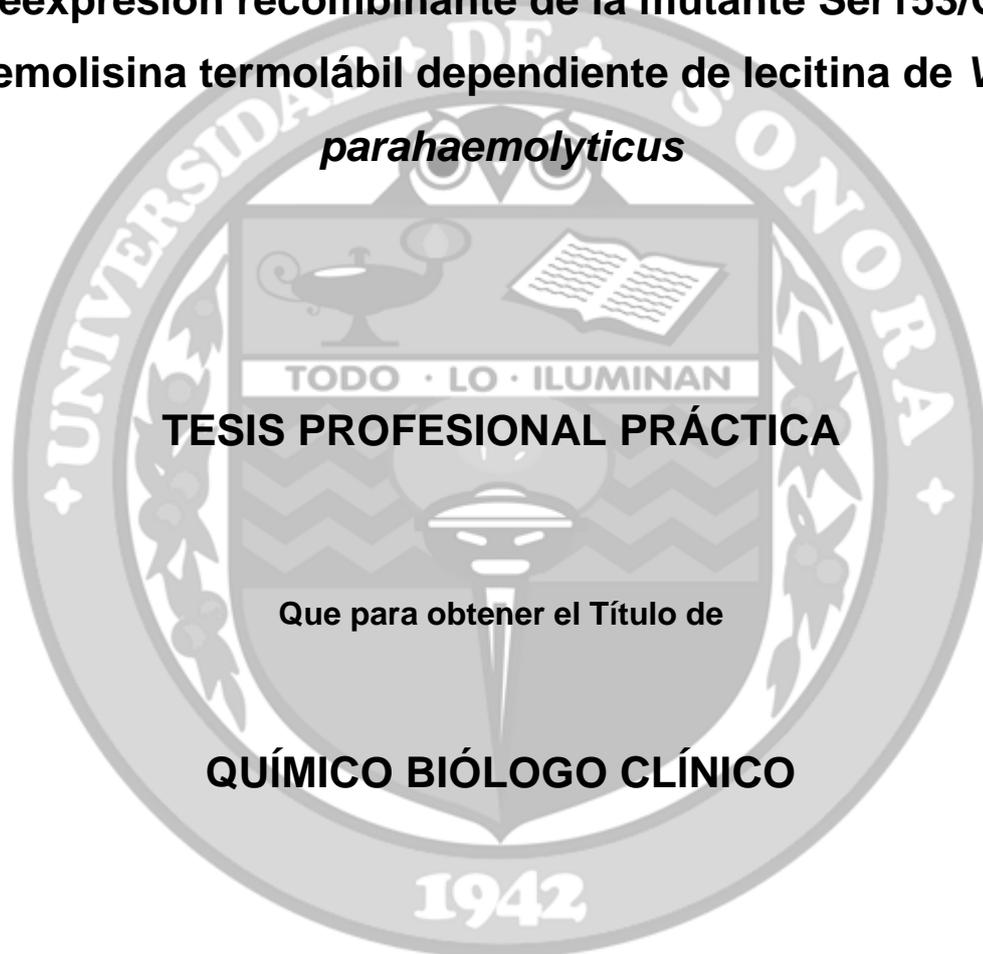


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Sobreexpresión recombinante de la mutante Ser153/Gly de
la hemolisina termolábil dependiente de lecitina de *Vibrio
parahaemolyticus***



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Michelle Adriana Grajeda Gutiérrez

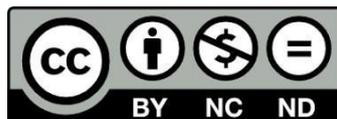
Hermosillo, Sonora, México.

Enero de 2019

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

COMITÉ DE TESIS

Dr. Alonso Alexis López Zavala
Director

Dra. Maritza Lizeth Álvarez Ainza
Secretario

Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo
Sinodal

M.C Elena Nohelí Moreno Córdova
Suplente

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Michelle Adriana Grajeda Gutiérrez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Químico Biólogo Clínico.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi director de tesis el Doctor Alexis López por todo el apoyo que me brindó a lo largo de mi trabajo. Usted es de esas personas difíciles de encontrar, sencillo, paciente, atento y dispuesto a brindar ayuda y compartir sus conocimientos con los demás. Le agradezco todo lo que me enseñó y me llevó de usted esa humildad tan grande que lo caracteriza. A mis compañeros de laboratorio y maestros muchas gracias por su ayuda, por las risas y por los momentos tan divertidos que compartimos, estoy segura que no encontraré compañeros tan buenos y sencillos como ustedes. A la Universidad de Sonora quiero agradecerle infinitamente por los años que me albergó, sin duda alguna fue una de las mejores etapas en mi vida.

Agradezco la beca que me fue otorgada y el financiamiento para el desarrollo de esta tesis al proyecto “Sobreexpresión recombinante y caracterización bioquímica parcial de la mutante (Ser153/Gly) de la hemolisina dependiente de lecitina de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno para camarón” del Programa para el Desarrollo del Personal Docente en la modalidad Nuevo profesor de tiempo completo. Vigencia 01/06/2017 a 01/06/2018.

Le extiendo mi agradecimiento al Dr. Adrián Ochoa, IBT-UNAM y al Biólogo Filiberto Sánchez López por la colaboración en la elaboración de la *LDH* mutante a partir de la secuencia codificante de la *LDH* nativa. Sin su trabajo esto no hubiera sido posible.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de tesis a mi familia que me apoyo día a día desde mi entrada no solo a la Universidad sí no a mi vida académica, gracias por inspirarme y motivarme a ser un estudiante con aspiraciones y metas.

A mis padres en especial quiero decirles que agradezco mucho todos los sacrificios que tuvieron que hacer para que yo esté el día de hoy aquí cumpliendo unos de mis sueños y metas, gracias por todas las veces que se levantaron temprano para llevarme a la escuela, gracias por ayudarme con mis tareas, gracias por asegurarse que nunca me faltara que comer aun en mis largas jornadas de trabajo, gracias por eso y por muchas cosas más. Los amo y llevo todas esas experiencias conmigo.

A mis hermanos quiero decirles que ustedes me inspiran a querer ser alguien mejor y yo, como su hermana mayor, siempre he buscado ser una inspiración para ustedes y espero aprendan de mí las cosas buenas que tengo para ofrecerles. Ustedes son un motor en mi vida, jamás lo duden o lo olviden.

A mi mejor amiga muchas gracias por todo tu apoyo a lo largo de los años, sabes lo importante que eres para mí y lo mucho que me inspiras no solo académicamente, sino en todo aspecto, te convertiste en la hermana que nunca tuve.

A mis amigos gracias por hacer mi vida en la Universidad muy divertida y amena, voy a extrañar todas esas idas por un café, las risas, el apoyo y todos esos momentos los llevo conmigo siempre.

CONTENIDO

	Página
FORMATO DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
I. INTRODUCCION	10
II. OBJETIVOS	12
II.1 Objetivo General	12
II.2 Objetivos Específicos	13
III. ANTECEDENTES	14
III.1 El Camarón Blanco y la Importancia de su Estudio	14
III.2 Principales Enfermedades en el Cultivo de Camarón	14
III.3 Vibriosis	16
III.4 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17
III.4.1 Factores de Virulencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17
III.4.2 Sistemas de Secreción tipo III y tipo IV	18
III.4.3 Hemolisinas	19
III.5 Acción de las Fosfolipasas	20
III.6 Importancia Catalítica y Hemolítica de la Mutante Ser153/Gly_LDH	21
III.6.1 Cambio de Serina por Glicina	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	25
IV.1 Transformación bacteriana	25
IV.2 Preparación del Inóculo bacteriano	25
IV.3 Sobreexpresión Recombinante de la Mutante Ser153/Gly_LDH	27
IV.3.1 Cinética de Sobreexpresión	27

IV.4 Preparación del Extracto Crudo y Purificación de Cuerpos de Inclusión	28
IV.4.1 Extracción de Cuerpos de Inclusión	28
IV.4.2 Purificación de la mutante Ser153/Gly_LDH por Cromatografía de afinidad a metales (IMAC)	30
IV.4.3 Replegamiento de la proteína	30
IV.5 Ensayo de Actividad Fosfolipasa	32
IV.6 Ensayo de Actividad Esterasa.....	33
IV.7 Ensayo de Actividad Hemolítica.....	33
IV.8 Análisis Estadístico	35
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
V.1 Cinética de Sobreexpresión	36
V.2 Replegamiento y purificación de la mutante Ser153/Gly_LDH por Cromatografía de afinidad a metales (IMAC).....	40
V.3 Ensayo de Actividad Fosfolipasa	42
V.4 Ensayo de Actividad Hemolítica.....	46
VI. CONCLUSIONES	48
VII. RECOMENDACIONES	49
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Límites para el crecimiento óptimo de <i>V. parahaemolyticus</i>	18
2.	Cepas de sobreexpresión de <i>E. coli</i>	26
3.	Composición de buffer lisis (base 100mL)	28
4.	Composición de buffer de lavado 1 (base 100mL)	28
5.	Composición de buffer de lavado 2 (base 100mL)	29
6.	Composición de buffer de extracción (base 100mL)	29
7.	Composición de buffer de Urea 4M (base 500mL)	31
8.	Composición de buffer de Urea 1M (base 500mL)	31
9.	Composición de buffer de Urea 0M (base 500mL)	33
10.	Muestras utilizadas para el ensayo de actividad hemolítica	34
11.	Diseño del ensayo de actividad de fosfolipasa	43

TABLA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Clasificación de las fosfolipasas en sus tipos A1, A2, B, C y D	20
2. Principales residuos del sitio activo de las enzimas con dominio GDSL	21
3. Comparación de estructuras de los aminoácidos Serina y Glicina donde se observa la ausencia de cadena lateral en la Glicina	22
4. Resultados de la pérdida de actividad fosfolipasa (a) y actividad hemolítica (b) del estudio realizado con la hemolisina de la bacteria <i>V. harveyi</i> en su estado nativo (<i>VHH</i>) y la mutante.....	23
5. Cromatograma típico de la purificación de la <i>LDH</i>	32
6. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión en la cepa de <i>E.coli</i> Rosetta 2.....	37
7. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión en la cepa de <i>E.coli</i> Gold. 37	
8. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión en la cepa de <i>E.coli</i> Star.. 38	
9. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión en la cepa de <i>E.coli</i> Rosetta 2.....	38
10. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión en la cepa de <i>E.coli</i> Gold. 39	
11. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión en la cepa de <i>E.coli</i> Star.. 40	
12. Replegamiento de la proteína mutante S153/Gly_ <i>LDH</i> antes de la purificación	41
13. Gel SDS-PAGE al 12% de la purificación por IMAC en condiciones desnaturizantes de la S153/Gly_ <i>LDH</i>	42
14. Actividad de fosfolipasa de la mutante Ser153/Gly_ <i>LDH</i> en una placa de Petri con medio Agar-Fosfatidilcolina	44
15. Actividad de esterasa de la <i>LDH</i> en su estado nativo y la mutante S153/G_ <i>LDH</i>	45
16. Actividad enzimática de diferentes cantidades de la mutante Ser153/Gly_ <i>LDH</i>	46
17. Efecto de la mutante Ser153/Gly_ <i>LDH</i> sobre la actividad hemolítica de la <i>LDH</i>	47

RESUMEN

En los últimos años la camaronicultura se ha visto afectada debido a la aparición de enfermedades infecciosas causadas por distintos patógenos marinos, lo que ha provocado pérdidas importantes a la economía de este sector agropecuario. Una de las infecciones más comunes presentes en los camarones es la vibriosis. Algunos estudios sugieren que la incidencia de mortalidades masivas de camarones de cultivo podría deberse a una enfermedad presente en los camarones conocida como el síndrome de mortalidad temprana, la cual es causada por la especie *Vibrio parahaemolyticus*. Esta bacteria presenta diversos factores de virulencia como la hemolisina termolábil dependiente de lecitina (*LDH* por sus siglas en inglés). Así mismo, se ha identificado que las cepas patógenas para camarón presentan el gen que codifica para esta hemolisina. Por otro lado, la serina en la posición 153 en la secuencia de *LDH* de otras especies de *Vibrio*, es un residuo importante durante la función de este tipo de enzimas. En base a lo anterior, la sustitución de la serina 153 de la *LDH* por glicina (*Ser153/Gly_LDH*) puede afectar total o parcialmente la función de la enzima, es decir, ya sea su actividad catalítica y/o su función hemolítica. En el presente trabajo se realizó la sobreexpresión de la hemolisina mutante *Ser153/Gly_LDH* recombinante de *V. parahaemolyticus*. La *Ser153/Gly_LDH* se sobreexpresó en la cepa de *E.coli* Rosetta utilizando 0.4 mM de IPTG como inductor por 6 h a 37 °C. La enzima se obtuvo en forma de cuerpos de inclusión por lo que fue solubilizada en urea 8M. Se purificó por cromatografía de afinidad a metales en condiciones desnaturalizantes obteniendo una única banda correspondiente al peso molecular esperado de aproximadamente 47 kDa. Posteriormente, la *Ser153/Gly_LDH* purificada fue replegada por el método de diálisis eliminando completamente la urea obteniendo la enzima en la fase soluble. Se evaluó la actividad enzimática de la mutante cualitativa y cuantitativamente y se observó que perdió casi un 100 % de su actividad enzimática. Así mismo, la mutante específica de la *LDH* solo mostró actividad hemolítica residual (< 2 %). En base a los resultados presentados, se concluye que la Serina 153 desempeña un papel esencial durante la función de la *LDH* de *Vibrio parahaemolyticus*.

INTRODUCCIÓN

Vibrio parahaemolyticus ha sido una bacteria presente en las infecciones intestinales humanas desde años atrás. En general, los diferentes estudios relacionados con esta bacteria se han enfocado a la manifestación y su ciclo de infección en el humano, y son escasos los estudios con el enfoque a estudiar esto mismo en especies de animales de alto interés comercial. *Vibrio* es una bacteria perteneciente al ecosistema marino y por lo tanto las especies que ahí habitan son los hospederos y transmisores de la bacteria. El creciente interés por su estudio fue resultado de las pérdidas económicas que ha ocasionado al sector acuícola. En Japón y países asiáticos las bacterias pertenecientes al género *Vibrio* fueron las responsables de numerosas infecciones en la acuicultura de peces, moluscos y crustáceos. Años después las grandes epidemias que afectaron las costas asiáticas se trasladaron al continente americano y se hicieron presentes. En México los estados de Nayarit, Sinaloa, Baja California Sur, Tamaulipas y Sonora con altas producciones de camarones de cultivo sufrieron pérdidas masivas en sus cosechas, siendo el estado de Sonora uno de los más afectados por estas enfermedades infecciosas (6). De los productos del mar que mayormente fueron afectados y son parte de los productos de mayor comercio fue el camarón blanco.

De ahí proviene el interés de su estudio y las alternativas que se buscan para combatir su infección. *Vibrio parahaemolyticus* es conocido por sus hemolisinas las cuales son su factor de patogenicidad más reconocido y estudiado, éstas son la *Tdh* (hemolisina directa termoestable), la *Trh* (hemolisina relacionada a la *Tdh*) y en menor proporción la *LDH* (hemolisina dependiente de lecitina) (26). Esta última hemolisina se ha reportado que está presente en la mayoría de las cepas patógenas para camarón, de manera más frecuente que la *Tdh* y la *Trh*. La hemolisina *LDH* está catalogada como una fosfolipasa A2 semi B, y presenta un dominio específico de unas fosfolipasas conocidas como *GDSL*. La característica principal de estas fosfolipasas es que en su sitio activo tienen una serina, la cual es responsable de la función catalítica de la enzima, es decir, es el aminoácido catalítico. En un estudio con una hemolisina de *Vibrio harveyi* (*VHH*) la cual pertenece a las hemolisinas del grupo *GDSL* se propuso cambiar la serina central del sitio activo por una glicina. En este trabajo se encontró que la *VHH* perdía toda su actividad de fosfolipasa y que ya no resultaba tóxica para el pez cebra (31). Por lo tanto, en la *LDH* de *Vibrio parahaemolyticus*, el cambio de serina por una glicina podría afectar tanto la actividad de fosfolipasa como la hemolítica de la enzima. Por lo que en un futuro, la información generada en el presente estudio podría sentar las bases para el desarrollo de vacunas o inhibidores de actividad de la enzima.

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la mutante Ser153/Gly_LDH sobre la función de la hemolisina dependiente de lecitina recombinante de *Vibrio parahaemolyticus*.

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Transformar células competentes de *E. coli* con el constructo que contiene la mutante Ser153/Gly_LDH.
2. Establecer las condiciones para la sobreexpresión recombinante de la mutante Ser153/Gly_LDH.
3. Obtener a la enzima en su forma soluble mediante replegamiento *in vitro*.
4. Evaluar la actividad enzimática y hemolítica de la mutante Ser153/Gly_LDH.

iii. ANTECEDENTES

III.1 El Camarón Blanco y la Importancia de su Estudio

El camarón blanco es un crustáceo que pertenece al género *Litopenaeus*, especie *vannamei*, pero comúnmente se le conoce como camarón blanco o camarón blanco del pacífico (1). Este es nativo de la costa oriental del océano pacífico y se encuentra distribuido desde las costas de México hasta Perú (2). La pesca de camarón es una fuente de trabajo para millones de mexicanos, pero además de eso produce un alto ingreso a la economía del país. Actualmente la pesca de camarón no es suficiente para cubrir la demanda de consumo, por lo que se han implementado técnicas de cultivo (granjas de camarones) o cría de camarones como una estrategia para cubrir su alta demanda. (3). Actualmente se cultiva en varios países del continente americano (Brasil, Ecuador, México, Venezuela, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Perú, Colombia, Costa Rica, Panamá, El Salvador, Jamaica, Cuba, República Dominicana, EUA) y asiáticos (China, Tailandia, Indonesia, Vietnam, Malasia, Taiwán, India, Filipinas, Camboya, Surinam) (4). Los mercados mundiales han mostrado una demanda ligeramente creciente del camarón cultivado, propiciado por diferentes causas como el estancamiento de las capturas pesqueras, la facilitación de los recursos por parte del gobierno, la mayor demanda de la población y la preferencia por consumir este tipo de productos en menor tiempo (5).

En México, la producción de camarón en granjas ha aumentado notablemente, siendo los estados de Sonora, Nayarit, Sinaloa y Baja California Sur los principales productores. Se ha reportado que estos estados producen al año más de 100 mil toneladas de ese producto con un valor superior a los 6 mil millones de pesos. Esto representa más del 90% de la producción de camarón de granja de todo México. Sin embargo, en los últimos años se han registrado pérdidas en la producción de hasta el 60% causado por diversos patógenos tanto virales como bacterianos (6).

III.2 Principales Enfermedades en el Cultivo de Camarón

La industria mundial del cultivo de camarón ha sufrido efectos devastadores por la aparición de enfermedades infecciosas que afectan directamente su desarrollo. Se estima que en el periodo entre 1990-2005 la producción global del cultivo de camarón tuvo pérdidas económicas cercanas a los 15 mil millones de dólares (7). De acuerdo con datos

proporcionados por la Alianza Global de Acuicultura, el 60% de dichas pérdidas fue atribuido a enfermedades virales, 20% a enfermedades bacterianas y el restante (20%) a una variedad de otros agentes patógenos. En los últimos años la producción ha descendido notablemente: para el año 2010, la producción descendió a 49,400 t; al año siguiente, a 40,697 t, en 2012 la producción cayó a 35,305 t donde para el periodo 2013 se reportaron solo 14,000 t de camarón (8). Cabe señalar que la producción de camarón ha tenido un repunte positivo del 20 % en los últimos 3 años a la fecha.

Algunos estudios indican que la incidencia de mortalidades masivas de camarones de cultivo podría ser causada por la aparición de un nuevo agente patógeno: el cuál causa el conocido Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS, por sus siglas en inglés), también conocido como Síndrome de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPNS) (9). Esta enfermedad del camarón la cual proviene de origen bacteriano ha ocasionado pérdidas económicas significativas a los mayores productores de camarón a nivel mundial. La mayoría de las especies de camarón se ven afectadas por esta enfermedad y tiene incidencia de mortalidades masivas. Se ha determinado que el agente causante de la AHPNS, es una cepa patógena de la bacteria marina *Vibrio parahaemolyticus* (9). Se ha reportado que esta bacteria produce toxinas (uno de sus extensos mecanismos de patogenicidad) a través de un plásmido llamado *PirA* y *PirB*. Estas toxinas causan una disfunción de las células del hepatopáncreas (HP) afectando la absorción de nutrientes y en la fase terminal, adicional al desprendimiento de las células epiteliales, se presenta una infección secundaria bacteriana (10).

El panorama en nuestro país, y más recientemente en nuestro estado no es prometedor. Si se considera que la producción de camarón ya había sufrido un impacto muy importante, debido a la presencia del Síndrome del Virus de la Mancha Blanca, la aparición del Síndrome de mortalidad temprana ha provocado una crisis muy seria en la industria camaronera (10). Por tanto, es de suma importancia mantener acciones de vigilancia epidemiológica así como realizar investigación para combatir o prevenir las infecciones en los cultivos de camarón. En nuestro país el Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (COSAES) en conjunto con otras instituciones, han implementado estas acciones con el fin de evitar grandes pérdidas económicas. Solamente, a través de estas acciones, la vigilancia continua y del desarrollo de proyectos de investigación que permitan entender el proceso infeccioso y epidemiológico, será posible el desarrollo y aplicación de estrategias de intervención y tratamientos que eviten o contengan la transmisión y dispersión de las enfermedades infecciosas en cultivos marinos con importancia comercial en nuestro país, como la camaronicultura (11).

III.3 Vibriosis

La vibriosis es una enfermedad de origen bacteriano, causada por varias especies de cepas patógenas extracelulares pertenecientes al género *Vibrio*. La patogenicidad esta mediada por factores ambientales como la salinidad y temperatura (12). En el ecosistema marino los *Vibrios* juegan funciones importantes como biodegradación de la materia orgánica y regeneración de nutrientes (13), además pueden actuar como patógenos de organismos acuáticos, siendo parte del hábitat natural en las aguas marinas costeras, especialmente en los estuarios, los que representan su reservorio. El patógeno se asocia a la presencia de plancton y moluscos bivalvos para sobrevivir en agua de mar. Adicionalmente se ha reportado que pueden colonizar la superficie o formar parte de la flora comensal de algunos peces (14) de importancia comercial, o bien afectar al hombre (15).

La vibriosis como patología de etiología bacteriana, ha sido la causa de mortalidad en cultivos de camarón en países productores del mundo entero y afecta tanto en larvicultura como en fase de engorde en estanques de cultivo (16). Además se ha reportado que el uso indiscriminado de antibióticos ha favorecido el desarrollo de resistencia a antibióticos en este tipo de bacterias. Las más conocidas son *V. harveyi* y *V. Splendidus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. penaeicida*. La vibriosis afecta a los camarones produciendo un daño errático, letargia, anorexia, necrosis multifocal, inflamación, formación de nódulos en el órgano linfoide, corazón y branquias, etc. (12). Los brotes de vibriosis suelen darse cuando hay un cambio repentino de las condiciones favorables ambientales del patógeno, produciéndose un aumento en la velocidad de la reproducción bacteriana, superándose así las cargas toleradas por el organismo huésped (16).

El establecimiento de la infección se presenta por diversos mecanismos. Por ejemplo, estas bacterias pueden entrar al organismo a través de heridas en el exoesqueleto (primera barrera de defensa), las cuales generalmente son causadas por daños físicos, o bien, por otras bacterias con capacidad quitinolítica. También pueden penetrar el camarón a través de las branquias ya que están cubiertas por una cutícula delgada y es el órgano que se encuentra más expuesto ya que realiza funciones especializadas de intercambio de oxígeno con el ambiente. Si bien este tipo de bacterias tienen varias vías de entrada, se sabe que el intestino medio es el lugar de mayor ingreso y colonización de estos patógenos ya que están presentes en el sedimento, agua y alimentos consumidos por los camarones (10).

En los últimos años, muchas investigaciones se han desarrollado con el objetivo de proponer técnicas preventivas y terapéuticas para reducir o impedir la incidencia de enfermedades en los cultivos. Peeters y Rodríguez (16) señalan que los problemas de enfermedades muchas

veces son ocasionados por el manejo inadecuado de los antibióticos en el tratamiento de estos patógenos (17). Como se señaló anteriormente en México la prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno en los cultivos de camarón es del 80.5% siendo Sonora uno de los estados mayormente afectados económicamente.

iii.4 *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus es un bacilo curvo Gram negativo, no esporulado y halofílico (14). Es móvil por un solo flagelo polar, es una bacteria facultativa que se desarrolla en su aislamiento en agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), o conocido también como Agar Selectivo para Vibrios. (15). Logra desarrollarse en concentraciones de NaCl 1 - 4% y crece en concentraciones de NaCl de 8%, con un pH óptimo: 7.5 - 8.6 y una temperatura de 10 °C - 42 ° C (15). Es fermentador de glucosa sin producción de gas, fermenta manitol, arabinosa y manosa, pero no fermenta sacarosa, lactosa, inositol y ramnosa, y es ureasa variable (13). Este microorganismo afecta a ambas especies (humano y camarón) donde en el humano causa gastroenteritis y los síntomas que se presentan son dolor abdominal severo, náusea, vómito, fiebre, dolor de cabeza y diarrea, la cual persiste hasta ocho días, en casos severos la diarrea es acuosa con moco y sangre, y pueden presentarse cuadros de deshidratación, hipotensión y acidosis. La dosis infectiva es de 10^5 a 10^7 UFC y tiene un periodo de incubación de 12-24 horas. En el camarón *Vibrio parahaemolyticus* es responsable de causar Vibriosis sistémica, Síndrome de mortalidad temprana y necrosis aguda del Hepatopáncreas (AHPND) (9).

III.4.1 Factores de Virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*

Se conoce que son distintos los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus*, los cuales se pueden manifestar o expresar por diversos factores ambientales como la temperatura del agua. Diversos estudios han demostrado que la bacteria rara vez se detecta en agua de mar hasta que la temperatura del agua es mayor a 15°C (18). Por lo tanto, existe mayor probabilidad de detectar *V. parahaemolyticus* en los crustáceos en la primavera y en el verano que en el invierno (19). Además de la temperatura existen otros factores como el pH el cual varía entre 4.8 y 11, siendo entre 7.8 y 8.6 el pH óptimo para su crecimiento (Tabla 1). El oxígeno es otro factor importante, al ser un microorganismo anaerobio facultativo tiene la

capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno, pero crece óptimamente bajo condiciones aeróbicas. Se ha reportado que el agua dulce inactiva al organismo (20).

Tabla 1. Límites para el crecimiento óptimo de *Vibrio parahaemolyticus* (20).

Variable	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (°C)	5	37	43
pH	4.8	7.8-8.6	11
Actividad de agua	0.94	0.98	0.996

III.4.2 Sistemas de Secreción Tipo III y Tipo VI

En *V. parahaemolyticus* el sistema de secreción tipo III (T3SS) y el sistema de secreción tipo VI se han propuesto como factores importantes de virulencia (21). El primero se divide en T3SS1 y T3SS2. Al sistema T3SS1 se le hace responsable la citotoxicidad y la inducción de la autofagia, mientras T3SS2 es el sistema que se encarga de producir enterotoxigenidad. Todos los aislados de *V. parahaemolyticus* poseen T3SS1 (22). Mientras que T3SS2 se asocia comúnmente con *V. parahaemolyticus* que lleva *Tdh* y / o *Trh* (23).

El papel de T6SS2 está siendo estudiado, pero se sugiere que el T6SS2 no está involucrado en la citotoxicidad, sino que ayuda en la adhesión a las células huésped (24). Dado que los sistemas T6SS2 y T3SS2 coexisten, se propone que ambos sistemas puedan cooperar durante un proceso de infección en el huésped T6SS2 inicia el primer paso de la infección al adherirse a las células huésped y T3SS2 exporta moléculas efectoras al inducir enterocitotoxicidad. La función del sistema T6SS1 aún no se ha demostrado. Recientemente, los investigadores sugirieron el papel de T6SS2 en la aptitud ambiental de *V. parahaemolyticus* (21) informaron que T6SS1 es más activo en condiciones cálidas similares a las marinas, mientras que T6SS2 es activo en condiciones bajas en sal.

III.4.3 Hemolisinas

Las hemolisinas *Tdh* y *Trh* se consideran los principales factores de virulencia en las cepas patógenas para humanos de *V. parahaemolyticus* (21). La hemolisina directa termoestable (*Tdh*) es una hemolisina no inactivada por el calor y es por tanto causante de citotoxicidad, ya que aumenta la permeabilidad vascular de las membranas eritrocitarias formando poros por los cuales fluyen los iones y el agua fuera de la membrana y la acumulación de líquidos. (26). El fenómeno de Kanagawa es un ensayo para la detección de la beta hemólisis de eritrocitos usando agar Wagatsuma el cual contiene sangre con una alta concentración de sal para detectar la actividad hemolítica de la hemolisina *Tdh*.

La hemolisina relacionada a la *Tdh* (*Trh*) es una hemolisina termolábil e inmunológicamente similar a la *Tdh*. Fue descubierta en un brote en las Islas Maldivas, en aislamientos con ausencia de *Tdh*. (26). Se le llama hemolisina relacionada a la *Tdh* ya que ambas comparten aproximadamente un 70% de homología genéticamente (27). La *Tdh* produce citotoxicidad en los tejidos debido a que activa canales que producen un flujo iónico alterado. (28). También se ha visto asociada a la producción de ureasa. (20)

Además de todos los factores de virulencia descritos anteriormente se conoce que *V. parahaemolyticus* cuenta con otros factores de virulencia como hemaglutininas, factores de colonización, pilis y su capacidad de invasión celular.

Algunas cepas de *V. parahaemolyticus* cuentan con el gen *tlh* que codifica para otra toxina conocida como hemolisina termolábil dependiente de lecitina (*LDH*, por sus siglas en inglés) (29). Las hemolisinas son proteínas que producen la lisis de los eritrocitos por medio de la producción de poros en la membrana citoplasmática o hidrolizando los fosfolípidos (fosfatidilcolina) presente en la membrana celular. La *LDH* actúa hidrolizando la fosfatidilcolina (PC) a lisofosfatidilcolina (LPC) y, posteriormente la LPC a glicerofosforilcolina (GPC). Por lo tanto, la hemolisina se clasifica como una fosfolipasa del tipo A2 y tipo B (27) (Figura 1).

En un ensayo realizado por Tellechea Robles (30) se midió cualitativamente la actividad fosfolipasa de la *LDH* recombinante, obteniendo como resultado la degradación del sustrato fosfatidilcolina, presente en la placa del ensayo, confirmando así su actividad como fosfolipasa y en una investigación similar, además de determinar la actividad fosfolipasa se realizaron estudios cuantitativos en la cantidad de sustrato degradado y en la obtención de ésteres de ácidos grasos hidrolizados (19).

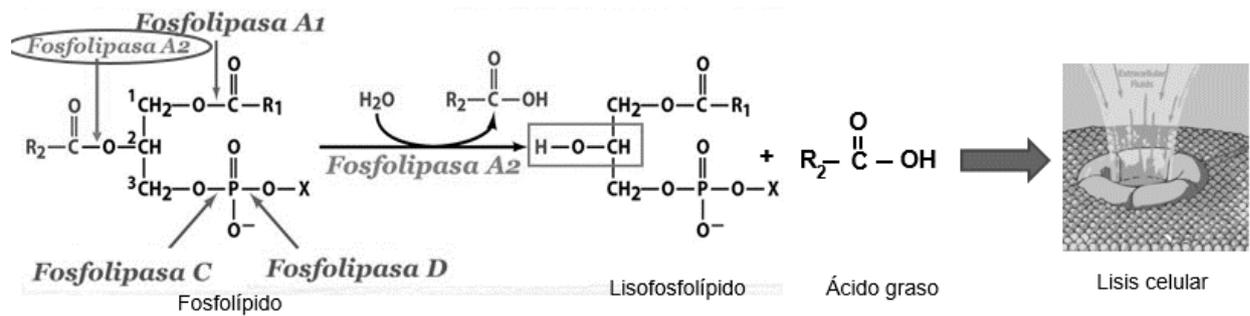


Figura 1. Clasificación de las fosfolipasas en sus tipo A1, A2, B, C y D según su sitio de acción en el fosfolípido. La fosfolipasa tipo A2 se encuentra señalada y corresponde a la hemolisina dependiente de lecitina (*LDH*) (17).

III.5 Acción de las Fosfolipasas

Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan fosfolípidos en ácidos grasos y en otras sustancias lipófilas. Existen 4 clases principales de fosfolipasas que se designan en base al sitio de la molécula donde hidrolizan. Son conocidas como A, B, C y D y cada una cuenta con un punto de acción diferente. Como se mencionó, la *LDH* de *Vibrio parahaemolyticus* se clasifica como una fosfolipasa del tipo A2 ya que hidroliza ambos ésteres de ácidos grasos de fosfolípidos (17). Adicionalmente, esta enzima también presenta una actividad atípica de fosfolipasa B, es decir, hidroliza la LPC a GPC. Se reportado que las fosfolipasas tipo B no tienen actividad hemolítica debido a que el producto final (GPC) no es un detergente, por lo tanto no es capaz de desestabilizar la membrana celular (25). Por otro lado, la LPC formada por acción de la fosfolipasa A es un detergente que trastorna a las membranas de los eritrocitos, conduciendo a la hemólisis (17). Aunque la *LDH* hidroliza a LPC, la velocidad de reacción es mucho menor que la dada por la fosfolipasa B. Por ende, el intermediario (LPC) es relativamente estable y se acumula durante la reacción de tal forma que puede causar hemólisis. Por lo contrario, se ha reportado que la adición de concentraciones elevadas de *LDH* disminuye la actividad hemolítica frente a eritrocitos de cordero debido a la rápida hemólisis de LPC (16). Por lo tanto, la *LDH* de *Vibrio parahaemolyticus* es clasificada como una fosfolipasa atípica, una fosfolipasa A2/B excepcional, con actividad de lisofosfolipasa (18).

III.6 Importancia Catalítica y Hemolítica de la Mutante Ser153/Gly_LDH

Las esterasas son una superfamilia de enzimas hidrolíticas como una amplia especificidad de sustrato. Algunas tienen actividad de lipasas, tioesterasa, proteasa, arilesterasa y lisofosfolipasa (20). La gran mayoría de este tipo de enzimas tiene un motivo estructural catalítico conservado formado por 4 aminoácidos *GDSL* (Gly-Asp-Ser-Leu). Los estudios muestran que las hidrolasas *GDSL* tienen un sitio activo flexible que parece cambiar la conformación con la presencia y la unión de los diferentes sustratos. Un residuo importante de las enzimas *GDSL* es la Serina (28). Este aminoácido se consideraba como un miembro importante del sitio activo ya que actúa como el responsable de la reacción catalítica, es decir, se le considera el aminoácido catalítico.

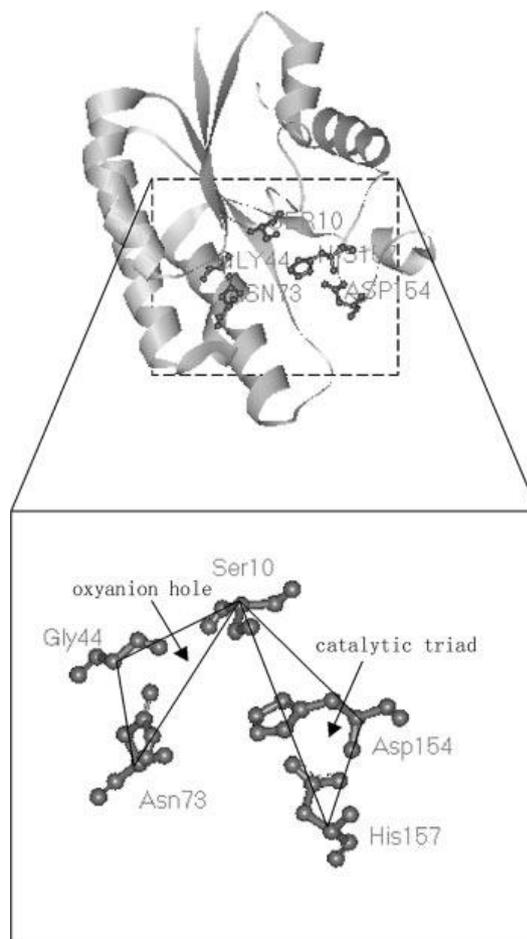


Figura 2. Principales residuos del sitio activo de las enzimas con dominio GDSL (29).

Otros residuos de aminoácidos también participan como elementos importantes durante la catálisis como son el ácido aspártico e histidina. Estos tres aminoácidos forman lo que se conoce como una triada catalítica que también se encuentra presente en otras hidrolasas como las Serina proteasas (20). En la figura 2 se muestra la triada catalítica de una hidrolasa del tipo *GDSL*.

III.6.3 Cambio del Aminoácido Serina por Glicina

Como se mencionó anteriormente, algunas hemolisinas tienen actividad de fosfolipasa como es el caso de la *LDH* de *Vibrio parahaemolyticus*. Esta enzima también se ha estudiado en otras especies del género *Vibrio*, como *Vibrio alginolyticus* (22), donde se reportó que la *LDH* de esta bacteria es una enzima termolábil, con actividad de fosfolipasa y hemolítica. Además, se encontró que al inyectar esta hemolisina de *Vibrio alginolyticus* purificada, fue capaz de causar la muerte de peces cebra en dosis desde 0.4 µg por gramo de peso del pez (21). Estos autores también reportaron que la actividad hemolítica de la *LDH* fue inhibida por compuestos (como β-mercaptoetanol y fluoruro de fenilmetilsulfonilo ó PMSF) capaces de modificar grupos hidroxilo de los aminoácidos como la Serina entre otros (Tre, Glu, Asp y Tir).

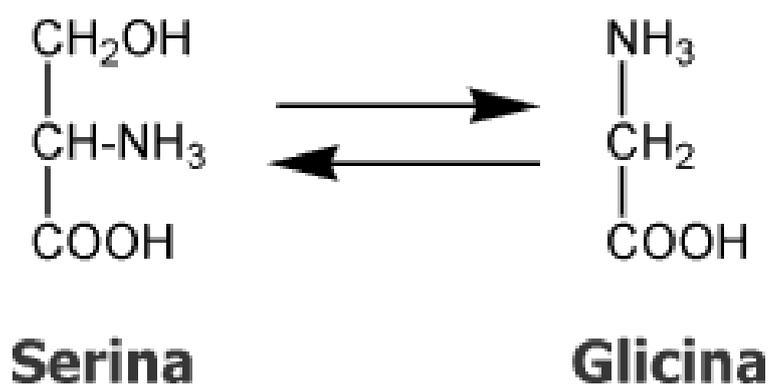


Figura 3. Comparación de estructuras de los aminoácidos Serina y Glicina donde se observa la ausencia de cadena lateral en la Glicina. La cual se transfiere por la enzima hidroximetil transferasa (39).

Como se mencionó anteriormente, se sabe que este tipo de enzimas tienen una Serina catalítica, por lo que estos compuestos pueden estar interactuando con la Serina catalítica y por lo tanto, afectando la función enzimática.

El uso de compuestos químicos que puedan modificar las cadenas laterales de los aminoácidos del sitio activo de las enzimas ha sido ampliamente estudiado para determinar su importancia en la función catalítica. Sin embargo, esta estrategia carece de especificidad ya que en las enzimas puede existir más de un aminoácido que puede ser modificado y es muy complicado identificarlo. Existen otras herramientas que permiten hacer la modificación con alta precisión de aminoácidos como es la mutagénesis dirigida. Básicamente, esta se basa en hacer cambios en los nucleótidos del gen que codifica para la enzima en cuestión y una vez que este gen es traducido a proteína se genera una variante de la misma pero con el cambio del aminoácido deseado. Por ejemplo, el cambio del triplete que codifica para Serina AGC puede ser cambiado a GGC dando como resultado la mutante de Serina por Glicina (29). Como consideración general, un residuo neutro como lo es la Glicina podría no tener impacto sobre una reacción catalítica, independientemente de su contribución a la conformación de la proteína, que como se comentó anteriormente la estructura entre estos dos aminoácidos sólo difiere en su grupo lateral (Figura 3).

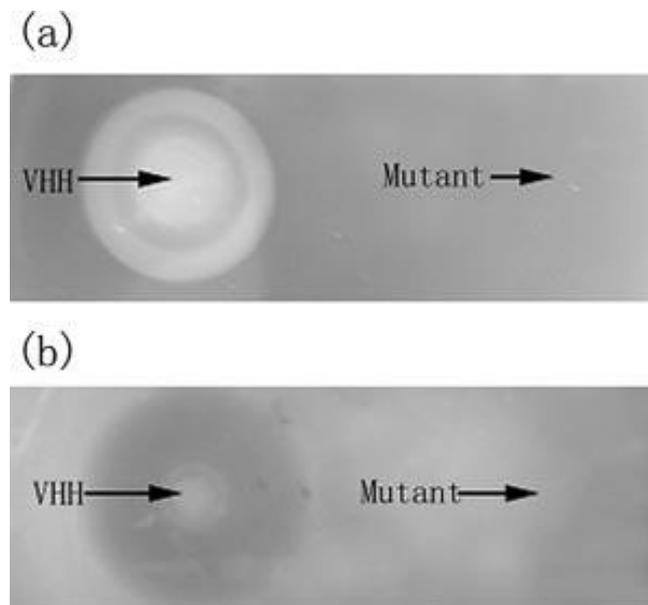


Figura 4. Resultados de la pérdida de actividad fosfolipasa (a) y actividad hemolítica (b) del estudio realizado con la hemolisina de la bacteria *Vibrio harveyi* en su estado nativo (VHH) y la mutante. (31).

En un estudio realizado por Boguang Sun y colaboradores (31), en la hemolisina de *Vibrio harveyi* (*VHH*) se demuestra que la sustitución de una Glicina por Serina en la posición 153 dio como resultado la pérdida total de la actividad catalítica de la enzima (Figura 4). Así mismo, se eliminó por completo la capacidad hemolítica de la *VHH*. Adicionalmente, se demostró que esta mutante de la *VHH* no presentaba toxicidad en un bioensayo realizado en pez cebra. Por tanto la mutante podría considerarse como un componente de una vacuna potencial contra *V. harveyi*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Transformación de Cepas *E. Coli* con el Constructo Ser153/Gly_LDH

La construcción de la mutante específica (Ser153/Gly_LDH) se elaboró en colaboración con el Laboratorio de Biotecnología de la UNAM a partir de la secuencia codificante de la LDH nativa (GenBank # BAA25328.1). A la secuencia se le agregó una etiqueta de Histidinas (5xHis) en el extremo C-terminal de la proteína para facilitar su purificación. El constructo se insertó en el plásmido pET28B, el cual contiene un gen que confiere resistencia a kanamicina. La transformación del constructo se llevó a cabo mediante el método de choque térmico utilizando diferentes cepas químicamente competentes de *E. coli* BL21: Rosetta 2, Star y Gold (Tabla 2). El método consiste en lo siguiente: 50 μ L de células químicamente competentes se colocaron en una cama de hielo para su descongelamiento. La suspensión bacteriana se homogenizó suavemente para posteriormente añadir un 1 μ L del plásmido (concentración de 0.1 μ g/ μ L), la solución se mezcló cuidadosamente y se incubó en hielo por 10 minutos. Después, la mezcla se sometió a un shock térmico (variación de la temperatura) a 42°C durante 1 minuto, una vez transcurrido este tiempo se regresó rápidamente al hielo y se dejó reposar durante 2 minutos sin agitación. Se agregaron 250 μ L de medio Super Optimal Broth, (SOC, por sus siglas en inglés: 20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 4.8 g/L MgSO₄, 3.603 g/L glucosa, 0.5g/L NaCl y 0.186 g/L KCl) mezclándose por agitación con una micropipeta y se incubó durante 2 horas a 37 °C en un agitador orbital a 220 rpm.

Posteriormente se inocularon dos placas de agar Luria Bertani (15 g/L Agar, 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 0.5 g/L NaCl) y se les adicionó kanamicina a una concentración final de 50 μ g/mL con 50 y 100 μ L del cultivo por método de barrido masivo. Las placas se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 37 °C. Esto permite asegurar que se cultivan únicamente las células de *E. coli* que contienen el plásmido de interés. La kanamicina por tanto, actúa como marcador de selección.

IV.2 Preparación del Inóculo Bacteriano

Como base para la sobreexpresión de proteínas se utilizaron las placas inoculadas previamente, se seleccionaron colonias aisladas para sembrar una nueva placa por el método de estriado, incubándose a una temperatura de 37 °C por 24 h. Posteriormente, se inoculó una colonia aislada en un tubo de ensayo con 5mL de caldo Luria Bertani al que se le adicionó

también kanamicina en una concentración final de 25 µg/mL. El cultivo se incubó por 16 horas a 37 °C en un agitador orbital a 220 rpm. Se observó crecimiento bacteriano.

Tabla 2. Cepas de sobreexpresión de *E. coli* (41).

Aplicación	Cepa	Destacable	Resistencia	Proveedor
Expresión con promotor T7	Rosetta-Gami 2(DE3)	Combina la expresión de siete tRNAs raros en <i>E. coli</i> con la formación mejorada de puentes disulfuro .	Kan, Tet, Str, Cam	Novagen
	BL21(DE3)	Deficiente en las proteasas Lon y OmpT	Stratagene	Stratagene
Clonajes rutinarios	Top 10	Buen rendimiento plásmido. Insertos estables.	Str	Invitrogen
Clonaje difícil	XL10 Gold	Aumenta la transformación de DNA de gran tamaño. Deficiente en endonucleasas y sistemas de restricción.	Tet/Cam	Stratagene

IV.3 Sobreexpresión Recombinante de la mutante Ser153/Gly_LDH

IV.3.1 Cinética de Sobreexpresión

Se tomaron 500 μ L del inóculo para adicionar a un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL de caldo Luria Bertani con kanamicina (25 μ g/mL) y se incubó en un agitador orbital a 220 rpm a 37 °C. Para comprobar que la bacteria se encuentra en su fase exponencial donde estará ocurriendo la duplicación celular (33), que es un factor necesario para que se lleve a cabo la sobreexpresión, se monitoreó la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm, teniendo como objetivo alcanzar una absorbancia de 0.6 unidades. Cuando este valor fue alcanzado se tomaron 2 alícuotas para representar el t=0 y posteriormente se añadió de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4mM para inducir la sobreexpresión. A partir de este punto se tomaron alícuotas de 1.5 mL por duplicado a diferentes tiempo post-inducción: 2, 4, 6 y 18 horas. El matraz permaneció incubado a 37° C con una agitación de 220 rpm durante este tiempo. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 7000xg a una temperatura de 4° C por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se almacenó a -80°C hasta su uso.

Las células cosechadas en cada muestreo se resuspendieron en 200 μ L de buffer Lisis (Tabla 3) cada una y se lisaron por sonicación (34) en una cama de hielo a 10 % de amplitud 10 pulsos por 10 segundos cada uno para permitir la extracción de los compuestos intracelulares. El homogenizado celular se centrifugó a 16, 000 \times g por 20 minutos a 4 °C para separar las dos fases resultantes: fase soluble (compuesta por el sobrenadante) y la fase insoluble (compuesta por el precipitado). Las dos fases de todas la muestras a las 0, 2, 4, 6 y 18 horas post inducción (HPI) se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida sodio en una concentración del 12% en condiciones reductoras y desnaturalizantes (SDS-PAGE) a corriente constante 20 mA (35).

Esto se realizó con la finalidad de determinar el tiempo en el cual se obtiene la mayor cantidad de proteína, y si ésta se sobre expresa en la fracción soluble o insoluble del cultivo bacteriano. Los geles fueron teñidos con 0.25% Azul de Coomassie. Los geles se documentaron por fotodocumentación Biorad Gel-doc EZ en el laboratorio de Bioquímica del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la UNISON.

IV.4 Preparación de Extracto Crudo y Purificación de Cuerpos de Inclusión

El análisis electroforético de la sobreexpresión mostró que la proteína se encontró en forma de cuerpos de inclusión, es decir, en una forma inactiva e insoluble. Por lo tanto, se optó por desarrollar protocolos para extracción, solubilización y replegamiento de la enzima. Estos protocolos se describen a continuación.

Tabla 3. Composición de buffer lisis

Composición del buffer lisis (base a 100mL)	
Tris HCl 50mM, pH 7.0	50mL (partiendo de un stock de 100mM)
Benzamidina 5mM	10mL (partiendo de un stock de 50mM)
NaCl 100mM	20mL (partiendo de un stock 500mM)
EDTA 5mM	5mL (partiendo de un stock 100mM)

Tabla 4. Composición de buffer de lavado 1

Composición del buffer de lavado 1 (base a 100mL)	
Tris HCl 50mM, pH 7.0	50mL (partiendo de un stock de 100mM)
Tritón X-100 (2%)	2mL
DDT 5mM	80 miligramos
EDTA 5mM	5mL (partiendo de un stock 100mM)

IV.4.1 Extracción de la mutante Ser153/Gly_LDH de Cuerpos de Inclusión

La extracción se inició a partir de la biomasa obtenida al final de la sobreexpresión de un cultivo de 100 mL. La masa total obtenida (pellet bacteriano) fue de 3.0504 gr de los cuales se tomó 1 gr de células bacterianas y se sometió a cuatro buffers para la extracción de la

mutante Ser153/Gly_LDH. Se utilizó un buffer lisis, un buffer de lavado 1, un buffer de lavado 2 (2 veces) y un buffer de extracción (Tablas 3,4,5 y 6) a una razón de 4 mL c/u por cada gramo de biomasa inicial. En cada etapa se resuspendió por sonicación en hielo durante 10 segundos por 6 ocasiones a una intensidad del 10%. Posteriormente cuando el botón de células bacterianas se encontró resuspendida en el buffer, se centrifugó a 25, 000 x g por 20 minutos a 4 °C, después se recuperó el precipitado y se descartó el sobrenadante; excepto en la última etapa (buffer de extracción) en la cual se recuperó el sobrenadante en el que se encuentra la LDH desnaturalizada en presencia de urea 8M. Se midió la concentración de proteína utilizando un espectrofotómetro Nanodrop Thermo Scientific a 280 nm de longitud de onda. Este protocolo se siguió de acuerdo a lo reportado por Tellechea-Robles, 2015. (39).

Tabla 5. Composición de buffer de lavado 2

Composición del buffer de lavado 2 (base a 100mL)	
Tris HCl 50mM, pH 7.0	50mL (partiendo de un stock de 100mM)
DDT 5mM	80 miligramos
EDTA 5mM	5mL (partiendo de un stock 100mM)

Tabla 6. Composición de buffer de extracción

Composición del buffer de extracción (base a 100mL)	
Tris HCl 50mM, pH 7.0	50mL (partiendo de un stock de 100mM)
Urea 8M	48 gramos
DDT 5mM	80 miligramos
EDTA 5mM	5mL (partiendo de un stock 100mM)

IV.4.2 Purificación de la mutante Ser153/Gly_LDH por Cromatografía de Afinidad a Metales (IMAC)

La Ser153/Gly_LDH se sobreexpresó en la fase insoluble o cuerpos de inclusión, durante el proceso de extracción se observaron un gran contenido de proteínas contaminantes. Esto afecta significativamente la confianza de las determinaciones de la función de la enzima y por lo tanto del efecto de cambio de la Ser153 por Gly. Por lo anterior, se procedió a realizar un proceso de purificación de la proteína antes de medir su actividad de fosfolipasa, esterasa y hemolítica. El proceso de purificación se realizó utilizando una columna de afinidad a metales inmovilizados (*HisTrap FF crude* de 1 mL) en un equipo de cromatografía de baja presión AKTA Prime (General Electric, Life Sciences). Se siguieron la recomendaciones del fabricante durante todo el proceso de la purificación. En resumen, se aplicaron 5 ml de la Ser153/Gly_LDH desnaturalizada en el búfer de extracción o búfer A (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, 500 mM NaCl, urea 8M). Las proteína unidas a la columna se eluyeron mediante un gradiente lineal de búfer B (búfer A + 500 mM de imidazol). Durante la cromatografía se mantuvo un flujo constante de 1mL/min, se monitoreó la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm y se colectaron fracciones de 3 mL. Las fracciones en la absorbancia fue mayor, es decir, donde se encuentra a proteína unida inespecíficamente o proteínas contaminantes, se analizaron por SDS-PAGE al 12%. En aquellas fracciones en donde se encontró una banda única con el peso esperado de 47kDa se mezclaron, se les midió concentración de proteína y fueron utilizadas para el replegamiento o renaturalización de la enzima.

IV.4.3 Replegamiento de la mutante Ser153/Gly_LDH Recombinante

Una vez purificada la Ser153/Gly_LDH está aún se encuentra desnaturalizada y por lo tanto inactiva, es decir, es necesario implementar un proceso de replegamiento *in vitro* para que la enzima recupere su conformación nativa y por lo tanto su función. Esto se llevó a cabo por un proceso de diálisis con una membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 8kDa (Millipore). La diálisis consistió en disminuir gradualmente la concentración de urea en pasos escalonados empezando de 8 M, 4 M, 1 M hasta eliminar completamente la urea (Tablas 7, 8 y 9) de urea.

Tabla 7. Composición del buffer de urea 4M

Composición del buffer de urea 4M (base a 500mL)	
Urea 4M, pH 7.5	120 gramos
Tris base 50mM	50mL (partiendo de un stock 500mM)
EDTA 5mM	5mL (partiendo de un stock 100mM)

Tabla 8. Composición de buffer de urea 1M

Composición del buffer de urea 1M (base a 500mL)	
Urea 1M, pH 7.5	30 gramos
Tris base 50mM	50mL (partiendo de un stock 500mM)
EDTA 5mM	5mL (partiendo de un stock 100mM)

En cada etapa se realizaron recambios de buffer de 250 mL c/u. Las condiciones se establecieron a 4°C por 3 horas con agitación constante de 100 rpm. Los últimos dos recambios del buffer 0 M de urea tuvieron una duración por toda 10 horas. Al final se recuperó la solución de la membrana y se centrifugó a 16, 000 × g durante 20 minutos a una temperatura de 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4°C para su uso posterior (29). Todas la etapas del replegamiento se analizaron por SDS-PAGE. Esto con la finalidad de determinar la integridad de la enzima, ya que se considera que una proteína que se mantiene en solución y por lo tanto su integridad estructural es la adecuada.

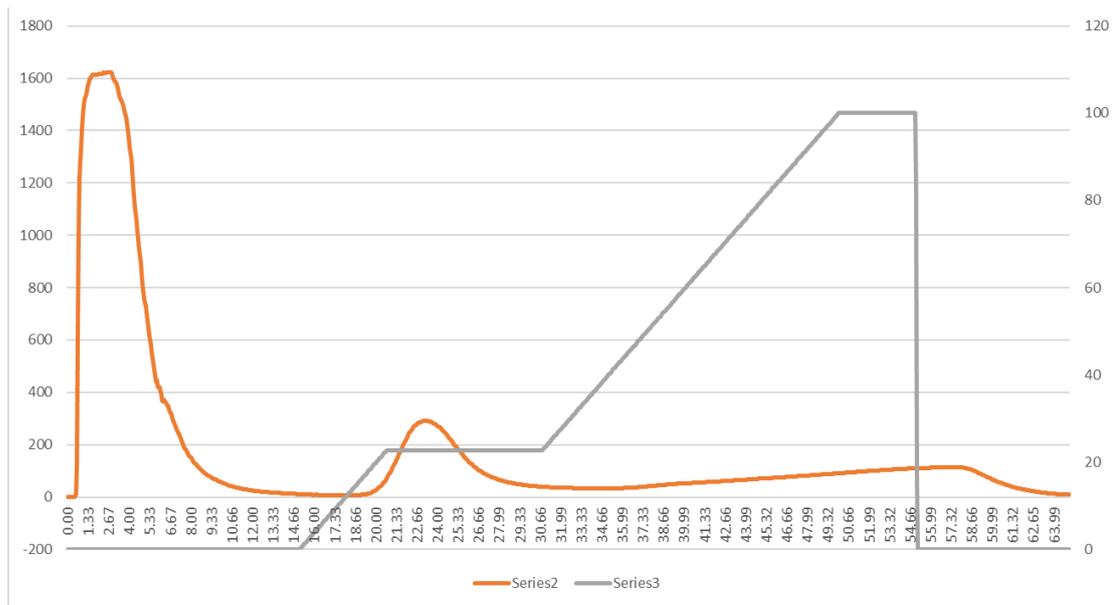


Figura 5. Cromatograma típico de la purificación de la LDH. Lavado: F1 y F2. Uniones inespecíficas: F7 y F8. Uniones específicas (HDL): F9-F13. En el primer pico se observan las uniones inespecíficas, o proteínas contaminantes y en el segundo pico se encuentran las uniones específicas, de la proteína unida correctamente a la columna.

IV.5 Ensayo de Actividad de Fosfolipasa

La actividad de Fosfolipasa A2 que mide la funcionalidad de la proteína se realizó mediante un ensayo cualitativo en un medio Agar-Fosfatidilcolina (Agar-Agar 3%, Fosfatidilcolina 0.1%) (opaco/translúcido). Se hicieron 5 perforaciones (3 de muestra y 2 de control) en el medio, donde se adicionaron diferentes cantidades de la mutante Ser153/Gy_LDH: 5 µg, 10 µg y 20 µg. Además como control positivo se utilizó la proteína LDH en su estado nativo de la cual se agregó el volumen de 50uL a una concentración de 5 µg y como control negativo se utilizaron 50 µL de buffer Tris HCl 50 mM pH 7.5. La actividad de la enzima se observó en los pozos donde se forman halos claros a su alrededor que indican la hidrólisis de fosfatidilcolina a lisofosfastidilcolina y/o lisofosfatidilcolina a glicerofosfatidilcolina (32).

Tabla 9. Composición de buffer de urea 0M

Composición del buffer de urea 0M (base a 500mL)	
Tris base 50mM, pH 7.5	50mL (partiendo de un stock 500mM)
EDTA 5mM	5mL (partiendo de un stock 100mM)

IV.6 Ensayo de Actividad de Esterasa

Para analizar la actividad enzimática de tipo esterasa se utilizó como sustrato p-nitrofenil laurato a una concentración de 10 mM (36). Para ello se incubó la proteína (concentración de proteína en mg/ml) con una solución buffer de actividad (Tris 50 mM pH 7.5) durante 5 minutos a 37 °C, se agregaron 10 µL del sustrato (concentración final 1 µM) y fosfatidilcolina a una concentración final de 0.001%. Posteriormente se registró la absorbancia por 3 minutos a una longitud de onda de 410 nm (31). Una unidad de actividad de la fosfolipasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un µmol de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo. Como control negativo de la reacción se utilizó buffer Tris HCl (980 µL), p-nitrofenol laurato (10 µL) y lecitina (10 µL) . Por otro lado, se utilizó la *LDH* nativa (sin mutaciones) como control positivo de la reacción a la misma concentración que la *Ser153/Gly_LDH*.

IV.7 Ensayo de Actividad Hemolítica

Se utilizó sangre de humano, de la cual se extrajo el paquete eritrocitario mediante centrifugación y lavados (3 lavados) con una solución salina estéril al 0.9% de NaCl. Durante cada lavado las células fueron sedimentadas por centrifugación a 150 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente de 24 °C y se desechó el sobrenadante. El paquete celular fue resuspendido en una relación 1:10 y después 1:20 con buffer TBS (TrisHCl 50 mM pH 7.4, NaCl 155 mM). Se separaron las muestras (Tabla 10) y se incubaron a 37°C por 1 hora.

Después de transcurrido el período de incubación se centrifugó a 900 x g por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 540 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad hemolítica respecto al control positivo. Como control positivo se realizó una lisis total de los eritrocitos utilizando el detergente Tween

20 al 0.1 %, este resultado fue tomado como el 100% de actividad hemolítica (20), y como control negativo a la actividad hemolítica se utilizaron eritrocitos incubados a 37°C en presencia del buffer de reacción (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 155 mM).

Tabla 10. Muestras utilizadas para el ensayo de actividad hemolítica

Mutante S153/Gly LDH	Volumen en (µL)		
Sangre + Solución Salina	300	300	300
LDH S153/Gly (µg)	10	20	50
Lecitina (0.1%)	10	10	10
Buffer fosfato	680	670	640

LDH nativa	Volumen en (µL)		
Sangre + Solución Salina	300	300	300
LDH nativa (µg)	10	20	50
Lecitina (0.1%)	10	10	10
Buffer fosfato	680	670	640

Control positivo	Volumen en (µL)	Control negativo	Volumen en (µL)
Sangre + Solución Salina	300	Sangre + Solución Salina	300
Tween 20 0.01%	100	Lecitina (0.1%)	10
Buffer fosfato	600	Buffer Fosfato	640

Para comparar el efecto de la mutante Ser153/Gly_LDH sobre la actividad hemolítica se utilizó la LDH en su estado nativo bajo las mismas condiciones descritas. La LDH en su estado nativo fue amablemente proporcionada por Luis E. Vazquez Morado (estudiante de maestría en ciencias de la salud).

IV.8 Análisis Estadístico

Los resultados de actividad enzimática y hemolítica de la mutante Ser153/Gly_LDH y de la LDH nativa se analizaron estadísticamente utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. para datos no paramétricos mediante Kruskal-Wallis. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante una prueba de comparación de medias (U de Mann Whitney). Se trabajó con un intervalo de confianza del 95% ($P < 0.05$). Estos análisis se realizaron en el paquete estadístico SPSS ver 10.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Cinética de Sobreexpresión

El plásmido con el gen de la Ser153/Gly_LDH fue transformado en diferentes condiciones de sobreexpresión, las cepas de *E.coli* que se utilizaron fueron: Rosetta 2, Star y Gold. De las cuales se decidió usar Rosetta 2 debido a que esta cepa fue la que producía mayor cantidad de proteína (intensidad de la banda observada) con el peso molecular esperado de aproximadamente 47 kDa respecto a las otras 2 cepas utilizadas. Las concentraciones de inductor IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) que se manejaron fueron 0.4 mM y 1mM; donde se optó por utilizar una concentración final de sobreexpresión de 0.4 mM debido a que era suficiente para expresar a la proteína. Y por último se probaron diferentes temperaturas de 25°C y 37°C, pero finalmente se decidió usar una temperatura de 37°C porque no se observó un cambio significativo en la expresión de la proteína. Aun después de modificar las condiciones, el resultado siempre fue el mismo, la proteína se sobre expresó en cuerpos de inclusión en todas las repeticiones. Los geles de sobreexpresión (Figuras 5, 6, 7, 8, 9 y 10). Asimismo, se realizó una cinética de sobreexpresión para determinar cuánto tiempo después de la inducción se obtenía la mayor cantidad de la proteína de interés. Todas la fracciones recolectadas (soluble e insoluble) a los diferentes tiempos (0, 2, 6 y 20 HPI) se analizaron mediante SDS-PAGE 12%.

Se obtuvo como resultado que desde las 2 HPI (horas post inducción) la proteína se sobreexpresaba en cantidades abundantes. Por cuestiones de optimización y reproducibilidad de los futuros experimentos se optó por utilizar 6 HPI para obtener cantidades suficientes de proteína para cumplir con los objetivos planteados (Figura 5). Resultados similares se obtuvieron de la sobreexpresión de la LDH de *V. alginolyticus* donde la proteína se sobreexpresó en una cepa de *E.coli* BL21, con Kanamicina como antibiótico de selección, a una concentración de 1 mM de inductor IPTG y a una temperatura de 25°C por 6 HPT. Después se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 12% y se observó que la proteína también se sobreexpresaba en la fracción insoluble. De la misma manera, en un estudio realizado para la mutante LDH de *Vibrio harveyi*, donde se sobreexpresó a la proteína en la cepa *E.coli* BL21 y como inductor IPTG a una concentración, tiempo y temperatura desconocida se encontró que esta se sobreexpresaba en cuerpos de inclusión. Por tanto podemos concluir que independientemente de la cepa de *E.coli* de sobreexpresión utilizada, el resultado para las proteínas LDHs es el mismo. Donde tal vez, influyan o no factores como el tipo de inductor, la temperatura, y el tiempo.

En este reporte al igual que lo encontrado en el presente trabajo, se realizó un proceso de purificación y replegamiento de la enzima.

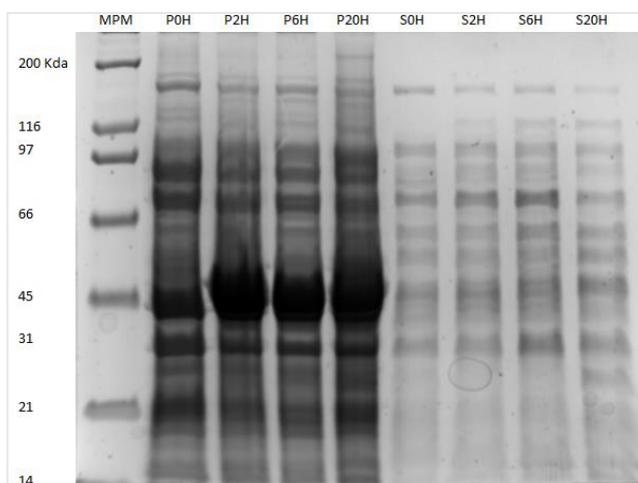


Figura 6. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión en la cepa de *E.coli* Rosetta 2. Se muestran las fracciones correspondientes al pellet (P) y sobrenadante (S) a las 0 (P0H y S0H), 4 (P4H y S4H) 6 (P6H y S6H) y 20 (P20H y S20H) HPI, respectivamente. A una temperatura de 37°C con una concentración de IPTG 0.4mM. El gel se tiñó con azul de Coomassie MPM, Marcador de peso molecular de amplio rango.

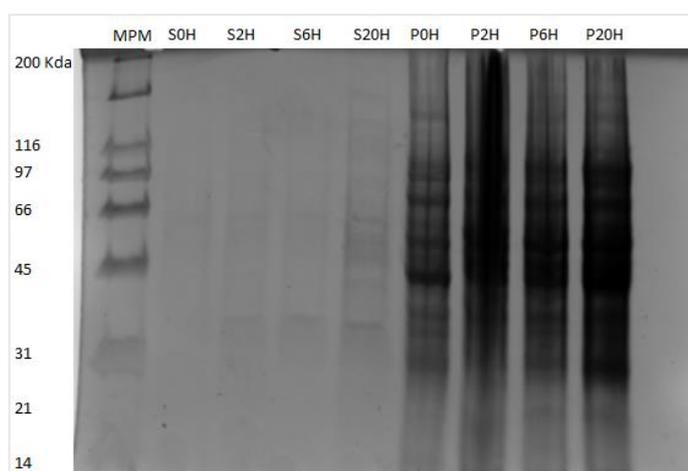


Figura 7. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión con la cepa de *E.coli* Gold. Se muestran de las fracciones corridas P (pellet) y S (sobrenadante) a las 0 (P0H y S0H), 4 (P4H y S4H) 6 (P6H y S6H) y 20 (P20H y S20H) horas respectivamente. A una temperatura de 37°C con una concentración de IPTG 0.4mM. El gel se tiñó con azul de Coomassie a 0.1%. MPM, Marcador de peso molecular.

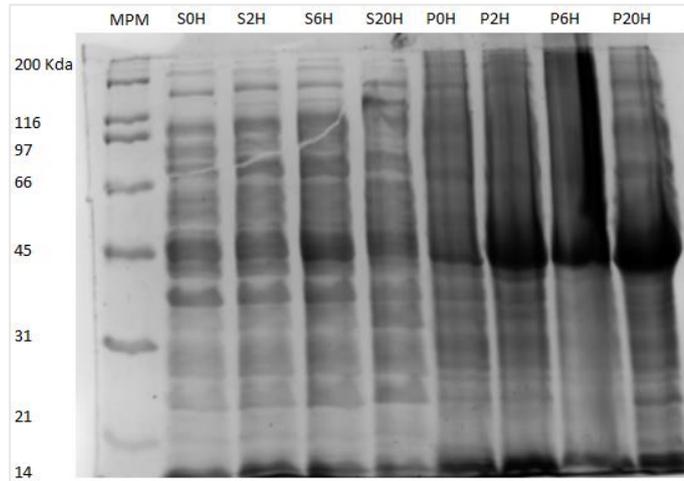


Figura 8. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión con la cepa *E.coli* Star. Se muestran las fracciones del pellet (P) y sobrenadante (S) a las 0 (P0H y S0H), 4 (P4H y S4H) 6 (P6H y S6H) y 20 (P20H y S20H) HPI, respectivamente. A una temperatura de 37°C con una concentración de IPTG 0.4mM. El gel se tiñó con azul de Coomassie a 0.1%. MPM, Marcador de peso molecular.

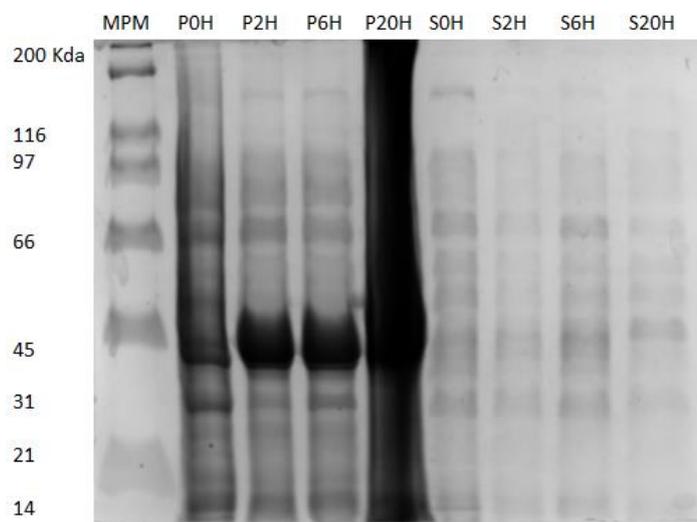


Figura 9. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión con la cepa *E.coli* Rosetta 2. Se muestran las fracciones del pellet (P) y sobrenadante (S) a las 0 (P0H y S0H), 4 (P4H y S4H) 6 (P6H y S6H) y 20 (P20H y S20H) HPI, respectivamente. A una temperatura de 37°C con una concentración de IPTG 1mM. El gel se tiñó con azul de Coomassie a 0.1%. MPM, Marcador de peso molecular.

En función a estos resultados, se procedió a purificar los cuerpos de inclusión y renaturalizar la enzima mediante los protocolos anteriormente descritos. Después de purificar los cuerpos de inclusión se obtuvieron 4 mL de proteína en presencia de urea 8 M (forma inactiva) a partir de 1 gr de biomasa (pellet bacteriano). A esta solución se le midió concentración con el equipo Nanodrop (Thermo Scientific) y se ajustó la concentración a 10 mg/mL. Cabe señalar que a concentraciones superiores se ha reportado que el proceso de replegamiento (renaturalización) *in vitro* no es eficiente y se precipita >80 % de la proteína (29). Esta solución que contenía la Ser153/Gly_LDH fue utilizada para la renaturalización o replegamiento *in vitro*.

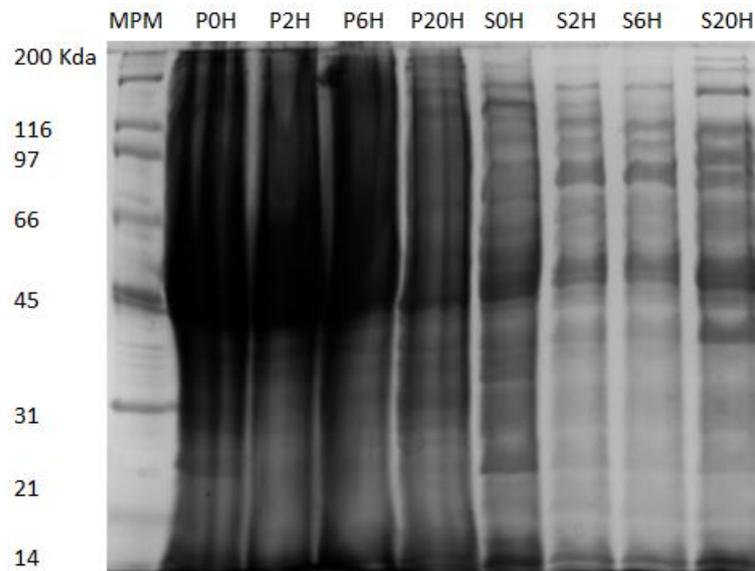


Figura 10. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión con la cepa *E.coli* Gold. Se muestran las fracciones del pellet (P) y sobrenadante (S) a las 0 (P0H y S0H), 4 (P4H y S4H) 6 (P6H y S6H) y 20 (P20H y S20H) HPI, respectivamente. A una temperatura de 37°C con una concentración de IPTG 1mM. El gel se tiñó con azul de Coomassie a 0.1%. MPM, Marcador de peso molecular.

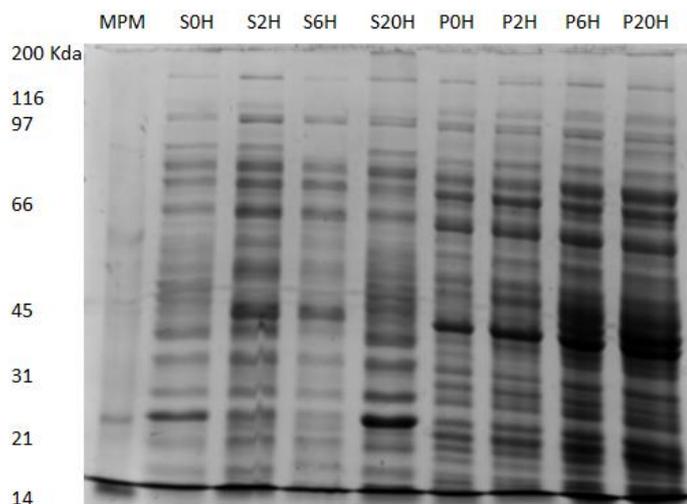


Figura 11. Gel SDS-PAGE al 12% de la cinética de sobreexpresión con la cepa *E.coli* Star. Se muestran las fracciones del pellet (P) y sobrenadante (S) a las 0 (P0H y S0H), 4 (P4H y S4H) 6 (P6H y S6H) y 20 (P20H y S20H) HPI, respectivamente. A una temperatura de 25°C con una concentración de IPTG 0.4mM. El gel se tiñó con azul de Coomassie a 0.1%. MPM, Marcador de peso molecular.

V.2 Replegamiento y Purificación de la Mutante Ser153/Gly_LDH por Cromatografía de Afinidad a Metales (IMAC)

A partir del extracto obtenido de la purificación de cuerpos de inclusión la proteína fue renaturalizada por el método de diálisis. Esto consistió en disminuir gradualmente la concentración de urea 8 M (agente caótopico) hasta 0 M. El último recambio de buffer (Tris HCl 50 mM pH 7.5,) se realizó por duplicado para asegurar la mayor extracción de urea del medio. Cada una de las etapas de este procedimiento se monitoreó por SDS-PAGE al 12% (Figura 8). En esta figura se observa la banda correspondiente al peso molecular esperado (47 kDa) de la mutante Ser153/Gly_LDH en todas las fracciones. Esto indica que la proteína se plegó correctamente ya que se mantuvo presente en solución aun eliminando la urea del último buffer (37).

Asimismo, se observa la presencia de una gran número de bandas de proteínas contaminantes proveniente de lisado bacteriano. Estas proteínas pueden interferir positiva o negativamente en la función de la LDH. O bien, es posible que alguna de estas moléculas

pueda presentar actividad catalítica que resulten falsos positivos o negativos durante los ensayos de funcionalidad. Por lo tanto, se procedió a purificar la enzima antes de replegar, es decir en presencia de urea 8 M, mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC) utilizando una columna Hitrap-HP de 1mL (GE life sciences). Para lo cual se siguió el protocolo descrito por el fabricante para un equipo de cromatografía de baja presión AKTA-Prime (GE, life sciences). La pureza se determinó a homogeneidad en aquellas fracciones que sólo contenían una banda del peso molecular esperado para la Ser153/Gly_LDH (47 kDa) (Figura 9). Como se observa en esta figura se obtuvo una banda de correspondiente al peso molecular de la enzima de interés en las fracciones F8 a F11. Por lo tanto, se logró purificar la Ser153/Gly_LDH en presencia de urea 8 M. Estas fracciones se agruparon y se replegaron con el procedimiento descrito. En el carril FR (Figura 9) se muestra una única banda en la solución final del replegamiento (sin urea) del peso molecular esperado. Se obtuvieron 4 mL a una concentración de 0.2837 mg/mL. Esta solución fue utilizada para los análisis posteriores.

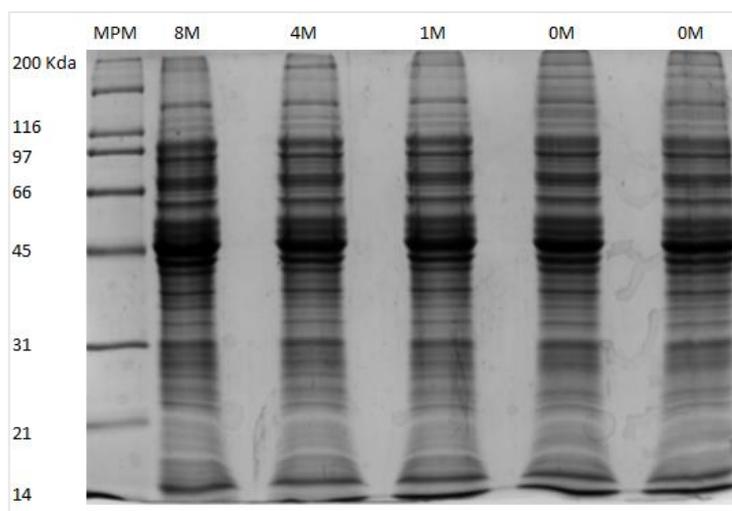


Figura 12. Replegamiento de la proteína mutante S153/G LDH antes de la purificación indicando las muestras corridas 8 M, 4 M, 1 M, 0 M (8, 4, 1 y 0 Molar de urea) respectivamente. El gel (SDS-PAGE al 12%) se tiñó con azul de Coomassie a 0.1%. MPM, Marcador de peso molecular de amplio rango (Biorad).

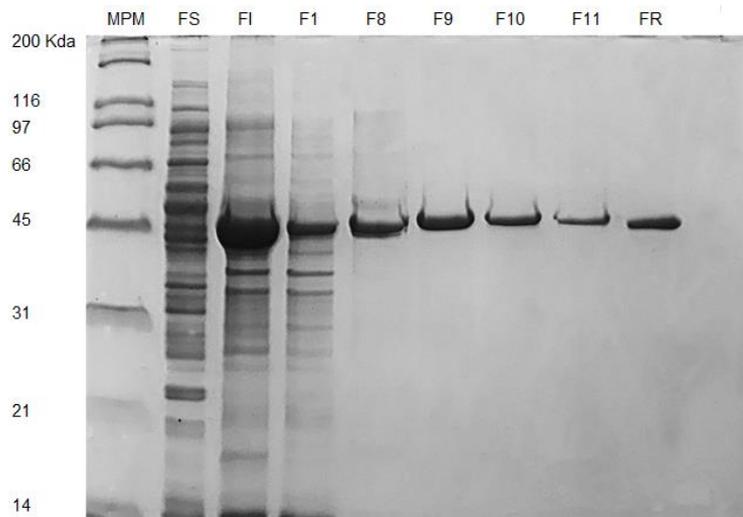


Figura 13. Gel SDS-PAGE al 12% de la purificación por IMAC en condiciones desnaturalizantes de la S153/G *LDH*. FS (fracción soluble), FI (fracción insoluble. Extracto crudo), F1 (proteína no unida) , F8- 1 (proteína unida) y FR (fracción replegada). El gel se tiñó con azul de Coomassie a 0.1%. MPM, Marcador de peso molecular de amplio rango (Biorad).

V.3 Ensayo de Actividad de Fosfolipasa

Una vez que la enzima fue purificada y replegada se determinó el efecto de la mutación en el residuo Ser153/Gly_ *LDH* de la *LDH*. Por lo tanto, se procedió a evaluar tanto la actividad enzimática (fosfolipasa y esterasa) como hemolítica de la enzima. El ensayo cualitativo de actividad fosfolipasa consistió en la preparación de un agar-agar al cual se le adicionó el sustrato (fosfatidilcolina 0.1 %). Se agregaron 50uL de una solución con diferente concentración de la Ser153/Gly_ *LDH* purificada como se muestra en la Tabla 11.

En el pozo que contenía la proteína *LDH* nativa se observó la formación de dos halos, lo cual indican la hidrólisis del sustrato y por lo tanto que la enzima es activa (Figura 10). El primer halo (flecha amarilla) corresponde a la actividad de la proteína como fosfolipasa A2, mientras que el segundo corresponde a la actividad de la proteína como fosfolipasa tipo B (flecha negra). Estos resultados son similares a lo reportado para *LDH*'s de este tipo de otras especies de *Vibrio* patógenas para camarón como son *Vibrio harveyi* (34) y *Vibrio alginolyticus* (13). Donde en el ensayo actividad de fosfolipasa de la *LDH* de *Vibrio harveyi* en agar LB

adicionado con yema de huevo se observó la formación de halos de actividad en la proteína nativa, mientras que con la mutante no se observó. De la misma manera, en el estudio de la *LDH* de *Vibrio alginolyticus* en agar adicionado con yema de huevo, la proteína nativa mostro la formación de halos de actividad, mientras que los pozos con el control negativo, y la enzima desnaturizada no se observaron. Concluyendo entonces, que la formación de halos es característico a la actividad de fosfolipasa de las proteínas *LDH*s.

Tabla 11. Diseño del ensayo de actividad de fosfolipasa.

Pozo	Contenido	µg/µL
1 Control positivo	<i>LDH</i> nativa	5
2	<i>LDH</i> S153/Gly	5
3	<i>LDH</i> S153/Gly	10
4	<i>LDH</i> S153/Gly	20
5 Control negativo	Buffer Tris HCl 50mM	

En los pozos donde se encontraba la mutante Ser153/Gly_*LDH* (2 al 4) y el control negativo (pozo 5) no se observó formación de halos después de 24 horas de incubación. Se prolongó el tiempo de incubación por 72 horas para descartar que la enzima tuviese una baja actividad enzimática. Por lo tanto, la mutante específica Ser153/Gly_*LDH* no mostró actividad de fosfolipasa mediante este ensayo. Se ha reportado el residuo de Serina en el sitio activo en las hemolisinas termolábiles de otras especies de *Vibrio* también es esencial para su actividad enzimática.

Por ejemplo, se demostró que el cambio de Serina por Glicina hemolisina de *Vibrio harveyi* (que también es patógena para camarón) causa una pérdida de la actividad de fosfolipasa en ensayos con geles de agar/lecitina (31). Estos autores concluyeron que el cambio de un solo residuo (Serina/Glicina) del sitio activo era suficiente para que la enzima se volviera inactiva. Cabe señalar que los experimentos realizados por estos investigadores y los presentados en esta tesis son cualitativos, por lo que no se puede determinar con precisión y suficiente sensibilidad si existe actividad residual de la enzima modificada. Por lo tanto, se procedió a

realizar un ensayo espectrofotométrico y cuantitativo utilizando el sustrato para esterasas 4-*p*-nitro fenilaurato como sustrato.

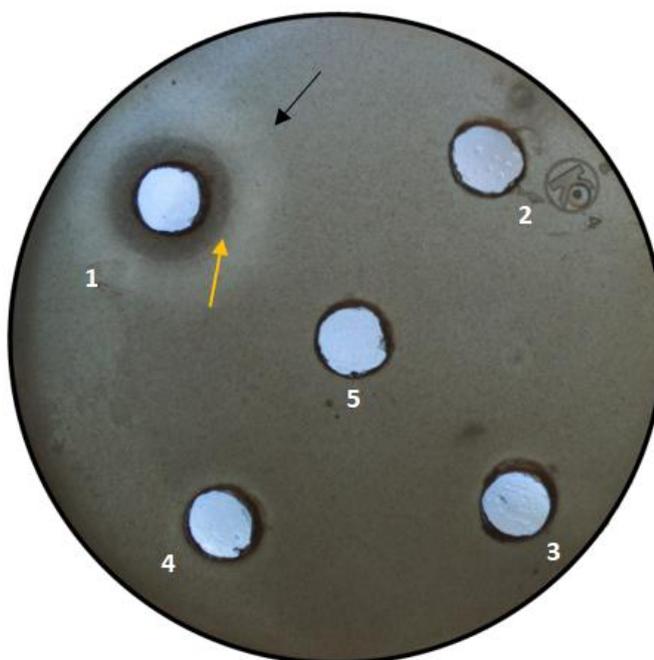


Figura 14. Actividad de fosfolipasa de la *LDH* en una placa de Petri con medio Agar-Fosfatidilcolina. Las flechas indican la presencia de los halos de actividad de la proteína en su estado nativo. La flecha amarilla señala el halo correspondiente a la hidrólisis de la fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina, mientras que la flecha negra señala el halo de hidrólisis de la lisofosfatidilcolina a glicerofosfatidilcolina. En el pozo 1, se adicionó la *LDH* nativa (5 μ g), pozo 2-4 (Ser153/Gly_*LDH* 5, 10 y 20 μ g) y en el pozo 5 (control negativo, Tris-HCl 50 mM pH 7.4).

El *p*-nitrofenil laurato es un compuesto fenólico que tiene un átomo de nitrógeno en la posición opuesta del grupo hidroxilo en el anillo de benceno (40). La presencia de enzimas con capacidad de hidrolizar el enlace éster entre el nitro-fenol y el ácido graso genera la aparición de una coloración amarilla, la cual se puede cuantificar monitoreando la absorbancia a 410 nm. En la Figura 11 se muestra una gráfica típica (absorbancia a 410 nm vs tiempo) del ensayo de actividad de esterasa de la *LDH* nativa. Se observa un aumento en la absorbancia como producto de la hidrólisis de sustrato por efecto de la actividad enzimática

de la *LDH* nativa (círculos). Mientras que en las reacciones donde se agregó la Ser153/Gly_*LDH* (cuadrados) no se observa un aumento de la absorbancia, lo que indica que la enzima no fue capaz de hidrolizar el sustrato. Los valores de absorbancia permanecieron con el mismo comportamiento que el blanco de la reacción (triángulos). Para determinar si existía un efecto de la cantidad de enzima en la reacción se realizaron varios ensayos en los que se aumentó la cantidad de la Ser153/Gly_*LDH* en el ensayo (8, 11, 28 μg de proteína) como se muestra en la Figura 12. En esta gráfica los resultados se expresan como porcentaje de actividad residual tomando como el 100% la actividad de la *LDH* nativa.

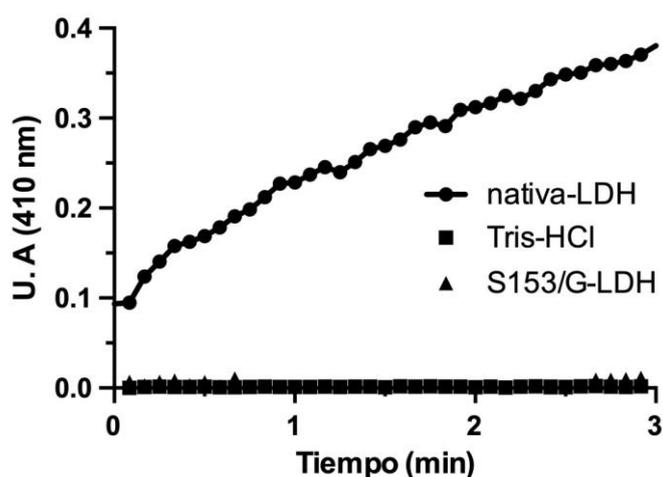


Figura 15. Actividad de esterasa de la *LDH* en su estado nativo (círculos) y la S153/Gly_*LDH* (triángulos). Como control negativo se utilizó buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5. En ambas muestras se agregaron 8 μg de proteína.

En las tres cantidades evaluadas se observó una actividad residual de esterasa <3 %, lo que indica una disminución drástica en la función catalítica de la Ser153/Gly_*LDH*. Es decir, el residuo de Serina en la posición 153 de la *LDH* de *Vibrio parahaemolyticus* desempeña un rol importante durante la catálisis enzimática. Este resultado es consistente con lo observado en los experimentos cualitativos de actividad fosfolipasa aquí reportados y con los descritos para la *LDH* de *Vibrio harveyi*. Donde la hemolisina se sobreexpresó en *E. coli* BL21 indujo la sobreexpresión con isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) a una concentración desconocida, y se purificó por cromatografía de afinidad a metales. Posteriormente para los ensayos de actividad fosfolipasa cualitativamente se utilizó agar LB suplementado con yema de huevo (31).

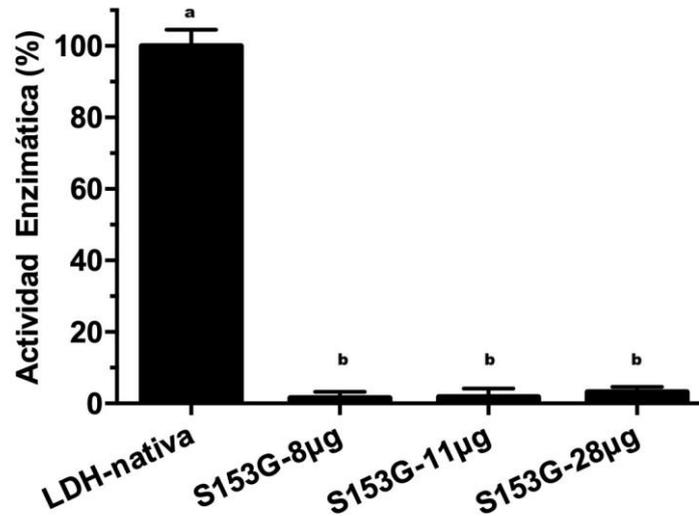


Figura 16. Actividad enzimática de diferentes cantidades de la Ser153/Gly_LDH. Los resultados se expresan en porcentaje de actividad residual comparado con la LDH nativa. Se muestra el promedio de tres repeticiones de cada ensayo y la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

X.4 Ensayo de Actividad Hemolítica

La hidrólisis de la fosfatidilcolina da como producto a la lisofosfatidilcolina, el cual es el encargado de producir hemólisis debido a que actúa como detergente formando poros en las membranas celulares de los eritrocitos del camarón. Para medir la actividad hemolítica de la mutante se utilizaron eritrocitos humanos, los cuales fueron lavados con solución salina y extraídos por centrifugación para ser incubados con la proteína LDH nativa a una concentración de 20 µg/µL y la mutante Ser153/Gly_LDH a la misma concentración 20 µg/µL. Del porcentaje de hemólisis que se obtuvo se midió la hemoglobina liberada al medio. En la Figura 13 se muestran los resultados de los ensayos de actividad hemolítica, los cuales se expresaron como porcentaje de actividad respecto al control positivo conformado por el detergente TWEEN 20 al 0.5% el cual se tomó como 100% de hemólisis.

La LDH nativa mostró un porcentaje de 80% de hemólisis lo que nos indica que la proteína en su estado nativo se encuentra activa y funcional. Al contrario de la mutante S153/Gly_LDH presentó una actividad hemolítica <1%. Por lo tanto, el cambio del residuo de Serina en la

posición 153 por Glicina de la *LDH* causa una disminución drástica de la actividad hemolítica. La pérdida de la actividad hemolítica son consistentes con los observado en los ensayos de actividad enzimática (fosfolipasa y esterasa).

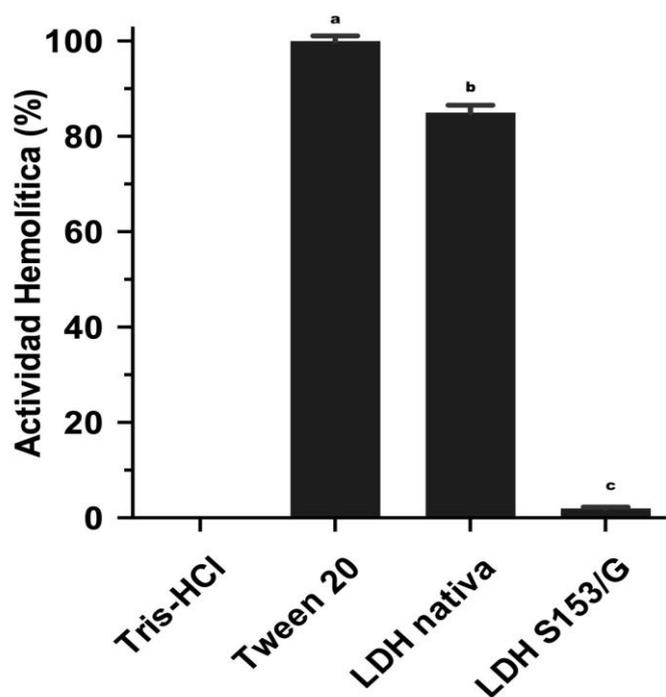


Figura 17. Efecto de la mutante Ser153/Gly_ *LDH* sobre la actividad hemolítica de la *LDH*. Los resultados se muestran como porcentaje de hemólisis tomando como 100 % el Tween 20. Como control negativo se utilizó el buffer en el que se encuentra disuelta ambas enzimas y el Tween 20. Se muestra el promedio de tres repeticiones y su desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En conjunto, estos resultados indican que la Serina 153 es parte del sitio activo de la enzima y además es un aminoácido esencial para la funcionalidad de la *LDH* de *Vibrio parahaemolyticus*. Si bien los resultados de actividad de fosfolipasa son similares a lo reportado para la hemolisina termolábil de *Vibrio harveyi* (31), cabe señalar que en el presente se profundizó en evaluar el efecto de esta mutación a nivel cuantitativo tanto enzimática como a nivel de daño celular (eritrocitos de humano).

VI. CONCLUSIONES

Se demostró que el cambio del residuo del aminoácido Serina por Glicina en la posición 153 de la *LDH* de *Vibrio parahaemolyticus* causa una disminución significativa y prácticamente total tanto en la actividad enzimática como hemolítica de la enzima. Por lo tanto, la Serina 153 desempeña un papel esencial en el sitio catalítico durante la función de la *LDH*. Además, se establecieron las condiciones de sobreexpresión funcionales para la transformación y producción de la mutante Ser153/Gly_*LDH*.

VII. RECOMENDACIONES

- Determinar el efecto de la mutante Ser153/Gly_LDH la actividad hemolítica de la utilizando hemocitos de camarón.
- Evaluar *in vivo* el efecto de la mutante Ser153/Gly_LDH sobre la toxicidad mediante un bioensayo con camarones.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Biotech Consulting Group (2011). Consultado en: <http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/especies/crustaceos/camaron.html> (fecha de acceso: 25 de octubre de 2017).
2. CESAIBC. Comité Estatal de sanidad acuícola e inocuidad de Baja California A.C. (2015). Consultado en: http://www.cesaibc.org/sitio/archivos/FICHA%20TEC.%20SANITARIA%20DE%20L.%20VANNAMEI_070616204151.pdf (fecha de acceso: 25 de octubre de 2017).
3. Nueva Martín Téllez Castañeda. (2017). El cultivo de camarón en México, en vías de crecimiento (I). EL ECONOMISTA, 3. Consultado en: <https://www.eleconomista.com.mx/opinion/El-cultivo-de-camaron-en-Mexico-en-vias-de-crecimiento-I-20171120-0094.html> (fecha de acceso: 3 de noviembre de 2017)
4. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura para un mundo sin hambre. *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). ICTIOTERM. (2012). Consultado en: http://www.ictioterm.es/nombre_cientifico.php?nc=235 (fecha de acceso: 28 de octubre 2017).
5. Aquaculture Management and Conservation Service (FIMA) 2006-2017. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. Briggs, M. 7 April (2006). Consultado en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es (fecha de acceso: 30 de octubre 2017).
6. Iván Restrepo. (Lunes 9 de septiembre de 2013). Los graves daños de las granjas de camarón. LA JORNADA. Consultado en: <http://www.jornada.unam.mx/2013/09/09/opinion/020a2pol>. (fecha de acceso: 30 de octubre 2017).
7. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. (2006). Consultado en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es (fecha de acceso: 17 de octubre de 2017).

8. Tania Enríquez-Espinoza, Trinidad Encinas-García, Guillermo Portillo Clark y Manuel Grijalva-Chon. (February 2014). Síndrome de mortalidad temprana del camarón, ¿presente en México?. Ciencia y desarrollo. Consultado en: https://www.researchgate.net/profile/Fernando_Mendoza-Cano/publication/260871793_Sindrome_de_mortalidad_temprana_del_camaron_presente_en_Mexico/links/0a85e532b2f238e0ac000000/Sindrome-de-mortalidad-temprana-del-camaron-presente-en-Mexico.pdf. (fecha de acceso: 27 de octubre 2017).
9. MEJÍAS, A. I. A. V., & NAVARRO, I. N. P. Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión. Consultado en: https://www.researchgate.net/profile/Alexander_Mejias2/publication/282942291_Sindrome_de_la_Mortalidad_Temprana EMSAHPNS en camarones cultivados Una revision/links/56233d4c08ae70315b592844/Sindrome-de-la-Mortalidad-Temprana-EMS-AHPNS-en-camarones-cultivados-Una-revision.pdf (fecha de acceso: 3 de noviembre de 2017)
10. Cuéllar-Anjel, J. (2012). Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS). In Memorias de la Conferencia técnica presentada a miembros de la OIE, Ministerio de Desarrollo Agropecuario de Panamá (MIDA–DINASA) y sector privado camaronero panameño. Estación de Aguas Estuarinas Ing. Enrique Enseñat, Aguadulce (Coclé), Panamá. Consultado en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/acute-hepatopancreatic-necrosis-disease-es.pdf>. (fecha de acceso: 27 de octubre 2017).
11. GÓMEZ GIL BRUNO, ROQUE ANA y GUERRA FLORES ANA L.. (2001). Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. 30 de octubre de 2017, de ResearchGate. Consultado en : https://www.researchgate.net/profile/Bruno_Gomez-Gil/publication/229150678_Las_Enfermedades_en_la_Camaronicultura/links/09e41509bd22371a4b000000/Las-Enfermedades-en-la-Camaronicultura.pdf (fecha de acceso: 3 de noviembre de 2017)
12. ARTURO SÁNCHEZ-PAZ ET AL.. (2013). Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. Revista AquaTIC, 19, 9-15. 30 de octubre de 2017, De Revista AquaTIC Base de datos. Consultado en: <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/254/242>. (fecha de acceso: 31 de octubre 2017).

13. Jia A, Woo NYS, Zhang XH (2010) Expression, purification, and characterization of thermolabile hemolysin (TLH) from *Vibrio alginolyticus*. *Dis Aquat Org* 90:121-127. <https://doi.org/10.3354/dao02225> Consultado en: <http://www.int-res.com/abstracts/dao/v90/n2/p121-127/> (fecha de acceso: 2 de noviembre de 2017)
14. Heitmann, G., Jofre, M., Hormazabal, O., Carlos, J., Olea, N., Vallebuona, S., & Valdés, H. (2005). Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista chilena de infectología*, 22(2), 131-140.
15. Cavallo, R. A., & Stabili, L. (2004). Culturable vibrios biodiversity in the Northern Ionian Sea (Italian coasts). *Scientia Marina*, 68(S1), 23-29. Consultado en: <http://www.vliz.be/imisdocs/publications/225456.pdf> (fecha de acceso: 3 de noviembre de 2017)
16. Peeters, M., & Rodríguez, J. (1999). Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, prácticas de manejo y alternativas de control. *El Mundo Acuicola*, 5, 13-18.
17. Egidius, E. (1987). Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture*, 67(1-2), 15-28. Consultado en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0044848687900044> (fecha de acceso: 30 de octubre 2017).
18. Raghunath, P. (2015). Roles of thermostable direct hemolysin (*Tdh*) and *Tdh*-related hemolysin (*Trh*) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in microbiology*, 5, 805.
19. Su, Y. C., & Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food microbiology*, 24(6), 549-558.
20. Okuda, J., Ishibashi, M., Abbott, S. L., Janda, J. M., & Nishibuchi, M. (1997). Analysis of the thermostable direct hemolysin (*Tdh*) gene and the *Tdh*-related hemolysin (*Trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *Journal of clinical microbiology*, 35(8), 1965-1971.
21. Shimohata T., Takahashi A. (2010). Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Med. Invest.* 57 179 –182. 10.2152/jmi.57.179 [PubMed] [Cross Ref]

22. Park K., Ono T., Rokuda M., Jang M., Iida T., Honda T. (2004a). Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* 48 313–318 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03512.x [PubMed] [Cross Ref]
23. Burdette D. L., Yarbrough M. L., Orth K. (2009). Not without cause: *Vibrio parahaemolyticus* induces acute autophagy and cell death. *Autophagy* 5 100–102 10.4161/auto.5.1.7264
24. Yu W. T., Jong K. J., Lin Y. R., Tsai S. E., Tey Y. H., Wong H. C. (2013). Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 160185–192 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.002
25. Morán, G. A. G., Gaitán, Á. A., Cardona, A. G., Grimaldi, D. C., Mejía, Ó. R., Cobos, C., & Casadiego, C. A. (2008). Aspectos biomédicos de las fosfolipasas A2 en la especie humana. *MedUNAB*, 11(1), 14-27.
26. Honda T., Ni Y. X., Miwatani T. (1988). Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.* 56 961–965.
27. Kishishita, M., Matsuoka, N. A. O. K. I., Kumagai, K. E. I. K. O., Yamasaki, S. H. I. N. J. I., Takeda, Y. O. S. H. I. F. U. M. I., & Nishibuchi, M. I. T. S. U. A. K. I. (1992). Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*Trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and environmental microbiology*, 58(8), 2449-2457.
28. Lynch, T., Livingstone, S., Buenaventura, E., Lutter, E., Fedwick, J., Buret, A. G., ... & DeVinney, R. (2005). *Vibrio parahaemolyticus* disruption of epithelial cell tight junctions occurs independently of toxin production. *Infection and immunity*, 73(3), 1275-1283.
29. Zhong, Y., Zhang, X. H., Chen, J., Chi, Z., Sun, B., Li, Y., & Austin, B. (2006). Overexpression, purification, characterization, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* hemolysin VHH. *Infection and immunity*, 74(10), 6001-6005.

30. Luis Eduardo Tellechea Robles. (2015). Sobreexpresión, purificación y caracterización parcial de la hemolisina dependiente de lecitina (HDL) de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. (tesis de licenciatura). Universidad de Sonora., Hermosillo, Sonora.
31. Sun, B., Zhang, X.-H., Tang, X., Wang, S., Zhong, Y., Chen, J., & Austin, B. (2007). A Single Residue Change in *Vibrio harveyi* Hemolysin Results in the Loss of Phospholipase and Hemolytic Activities and Pathogenicity for Turbot (*Scophthalmus maximus*) . *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2575–2579. <http://doi.org/10.1128/JB.01650-06>
32. Shinoda S., Matsuoka, H., Tsuchie, T., Miyoshi, S. I., Yamamoto, S., y Mizuguchi, Y. 1991. Purification and characterization of a lecithin –dependent haemolysin from *Escherichia coli*. Transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *Journal of General Microbiology*, 137 (12): 2705-2711.
33. Santos, J. R., Ferrat, G. C., & Eichelmann, M. C. G. (2005). Stationary phase in *Escherichia coli*. *Revista latinoamericana de microbiologia*, 47(3-4), 92-101. Consultado en: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=5164> (fecha de acceso: 15 de junio de 2018)
34. Tang, W. L., Zhang, M., & Fang, Z. (2015). Optimization of ultrasound-assisted-extraction of porcine placenta water-soluble proteins and evaluation of the antioxidant activity. *Journal of food science and technology*, 52(7), 4042-4053.
35. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.
36. Nawani, N., Dosanjh, N. S., & Kaur, J. (1998). A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*, 20(10), 997-1000.
37. Tamames, J., Gil, R., Latorre, A., Peretó, J., Silva, F. J., & Moya, A. (2007). The frontier between cell and organelle: genome analysis of Candidatus *Carsonella ruddii*. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 181.

38. Breslow, N. (1970). A generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal patterns of censorship. *Biometrika*, 57(3), 579-594.
39. Profesor G. Gómez-Jarabo. (2012). Glicina. 10 de Octubre de 2018, de biopsicologia
Sitio web: <http://www.biopsicologia.net/es/nivel-3-participaci%C3%B3n-pl%C3%A1stica-y-funcional/4.2.8.-Glicina>
40. Sigma Aldrich. (2018). 4-Nitrophenyl palmitate. 11 de Octubre de 2018, de Sigma-Aldrich
Sitio web: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n2752?lang=es&ion=MX>
41. Luis Manuel Rosales Colunga . (2007). OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE *Escherichia coli* SOBREPRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO. 23 de Septiembre de 2018, de INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C. POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR Sitio web: <https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1010/574/3/TMIPICYTR6O22007.pdf>