducción y 4, 6, 24 h post-inducción a concentración final de IPTG y NaCl de 1 mM y 0.3 M, respectivamente.

Sobreexpresión de la proteína LvFSH recombinante

La sobreexpresión se realizó en matraces Fernbach de 1 L de medio Luria Broth (LB) conteniendo ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 30 µg/mL y 20 mL de glucosa al 20 % estéril los cuales se inocularon con 25 mL de un cultivo de 24 h preparado en medio LB conteniendo los mismos antibióticos, el cual a su vez se inoculó utilizando un stock de glicerol de bacterias *E. coli* BL21 SI transformadas con el gen sintético conteniendo la región codificante para la proteína LvFSH. El cultivo de 1 L se creció a 37°C con agitación constante de 225 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm = 0.6 DO, para luego inducir la expresión de la proteína añadiendo IPTG y NaCl a una concentración final de 1 mM y 0.3 M, respectivamente y se dejó incubando toda la noche en las mismas condiciones.

Al siguiente día o 24 h post-inducción las bacterias fueron colectadas por centrifugación (3500 xg, 4 °C), obtuvieron alrededor de 4 g de bacterias por litro de cultivo. En general se ha reportado un rendimiento de 2 a 8 g de pellet por litro de cultivo, lo cual es dependiente de la cepa utilizada la secuencia misma a sobreexpresar y de las condiciones del cultivo como son temperatura, velocidad de agitación, alimentación, etc. No esta dentro de los objetivos de el presente estudio optimizar condiciones de producción.

Purificación de la proteína LvFSH Recombinante

Para obtención de la proteína LvFSH recombinante pura fueron necesario s dos pasos de purificación en un ÄKTA (GE Healthcare, Suecia) (Figura 24). En un primer paso de cromatografía de afinidad a metales (IMAC) (Panel A), el extracto crudo clarificado obtenido de la lisis bacteriana fue aplicado a una columna His-Trap HP de 5 ml previamente equilibrada en buffer A conteniendo Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 500 mM. La elución de la proteína unida a la matriz se realizó con un gradiente del 0 al 500 mM de imidazol, la proteína eluyó aproximadamente al 17 % de imidazol, al observar proteínas contaminantes en el gel de electroforesis (Figura 24a), fue necesario un segundo paso de purificación mediante cromatografía de hidrofobicidad o interacción hidrofobica (HIC) (Figura 24b). En este caso las fracciones de IMAC conteniendo la proteína de interés se juntaron y equilibraron con

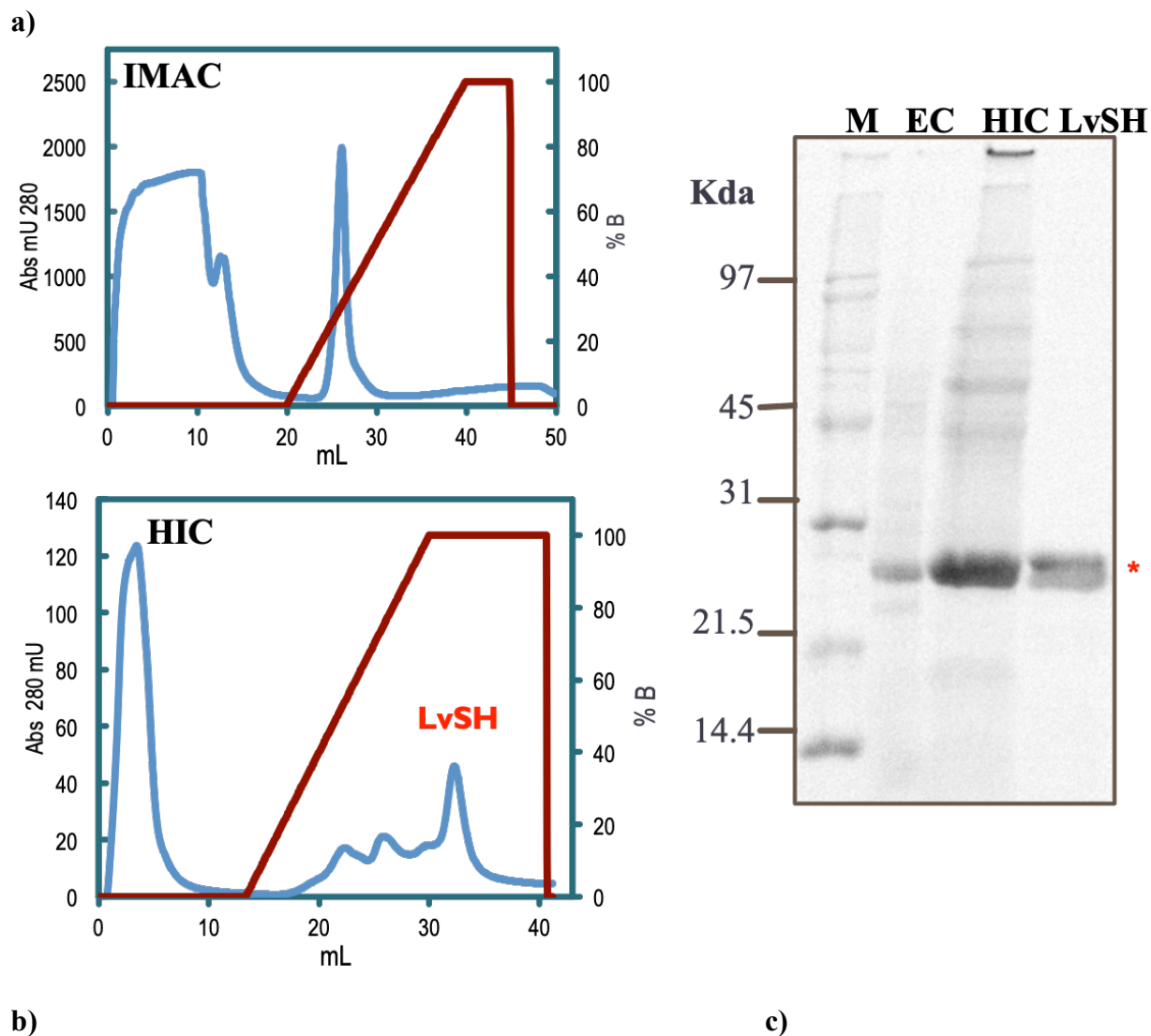


Figura 24. Purificación cromatografica de la proteína LvFSH recombinane. a) cromatografía de afinidad a metales (IMAC); b) Cromatografía de Hifrofobicidad (HIC); c) SDS-PAGE, M marcador de peso molecular de amplio rango (BioRad); EC, extracto crudo de bacterias; HIC fracción obtenida de IMAC y sometida a HIC y LvFSH, fracción de HIC conteniendo la proteína pura (* banda de 27 kDa).

buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7.4 conteniendo NaCl 3M y se aplicaron a la columna de 5 mL de interacción hidrofóbica (Buthyl sepharosa HP) previamente equilibrada en este mismo buffer, la proteína unida a la matriz fue eluida mediante un gradiente inverso de sal (3 a 0 M NaCl). Según el análisis electroforético de las fracciones (3 mL) la proteína fue obtenida a homogeneidad al 100 % de buffer B, es decir en buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.4 sin sal.

Caracterización Bioquímica de la Proteína LvFSH Recombínate

Análisis de la Estructura Secundaria de la Proteína LvFSH por Dicroísmo Circular

El contenido de la estructura secundaria se determinó mediante el análisis de las unidades delta épsilon ($\Delta\epsilon$) con el algoritmo K2D disponible a través de internet en el servidor DICHROWEB (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/>) en Birkbeck College, REINO UNIDO. Se utilizó una solución proteína LvFSH de 1.74 mg/mL. El análisis de las elipticidades medias de los residuos *aa* arrojó un contenido de estructura secundaria de 31 % de hélice α , un 18 % de hojas β y un 51 % de estructura desordenada (Figura 24a). Este resultado experimental fue comparable con la asignación de estructura secundaria del modelo teorico obtenido en Phyre². Por lo tanto, a nivel de estructura secundaria existe concordancia entre la asignación estructural teórica y la calculada mediante un método experimental.

Determinación del Peso Molecular y de la Estructura Cuaternaria de LvFSH

La estructura cuaternaria de la proteína LvFSH de camarón obtenida de manera recombinante y purificada se analizó mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superdex 75 (GE Healthcare, EE. UU.). La proteína eluyó en 10.3 mL, correspondiente según la calibración previa de la columna a una masa molecular calculada de alrededor de 58,105 Da (Figura 25b). Para este experimento se aplicaron 250 μ l de muestra a la columna, y fue realizado por triplicado. El peso molecular calculado indica que la enzima es un dímero. Azizi et al. (2006) propusieron una estructura monomérica para la proteína OVCA2 de humano, mientras que Yhr049w/FSH1 de levaduras (PDB 1ycd) se encuentra como dímero (Quevillon et al., 2005).

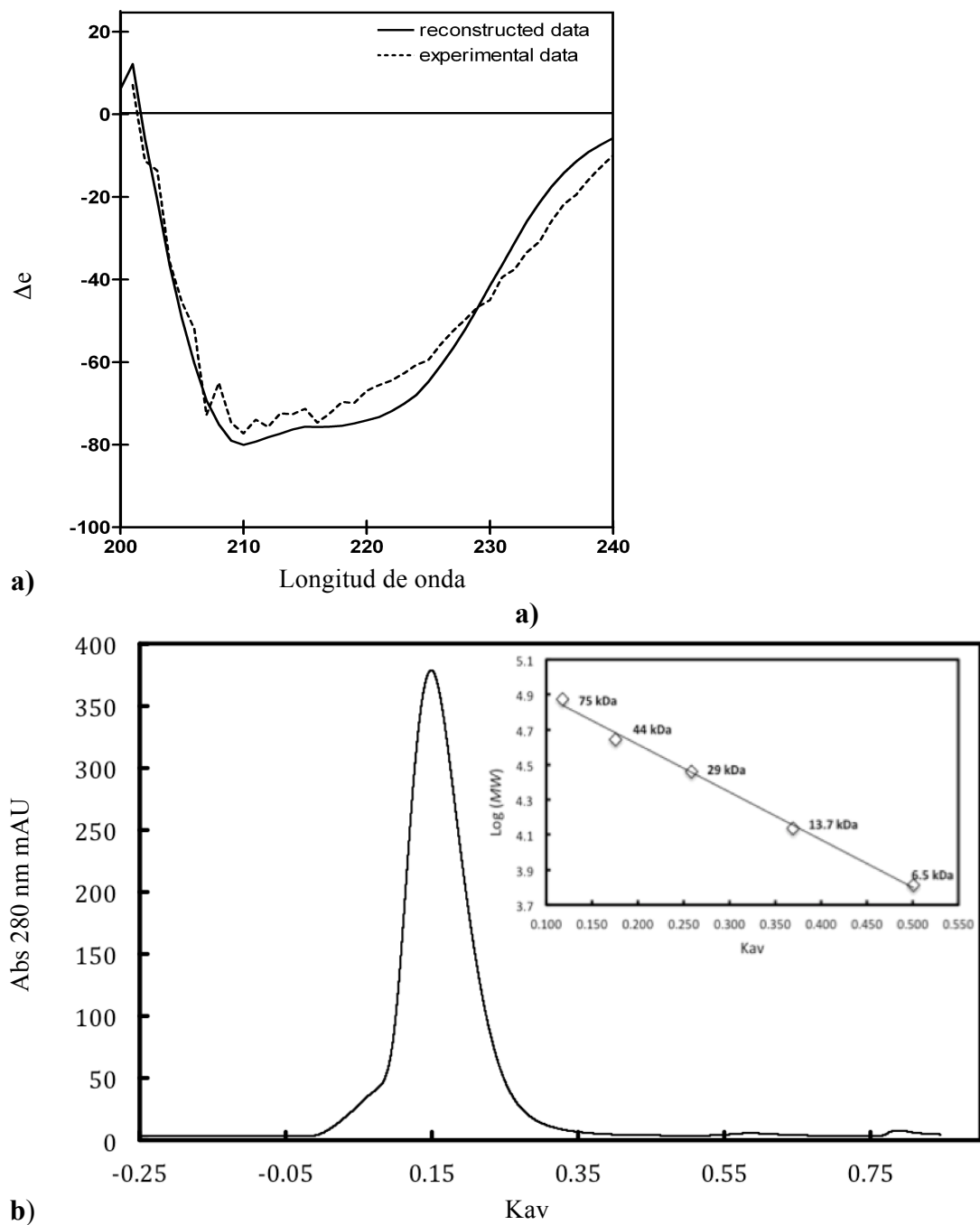


Figura 25. Análisis de estructura secundaria y cuaternaria de la proteína LvFSH recombinante. a) espectro de dicroísmo circular de ultravioleta lejano. Datos experimentales (línea discontinua); espectro reconstruido (línea continua) calculados por el algoritmo K2D; b) cromatografía de exclusión molecular. Inserto, curva de calibración utilizando los estándares de peso molecular; conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ribonucleasa A (13.7 KDa) y aprotinina (6.5 kDa).

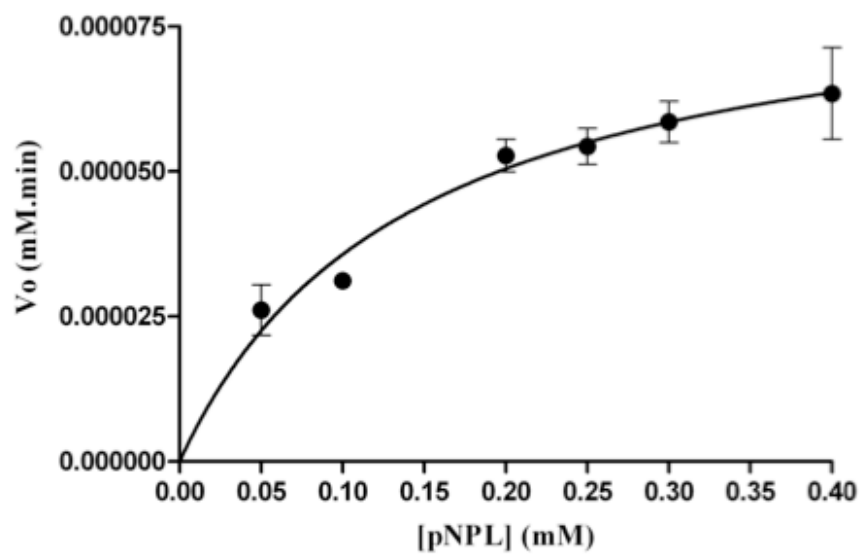
En el modelo estructural OVCA2, Cis 11 y Cis 41 se ubican en hebras β adyacentes para que se pueda formar un enlace S–S. Aunque hasta ahora no se han observado enlaces S-S en proteínas relacionadas, dependiendo de la ubicación celular es posible que un puente disulfuro sea un rasgo característico del OVCA2 humano.

Actividad Enzimática Específica de la Proteína LvFSH Recombinante.

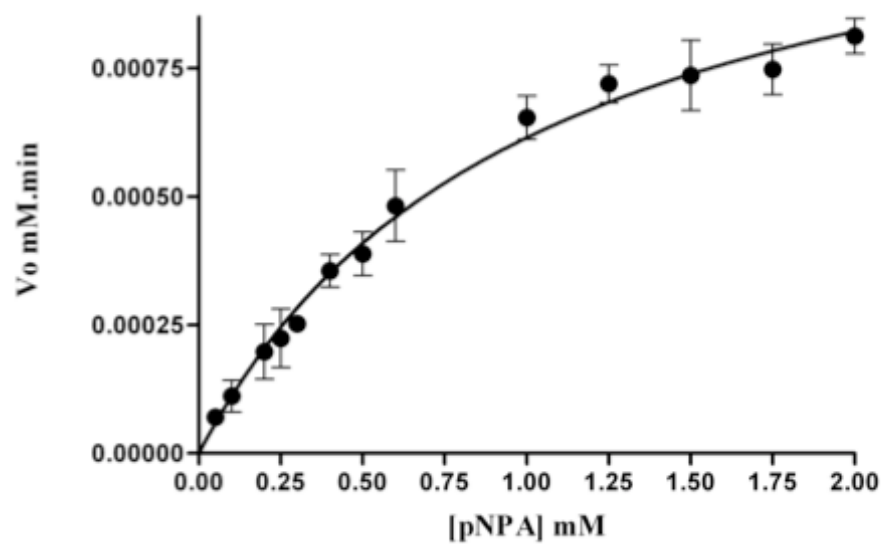
La actividad enzimática hidrolítica se analizó utilizando sustratos *p*-nitrofenil ésteres de dos tamaños diferente de cadena: *p*-nitrofenil acetato (*p*NPA) y *p*-nitrofenil laurato (*p*NPL). Se encontró que la enzima presentó una actividad específica de 10.99 U/mg de proteína para el caso de *p*NPA que cuenta con una cadena de solo un carbono, mientras que para el *p*NPL con cadena de 12 carbonos la actividad fue de 0.77 U/mg. Las enzimas esterasas por razones estéricas solo tienen actividad con los ésteres de ácidos grasos de cadena corta (no más de seis carbonos), mientras que las enzimas lipolíticas pueden hidrolizar ésteres de ácidos grasos larga insolubles de cadena y corta (Holmquist, 2000).

Determinación de Constantes Cinéticas

Las constantes cinéticas como: K_m , V_{max} , k_{cat} y eficiencia catalítica de la enzima LvFSH recombinante fueron calculadas cada sustrato (*p*NPA y *p*NPL) a partir de los experimentos de el efecto de la variación de los mismos en la velocidad de la reacción catalítica (Figura 26). El rango de concentración de *p*NPA y *p*NPL utilizado fue 0.05 a 2 mM y 0.05 - 0.2 mM, respectivamente. Para ambos sustratos, la velocidad de reacción fue dependiente de la concentración de sustrato aumentando hasta la saturación en las concentraciones más altas. Para ambos sustratos, el gráfico obtenido de velocidad inicial (V_o =mM/min) contra la concentración de sustrato [S =mM], mostró un comportamiento de Michaelis-Menten característico. Las constantes cinéticas K_m y V_{max} estimadas por regresión no lineal se muestran en la Tabla 4. En el caso de *p*NPA este presentó K_m y V_{max} mayores ($K_m = 1.010 \text{ mM} \pm 0.04$, $V_{max} = 0.001 \pm 8.82 \times 10^{-5} \text{ mM} \cdot \text{min}$). Además, aunque la V_{max} con *p*-NPL es un orden de magnitud menor que con *p*-NPA, el primero tiene una mayor afinidad por el sustrato, de modo que las eficiencias catalíticas con ambos sustratos son del mismo orden de



a)



b)

Figura 26. Efecto de la concentración de sustrato $[S]$ en la actividad enzimática de LvFSH . p -nitrofenil ésteres se usaron como sustratos. a) p -nitrofeil laureato (0.05 - 0.2 mM); b) 0.05 - 2 mM de p -nitrofenil acetato.

Tabla 4. Constantes cinéticas de la enzima LvFSH calculadas para sustratos *p*-nitrofenil ésteres.

Sustrato	$V_{\max}$ (mM·min)	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ ·min ⁻¹)
<i>p</i> NPA	0.001	1.010±0.1	2.08	2.06
<i>p</i> NPL	8.589x10 ⁻⁵	0.14±0.04	0.12	0.88

*p*NPA = *p*-nitrofenil acetato (1C); *p*NPL= *p*-nitrofenil laurato (12C), las determinaciones se realizaron por triplicado.

magnitud. Este perfil junto los valores de actividad específica encontrados proponen que la enzima estudiada es una enzima con actividad lipolítica hacia ésteres de ácidos grasos insolubles de cadena larga y/o corta. En cuanto a otras lipasas, su actividad es muy variable y depende de la afinidad de los sustratos específicos relacionada directamente con el tamaño de el mismo y el sitio activo.

Determinación de la Estructura Tridimensional de la Proteína LvFSH

Obtención de Cristales de Proteína LvFSH por el Método de Microbatch

La proteína purificada por LvFSH se dializó contra buffer fosfato 25 mM pH 7.4 y se concentró con una membrana de ultrafiltración de 10 kDa (Amicon, Millipore, Billerica MA, EE. UU.) a 10 mg/ml para experimentos de cristalización. Después de realizar las pruebas de cristalización con los kits comerciales Crystal Screen 1 y 2 e Index (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, EE. UU.), se encontraron cristales de proteína en las condiciones 54 y 65 de el kit Index (Figura 27). Los cristales se obtuvieron mezclando 1 μ L LvFSH (10 mg/mL) con 1 μ L de la solución de cristalización para cada pocillo. Las placas se incubaron a 16 °C y los cristales crecieron después de 2 semanas.

Colecta de datos de difracción de Rayos X

Los cristales de proteína LvFSH recombinante obtenidos en la condición 54 se colocaron el “loops” según el tamaño y se súper enfriaron (100 K) con nitrógeno líquido. Para evitar la formación de cristales hielo y por lo tanto daño a los cristales se utilizaron soluciones crioprotectantes previamente preparadas con la solución de cristalización (condición precipitante) y glicerol en diferentes concentración (10 - 30 %). La colecta de los datos cristalográficos se llevó a cabo en la fuente de radiación sincrotrón de Stanford (SSRL) San Francisco, CA, USA. Los experimentos se realizaron en la línea 14-1 (Beamline 14-1) provista de un detector MARmosaic325 CCD. Las condiciones de difracción fueron: longitud de onda de 1.181 Å. Primeramente se determinó la celda ($P3_1$) y posteriormente se colectaron 180 grados cada 0.5 grados con un tiempo de exposición de 13 s. Una vez obtenidas las 360



Figura 27. Cristales de proteína LvFSH recombinante obtenidos en la condición 54 de Index (cloruro de calcio di-hidrato 0.05 M, bis-Tris 0.1 M pH 6.5, 30 % v/v poli etilenglicol monometil éter 550).

imágenes se concluyó la colecta y se procedió al análisis de los datos y resolución de la estructura tridimensional de la proteína LvFSH.

Procesamiento y Análisis de los Datos de Difracción de Rayos X de los Cristales de Proteína LvFSH

Los datos se indizaron, fusionaron y escalaron utilizando el paquete de software XDS. Las fases de la estructura se resolvieron mediante reemplazo molecular en la plataforma de PHENIX, utilizando el modelo teórico obtenido por Phyre² y el la estructura de la proteína FSH1/Yhr049w (27.5 % identidad) depositada en el Protein Data Bank (PDB 1YCD). El refinamiento de la estructura obtenida se realizó con PHENIX (Adams et al., 2010; Liebschner et al., 2019) y la construcción manual con COOT (Emsley et al., 2010) utilizando el mapa 2Fo-Fc a 0.5 Å y omitiendo los mapas elaborados en Phenix. Las figuras fueron elaboradas con MacPyMOL (Figura 28) (Schrödinger, 2010).

Las estadísticas de la colecta, procesamiento y refinamiento de los datos cristalográficos se muestran en la Tabla 5. El cristal de proteína LvFSH mostró una celda unitaria de parámetros $a = 112.72$, $b = 112.72$, $c = 43.86$ Å y $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ y $\gamma = 120^\circ$ perteneciente al grupo espacial $P3_1$. Se integraron un total de 82467 reflexiones a una resolución de 3.0 Å y se fusionaron para obtener 13852 reflexiones únicas con un Rmerge y Rmeas general de 0.2 y una integridad de 99.6 %. Los cálculos del coeficiente de Matthews indicaron la presencia de dos monómeros por unidad asimétrica (2.89 Å³/Da y 57.4 % de contenido de disolvente) (Matthews, 1968). Las fases iniciales para la estructura cristalográfica de LvFSH se determinaron en Phaser (McCoy et al., 2007) mediante reemplazo molecular. La mejor solución fue obtenida utilizando como modelo de búsqueda la estructura de LvFSH construida en Phyre² (LLG 11.58 y TFZ 6.2). Se inspeccionó visualmente el primer mapa de densidad de electrones de la solución obtenida en Phaser, la mayoría de los átomos de la cadena principal ($C\alpha$) se ajustaron adecuadamente; sin embargo, varios residuos se ajustaron y/o construyeron a mano en varios ciclos de reconstrucción del modelo y refinamiento; este proceso fue difícil debido a la resolución (3 Å) y en algunos casos no fue posible obtener las coordenadas de los grupos R de

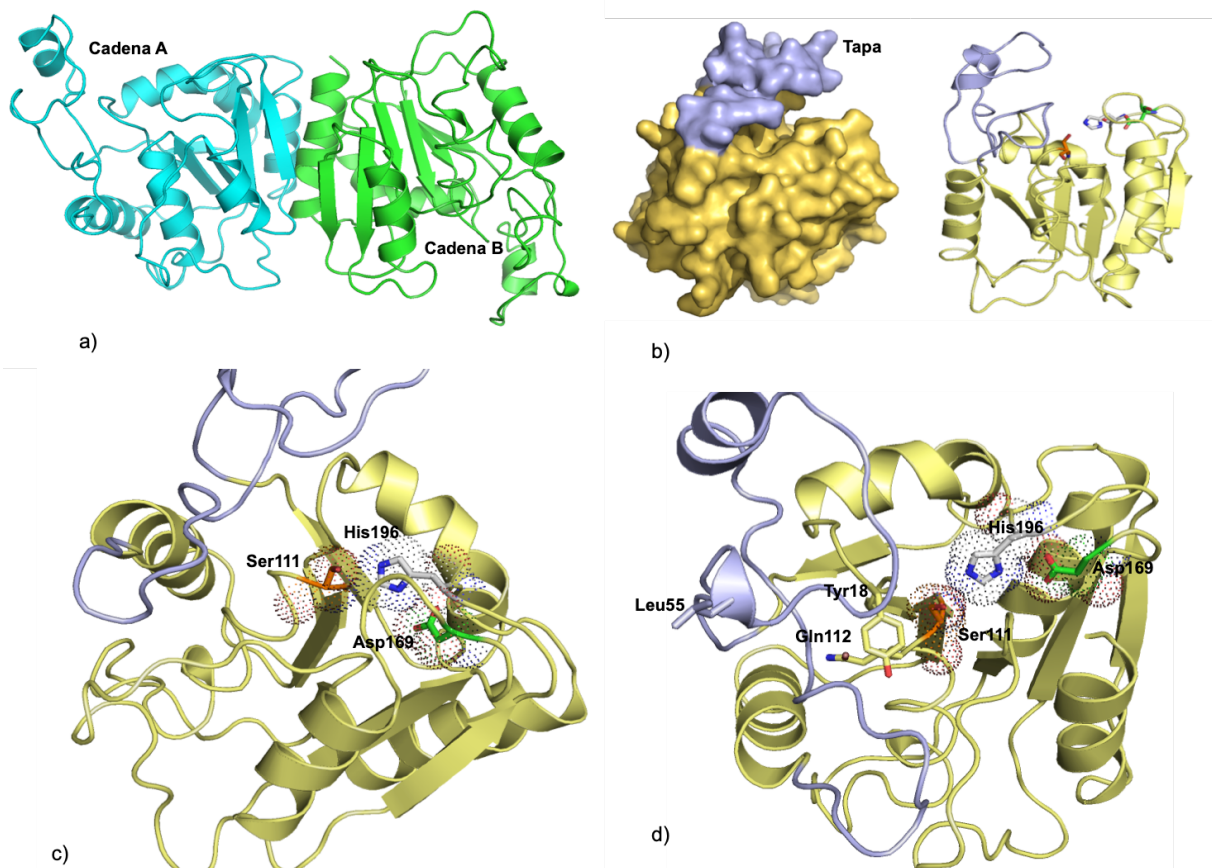


Figura 28. Estructura cristalográfica de LvFSH de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). a) estructura 3D de LvFSH se observaron dos monómeros en unidades asimétricas; b) dominio de la tapa cubiendo el sitio activo y tríada catalítica; c) tríada catalítica Ser111 Asp169 e His196 (color naranja, verde y blanco, respectivamente); d) topología y entorno de los sitios de unión del sustrato y catalítico.

Tabla 5. Valores estadísticos obtenidos en la colección y procesamiento de los datos cristalográficos de la estructura 3D de LvFSH de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

Colecta de Datos	
Fuente de rayos X	SSRL Beamline 14-1
Detector	MARmosaic325 CCD
Longitud de onda (Å)	1.181
Rango de resolución (Å)	34.58 - 2.895 (2.999 - 2.895)
Grupo espacial	P 31
Parámetros de la celda unitaria	a=112.72, b=112.72, c=43.79 $\alpha=90^\circ$ $\beta=90^\circ$ $\gamma=120^\circ$
Reflexiones totales	82467 (7956)
Reflexiones únicas	13852 (1301)
Multiplicidad	6.0 (5.9)
Completeness (%)	99.59 (96.29)
Mean I/sigma (I)	12.87 (1.04)
R-merge	0.2129 (1.715)
R-meas	0.2334 (1.882)
R-pim	0.09541 (0.7746)
CC1/2	0.988 (0.303)
Refinamiento	
R-work	0.3548 (0.3563)
R-free	0.3683 (0.4047)
Protein residues	414
Geometría del Modelo	
RMS(bonds)	0.033
RMS(angles)	3.23
Distribución de Ramachandran	
Ángulos Ramachandran favorecidos (%)	95.86
Ángulos Ramachandran no favorecidos (%)	4.14
Rotámeros	
Rotamer no favorecidos (%)	35.63

Los datos entre paréntesis corresponden a los datos de mayor resolución

algunos residuos α . Los valores iniciales de R_{work} y R_{free} calculados después del reemplazo molecular fueron 42.54 y 42.10 %, respectivamente; después de los ciclos de refinamiento usando Phenix y Coot, la estructura logró refinarse a valores finales de 35.48 (R_{work}) y 36.83 % (R_{free}).

En la estructura cristalográfica de LvFSH de camarón (*Litopenaeus vannamei*) obtenida se observó el plegamiento característico α/β hidrolasas y de acuerdo con la masa molecular de la proteína (58 kDa) determinada por cromatografía de exclusión molecular y al coeficiente de Matthews, se encontraron dos monómeros en la unidad asimétrica (Figura 28a). El lazo conocido como tapa o lid se identificó cubriendo el sitio activo de la enzima conteniendo los residuos catalíticos Ser111, Asp169 e His196 propuestos anteriormente por homología de la secuencia (Figura 28b). La localización y la disposición de estos residuos en la estructura cristalográfica respaldan la hipótesis de que la Ser111 actúa como el nucleófilo que ataca el carbono carbonilo parcialmente cargado positivamente del sustrato, mientras que los residuos His196 y Asp169 están orientados para apoyar la transferencia de carga involucrada en la deprotonación del nucleófilo (Ser111) (Figura 28c). Como se ha reportando ampliamente en las α/β hidrolasas, el nucleófilo (Ser111) se encuentra localizado en un lazo cerrado al final de la hoja $\beta 3$ (codo catalítico) con ángulos de Ramachandran desfavorables. Los residuos Tyr18 y Gln112 están en una posición con respecto al átomo de oxígeno de la Ser111 de tal modo de formar el llamado agujero de oxianiónico, involucrado en la estabilización de la carga negativa durante la catálisis (Figura 28d) (Holmquist, 2000; Quevillon et al, 2005, Azizi et al., 2006).

Los residuos 145-148 ubicados en la parte posterior de la lámina $\beta 4$ forman el fondo del sitio catalítico. Un lazo largo después de la hélice $\alpha 3$ (aminoácidos 76-83), Tyr18 (después de $\beta 1$) e Ile172 (después $\beta 5$) forman las paredes del sitio catalítico. Las enzimas lipasas tienen un canal de sustrato hidrófobo, esto podría ser necesario para acomodar en el sitio de unión la cadena de carbono hidrofóbica del sustrato. El residuo de Leu55 presente en el lazo de la tapa puede formar interacciones hidrófobas con la cadena de carbono del sustrato (Aschauer et al., 2016).

La comparación de la estructura de LvFSH en la base de datos de PDB muestra similitud a lo largo de la cadena principal de αC es similar (Figura 29) con las estructuras de otras

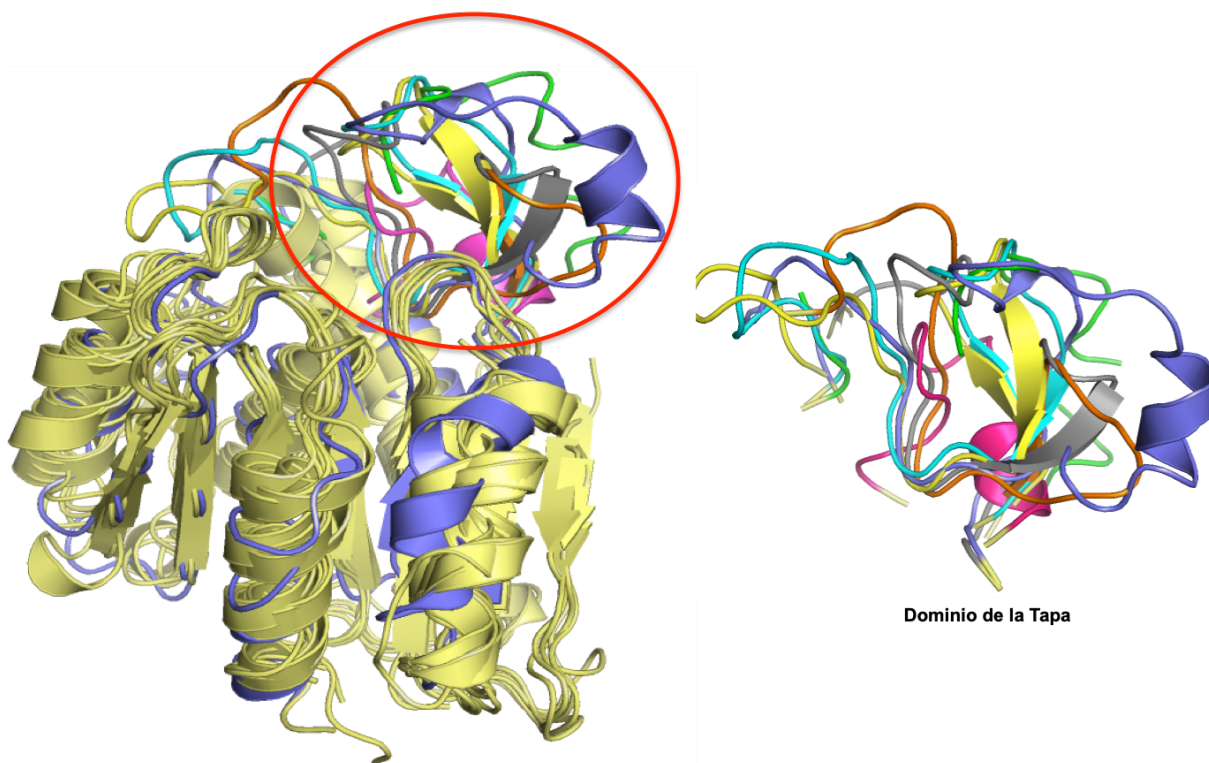


Figure 29. Comparación estructural de LvFSH de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con otras enzimas de la familia de las α/β -hidrolasas (PDB: 4f21: G; 4ftw: A; 6bje: B; 2qjw: A; 3cn7: B; 5dwd: A); círculo rojo indicando el dominio de la tapa con mayor variabilidad en el contenido de estructura secundaria.

enzimas esterasas y lipasas pertenecientes a la familia de las α/β -hidrolasas caracterizadas estructuralmente. Se ha reportado que las diferencias de contenido de estructura secundaria en el dominio de la tapa pueden llevar de una enzima citosólica soluble a una enzima asociada a la membrana y los depósitos de lípidos; llevando en consecuencia diferencia en la afinidad a sustratos entre enzimas localizadas en diferentes compartimentos celulares. Por otro lado la variabilidad estructural del dominio de la tapa entre las monoacilglicerol lipasas de especies de *Bacillus*, *S. cerevisiae* y *Homo sapiens* se le ha atribuido a un proceso evolutivo necesario.

El sitio de unión al sustrato de LvFSH parece similar a las conformaciones abiertas observadas en otras estructuras de α/β hidrolasas, con una abertura entre la $\alpha 2$ y la segunda hélice ($\alpha 3$) de el lazo de la tapa. Estudios previos en estructuras de lipasas reportaron flexibilidad conformacional en el núcleo de la tapa. Aschauer et al. (2016) proponen que la forma de las cavidades también podría influir en la especificidad del sustrato. Además de las propiedades físico-químicas del sustrato la presentación de el mismo en los ensayos utilizados también influye en la actividad absoluta. Específicamente en el caso de las enzimas lipasas la afinidad del sustrato también se correlaciona con los ácidos grasos más abundantes dentro del organismo.

En este caso, los hallazgos estructurales descritos no permiten explicar las diferencias en la afinidad de la enzima LvFSH por los sustratos ensayados. El R_{work} y R_{free} de la estructura 3D obtenida por reemplazo molecular deben mejorarse para tener mayor certeza en la disposición de los grupos R de los residuos. La baja identidad de secuencia de LvFSH con otras lipasas y con las estructuras de proteínas homólogas depositadas en el PDB, impide realizar un reemplazo molecular por homología confiable. Lo anterior lleva a la necesidad de resolver las fases por métodos experimentales.

Existen diferentes estrategias para resolver el problema de fases; las dos más comunes son: los métodos experimentales (colecta de difracciones anómalas múltiples y simples MAD y SAD, respectivamente), y el reemplazo molecular, este último consiste en utilizar moldes con una identidad mayor al 40 % es decir los datos de las coordenadas de la estructura deben ser de una proteína con alta identidad. Mientras que si se utilizan datos de proteínas con 30 - 40 %

de identidad el reemplazo molecular puede generar un modelo defectuoso. Asimismo, con un porcentaje del 20 - 30 % de identidad el reemplazo molecular es difícil, pero puede llegar a realizarse exitosamente después de un arduo trabajo de análisis de los datos. Finalmente con un porcentaje de identidad menor del 20 % esta estrategia no puede realizarse (Rossmann, 1972; Hendrickson y Ogata, 1997; McCoy et al., 2007) y otras deben utilizarse como la colecta de datos en señal anómala.

Aun cuando a partir de los datos experimentales se ha logrado obtener una estructura de la proteína LvFSH, mediante reemplazo molecular, es importante mencionar que esta se considera preliminar, ya que es necesario mejorar en gran medida las estadísticas. Por otro lado, la obtención de un complejo enzima:análogo de sustrato podría proporcionar información importante acerca de la relación enzima:sustrato, además de muy probablemente mejorar la calidad de los cristales.

Detección de la Proteína LvFSH en Tejidos de Camarón

Inmunización y Purificación de Anticuerpos Policlonales anti-LvFSH

Se obtuvieron 2 mL de suero de conejo inmunizado. De este suero se logró obtener tras su purificación mediante cromatografía de afinidad en columna de proteína A y su diafiltración en un amicón de 10 kDa, un total de 1 mL de anticuerpos policlonales en solución salina y 10 mM de azida de sodio para su conservación. Estos fueron almacenados a 4 °C.

Para que un anticuerpo sean útiles en los inmunoensayos deben tener alta especificidad contra el antígeno para los cuales fueron preparados, así como selectividad y reproducibilidad bajo las condiciones de trabajo (Mattio et al., 2017; Bordeaux et al., 2010). Los anticuerpos policlonales (PAb) al representar una colección más variada de paratopes para un mismo antígeno, proporcionan mayores probabilidades de detección. Siendo la proteína LvFSH novedosa y sin conocer su forma de interacción como antígeno, los PAb resultan una herramienta con más alta probabilidad de detección para nuestras pruebas (Bordeaux et al., 2010). Por otro lado, aunque anticuerpos monoclonales pueden poseer una a mayor

especificidad su obtención implica mucho mayor requerimiento de reactivos, equipo e infraestructura.

Titulación de los anti-LvFSH Mediante Inmunoensayo de Manchas (Dot Blot)

En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de inmunodetección por manchas (Dot-Blot), mediante el cual se determinó el título de los anticuerpos policlonales anti-LvFSH generados en conejo. Como se muestra en los controles A, B y C (sin ningún anticuerpo, sin primer anticuerpo anti-LvFSH y sin segundo anticuerpo Goat anti-rabbit-AP) no se presentó señal de detección en ninguna de las diluciones de la proteína o buffer, lo cual indico nula reactividad cruzada o unión inespecífica de los anticuerpos. Las membranas D, E y F, en donde se utilizaron diferentes diluciones del primer anticuerpo (anti-LvFSH) a razón de 1:500, 1:1,000 y 1:1,500, respectivamente, en el blanco sin proteína (TBS) no hubo detección y la respuesta más intensa fue encontrada con la proteína sin diluir (0.228 mg/mL) y fue disminuyendo conforme aumenta la dilución de la misma. Las dilución 1:500 y 1:1,000 del anti-LvFSH mostraron detección de la proteína diluida hasta 1000 veces (0.000288 mg/mL), mientras que la dilución los anticuerpos 1:1,500 tuvieron detección de la proteína hasta 100,000 veces.

Como se menciona con anterioridad la especificidad es una de las características más importantes que los anticuerpos deben de tener, de tal modo que no debe presentar reactividad cruzada o esta debe ser controlada, ya que los anticuerpos pueden reaccionar con otros antígenos similares causando detecciones erróneas (Frank, 2002). Para este caso los anticuerpos anti-LvFSH fueron específicos y no presentaron reactividad cruzada, ya que en las condiciones de trabajo no hubo detección en los controles (sin primer anticuerpo anti-LvFSH, sin segundo anticuerpo Goat anti-rabbit-AP y sin ninguno de los dos anticuerpos), así como

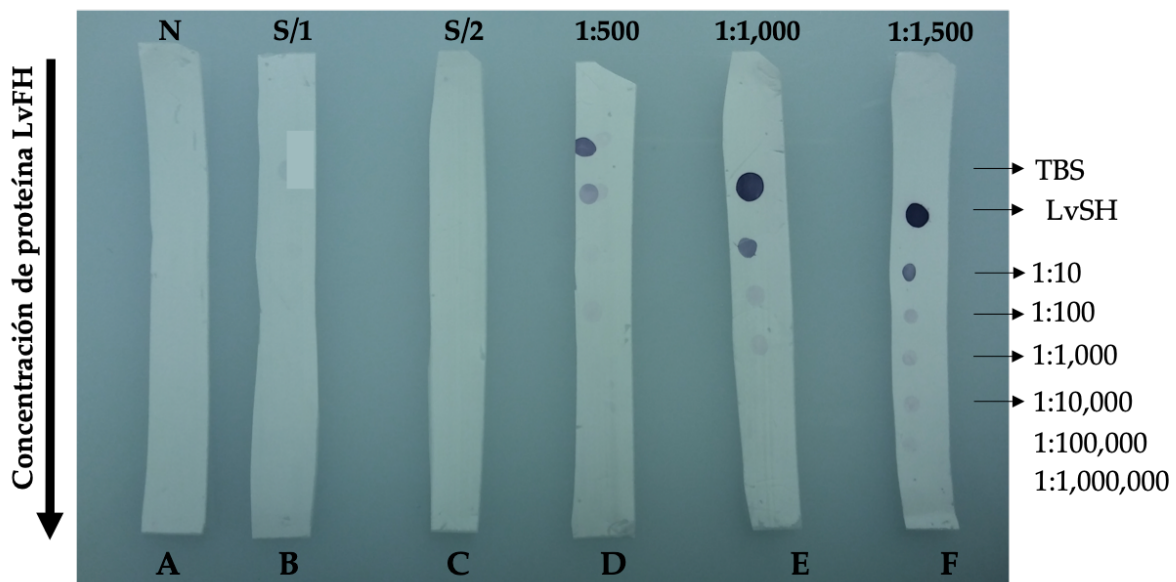


Figura 30. Titulación de los anticuerpos anti-LvFSH mediante ensayo de manchas Dot blot. A: sin ningún anticuerpo (N); B: sin primer anticuerpo Anti-LvFSH; C: sin segundo anticuerpo Goat anti-rabbit-AP; D, E, F, dilución del anticuerpo anti-LvFSH (1:500, 1:1,000 y 1:1,500, respectivamente). TBS, 2 μ L de buffer tris salino; LvFSH a 0.228 mg/mL y diluciones de la misma desde (1:10 hasta 1:1,000,000).

tampoco se presentó respuesta con el blanco de buffer tris salino (TBS) que se utilizó en todos los inmunoensayos como diluyente tanto de la proteína como de el anti-LvFSH.

El alcance de detección o título es también una característica importante de los anticuerpos. Los resultados mostraron que la dilución antiLvFSH (1:1500) alcanzó a detectar una dilución de 1:100,000. Lo anterior se atribuye al principio de equivalencia de la interacción antígeno-anticuerpo (Calderón, 2007; Lomonte, 2007), donde un exceso de cualquiera de los dos reactantes no resulta en una detección mayor, si no en imprecisión de las lecturas realizadas durante los métodos de inmunodetección; las concentraciones de ambos deben ser similares para alcanzarse la zona de equivalencia, punto donde antígeno anticuerpo son equimolares, lo cual con lleva lecturas más precisas y reproducibles.

Según el título obtenido de los anticuerpos anti-LvFSH preparados en el laboratorio, estos son aptos para su uso en los ensayos de inmunodetección de la proteína (Sohrabi et al., 2011) (Beards et al., 1983). Para las pruebas de inmunoblotting se eligió una dilución 1:1,000, debido a que el objetivo de estas pruebas es una detección cualitativa y la alta concentración de anticuerpos favorece la intensidad de interacción; en el caso de las pruebas ELISA, se siguió el principio de la equivalencia para las lecturas realizadas.

Inmunodetección de la Proteína LvFSH en Tejidos de Camarón Blanco

Extractos proteicos de tejidos de camarón

En la Tabla 6, se presentan la concentración de proteína de los distintos extractos obtenidos de los tejidos de camarón blanco y en la Figura 31 se presenta el patrón de bandeo proteico obtenido del análisis electroforético (SDS-PAGE) de los tejidos músculo (Mu), hepatopáncreas (He), pleópodos (Pl), intestino (In). branquias (Br), intestino posterior (Ip) y estómago (Es).

Tabla 6. Concentración de proteína de los extractos proteicos de los diferentes tejidos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

Tejido	Concentración de proteína por gramo de tejido (mg/g)
Pleópodos	11.97
Branquias	14.33
Músculo	16.93
Estómago	15.88
Hepatopáncreas	20.58
Intestino	9.26
Intestino posterior	20.96

*Determinada por método de ácido bicinonínico (BCA).
Análisis realizado por triplicado.*

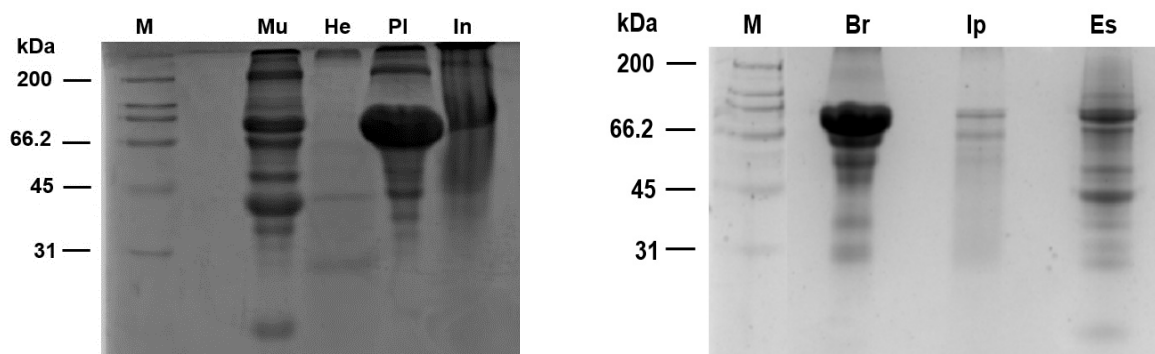


Figura 31. Análisis electroforético de los extractos de proteína de los diferentes tejidos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). M, Marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad); Mu, músculo; He, hepatopáncreas; Pl, pleópodos; In, intestino; Br, branquias; Ip, intestino posterior; Es, estómago.

Inmunodetección de la proteína Lv FSH mediante Western Blot

A continuación en la Figura 32 se presentan los resultados correspondientes a la inmunodetección de la proteína LvFSH en los tejidos hepatopáncreas (He), intestino (In), intestino posterior (Ip), estómago (Es), pleópodos (Pl), branquias (Br), músculo (Mu), en todos los ensayos el control positivo (10 µg de proteína LvFSH recombinante (Lv)) fue detectada exitosamente como una banda de 27 kDa correspondiente al monómero de la proteína. Una banda de este peso se detectó en el extracto de músculo Mu, indicando la posible localización de la enzima en ese tejido (Figura 32 c y d).

Con el fin de mejorar la inmunodetección encontrada (Mu) se realizó otro experimento de Western cargando de 200 a 20 µg de el extracto proteico de músculo (Figura 33). Sin embargo, los resultados obtenidos anteriormente no pudieron reproducirse. Igualmente se incluyó un control positivo de la proteína pura, la cual fue inmunodetectada alrededor de los 27 kDa.

Los ensayos de western blotting corroboraron la especificidad de los anticuerpos hacia la proteína LvFSH con la detección de la banda de 27 kDa. En los extractos de tejidos no se detectó la proteína, excepto en una sola ocasión en músculo, sin embargo este resultado no fue reproducible en ensayos posteriores, aún aumentando la concentración de proteína cargada al gel de electroforesis. Es importante, mencionar que los extractos de los tejidos fueron preparados a partir de un homogenizado de los 10 especímenes de camarón blanco muestreados; sin embargo, en el caso del tejido muscular, por la cantidad y tamaño disponible, se tomó muestra de un solo organismo, atribuyendo el hecho de no inmunodetectar la banda en otro organismo, a la variabilidad inter-individual. Por otro lado, se han reportado algunas desventajas de los métodos de detección por colorimetría en muestras de tejido muscular, siendo estos sujetos a un margen de error más alto debido a contaminación de muestra por células o componentes de otros tejidos (Bass et al., 2017)(Doumas et al., 1981).

Por lo anterior, fue el uso de otras pruebas de inmunodetección como los ensayos ELISA, que además de ser una prueba cuantitativa, ofrecen ser pruebas inmunoquímicas con mayor

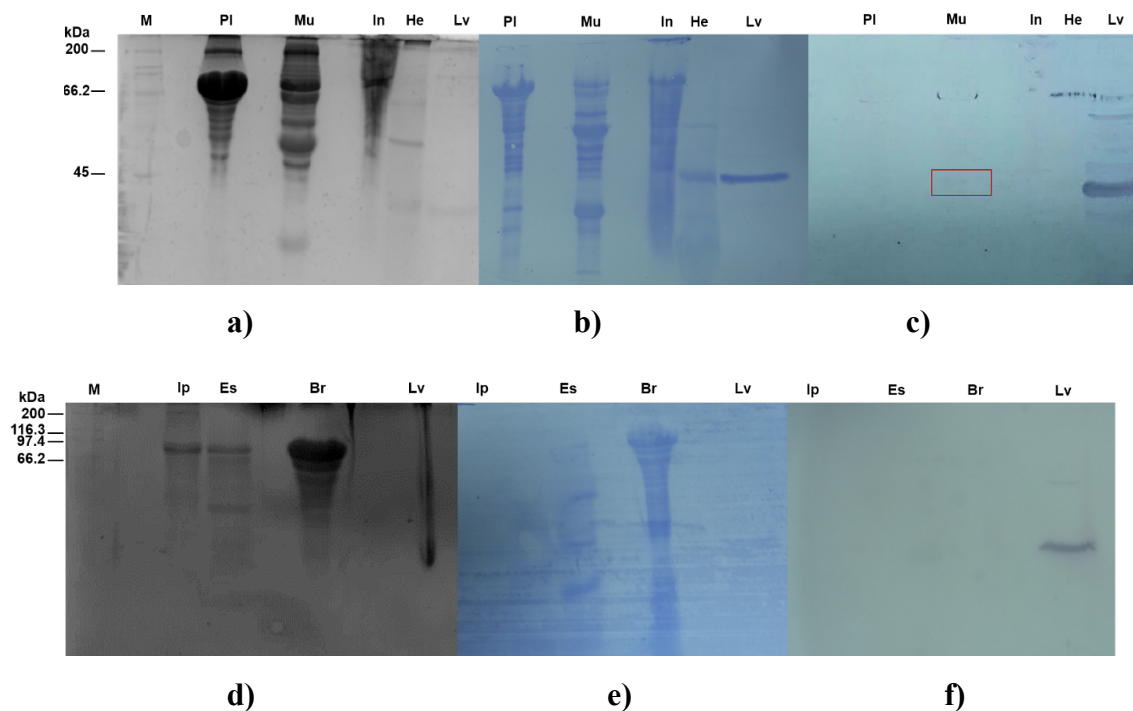


Figura 32. Western Blot de los extractos proteicos de tejidos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). M, marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad); Pl, de pleópodos; Mu, músculo; In, intestino; He, hepatopáncreas; Ip, intestino posterior; Es, estómago; Br, branquias; Lv, 10 µg de LvFSH como control positivo; a y d, SDS-PAGE; b y e, membranas teñidas con azul de Coomassie; c y f, Western Blot utilizando el anti-LvFSH como primer anticuerpo. Se cargaron 40 µg de proteína en cada carril.

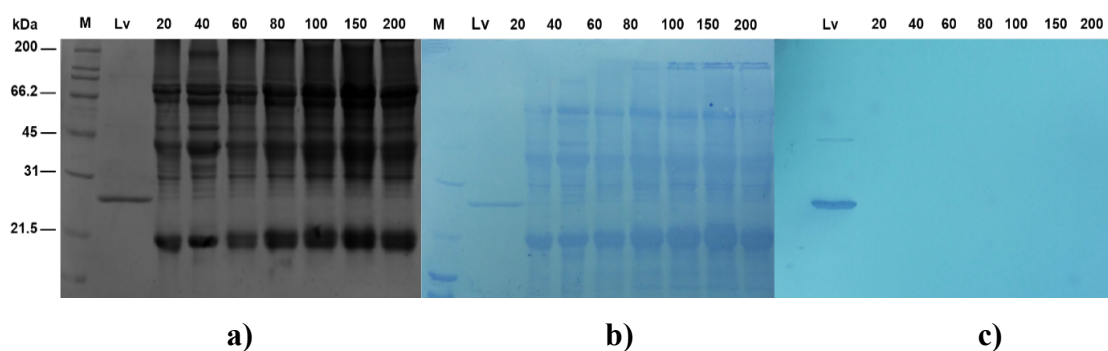


Figura 33. Inmunodetección de LvFSH en extracto de músculo (Mu) de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) mediante Western Blot. A, SDS-PAGE; B, membrana teñida con azul de Coomasie; C, Western blot utilizando anti-LvFSH como primer anticuerpo. M, Marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad); Lv, control positivo 10 µg de LvFSH. Se cargaron de 200 a 20 µg de proteína.

sensibilidad para localizar la proteína en los diferentes tejidos (Bass et al., 2017; BioRad, 2017).

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Primeramente fue elaborada una curva de estándar la cual fue realizada con proteína LvFSH pura (Figura 34) en un rango de concentración de 0.0017734 – 0.227 µg/mL.

En la Figura 35 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas ELISA para cada uno de los tejidos analizados. La proteína LvFSH fue inmunodetectada en todos los tejidos de camarón analizados. Utilizando la curva estándar construida a partir de la placa madre se determinó la concentración de LvFSH en miligramos por gramo de tejido (mg LvFSH/g tejido). Los niveles mayores fueron encontrados en branquias (41.38 mg LvFSH/g tejido), seguida de pleópodos con 25.40 mg LvFSH/g tejido, mientras que el estómago mostró el menor nivel (0.00022 mg LvFSH/g tejido) (Tabla 7).

Los estudios de inmunodetección en camarón blanco se enfocan en proteínas relacionadas a afecciones con interés acuícola. Técnicas como el ensayo de manchas (Dot blot), Western blot y ELISA han sido ampliamente utilizadas en la detección y diagnóstico de diferentes enfermedades, como son el virus de la mancha blanca (WSSV) virus de cabeza amarilla (YHV), síndrome del virus Taura (TSV), entre otros (Chaivisuthangkura et al., 2014).

Además, se han logrado detectar distintas proteínas en camarón blanco bajo condiciones similares a las descritas en este trabajo: Sahul et al. (1998) reportaron la detección del virus baculovirus (SEMBV) mediante técnicas Western Blot y ELISA; esta última con capacidad de análisis en cantidades mínimas (5 µL) de muestra de hemolinfa y/o extractos de tejidos infectados (saco ocular, branquias, cabeza y hemolinfa). Wang et al. (2009) reportaron la detección mediante Western Blot de la proteína de deficiencia inmune en diferentes tejidos (hepatopáncreas e intestino) de camarón blanco utilizando anticuerpos policlonales, localizándola en estos tejidos durante eventos de respuesta a un desafío inmune y regulando la expresión de la respuesta inmunológica. Específicamente, en el caso de lipasas, a través de técnicas inmunológicas se ha detectado una isoforma de la lipasa humana de 62 kDa en líneas

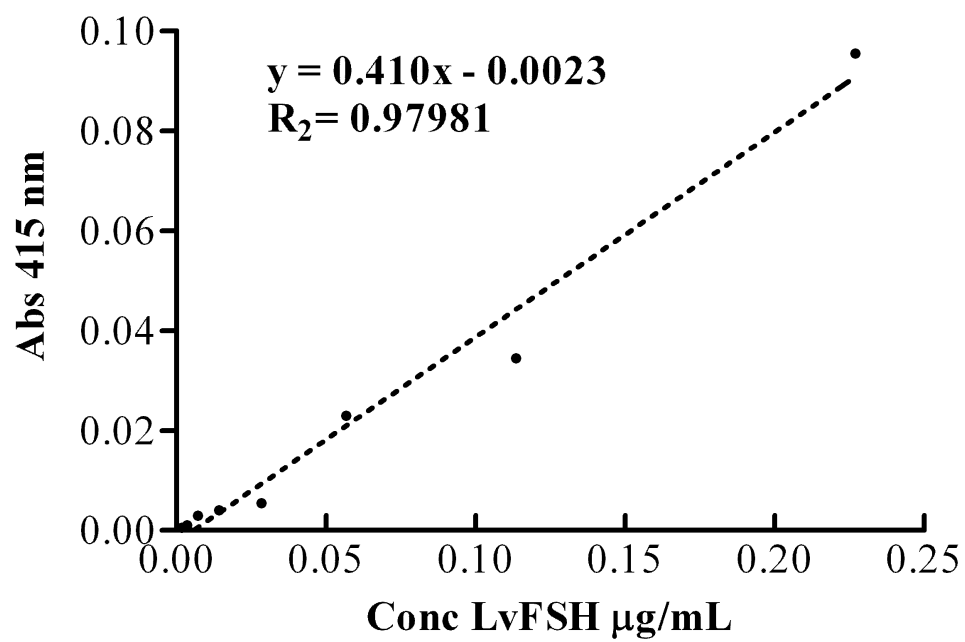


Figura 34. Curva estándar de inmunodetección de la proteína LvFSH para ensayos ELISA.

Tabla 7. Concentraciones de proteína LvFSH en tejidos de camarón blanco mediante ensayos de ELISA.

Tejido	Concentración de LvFSH mg LvFSH/g tejido$\pm$DS
Branquias	41.38 $\pm$ 4.8
Pleópodos	25.40 $\pm$ 2.6
Intestino	0.002 $\pm$ 0.0002
Hepatopáncreas	0.0007 $\pm$ 0.0001
Músculo	0.0003 $\pm$ 0.00002
Estómago	0.0002 $\pm$ 4E-05

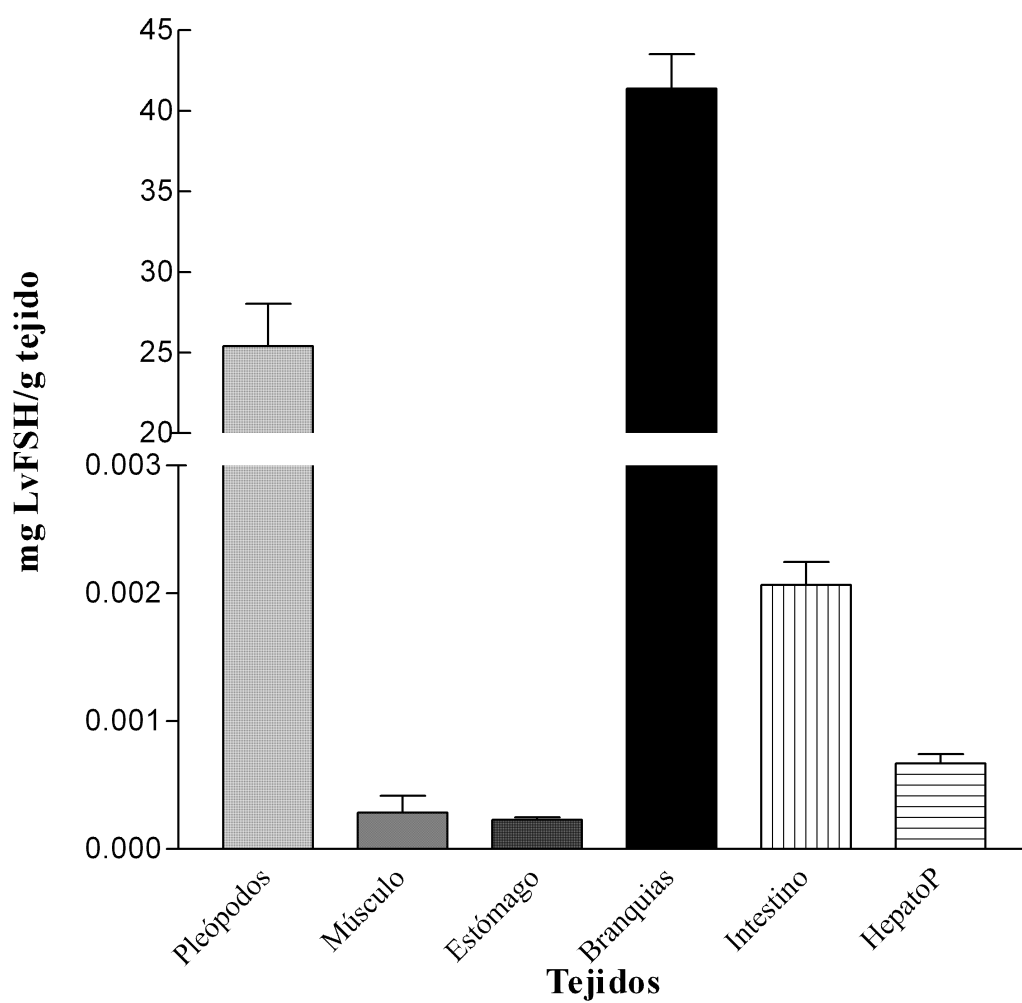


Figura 35. Niveles de proteína LvFSH en los tejidos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

celulares cancerígenas (Vérine et al., 1999); finalmente en otros invertebrados como el caracol *Hexaplex trunculus*, cuya proteína fosfolipasa A₂ de 30 kDa fue identificada por técnicas Western blot en extractos de hepatopáncreas (Zarai et al., 2011).

En el presente estudio fueron necesarias pruebas ELISA para detectar la proteína LvFSH en los diferentes extractos de camarón blanco lo cual podría indicar que esta proteína se encuentra en concentraciones muy bajas en el camarón. A diferencia de los ensayos Western Blot, ELISA detectó la proteína en todos los tejidos analizados excepto en intestino posterior. La proteína se detectó a una concentración mayor en branquias y pleópodos, lo anterior y los resultados de actividad enzimática podrían indicar que no se trata de una enzima con actividad lipolítica digestiva sino lisosomal.

En un estudio realizado por Rivera y García (2011) se identificaron los transcritos enzimas lipasas intracelular y extracelular en las glándulas digestivas de camarones sin embargo, en momentos de demanda energética diferente como ocurre en los periodos de ayuno, la expresión de lipasa intracelular se aumenta mientras que se decrece la de lipasa digestiva, indicando la movilización de lípidos durante periodos de ausencia de alimentos. No obstante, un punto clave de identificación entre un tipo de lipasa y otro fue la exclusividad de su expresión, ya que los transcritos de la lipasa digestiva fueron expresados únicamente en tejidos digestivos, mientras que la expresión de lipasa intracelular no se limitó a la glándula digestiva, sino que fue encontrada igualmente en pleópodos, músculos y otros tejidos no digestivos. En Smith et al. (1994) se describe la habilidad de síntesis de lipasas en diferentes tejidos y a niveles de transcripción distinta para el mantener la homeostasis lipídica durante condiciones de estrés. En camarón se ha reportado una lipasa intracelular de 196 kDa, la cual fue detectada en pleópodos y fue relacionada a las demandas energéticas de movimiento; no se ha reportado la presencia de lipasas en branquias de camarón blanco (Rivera et al., 2011).

Los niveles de la proteína LvFSH encontrados en tejidos de respiración y estructuras de movimiento como son branquias y pleópodos respectivamente, puede estar relacionada a las condiciones en las que los camarones utilizados se encontraban, niveles bajos de oxígeno y alto contenido orgánico suspendido. Durante condiciones de hipoxia donde el metabolismo

aerobio decrece, el organismo tiende a aumentar el uso de sus reservas de energía (Schmitt y Santos, 1993; Jiang et al., 2009).

Al atribuir un carácter intracelular a la proteína LvFSH con actividad lipolítica, y con base en similitudes moleculares y estructurales (identidad del 23 %) con la proteína YHR049W/FSH1 reportada en Quevillon et al., 2005, se propone que esta es una enzima de la familia de las serina hidrolasa de eucariotes (FSH: Familia de Serinas Hidrolasas) (Quevillon et al., 2005). Otras proteínas de regulación como la antes mencionada y OVCA2 presente en procesos de proliferación de tumoral en algunos tipos de cáncer en humano (Azizi et al., 2006) y la dihidrofolato reductasa, pertenecen también a esta superfamilia FSH de las α/β hidrolasas. Con todo lo anterior, se propone que la proteína de estudio LvFSH una función de carácter regulatorio con actividad hidrolítica de compuestos de naturaleza lipídica.

El catabolismo de lípidos, las enzimas que participan en él, sus mecanismos y regulación, son un área en crustáceos poco explorada pese a su importancia en el ciclo de vida de los invertebrados marinos. En crustáceos los estudios relacionados a lipasas intracelulares son escasos, de ahí que los mecanismos que regulan la expresión de sus transcritos para el uso, movilización y procesamiento de lípidos almacenados son poco conocidos. Los resultados y productos obtenidos en el presente trabajo de investigación podrían contribuir grandemente en los estudios bioquímicos y estructurales de las lipasas, sentando bases para comprender su importancia biológica.

CONCLUSIONES

El análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la proteína LvFSH identificó una nueva proteína de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) la cual pertenece a la familia de las α/β hidrolasa. La proteína recombinante obtenida como producto génico utilizando la herramienta de expresión recombinante mostro actividad tipo lipolítica (Palacios et al., 2004). La secuencia de aminoácidos y la tríada catalítica Ser-His-Asp basada en similitudes moleculares y estructurales (27 % de identidad) con la proteína FSH1/YHR049W, sugiere que esta lipasa podría ser parte de la familia serina hidrolasa (FSH) de eucariotes.

Proponemos que la función de LvFSH está más relacionada con la transducción de señales que con la función digestiva, ya que la secuencia de aminoácidos no contiene un péptido señal que permita la secreción al hepatopáncreas o al intestino. Además el volumen del sitio activo sugiere como sustrato lípidos con cadenas de hasta doce carbonos, y el camarón metaboliza preferiblemente ácidos grasos de cadena larga. Las múltiples interacciones proteína-proteína predichas por los métodos bioinformáticos serían bioquímicamente posibles en el espacio intracelular con un rango más amplio de interacciones, mientras que un ambiente digestivo la función catalítica sería crítica. La alta similitud de LvFSH con la proteína OVCA2 de humano, un importante participante en los procesos de proliferación tumoral, sugiere relevancia de la proteína en la biología de los organismos como es la movilización de lípidos para la producción de energía. Se requiere más investigación para dilucidar la función en invertebrados marinos.

Estructuralmente la enzima es una α/β -hidrolasa con todas las características estructurales para realizar la hidrólisis de lípidos, sin embargo es necesario mejorar la calidad de la estructura especialmente a nivel de orientación de los grupos laterales ya que estos son los que participan en la catálisis enzimática. Además, es importante cristalizar la proteína en complejo con un análogo no hidrolizable del sustrato para conocer el mecanismo catalítico de la enzima y explicar los resultados obtenidos de la actividad enzimática.

REFERENCIAS

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66:213-221. doi:10.1107/S0907444909052925
- Alatorre, F.M.R. (1998). La acuicultura en México: Un sector del futuro. *Panorama acuícola*. México, 175.
- Alberts, B. (1994). Molecular Biology of the cell. New York, Garland Pub, 787-863.
- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigo, K. D., Kaae S nderby, C., Nordahl Petersen, T., Winther, O., Brunak, S., Heijne, G., Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37:420-423. doi:10.1038/s41587-019-0036-z
- Arpigny, J., Jaeger, K. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J*, 343:177-183.
- Aschauer, P., Rengachari, S., Lichtenegger, J., Schittmayer, M., Das, K.M., Mayer, N., Breinbauer, R., Birner-Gruenberger, R., Gruber, C.C., Zimmermann, R., Gruber, K., Oberer, M. (2016). Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* monoglyceride lipase Yju3p. *Biochim Biophys Acta*. 1861, 5:462-70. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.02.005.
- Azizi Amedeo, A., Gelpi, E., Yang, J., Rupp, B., Andrew, K.G., Slater, C., Slavc, I., Lubec, G., (2006). Mass spectrometric identification of serine hydrolase OVCA2 in the medulloblastoma cell line DAO. *Cancer Letters*, 241:235-249. doi.org/10.1016/j.canlet.2005.10.023
- Bass, J., Wilkinson, D., Rankin, D., Phillips, B., Szezewyck, N., Smith, K., Atherton P. (2016). An Overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 27:4-25.
- Beards, G., Campbell, A., Cottrelli R., Peiris, J., Rees, N., Sanders, R., Shirley, J., Wood, H., Flewett, T. (1983). Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Polyclonal and Monoclonal Antibodies for Rotavirus Detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 2, 248-254.
- Bertani, L.E., Campbell, J.L. (1994) "The isolation and characterization of the gene (dfr1) encoding dihydrofolate reductase (DHFR) in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 147:131-135.
- Bhowmick, A., Brookes, D.H., Yost, S.R., Dyson, H.J., Forman-Kay, J.D., Gunter, D., Head-Gordon, M., Hura, G.L., Pande, V.S., Wemmer, D.E., Wright, P.E. y Head-Gordon T. (2016). Finding Our Way in the Dark Proteome. *J Am Chem Soc*, 138(31), 9730-

9742. Bio-Rad. (Third Edition). Protein Blotting Guide: A Guide to Transfer and Detection. United States of America: Bio-Rad.
- Bio-Rad. (2017). ELISA Basics Guide. Bio-rad-antibodies.com, (<https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2017/an-introduction-to-elisa/elisa-basics-guide.pdf>).
- Birari, R.B. y Bhutani K.K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug discovery today*. 12:879-889.
- Blakley, R. L. (1995). Eukaryotic dihydrofolate reductase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 70:23–102.
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*: 294(5): 1351-1362.
- Bordeaux, J., Welsh, A., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M., Hanna, J., Anagnostou, V., Rimm, D. (2010). Antibody Validation. *BioTechniques*. 48: 197:209.
- Bornscheuer, U.T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*. 26: 73-81.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, Nature Publishing Group 343:767–770.
- Bru, C., Courcelle, E., Carrère, S., Beausse, Y., Dalmar, S., Kahn, D. (2005). The ProDom database of protein domain families: more emphasis on 3D. *Nucleic acids research*, 33(Database issue), D212–D215. doi:10.1093/nar/gki034.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S. A. Thim, L. (1991) A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, Nature Publishing Group 351: 491–494.
- Cai, S., Wang, O., Wang, M., He, J., Wang, Y., Zhang, D., Zhou, F., Ji, B. (2012). In vitro inhibitory effect on pancreatic lipase activity of subfractions from ethanol extracts of fermented oats (*Avena sativa* L.) and synergistic effect of three phenolic acids. *J. Agric. Food Chem.* 60:7245-7251.
- Cajamarca Sacta, K.D. (2017). Evolución de la Entropía Durante la Transición Conformacional del Lazo 36 de la hemaglutinina. Tesis. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ciencias.
- Calderón, R.V. (2007). Curso de Métodos Físicoquímicos en Biotecnología. Universidad Autónoma de México. Ibt.unam.mx. Actualizado en 2007. (<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>).
- Calderón de la Barca, A.M., Wall, A., Jara, M., González, A., Ruíz, A. (2000). Modificación enzimática de las propiedades funcionales, nutricias y sensoriales de la soya para alimentación especial. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 1:26-34.

- Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray L.W., Richardson J.S., Richardson D.C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66:12-21.
- Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Sithigorngul, P. (2014). Immunological-based assays for specific detection of shrimp viruses. *World Journal of Virology* .1: 1-10.
- Coligan, J.E. (2003). Short protocols in protein science: a compendium of methods from Current protocols in protein science (First Edition ed.). New York: John Wiley & Sons Inc.
- CONAPESCA. (2017). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2017. www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca
- CONAPESCA. (2013). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013. www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca
- Córdova, L.R. (2002). “Camaronicultura: Avances y Tendencias”. México, D.F., AGT Editor, S.A.
- Côtes, K., N’goma, J.B., Dhouib, R., Douchet, I., Maurin, D., Carrière, F., Canaan, S. (2008) Lipolytic enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 741-749.
- d’Alençon, E., Taghbalout, A., Bristow, C., Kern, R., Aflalo, R., Kohiyama M. (2003). Isolation of a new hemimethylated DNA binding protein which regulates dnaa gene expression. *J Bacteriol.* May;185(9):2967-2971. doi:10.1128/JB.185.9.2967-2971.2003.
- Davey, N. E., Van Roey, K., Weatheritt, R.J., Toedt, G., Uyar, B., Altenberg, B., Budd, A., Diella, F., Dinkel, H., Gibson, T.J. (2012) Attributes of short linear motifs. *Mol. Biosyst.*, Royal Society of Chemistry 8:268–281.
- Dawson, N.L., Lewis, T.E., Das, S., Lees, J.G., Lee, D., Ashford, P, Sillitoe, I. (2017). CATH: an expanded resource to predict protein function through structure and sequence. *Nucleic Acids Res.* 45:289-295. doi: 10.1093/nar/gkw1098
- Del Monte, A., Nolasco, H., Forrellat, A., Aragón, C., García, A., Díaz, J., Carrillo, O. (2002) Evidencias de la presencia de lipasas en el hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitti*. Memorias del Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA. Zaragoza, España.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobittg, M., Montanyola, A., Chang, J. M., Notredame, C. (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic acids research*, 39(Web Server issue):W13–W17. doi:10.1093/nar/gkr245.
- Dolomanov, O.V., Bourhis, L.J., Gildea, R.J., Howard, J.A.K., Puschmann, H., IUCr. (2009) OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Crystallogr.*, International Union of Crystallography 42:339–341.

- Doumas, B., Bayse, D., Carter, R., Peters, T., Schaffer, R. (1981). A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. *Clinical Chemistry*, 10: 1642-1650.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C., Qureshi, M., Richardson, L.J., Salazar, G.A., Smart, A., Sonnhammer, E.L.L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S.C.E., Finn R.D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*. Volume 47, Issue D1:D427–D432.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 300:1005-1016.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66 (Pt 4):486-501.
- FAO. (2019). FAO. Fishery and Aquaculture Statistics 2017/FAO annuaire. Roma.
- FAO. (2014). The state of world fisheries and aquaculture. Opportunities and challenges., from FAO www.fao.org/3/a-i3720e.pdf.
- FAO. (2013). Visión general del sector acuícola nacional-México. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es#tcN70019.
- rFAO. (2012). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. from FAO www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf.
- FAO. (2006). Programa de información de especies acuáticas, *Pennaeus vannamei*. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es.
- FAO. (2001). Indian white prawn - Natural food and feeding habits. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fao.org. Actualizado en 2017. (<http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/indian-white-prawn/natural-food-and-feeding-habits/en/>).
- Forrellat Barrios, A., Del Monte, A., Estévez, T., Boburg, B., Nolasco, H., Carrillo Farnés, O. (2004). Caracterización de lipasas en tres especies de camarones peneidos. Su importancia en la digestión. Memorias del Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA. Zaragoza, España.
- Frank, S.A. (2002). Immunology and Evolution of Infectious Disease. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Gao, W.Y., Mulberg, A.E. (2014). Dependence of PERT Endpoint on Endogenous Lipase Activity. *Pancreas*. 43:1232-1238.
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., Cruz O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*. 22:30-39.
- García-López, J.A. (2017). Estructura cristalográfica de una triosa fosfato isomerasa (TIM) obtenida del estructuroma del camarón. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

- Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud pública de México*. 51: s439-s446.
- Ghaffari, N., Sanchez-Flores, A., Doan, R., Garcia-Orozco, K.D., Chen, P.L., Ochoa-Leyva, A., Lopez-Zavala, A.A., Carrasco, J.S., Hong, C., Briebe, L.G., Rudiño-Piñera, E., Blood, P.D., Sawyer, J.E., Johnson, C.D., Dindot, S.V., Sotelo-Mundo, R.R., Criscitiello, M.F. (2014). Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. *Scientific Reports* 4. DOI: 10.1038/srep07081.
- Gómez-Aguilar, C. (2017). Estudio de Inmunodetección de una Proteína Lipasa de Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Sonora.
- Gómez-Gil, B. (2002). Enfermedades Infecciosas más comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. Sinaloa, México, UAS, 14: 315-346.
- González, R. (2008). Perspectivas y retos para la exportación de camarón. from INAPESCA http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/ultima/03Gonzalez_R.pdf.
- González-Bacerio, J., Moreno-Medina, V.R., del Monte Martínez, A. (2010). Las lipasas: Enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 12: 113-140.
- González-Félix, M.L., Pérez-Velázquez, M. (2002). Current status of lipid nutrition of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Avances en Nutrición Acuicola. VI Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición.
- González-Pérez, C.J. (2016). Caracterización bioquímica y estructural de una lipasa de *Vibrio parahaemolyticus* causante de síndrome de mortalidad temprana en camarón blanco. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Gough, J., Karplus, K., Hughey, R., Chothia, C. (2001). Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J Mol Biol.* Nov 2;313(4):903-19.
- Gupta, R. Prediction of glycosylation sites in proteomes: from post-translational modifications to protein function. (2001). Ph.D thesis.
- Gupta, R., Brunak S. (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 7:310-322.
- Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soares, A.M.V.M. (1996). Acetylcholinesterase activity in juveniles of *Daphnia magna* straus. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*. 57, 979-985.
- Hamzaoui, S., Ben Salah, B., Hamden, K., Rekik, A., Kossentini, M. (2015). Synthesis and Evaluation of New Bis-1, 3, 4, 2-triazaphospholinoalkane Derivatives as In Vitro α -Amylase and Lipase Inhibitors. *Archiv der Pharmazie*. 348: 188-193.

- Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.*, BioMed Central 4:17.
- Hasan F., Shah A.A., Hameed A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnology advances*. 27: 782-798.
- Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C., Ollis, D.L. (1999). Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. *Structure*. Cell Press 7:R141–R146.
- Hendrickson, W.A., Ogata, C.M. (1997). [28] Phase determination from multiwavelength anomalous diffraction measurements. *Methods in Enzymology*, 276:494-523.
- Holmes, R.S. y Cox, L.A. (2012). Bioinformatics and Evolution of Vertebrate Pancreatic Lipase and Related Proteins and Genes. *J. Data Mining Genomics Proteomics* 3:111.
- Holmquist, M. (2000). Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms. *Current Protein and Peptide Science*, Vol. 1, No. 2:209-235.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS microbiology reviews*. 15: 29-63.
- Jiang, H., Li, F., Xie, Y., Huang, B., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, C., Li, S., Xiang, J. (2009). Comparative proteomic profile of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress. *Proteomics*, 12: 3353-3357.
- Joshi, J., Srisala, J., Truong, V.H., Chen, I.-T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo, C.F., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S. (2014). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*. 428: 297-302.
- Kademi, A., Aït-Abdelkader, N., Fakhreddine, L. and Baratti, J. C. (2000). Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, Elsevier 10:395–401.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre² web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protocols*. 10: 845-858.
- Kim, K.K., Song, H.K., Shin, D.H., Hwang, K.Y., Suh, S.W. (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structur*. Elsevier 5:173–85.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Ladner, C., Yang, J., Turner, R.J., Edwards, R.A. (2004). Visible Fluorescence Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels without staining. *Anal. Biochem*. 326:13-20.
- Lara, Á.R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Revista mexicana de ingeniería química. 10: 209-223.
- Lee, C.T., Chen, I.T., Yang, Y.T., Ko, T.P., Huang, Y.T., Huang, J.Y., Huang, M.F., Lin, S.J., Chen, C.Y., Lin, S.S. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio*

- parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112: 10798-10803.
- Leenaars, M. y Hendriksen, C.F.M. (2005). Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR J. Narnia* 46:269–279.
- Lenfant, N., Hotelier, T., Velluet, E., Bourne, Y., Marchot, P., Chatonnet, A. (2012). ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Research*. 41:D423–D429. DOI: 10.1093/nar/gks1154.
- Lehninger, A.L., Cox, M.M., Nelson, D.L. (2013). *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Letchumanan, V., Chan, K.G., Lee, L.H. (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Front. Microbiol.* 5: 10.3389.
- Letunic, I., Doerks, T., & Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D257–D260. doi:10.1093/nar/gku949.
- Letunic, I., & Bork, P. (2018). 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic acids research*, 46(D1), D493–D496. doi:10.1093/nar/gkx922.
- Liebschner, D., Afonine, P.V., Baker, M.L., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Croll, T.I., Hintze, B., Hung, L.W., Jain, S., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R.D., Poon, B.K., Prisant, R.J., Read, J.S., Richardson, D.C., Richardson, M.D., Sammito, O.V., Sobolev, M.G., Stockwell, D.H., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A.G., Videau, L.L., Williams, C.J., and Adams, P.D. (2019). Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Cryst.* D75:861-877.
- Lomonte, B. (2007). *Manual de Métodos Inmunológicos*. Universidad de Costa Rica. Instituto Clodomiro Picado. [Icp.ucr.ac.cr](http://www.icp.ucr.ac.cr). Actualizado en 2007. (<http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>).
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *The Lancet*. 361: 743-749.
- Mala, J.G.S. y Takeuchi, S. (2008). Understanding structural features of microbial lipases—an overview. *Anal. Chem. Insights*. 3:9.
- Martínez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthysens, G., Cambillau, C. (1992). Fusarium solani cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, Nature Publishing Group. 356:615–618.
- Martínez Córdova, L., Porchas, M. y Villareal, H. (2009). Efecto de tres diferentes estrategias de alimentación sobre el fitoplancton, zooplancton y bentos en estanques de cultivo de camarón café *Penaeus californiensis*. *Cienc. Mar.* 24: 267-281.

- Mathews, C.K. y Van Holde, K.E. (2003). Bioquímica (3ªEd.). Addisson Wesley.
- Matthews, B.W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 2:491-497.
- Mattio, M., Peretti M., Lurá M., Latorre, M. (2017). Validación de una técnica de Dot Blot para la detección de *Cercospora kikuchii* en plantas de soja. *Revista Argentina de Microbiología.* 223:5.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography.* 40,4: 658-674.
- Mercado Malebrán, F. (2014). Modelamiento estructural y caracterización de una lipasa activa a bajas temperaturas mediante ingeniería de proteínas. Tesis. Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas. Departamento de Ingeniería.
- Miled, N., Canaan, S., Dupuis, L., Rousel, A., Riviere, M., Carriere, F., de Caro, A., Cambillau, C., Verguer, R., (2000). Digestive lipases: from three-dimensional structure to physiology. *Biochimie.* 82:973-986.
- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.*, May 12:88-118.
- Moreau, H., Bernadac, A., Trétout, N., Gargouri, Y., Ferrato, F., Verger. R., (1990). Immunocytochemical localization of rabbit gastric lipase and pepsinogen. *Eur J Cell Biol*;51:165–72.
- Moretti, S., Armougom, F., Wallace, I.M., Higgins, D.G., Jongeneel, C.V., Notredame, C. (2007). The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic acids research*, 35(Web Server issue):W645–W648. doi:10.1093/nar/gkm333.
- Morrison, R. y Boyd, R. (1992). Organic Chemistry (Prentice Hall, New Jersey).
- Nardini M., Dijkstra B.W. (1999). Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol.* Dec (9)6:732-7.
- Nardini, M., Lang, D.A., Liebeton, K., Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. (2000). Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation THE prototype for family I. 1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* 275: 31219-31225.
- Navarro González, I. y Periago Castón, M.J. (2012). Enzimas lipolíticas bacterianas: propiedades, clasificación, estructura, aplicaciones tecnológicas y aspectos legales. *Anales de Veterinaria* (Murcia). 28: 45-65.
- Nawani, N., Dosanjh, N.S., Kaur, J. (1998). A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnol. Let.* 20: 997-1000.
- Nawani, N., Khurana, J., Kaur, J. (2006a). A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization. *Molecular and cellular biochemistry.* 290(1-2): 17-22.

- Nawani, N., Singh, R., Kaur, J. (2006b). Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9(5): 559-565.
- Nirupama, N., Nirpjit, S.D., Jagdeep, K. (1998). A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and sterification studies. *Biotechnology Letters*. 20(10): 997-1000.
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Organ.*
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G., Goldman A. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*. 5:197–211. DOI: 10.1093/protein/5.3.197.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 300: 1005-1016.
- Palacios, E., Bonilla, A., Pérez, A., Racotta, I.S., Civera, R. (2004). Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, Elsevier 299:201–215.
- Papaneophytou, C.P. and Kontopidis, G. (2014). Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein expression and purification*. 94: 22-32.
- Park, Y.J., Choi, S.Y., Lee, H.B. (2006). A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1; purification, characterization, and expression. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1760: 820-828.
- Pathak, D. Y Ollis, D. (1990). Refined structure of diene lactone hydrolase at 1.8 Å. *J. Mol. Biol.* 214, 497–525.
- Pauling, L. (1964). The Nobel Prize in Chemistry 1945. Nobel Lectures, Chemistry Elsevier Publishing Company 1942-1962.
- Perdigao, N., Heinrich, J., Stolte, C., Sabir, K.S., Buckley, M.J., Tabor, B., Signal, B., Gloss, B.S., Hammang, C.J., Rost, B., Schafferhans, A., O'Donoghue, S.I. (2015). Unexpected features of the dark proteome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(52):15898-15903.
- Pierleoni, A., Martelli Pier, L., Fariselli, P., Casadio, R. (2006). BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics*, 22, 14, 15:e408–e416.
- Plou, F.J., Ferrer, M., Nuero, O.M., Calvo, M.V., Alcalde, M., Reyes, F., Ballesteros, A. (1998). Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnol. Tech.* Kluwer Academic Publishers 12:183–186.
- Pride, A.C., Guan, Z., Trent, M.S. (2014). Characterization of the *Vibrio cholerae* VolA Surface-Exposed Lipoprotein Lysophospholipase. *J. Bacteriol.* 196: 1619-1626.

- Quevillon-Cheruel, S., Collinet, B., Zhou, C.-Z., Minard, P., Blondeau, K., Henkes, G., Aufrere, R., Coutant, J., Guittet, E., Lewit-Bentley, A., Leulliot, N., Ascone, I., Sorel, I., Savarin, P., de La Sierra Gallay, I. L., de la Torre, F., Poupon, A., Fourme, R., Janin, J. & van Tilbeurgh, H. (2003). A structural genomics initiative on yeast proteins. *J. Synchrotron Radiat.*, International Union of Crystallography 10, 4–8.
- Quevillon-Cheruel, S., Liger, D., Leulliot, N., Graille, M., Poupon, A., De la Sierra-Gallay, I. L., Zhou, C.-Z., Collinet, B., Janin, J. and Van Tilbeurgh, H. (2004). The Paris-Sud yeast structural genomics pilot-project: from structure to function. *Biochimie*, Elsevier 86: 617–623.
- Quevillon-Cheruel, S., Leulliot, N., Graille, M., Hervouet, N., Coste, F., Bénédicti, H., Van Tilbeurgh, H. (2005). Crystal structure of yeast YHR049W/FSH1, a member of the serine hydrolase family. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 14(5), 1350–1356. doi:10.1110/ps.051415905.
- Rengachari, S., Aschauer, P., Schittmayer, M., Mayer, N., Gruber, K., Breinbauer, R., Birner-Gruenberger, R., Dreveny, I., Oberer, M. (2013). Conformational plasticity and ligand binding of bacterial monoacylglycerol lipase. *J. Biol. Chem.* 288: 31093-31104.
- Rivera-Pérez, C. y García-Carreño, F. (2011). Effect of fasting on digestive gland lipase transcripts expression in *Penaeus vannamei*. *Marine genomics* 4(4): 273-8.
- Rivera-Pérez, C., Navarrete del Toro, M. y García-Carreño, F. (2011a). Purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 158(1): 99-105.
- Rivera-Pérez, C., García-Carreño, F.L., Saborowski, R. (2011b). Purification and biochemical characterization of digestive lipase in whiteleg shrimp. *Mar. Biotechnol.* 13: 284-295.
- Rodríguez-Valencia, J.A., Crespo, D., López-Camacho, M. (2010). La camaronicultura y la sustentabilidad del Golfo de California. México. Retrieved from http://awsassets.panda.org/downloads/rep_camaronicultura_golfo_california_1030.pdf
- Rosano, G.L. y Ceccarelli, E.A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Recombinant protein expression in microbial systems*: 7.
- Rosenau, F., Tommassen, J., Jaeger, K.E. (2004). Lipase-specific foldases. *Chembiochem.* 5: 152-161.
- Rossmann, M.G. (1990). The Molecular Replacement Method. *Acta Cryst.* A46:73-82.
- Ruiz, C., Javier Pastor, F.I., Díaz, P. (2003). Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 LipA, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species. *Letters in applied microbiology.* 37(4): 354-359.
- Sahul, A.S., Anilkumar, M., Stephen, M.L., Jayaraman, K.. (1998). Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture*, 160: 31-45.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning* (Vol. 2): Cold spring harbor laboratory press New York.
- Sánchez-Otero, M.G., Valerio-Alfaro, G., García-Galindo, H.S., Oliart-Ros, R.M. (2008). Immobilization in the presence of Triton X-100: modifications in activity and thermostability of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 lipase. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 35(12):1687-93.
- Saun, N.K., Mehta, P., Gupta, R. (2014). Purification and Physicochemical Properties of Lipase from Thermophilic *Bacillus aerius*. *J. Oleo Sci.* 63:1261-1268.
- Schmitt, A., y Santos, E. (1993). Lipid and Carbohydrate Metabolism of the Intertidal Crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda) During Imersion. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2: 329-336.
- Schlömann, M., Ngai, K.L., Ornston, L.N., Knackmuss, H.J. (1993). Dienelactone hydrolase from *Pseudomonas cepacia*. *J Bacteriol.* May, 175,10:2994-3001. doi:10.1128/jb.175.10.2994-3001.
- Schrödinger, L. (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4
- Seibert, G., Toti, L., Wink, J. (2008). Treating mycobacterial infections with cyclipostins: WO/2008/025449.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-662.
- Sigrist, C.J., de Castro, E., Cerutti, L., Cucho, B.A., Hulo, N., Bridge, A., Xenarios, I. (2013). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic acids research*, 41(Database issue):D344–D347. doi:10.1093/nar/gks1067
- Sippl, M.J. (1993). Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. *Proteins*. 17:355-362.
- Smith, G.M., Rothwell, K., Wood, S., Yeaman, S., Bownes M. (1994). Specificity and localization of lipolytic activity in adult *Drosophila melanogaster*. *Biochememical Journal*. 304: 775–779.
- Sohrabi, S., Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Farhangi, A., Mortazavi, M., Reza, M., Chiani, M., Saffari, Z., Ghassemi, S. (2011). Production and Purification of Rabbit's Polyclonal Antibody Against Factor VIII. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 4: 354-359.
- Sørensen, H.P. y Mortensen, K.K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*. 4: 1.
- Stryjewska, A., Kiepusa, K., Librowski, T., Lochyński, S. (2013). Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacological Reports*. 65: 1075-1085.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Mering, C.V. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage,

- supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*. 47(D1):D607–D613. doi:10.1093/nar/gky1131.
- Thoms, S., Debelyy, M.O., Connerth, M., Daum, G., Erdmann, R. (2011). The putative *Saccharomyces cerevisiae* hydrolase Ldh1p is localized to lipid droplets. *Eukaryotic cell*, 10(6):770–775. doi:10.1128/EC.05038-11.
- Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J. and Liang, J. (2018). CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res.*, Narnia 46:W363–W367.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 9: 4350-4354.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohny, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K., Lightner, D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Organ.*:45-55.
- Tőke, E.R., Nagy, V., Recseg, K., Szakács, G., y Poppe, L. (2007). Production and Application of Novel Sterol Esterases from *Aspergillus* Strains by Solid State Fermentation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Springer-Verlag 84:907–915.
- Tsurumura, T. y Tsuge, H. (2014). Substrate selectivity of bacterial monoacylglycerol lipase based on crystal structure. *J. Struct. Funct. Genomics*. 15:83-89.
- Uyar, B., Weatheritt, R.J., Dinkel, H., Davey, N.E., Gibson, T.J. (2014). Proteome-wide analysis of human disease mutations in short linear motifs: neglected players in cancer? *Mol. BioSyst.*, Royal Society of Chemistry 10:2626–2642.
- van Pouderooyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. (2001). The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.*, Academic Press 309:215–226.
- Van Roey, K., Uyar, B., Weatheritt, R.J., Dinkel, H., Seiler, M., Budd, A., Gibson, T.J., Davey, N.E. (2014). Short Linear Motifs: Ubiquitous and Functionally Diverse Protein Interaction Modules Directing Cell Regulation. *Chem. Rev.* American Chemical Society 114:6733–6778.
- Verger, R. (1997). ‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* Elsevier 15:32–38.
- Vérine, A., Bruneau, N., Valette, A., Le Petit-Thevenin, J., Pasqualini, E., Lombardo, D. (1999). Immunodetection and molecular cloning of a bile-salt-dependent-lipase isoform in HepG2 cells. *Biochemical Journal*. 342:179-187.
- Wang P., Gu, Z., Haung, Z., Liu, B., Deng, Z., Ai, H., Wang, J., Yin, Z., Weng, S., Yu, X., He, J. (2009). An immune deficiency homolog from the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, activates antimicrobial peptide genes. *Molecular Immunology*. 46:1897-1904.

- Wei, Y., Schottel, J.L., Derewenda, U., Swenson, L., Patkar, S., Derewenda, Z.S. (1995). A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, Nature Publishing Group 2:218–223.
- Whitmore, L. y Wallace, B.A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* Jul 1;32(Web Server issue):W668-73.
- Wiederstein, M. y Sippl, M.J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research.* 35:W407-W410.
- Yakunin, A.F., Yee, A.A., Savchenko, A., Edwards, A.M., Arrowsmith, C.H. (2004). Structural proteomics: a tool for genome annotation. *Current Opinion in Chemical Biology* 8:42–48. DOI: 10.1016/j.cbpa.2003.12.003.
- Yu, C.S., Lin, C.J., Hwang, J.K. (2004). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Science.* 13:1402-1406.
- Yu, C.S., Chen, Y.C., Lu, C.H., Hwang, J.K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics.* 64:643-651.
- Zarai, Z., Boulais, N., Karray, A., Misery, L., Bezzine, S., Rebai, T., Gargouri, Y., Mejdoub, H. (2011). Immunohistochemical localization of hepatopancreatic phospholipase A₂ in *Hexaplex trunculus* digestive cells. *Lipids in Health and Disease*:10-91.
- Zhang, C. y Kim, S.K. (2010). Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Mar. Drugs.* 8: 1920-1934.
- Zhang, X., Yuan, J., Sun, Y., Li, S., Gao, Y., Yu, Y., Liu, C., Wang, Q., Lv, X., Zhang, X., Ma, K.Y., Wang, X., Lin, W., Wang, L., Zhu, X., Zhang, C., Zhang, J., Jin, S., Yu, K., Kong, J., Xu, P., Chen, J., Zhang, H., Sorgeloos, P., Sagi, A., Alcivar-Warren, A., Liu, Z., Wang, L., Ruan, J., Chu, K.H., Liu, B., Li, F., Xiang, J. (2019). Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nature Communications* 10:356. DOI: 10.1038/s41467-018-08197-4.

<http://nutricionanimal.mx/glosario-nutricion-animal/aminoacido>

<https://www.significados.com/aminoacidos/>

<https://www.asturnatura.com/articulos/proteinas/aminoacidos-estereoisomeria.php>).

(<http://www.chemistryexplained.com/Ge-Hy/Hydrolase.html>).

<https://medium.com/@Rogerloaeza/amino%C3%A1cidos-44766664f9f8>

www.asturnatura.com/articulos/proteinas/isomeria-enlace-peptidico.php

<https://www.nature.com/subjects/hydrolases>