UNIVERSIDAD DE SONORA

FACULTAD INTERDISCIPLINARIA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Purificación y caracterización molecular de la glutatión S-transferasa recombinante de clase *rho* (GSTR2) de Tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus)*

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

Q.A. Luis Pablo Velázquez Valdez

Hermosillo, Sonora Noviembre 2024

RESUMEN

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es una especie acuícola ampliamente cultivada por su rápido crecimiento, tolerancia a diversas condiciones ambientales y alta capacidad reproductiva. Esta investigación se enfocó en la glutatión S-Transferasa (EC 2.5.1.18) de clase Rho (GSTR2) mediante un enfoque combinado bioinformático y experimental. Inicialmente, se realizaron búsquedas exhaustivas de secuencias homólogas y se construyó un árbol filogenético para comparar GSTR2 con otras clases de GST. Los resultados mostraron que las GST de clase rho se agruparon dentro de un clado principal, con la presencia de clados divergentes dentro de esta misma clase, lo que podría estar relacionado con diferencias funcionales o estructurales. El modelo estructural de GSTR2 fue inicialmente obtenido mediante predicción de novo usando ColabFold, sin embargo, se optó por utilizar el modelo de AlphaFold (entry: G7Z098) debido a su menor incertidumbre y la presencia de características típicas de las GST, como el dominio de tioredoxina en el N-terminal. El modelo de AlphaFold mostró una mayor confiabilidad en comparación con el generado de novo, especialmente en las regiones clave para la actividad enzimática. El gen que codifica para GSTR2 fue clonado en el plásmido pET-11a(+) y optimizado para su expresión recombinante en *Escherichia coli* BL21 (DE3) Gold, utilizando 1.0 mM de IPTG para inducir su expresión a 37 °C durante 18 horas. La proteína fue recuperada de cuerpos de inclusión, solubilizada con urea 8 M y purificada mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC), utilizando la etiqueta de poli-histidina añadida al dominio N-terminal. La presencia de GSTR2 se confirmó mediante SDS-PAGE 15% y Western blot observándose su banda en el rango de 28.4kDa, y su conformación activa fue restaurada mediante replegamiento por diálisis. Los ensayos de actividad enzimática demostraron que GSTR2 cataliza la conjugación del 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) con glutatión reducido (GSH). La enzima mostró una actividad de 0.000139 unidades/mg en presencia de 0.5 M de urea; sin embargo, la eliminación de urea provocó precipitación de la proteína, resaltando la importancia de optimizar las condiciones de replegamiento para mantener su funcionalidad. Estos hallazgos aportan conocimientos clave sobre la estructura y actividad de GSTR2, con implicaciones para futuras aplicaciones biotecnológicas.