



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

**EFECTO DE LA HIPOXIA SOBRE p53 DEL CAMARÓN  
BLANCO *Litopenaeus vannamei*: DETECCIÓN DE  
TRANSCRITOS Y PROTEÍNA**

---

**Por:**

**Dahlia María Núñez Hernández**

**TESIS APROBADA POR LA**

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL**

**Como requisito parcial para obtener el grado de**

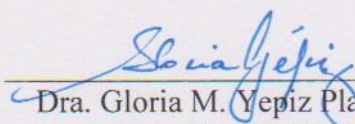
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

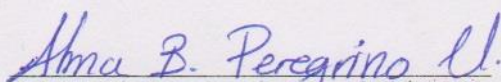
**Hermosillo, Sonora**

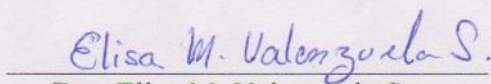
**Diciembre de 2015**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Dahlia María Núñez Hernández, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

  
Dra. Gloria M. Yepiz Plascencia  
Directora de Tesis

  
M. en C. Alma B. Peregrino Uriarte  
Asesora

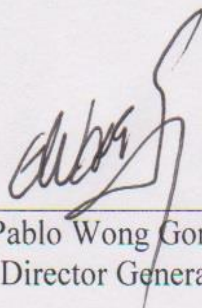
  
Dra. Elisa M. Valenzuela Soto  
Asesora

Dr. José G. Soñanez Organis  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

A **CONACyT**, por haberme proporcionado la beca de maestría y al proyecto 221240 “LA hipoxia en el camarón *Litopeneus vannamei*: efectos en proteínas clave en glucolisis y apoptosis” de Ciencia Básica de la Dra. Gloria Yepiz Plascencia.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo**, por abrirme las puertas y permitirme usar las instalaciones para llevar a cabo mi trabajo.

A la **Dra. Gloria Yepiz Plascencia**, por permitirme formar parte de este laboratorio, por su paciencia, por haberme guiado durante todo este proyecto y compartir su sabiduría conmigo.

A la **M. en C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte** y la **M. en C. Lilia Leyva Carrillo**, gracias por ser una guía y por compartir sus conocimientos conmigo, sin su apoyo no hubiera podido lograrlo.

A mi Comité de Tesis, la **Dra. Gloria Yepiz Plascencia**, la **M. en C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte**, la **Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto** y el **Dr. José Guadalupe Soñanez Organis** por el tiempo, por sus comentarios y el conocimiento brindado durante la elaboración de este trabajo.

A la **Dra. Ana María Calderón de la Barca** y al **Q. B. René Valenzuela Miranda** por el apoyo y las atenciones brindadas durante la parte de producción de anticuerpos.

A mis compañeros de laboratorio, mis casi hermanos, **Monse, José, Keni, Ámbar, Dulce**, por el apoyo moral, su amistad y que gracias a todo eso lograron hacer que este recorrido fuera más agradable.

A mis amigos de dentro y fuera del CIAD, **Anna, Janeth, Parra, Chavira, Javier, Carla, Coco, Jorge, Jurado, Ana, Gerardo, Xochilt, AnaC, Lucía**, gracias por compartir su amistad y por todos esos momentos, risas y ocurrencias que lograron hacer que estos dos años se sintieran más ligeros.

Pero principalmente gracias a mi familia, a mi **tía Chuy** y a mis **hermanos**, gracias por escucharme y por hacerme reír con sus ocurrencias, que sin ustedes y su cariño me hubiera vuelto loca. A mis **padres**, por estar ahí siempre y cuando los necesitaba, por su apoyo incondicional y sus consejos porque sin ustedes no hubiera podido llegar hasta donde estoy.

Saben que soy una persona de pocas palabras, pero cuando les digo gracias se los digo en serio.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres por su amor, su gran apoyo y su comprensión.*

*A mis hermanos, por estar a mi lado siempre.*

*A toda mi familia.*

## CONTENIDO

Lista de figuras .....	ix
Lista de tablas .....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
ANTECEDENTES .....	1
El gen p53 .....	1
La proteína p53 .....	1
Estructura.....	2
Familia p53 .....	3
Funciones.....	4
Regulación del ciclo celular .....	5
La proteína p21 .....	5
La proteína Gadd45.....	5
Inducción a apoptosis.....	6
Vía intrínseca .....	6
Vía extrínseca .....	7
Regulación .....	8
La proteína p53 en invertebrados.....	9
Hipoxia.....	10
JUSTIFICACIÓN .....	12
HIPÓTESIS .....	13
OBJETIVOS .....	13
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos .....	13

## CONTENIDO (Continuación)

MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Evaluación de la expresión génica de p53 en tejidos .....	14
Análisis estadístico .....	15
Construcción del plásmido recombinante.....	15
Digestión con enzimas de restricción y ligación al vector pTXB1 .....	17
Transformación de células competentes .....	18
Selección de colonias mediante PCR .....	18
Secuenciación .....	18
Sobreexpresión y purificación de la proteína p53 .....	20
Prueba de solubilidad de p53 recombinante .....	21
Solubilidad de la proteína p53 sobreexpresada .....	21
Purificación y cuantificación de la proteína p53 recombinante.....	21
Producción de anticuerpos anti-p53.....	22
Dot blots.....	23
Detección de la proteína p53 en tejidos del camarón .....	24
Extractos nucleares y citoplasmáticos .....	24
Detección de la proteína p53 mediante Western blot .....	25
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	26
Evaluación de la expresión génica de p53 en tejidos .....	26
Clonación de p53 para sobreexpresión .....	29
Sobreexpresión y purificación de p53 recombinante.....	33
Producción de anticuerpos policlonales anti-p53 .....	38
Detección de p53 en tejidos .....	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	42
REFERENCIAS .....	43



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la estructura de la proteína p53 de humano .....	2
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de las proteínas de la familia de p53 .....	3
<b>Figura 3.</b> Expresión diferencial de <i>Lvp53</i> ente hepatopáncreas y branquias de camarones bajo condiciones normales .....	26
<b>Figura 4.</b> Expresión relativa de <i>Lvp53</i> en hepatopáncreas de camarones sometidos a condiciones de normoxia e hipoxia .....	27
<b>Figura 5.</b> Expresión relativa de <i>Lvp53</i> en branquias de camarones sometidos a condiciones de normoxia e hipoxia.....	28
<b>Figura 6.</b> Obtención por PCR y clonación de p53. ....	29
<b>Figura 7.</b> Análisis de las colonias obtenidas de la transformación con el plásmido recombinante .....	30
<b>Figura 8.</b> Secuencia nucleotídica y secuencia aminoacídica deducida de p53 obtenida en el laboratorio .....	31
<b>Figura 9.</b> Comparación de la secuencia nucleotídica de p53 obtenida con p53 reportada por Qian y cols. (2014) .....	32
<b>Figura 10.</b> Comparación de la secuencia aminoacídica de p53 de <i>L. vannamei</i> obtenida con p53 reportada por Qian y cols. (2014) y p53 de <i>M. japonicus</i> .....	33
<b>Figura 11.</b> Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de la prueba de sobreexpresión a diferentes tiempos con distintas concentraciones de IPTG....	34
<b>Figura 12.</b> Prueba de solubilidad de la proteína p53. Solubilización de p53 utilizando Tritón X 100.....	35
<b>Figura 13.</b> Evaluación de las fracciones obtenidas durante el procedimiento de solubilización de p53 de fusión utilizando urea 8M .....	36

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<b>Figura 14.</b> Inducción del corte mediado por inteína con DTT de las muestras que contenían la banda de interés. Las flechas rojas indican a p53 cortada.....	37
<b>Figura 15.</b> Purificación de p53 por cromatografía de afinidad .....	37
<b>Figura 16.</b> Evaluación del antisuero mediante Dot blots, probando 3 diluciones..	38
<b>Figura 17.</b> Extractos nucleares y citoplasmáticos .....	40
<b>Figura 18.</b> Western blot de los extractos nucleares y citoplasmáticos de hepatopáncreas y branquias.....	41

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencia nucleotídica de los iniciadores para amplificar p53 .....	15
<b>Tabla 2.</b> Secuencia nucleotídica de los iniciadores para amplificar la secuencia codificante completa de p53 .....	17
<b>Tabla 3.</b> Secuencia nucleotídica de los iniciadores empleados en la secuenciación de p53.....	19
<b>Tabla 4.</b> Protocolo de inmunización.....	23
<b>Tabla 5.</b> Estrategias para solubilizar p53.....	35

## RESUMEN

La proteína p53 es un factor de transcripción importante en la respuesta celular contra varios tipos de estrés como la hipoxia. En células de humano se demostró que la proteína p53 es inducida por la hipoxia. En humanos, p53 previene el desarrollo de tumores mediante dos mecanismos principales, el arresto del ciclo celular y la inducción a la muerte celular por apoptosis. Existe poca información sobre las características de p53 en organismos invertebrados. En el camarón blanco, está involucrada en mecanismos de respuesta contra el estrés oxidativo. Por ello, es necesario investigar posibles mecanismos moleculares mediados por p53 que le permiten al camarón sobrevivir a ambientes hipóxicos. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar los transcritos de p53 y detectar la presencia de la proteína en tejidos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sometidos a hipoxia. Se evaluó la expresión génica de p53 mediante RT-qPCR. También se clonó la secuencia codificante de p53 en el vector de sobreexpresión pTXB1 para la producción de anticuerpos policlonales anti-p53. Se encontró que p53 se expresa 4 veces más en branquias que en hepatopáncreas bajo condiciones normales. Los transcritos de p53 aumentaron 4.5 veces en branquias a las 3 horas y 2.3 veces a las 24 horas de hipoxia, mientras que en hepatopancreas no se detectaron cambios. La proteína p53 se detectó en extractos nucleares de branquias y hepatopáncreas durante condiciones de normoxia, mientras que en hipoxia, solo se detectó en los extractos nucleares. Estos resultados indican que la proteína p53 es inducida y activada por efecto del estrés por hipoxia en el camarón blanco.

**Palabras clave:** p53, hipoxia, *Litopenaeus vannamei*, expresión de genes, camarón blanco

## ABSTRACT

The p53 protein is an important transcription factor for the cellular response against various types of stresses, including hypoxia. Hypoxia induces p53 in human cells. The p53 protein prevents tumors development mainly by two mechanisms, cell cycle arrest or induction of cell death by apoptosis. Little is known about the characteristics of p53 protein in invertebrates. In the white shrimp, p53 is involved in the response against oxidative stress. Therefore, it is necessary to investigate whether or not a p53 mediated mechanisms contributes to the survival of shrimp in hypoxic environments. The aim of this study was to quantify the p53 transcripts and to detect the presence of the protein in white shrimp tissues under normoxic and hypoxic conditions. p53 gene expression was evaluated by RT-qPCR. In addition, the p53 coding sequence was cloned in the overexpression vector pTXB1 for the production of anti-p53 polyclonal antibodies. It was found that the expression of p53 transcripts in gills is 4 times higher than in hepatopancreas under normal conditions. Also, hypoxia caused a 4.5 fold increase in the transcripts after 3 hours and a 2.3 fold increase after 24 hours of exposure, while in hepatopancreas did not have an effect on p53 transcripts. p53 protein was detected in the nuclear extracts from gills and hepatopancreas under normoxic conditions, while in hypoxia, p53 was detected only in the nuclear extracts from gills and hepatopancreas. These results suggest that the p53 protein is induced and activated by hypoxia in the white shrimp.

**Key words:** p53, hypoxia, *Litopenaeus vannamei*

## ANTECEDENTES

### El gen p53

El gen *TP53* codifica para la proteína p53 y se le conoce como “el guardian del genoma” (Bai y Zhu, 2006). El gen *TP53* de humano se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1), es de 20 kb y está conformado por 11 exones que producen un RNA mensajero (mRNA) de 3 kb con un marco de lectura abierto (ORF) de 1179 pb y codifica una proteína de 53 kDa. (George, 2011; Naccarati y cols., 2012). *TP53* se encuentra en forma latente bajo condiciones normales, y no es hasta que se presenta algún tipo de estrés cuando ocurre su activación (George, 2011). En más del 50% de los cánceres en humanos la función de p53 está disminuida por mutaciones del gen (McLure y Lee, 1998). Estudios realizados en ratones, demostraron que las mutaciones o la pérdida completa del gen *TP53* predisponían al desarrollo espontáneo de varios tipos de tumores (Donehower y cols., 1992).

### La proteína p53

La proteína p53 se identificó por primera vez en 1979 como una proteína relacionada a la transformación celular que se acumulaba en el núcleo de células cancerosas y que se unía fuertemente al antígeno T del virus vacuolado del simio (SV-40) (Bai y Zhu, 2006). En un principio se creía que p53 tenía actividad oncogénica debido a que su sobreexpresión causaba la transformación de células. Sin embargo, estudios subsecuentes demostraron que la función normal de p53 era anti-oncogénica, ya que la introducción de p53 en células cancerosas causaba la supresión del crecimiento celular (Bensaad y cols., 2006).

La proteína p53 juega un papel importante en la respuesta celular a diversos tipos de estrés entre los que se encuentra el daño al DNA y la hipoxia (Bensaad y cols., 2006). Esta proteína previene el desarrollo de tumores por medio de distintos mecanismos

(Bourdon y cols., 2003). p53 es un factor de transcripción que se une a secuencias específicas de DNA e induce la activación de un gran número de genes con distintas funciones. Entre estas funciones se encuentran el arresto del ciclo celular y la muerte celular por medio de apoptosis (Green y Kroemer; 2009; Loughery y Meek, 2013).

### Estructura

La p53 es una fosfoproteína nuclear de 53 kDa formada por 393 aminoácidos que conforma tetrámeros en solución y tiene varios dominios estructurales y funcionales. En la estructura de p53 se distinguen tres partes, el dominio de transactivación N-terminal, el dominio nuclear o región central y el dominio de oligomerización C-terminal (Figura 1) (Bai y Zhu, 2006). El dominio central es el responsable de la unión específica de la proteína a la secuencia de DNA de los genes blanco. La mayoría de las mutaciones de la proteína se encuentran en el dominio central lo que ocasiona la pérdida de afinidad hacia el DNA. El dominio carboxilo terminal funciona como un sitio de regulación negativa de la proteína y está involucrado en la inducción a muerte celular (Ko y Prives, 1996; Okorokov y cols., 2005).



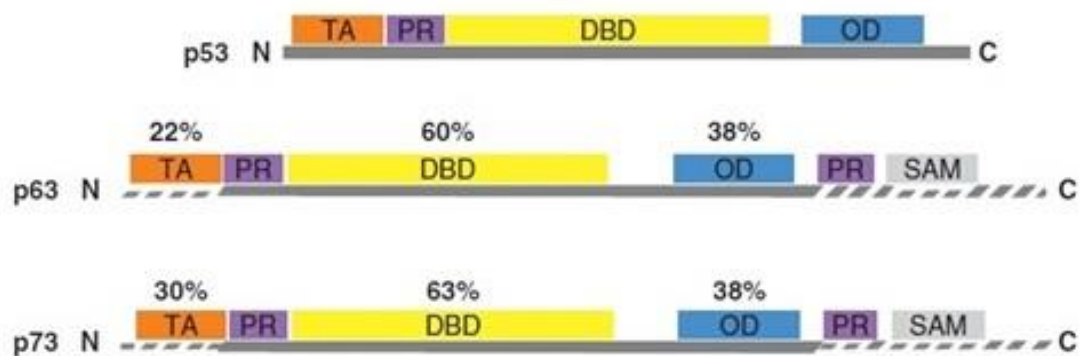
**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura de la proteína p53 de humano. Los números corresponden a los aminoácidos de la estructura primaria. Tomada de Bai y Zhu, (2006).

### Familia p53

En humano se han identificado dos proteínas pertenecientes a la familia p53 a las que se les denominó p63 y p73 (Marcel y cols., 2011). Los genes que codifican para este grupo de proteínas tienen dominios estructurales análogos y una alta homología en la secuencia de aminoácidos. Por eso, comparten similitudes estructurales, bioquímicas y

biológicas. La secuencia de aminoácidos que presenta mayor similitud es el dominio de unión al DNA. Este dominio es el más conservado, lo que sugiere que la regulación de la transcripción tiene un papel importante dentro de las funciones que son atribuidas a p53 (Wei y cols., 2011).

Las estructuras de los genes que codifican para p63 y p73 tienen mayor similitud entre ellas que con p53 (Figura 2), y realizan funciones similares a las de p53, como unirse a DNA, transactivar genes de respuesta de p53 e inducir apoptosis (Dötsch y cols., 2010). Una razón de la diversidad en las funciones de p53, p63 y p73 se encuentra en la estructura del gen. Los miembros de la familia de p53 y sus isoformas se pueden unir diferencialmente a diversos promotores (Irwin y Kaelin, 2001; Müller y cols., 2007).



**Figura 2.** Representación esquemática de las proteínas de la familia de p53. Donde, (TA) dominio N-terminal; (DBD) dominio de unión al DNA; (OD) dominio de oligomerización, (SAM) motivo alfa esteril; (PR) regiones ricas en prolina. Los porcentajes corresponden a la identidad de p63 o p73 con respecto a p53. Tomada de Dötsch y cols., (2010).

p63 y p73 juegan un papel importante en el desarrollo normal de la célula, y también están implicadas en la respuesta de la tumorigénesis en humanos debido a que activan la producción de proteínas que tienen funciones agonistas o antagonistas hacia p53 (Müller y cols., 2007). En estudios en ratones que carecían de p53, p63 y p73 se encontró que la expresión de p63 y p73 era más importante para el desarrollo del ratón que la expresión de p53. Además, la pérdida de p73 no predispuso al ratón a cáncer (Dötsch y cols., 2010).



## Funciones

La p53 actúa como un supresor tumoral, por lo que es esencial en el mantenimiento de la estabilidad celular (Bai y Zhu, 2006). Además, inhibe la proliferación de células anormales que fueron sometidas a algún tipo de estrés oncogénico para así detener el desarrollo de tumores (Bourdon y cols., 2003). p53 regula el destino de las células en respuesta a una gran variedad de señales, que incluyen el daño al DNA, el choque térmico, la hipoxia y la sobreexpresión oncogénica (Girardini y cols., 2014). Una vez que se activa p53 se presentan diversas respuestas biológicas que ocurren a nivel celular, p53 tiene la capacidad de activar o suprimir la expresión de genes involucrados en distintas vías de respuesta mediante su unión a sitios específicos reguladores de los genes de respuesta (Bai y Zhu, 2006).

Se han reportado una gran cantidad de genes involucrados en el arresto del ciclo celular así como en la reparación del daño al DNA y la inducción a apoptosis. Estos genes presentan diversas funciones y son efectores de varias vías de señalización (Espinosa y cols., 2003). Entre ellos se encuentran p21 y Gadd45 (Growth arrest and DNA damage), encargados del arresto del crecimiento celular, y genes de la familia Bcl-2 involucrados en la vía de la apoptosis (Bai y Zhu, 2006; Chung y cols., 2014). Se ha reportado que p53 pudiera estar asociada a la reparación del daño al DNA por medio de la reparación por escisión de bases (BER por sus siglas en inglés) (Souza-Pinto y cols., 2004). En dicho estudio, se encontró que en ratones que carecían de p53 estaba disminuida la actividad de la enzima  $\gamma$  polimerasa, encargada de agregar nucleótidos.

### **Regulación del ciclo celular**

El arresto del ciclo celular es una de las principales respuestas inducidas por p53 (Bai y Zhu, 2006). En esta etapa se asegura que el ciclo celular pueda concluirse correctamente. En caso de presentarse daño al DNA, la regulación en los puntos de revisión del ciclo celular evita el paso a la siguiente fase permitiendo que el daño causado sea reparado. La p53 puede causar el arresto del ciclo celular en la fase G1, G2 o S. Se considera que el arresto en la fase G1 previene la replicación de DNA dañado, mientras que en la fase G2 evita la segregación de cromosomas dañados (Senturk y Manfredi, 2013).

La proteína p21. Dentro de los efectores inducidos por p53, la proteína p21 es uno de los más importantes (Bai y Zhu, 2006). La p21 actúa como un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CDK) evitando que los complejos CDK-ciclina, fosforilen proteínas que están involucradas en la transición de la fase G a la fase S causando el arresto del ciclo. Sin embargo, la regulación del ciclo puede ocurrir de manera independiente de las ciclinas y del CDK (Cazzalini y cols., 2010; Senturk y Manfredi, 2013). La p21 tiene alta afinidad por el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), uniéndose para evitar la interacción de entre el PCNA con la  $\gamma$  polimerasa y con otras proteínas involucradas en la fase de elongación, inhibiendo directamente la replicación del DNA (Abbas y Dutta, 2009; Senturk y Manfredi, 2013).

La importancia de p21 dependiente de p53 en el arresto del ciclo celular se demostró por Waldman y cols. (1995), en donde se evaluaron células de cáncer de colon a las que se eliminó el gen que codifica para la proteína p21. En las células que carecían de p21, el punto de revisión en G1 no fué interrumpido. Aunque inicialmente se pensó que la proteína p21 estaba involucrada solamente en el punto de revisión en G1, se demostró que juega un papel importante en la fase G2. Sin embargo, la demora de la fase G2 no es tan eficiente como la de la fase G1, ya que ésta se pierde a través del tiempo lo que ocasiona que las células entren a mitosis sin reparar el daño causado al DNA (Senturk y Manfredi, 2013).

La proteína Gadd45. Otro de los efectores que son inducidos por p53 en respuesta al daño al DNA es la proteína Gadd45. En estudios realizados en células de ratón, se demostró que la eliminación del gen que codifica a Gadd45 ocasiona cambios celulares, mismos que fueron observados en células deficientes de p53 (Hollander y cols., 1999). Gadd45 pertenece a una familia de tres genes denominados *Gadd45a*, *Gadd45b* y *Gadd45g*. La proteína codificada por el gen *Gadd45a* es el único miembro de la familia que es activado por p53 (Liebermann y Hoffman, 2008). El aumento en la expresión de Gadd45 participa en la retraso de la fase G2 del ciclo celular, y fue demostrado por Wei y cols. (1999) en donde células que carecían del gen p53 en comparación con células que si presentaban p53, no tuvieron arresto en la fase G2 por efecto de Gadd45.

Gadd45a puede estar asociada a diferentes proteínas como el PCNA y p21, proteínas importantes en la regulación de la replicación del ADN y el crecimiento celular (Sheikh y cols., 2000; Moskalev y cols., 2012). La inhibición de la fase G2 ocurre por medio de la interacción de Gadd45 con el complejo CDK1/Ciclina B1. Este complejo controla el paso de la fase G2 a la fase de mitosis. Gadd45 actúa asociándose a CDK1 lo que causa la disociación e inhibición del complejo (Moskalev y cols., 2012). Gadd45 también participa en la reparación del daño al DNA por medio de la interacción con PCNA que está involucrado en la vía de la reparación del genoma (Global Genome Repair), que forma parte de la reparación por escisión de nucleótidos (NER). Además, la interacción de Gadd45 con p21 induce el arresto del ciclo celular en la fase G1 (Sheikh y cols., 2000).

### **Inducción a apoptosis**

La p53 puede inducir el arresto del ciclo celular o la muerte, dependiendo del tipo y de la severidad del daño causado al DNA. Si este daño es muy severo y no puede ser reparado por los mecanismos empleados en el arresto del ciclo celular, se induce la muerte celular por medio de apoptosis (Chen y cols., 2013). La apoptosis mediada por p53 es un mecanismo importante ya que inhibe la progresión tumoral (Ko y Prives, 1996; Bai y Zhu, 2006), por un proceso complejo mediado por eventos moleculares como la activación de genes pro-apoptóticos, entre los que se encuentran Bax (Proteína Bcl-2 asociada a X), Puma (Modulador de apoptosis inducido por p53), Noxa, p53AIP (Proteína inductora de apoptosis 1 regulada por p53), entre otros (Sun y cols., 2006). La apoptosis puede ocurrir por medio de dos vías, la intrínseca o la extrínseca, las cuales son altamente reguladas (Fridman y Lowe, 2003). Los productos de los genes que son activados por p53 pueden inducir apoptosis por cualquiera de estas dos vías (Bai y Zhu, 2006).

Vía intrínseca. La vía intrínseca, también llamada “vía mitocondrial”, está asociada con la liberación del citocromo c y otras proteínas del espacio intermembranal. Estas proteínas son liberadas hacia el citoplasma en respuesta a la activación de moléculas proapoptóticas (Schuler y cols., 2000; Haupt y cols., 2003; Maximov y Maximov, 2008). Las proteínas Bcl-2 son los principales miembros que participan en este tipo de vía y son reguladoras de la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Maximov y Maximov, 2008). La familia de las Bcl-2 se divide generalmente en dos grupos, el de las proteínas pro-

apoptóticas y el de las proteínas anti-apoptóticas. Dentro de estos grupos las proteínas pueden ser clasificadas en base a la similitud de la estructura con los dominios homólogos de Bcl-2 y su dominio transmembrana. Se pueden encontrar tres clases de proteínas de la familia Bcl-2, proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-XL; proteínas pro-apoptóticas, como Bax y Bak antagonistas de funciones anti-apoptóticas; y la proteína Bh-3 como PUMA (Modulador de apoptosis inducido por p53, por sus siglas en inglés) y Noxa (Burns y El-Deiry, 1999; Bai y Zhu, 2006).

La activación de los genes pro-apoptóticos causa la liberación del citocromo c, que se une al factor apoptótico activador de proteasa 1 (Apaf-1), lo que ocasiona la formación del complejo del proteosoma. Este complejo activa a la caspasa 9 que a su vez induce la acción de las caspasas 3, 6 y 7 lo que lleva a la muerte celular por apoptosis (Burns y El-Deiry, 1999; Haupt y cols., 2003). p53 induce la liberación del citocromo c por medio de una vía que involucra a Bax que fue el primer miembro de la familia Bcl-2 que se demostró que era activado por p53 (Bai y Zhu, 2006). p53 también induce la expresión de Apaf-1 por medio de interacciones con el promotor en el gen *Apaf-1*. Soengas y cols. (1999), demostraron en células murinas, que la muerte celular por apoptosis requiere de la presencia de p53 así como de Apaf-1 y la caspasa 9. La proteína PUMA es otro miembro importante de la familia Bcl-2, en respuesta al daño al DNA esta proteína es transactivada por p53. La proteína PUMA actúa como molécula de transporte de señales de muerte a la mitocondria induciendo alteraciones en este organelo y activando las caspasas lo que llevará a la muerte celular (Nakano y Vousden, 2001; Yu y Zhang, 2009).

Vía extrínseca. La apoptosis por medio de la vía extrínseca, ocurre con la unión de moléculas a receptores específicos situados en la membrana celular (Patiño, 2009). Esta vía se caracteriza por la expresión de receptores de membrana, sus contrapartes inhibitorias, y además sus proteínas citoplasmáticas asociadas (Fridman y Lowe, 2003). La vía extrínseca de apoptosis se inicia con la expresión de receptores que pertenecen a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF-R) incluyendo TNF $\alpha$ , el ligando Fas (También llamado CD95 o APO1) y el ligando APO2 que activa los receptores de la familia TNF/GNF. Fas se une a la proteína FADD (Dominio de muerte asociado a FAS) lo que forma el complejo de señales de inducción a apoptosis (DISC) y esto lleva a la activación

de caspasas que finalmente inducen la muerte celular (Haupt y cols., 2003). p53 puede promover la vía extrínseca por medio de la inducción de genes que codifican a proteínas transmembranales como Fas, DR4, DR5 o evitando la inhibición en la producción de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) (Haupt y cols., 2003; Bai y Zhu, 2006).

### Regulación

La p53 se mantiene en muy bajas concentraciones en condiciones normales en la célula y en forma latente inactiva. Estas bajas concentraciones de p53 en el citoplasma se mantienen así mediante su rápida degradación (Liang y Clarke, 2001). Durante la progresión del ciclo celular los bajos niveles de p53 deben de ser controlados de forma precisa. La p53 tiene una vida media corta que puede durar solo minutos. Sin embargo, en caso de presentarse algún tipo de estrés, la vida media de la proteína puede alargarse hasta varias horas, incrementándose así los niveles presentes en la célula (Bai y Zhu, 2006).

La p53 puede activarse en respuesta a un gran número de señales. En estos casos, las proteínas involucradas en la detección y la reparación del daño al DNA contienen enzimas que comunican a p53 que existe un daño. La exposición de la proteína a este tipo de señales puede causar un incremento marcado en su concentración. La activación puede ocurrir mediante dos maneras: 1) por medio de modificaciones pre-traduccionales que causan un incremento en la síntesis de la proteína además de evitar su degradación y 2) por medio de modificaciones post-traduccionales que resultan en la fosforilación, acetilación, metilación, y mono-ubiquitinación de p53, lo que lleva a su estabilización y acumulación (Oren, 1999; Harris y Levine, 2005).

La activación de p53 puede regularse en tres niveles. Primero, ocasionando un incremento en la concentración de la proteína mediante el aumento de la transcripción o alargando su vida media. Segundo, por medio de la transformación de la proteína a su conformación activa. Tercero, por la translocación de p53 del citoplasma hacia el núcleo (Brooks y Gu, 2010). La importación o retención de p53 en el núcleo es esencial para su funcionamiento normal en la inhibición del ciclo celular o en la inducción a apoptosis. Es por ello, que es necesaria la participación de mecanismos que regulen el transporte hacia el núcleo o citoplasma, ya sea aumentando la importación hacia el núcleo o disminuyendo

su exportación (Liang y Clarke, 2001). En estudios realizados en células de cáncer de mama, se observó que p53 se encontraba acumulada en el citoplasma y esto inactivaba su actividad tumoral, ya que se evitaba el transporte de la proteína hacia el núcleo donde se encuentra su sitio de acción (Moll y cols. 1992).

La regulación de los niveles de p53 involucra un gran número de proteínas. Dentro de las más importantes está la proteína Mdm-2, que es el producto de un oncogén cuya actividad en exceso ha demostrado facilitar la actividad de varios tipos de cáncer. La Mdm-2 puede unirse a p53 e inactivarla por medio de la unión a su dominio de transactivación en el extremo N-terminal, interfiriendo con el reclutamiento de moléculas necesarias para su función asociada a la transcripción basal (Bai y Zhu, 2006). La Mdm-2 promueve la degradación de p53 mediante el sistema ubiquitina-proteosoma en donde interactúa con p53 en el núcleo y la transporta hacia el citoplasma donde se induce su degradación. Niveles elevados de Mdm-2 resultan en una degradación rápida que es dependiente de la habilidad de las dos proteínas de unirse de manera directa. La degradación de p53 mediada por Mdm-2 ocurre cuando la actividad proteolítica del proteosoma es bloqueada por ciertos inhibidores, resultando en un aumento de Mdm-2, lo que causa la acumulación de la forma ubiquitinada de p53 (Oren, 1999; Liang y Clarke, 2001).

#### La proteína p53 en invertebrados

Existen muchos estudios de la proteína p53 en mamíferos, sin embargo, poco se sabe sobre las características de p53 en invertebrados. Entre los pocos estudios reportados está la identificación y caracterización de un homólogo de p53 en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En ese estudio, se encontró que este gen de p53 presenta homología con *TP53* de humano con similitudes en la secuencia del sitio de unión al DNA y en el de reconocimiento y unión del sitio de activación de la transcripción (Jin y cols., 2000). También, Sogame y cols. (2003) reportó que p53 es necesaria para la inducción de la muerte celular por medio de apoptosis pero no era indispensable en el arresto del ciclo celular en *D. melanogaster*, en contraste con su función en mamíferos.

También, recientemente se reportó la secuencia completa del DNA complementario (cDNA) de p53 (*LvP53*) en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Qian y cols., 2014) y además, se evaluó la posible relación entre p53 y las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa de manganeso (SOD) y glutatión peroxidasa (GluPer); estas enzimas son importantes en la eliminación de estrés oxidativo en el camarón blanco y son inducidas por la proteína p53 en humanos (Tan y cols., 1999). En dicho estudio, el silenciamiento de *LvP53* por medio de RNA de interferencia (RNAi) en condiciones normales, mostró en que las concentraciones de las enzimas SOD y GluPer en hepatopáncreas disminuyeron (Qian y cols., 2014), demostrando que de alguna forma, p53 participa en la regulación de estas enzimas antioxidantes.

### Hipoxia

Las bajas concentraciones de oxígeno disuelto (DO) ocurren en una gran variedad de sistemas acuáticos. Estos episodios varían en frecuencia temporal y en persistencia y son también ocasionados por actividades antropogénicas. El oxígeno es necesario para mantener la vida en peces e invertebrados que dependen de su respiración aeróbica (Richards y cols., 2009). Cuando el suministro de oxígeno disminuye o el consumo por los organismos presentes en ese medio aumenta considerablemente, la concentración del oxígeno disuelto puede bajar por debajo de los niveles requeridos por la mayoría de los organismos. Esta condición se conoce como hipoxia. En los ambientes acuáticos se considera como hipoxia niveles de DO menores a 2 mg/L (Vaquer-Sunyer y Duarte, 2008).

La disminución de oxígeno disuelto en el agua afecta al camarón ocasionando alteraciones en su desarrollo y reproducción, además de disminuir su respuesta inmune haciéndolo más susceptible a enfermedades (Mugnier y cols., 2008). Se sabe que algunos crustáceos tienen la capacidad de resistir periodos cortos de hipoxia. Además, estos organismos presentan diferentes mecanismos de evasión a estas condiciones. La primer línea de defensa es la de evitar los ambientes hipóxicos. Un gran número de organismos acuáticos pueden detectar bajas concentraciones de oxígeno y migrar hacia ambientes donde los niveles sean óptimos. Otro de los mecanismos empleados es el de la

disminución en la actividad para conservar energía y mantener reducida la demanda de oxígeno. Si la exposición a hipoxia es demasiado prolongada y el organismo es incapaz de llevar a cabo dichos mecanismos, ocurre el cambio de metabolismo aeróbico a anaeróbico, siendo este último el mecanismo más drástico y causando una reducción en el crecimiento (Wu, 2002; Richards y cols., 2009).



## JUSTIFICACIÓN

El rápido crecimiento de las células cancerosas genera microambientes hipóxicos. Estas células, en respuesta a condiciones de hipoxia, producen proteínas importantes para favorecer la supervivencia celular. Entre estas proteínas se encuentra el supresor tumoral p53, que es activado para suspender la progresión de células malignas (Lee y cols., 2012). Hace varias décadas que en células de humanos sometidas a hipoxia aumenta el nivel de la proteína p53 (Graeber y cols., 1994) y desde entonces se han realizados muchos estudios en vertebrados que describen la función clave de p53 en la regulación de diversos tipos de estrés, incluyendo la hipoxia. Sin embargo, los estudios de p53 en invertebrados son aún muy escasos. En particular, muy recientemente Qian et al., (2014) demostraron la presencia de p53 en el camarón, pero queda mucho por investigar para entender su probable función en las adaptaciones o modulaciones particulares que contribuyan a la supervivencia de los camarones en condiciones de hipoxia, que otros organismos no son capaces de tolerar. Por lo anterior, este trabajo se enfoca en investigar la expresión génica de p53 así como la presencia de la proteína en hepatopáncreas y branquias de camarones sometidos a condiciones de normoxia e hipoxia.

## HIPÓTESIS

La hipoxia ocasiona un aumento en la expresión génica y proteica de p53 en tejidos del camarón blanco *L. vannamei*

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Cuantificar los transcritos de p53 y detectar la presencia de su proteína en tejidos del camarón blanco *L. vannamei* sometidos a hipoxia

### Objetivos específicos

- a) Evaluar el efecto de la hipoxia en la expresión relativa del gen de p53 en hepatopáncreas y branquias de camarón mediante RT-qPCR.
- b) Clonar el DNA codificante de p53 de camarón en el vector de sobreexpresión pTXB1.
- c) Sobreexpresar p53 en *Escherichia coli* y purificar la proteína por medio de cromatografía de afinidad a quitina.
- d) Producir anticuerpos policlonales contra p53 recombinante.
- e) Evaluar mediante Western blot la presencia de p53 en hepatopáncreas y branquias de camarones sometidos a hipoxia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Evaluación de la expresión génica de p53 en tejidos

Se evaluó la expresión relativa del gen de p53 en hepatopáncreas y branquias de camarón mediante RT-qPCR. Para el análisis se empleó cDNA obtenido y proporcionado del trabajo doctoral de José Alfredo Martínez Quintana, en donde se realizó un bioensayo de hipoxia sometiendo a los camarones a  $1.45 \pm 0.2$  mg de OD L<sup>-1</sup> durante 3, 24 y 48 horas. De cada tiempo se obtuvieron 5 camarones usando como control condiciones de normoxia de  $5.3 \pm 0.3$  mg de DO L<sup>-1</sup> (Martínez-Quintana y cols., 2014).

Para la evaluación de la expresión de p53 se realizó una curva estándar utilizando diluciones seriadas (1:5) de cDNA de hepatopáncreas bajo condiciones de normoxia de 50 a  $1.6 \times 10^{-2}$  ng de RNA. Se realizó qPCR utilizando como templado el cDNA en un termociclador de tiempo real (CFX96 Touch™, Bio-Rad) utilizando los oligonucleótidos: p53F3 y p53F4rv (Tabla 1). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes, 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 35 segundos a 55 °C y 55 segundos a 72 °C, por último 1 minuto a 95 °C y con una curva de disociación de 60 °C a 94.5°C con un incremento de 0.5 °C/5 seg. La mezcla de reacción fue de 20 µL utilizando 1 µL de cDNA proveniente de 25 ng de RNA total libre de gDNA (DNA genómico), 0.7 µL de iniciador sentido p53F3 (5 µM), 0.7 µL del iniciador antisentido p53F4rv (5 µM), 10 µL de PCR iQ SYBR® Green Supermix 2X (Bio-Rad) y 7.6 µL de agua libre de nucleasas. La expresión de p53 se normalizó utilizando el gen constitutivo de la proteína ribosomal L8 (*RPL8*). La expresión relativa de p53 se reportó por el método  $2^{-\Delta Cq}$  (Schmittgen y Livak; 2008).

**Tabla 1.** Secuencia nucleotídica de los iniciadores empleados en la qPCR de p53

<b>Iniciador</b>	<b>T<sub>m</sub> °C</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
p53F3	57.5	CCAAGCAGCAATGTGTCAG
p53F4rv	56.4	CTTGTTGCGATCTTTGTTGC

### **Análisis estadístico**

Se realizó un diseño experimental completamente al azar, el cual constó de tres tratamientos con cinco repeticiones cada uno. El análisis de los datos se hizo mediante pruebas de t para dos muestras, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  y comparando cada tratamiento con su control. Se utilizó el paquete estadístico NCSS 2007 para el análisis de los datos.

### **Construcción del plásmido recombinante**

Para la producción de p53 recombinante de camarón se utilizó la sobreexpresión en *E. coli* por ser de los sistemas más sencillos disponibles actualmente. Para lo anterior, se usó el vector pTXB1 del sistema IMPACT (New England BioLabs) en donde primeramente se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la región codificante completa de p53 y a los cuales se les agregaron bases nucleotídicas para generar sitios de restricción adecuados para la posterior ligación de la secuencia codificante de p53 en el vector pTXB1.

La amplificación del fragmento codificante de p53 se realizó por PCR convencional utilizando DNAp (DNA plasmídico) obtenido durante el trabajo doctoral de Monserrath Félix Portillo (datos no publicados) en el mismo grupo de investigación. La reacción se llevó a cabo en un termociclador DNA Engine Dyad™ (PTC- 200, BIORAD, USA) empleando los oligonucleótidos p53F6 y p53F11Rv específicos para p53 (Tabla 2). Las condiciones de amplificación fueron: 3 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 54 °C y 1.5 minutos a 72 °C, y finalmente 10 minutos a 72 °C. La mezcla de reacción utilizada para la amplificación de p53 fue de 25 µL utilizando 1 µL de DNAp (521.75 ng/µL) como templado, 1 µL del iniciador sentido p53F6 (2.5 µM), 1 µL

del iniciador antisentido p53F11Rv (2.5  $\mu$ M), 12.5  $\mu$ L de PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific) y 9.5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con GelRed™ (Biotium), y posteriormente se purificaron mediante la técnica de precipitación de ácidos nucleicos con etanol (Sambrook y Russell, 2001). Brevemente, a cada volumen a purificar se le agregó un volumen de fenol (pH 7.9) y se mezcló y centrifugó brevemente a temperatura ambiente para separar las fases. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo y se agregó un volumen igual al inicial de cloroformo. Se mezcló (vortex (Maxi Mix II, Thermolyne)) por 15 segundos y se centrifugó (Centrifuga 5415D™, Eppendorf) a temperatura ambiente.

La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó dos volúmenes de etanol absoluto frío y 10% del volumen inicial de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y se incubó durante 1 hora a -80 °C en un ultracongelador. Posteriormente, se mezcló (vortex) por 15 segundos y se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y se lavó el pellet con 100  $\mu$ L de etanol al 80% frío y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos descartándose el sobrenadante. El botón se secó al vacío en SpeedVac (DNA 110 Speed Vac, SAVANT) y se resuspendió con 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Finalmente, se cuantificó por absorbancia a 260 nm en Nanodrop ND1000™ (Thermo Scientific).

Se realizó una reamplificación del ADN purificado empleando los oligonucleótidos p53cNdeIF y p53cSapIR que contienen los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *SapI* (Tabla 2). Las condiciones de PCR fueron: 3 minutos a 95 °C, 3 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 40 segundos a 63 °C y 1.5 minutos a 72 °C, seguido de 27 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 40 segundos a 68 °C y 1.5 minutos a 72 °C y 10 minutos a 72 °C. La mezcla de reacción fue la misma descrita anteriormente. Después de la amplificación se analizaron los productos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con GelRed y se purificaron siguiendo el protocolo de precipitación de ácidos nucleicos con etanol.

**Tabla 2.** Secuencia nucleotídica de los iniciadores para amplificar la secuencia codificante completa de p53

Iniciador	T <sub>m</sub> °C	Secuencia 5'-3'
p53F6	55.6	ATGCAGCGGTCGGAC
p53F11Rv	50.5	TTAGTTACTCTCCTCTTCAGG
p53cNdeIF	67.7	GGTGGT <u>CATATG</u> CAGCGGTCGGACTCCGAG
p53cSapIR	65.3	GGTGGT <u>TGCTCTTCCG</u> CAGTTACTCTCCTCTTC

\*Las bases subrayadas corresponden a los sitios de restricción de las enzimas *NdeI* y *SapI* respectivamente

### Digestión con enzimas de restricción y ligación al vector pTXB1

Con el DNA purificado se llevó a cabo la doble digestión usando las enzimas de restricción *SapI* y *NdeI* (Fermentas). El proceso de digestión se realizó en dos etapas secuenciales. Para la digestión del plásmido, se mezclaron 6 µL de pTXB1 (5 µg), 10 µL de buffer Tango 10X, 3 µL de la enzima *NdeI* (30 U) y 30.9 µL de agua libre de nucleasas, llevando a un volumen final de 50 µL. La mezcla de reacción se incubó en baño de agua a 37 °C durante 2 h, siguiendo las especificaciones del proveedor. El producto de la digestión se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

Una vez que se verificó que la reacción fuera correcta, se procedió a la digestión con la segunda enzima en donde se añadieron 6 µL (30 U) de *SapI* a la reacción y se siguió el procedimiento anteriormente descrito. Para la digestión de los productos de PCR se llevó a cabo el procedimiento descrito anteriormente, solo variaron las cantidades de las enzimas de restricción; de la enzima *NdeI* se agregaron 2 µL (20 U) y de *SapI* 4 µL (20 U). Finalmente, los productos de las digestiones se purificaron por precipitación con etanol como antes se describió y fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con GelRed y cuantificados en NanoDrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

La ligación se realizó mezclando el vector y el producto de PCR de p53 digeridos con las enzimas de restricción antes descritas. Se utilizaron 2 µL (115 ng/µL) del vector de sobreexpresión pTXB1, 3 µL de p53 (≈83 ng/µL), 5 µL de buffer 2X, 1 µL de ADN

ligasa T4 (Promega) y 1.5  $\mu\text{L}$  de agua para un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción se incubó a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante dos días. Posteriormente se llevó a cabo la transformación de las células competentes.

### **Transformación de células competentes**

La transformación de las células de *E. coli* Top 10 competentes se realizó mediante choque térmico siguiendo las indicaciones del kit pGEM®-T Easy Vector Systems (PROMEGA). Se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de la reacción de ligación a un tubo con 25  $\mu\text{L}$  de células químicamente competentes, se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 20 min. Después de la incubación se hizo el choque térmico en baño de agua a 42  $^{\circ}\text{C}$  por 45 seg. Inmediatamente se colocó el tubo en hielo y se incubó durante 5 min. Transcurrido el tiempo se le agregó 150  $\mu\text{L}$  de medio S.O.C. y se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  agitando a 200 rpm durante 1.5 h. El cultivo transformante se sembró por triplicado adicionando 100, 50 y 25  $\mu\text{L}$  en placas con agar LB conteniendo ampicilina (125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

### **Selección de colonias mediante PCR**

Las colonias recombinantes potenciales se analizaron mediante PCR convencional. Las colonias se resuspendieron en 50  $\mu\text{L}$  de agua estéril y fueron empleadas como templado usando 1  $\mu\text{L}$  para la reacción de PCR. Se utilizaron los iniciadores p53F6 y p53F11R (Tabla 2). Las condiciones de la PCR fueron las descritas anteriormente (primera amplificación). Los productos de las reacciones de PCR se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñido con GelRed.

### **Secuenciación**

Para determinar la secuencia nucleotídica se obtuvo el DNAP recombinante de la colonia que resultó positiva mediante la técnica de “mini preps”. Primero, se inocularon 5 mL de medio LB conteniendo ampicilina a una concentración de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con una colonia y se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  agitando a 200 rpm por lo menos 18 h. Se transfirieron 1.5

mL del cultivo a un microtubo y se centrifugó durante 15 minutos a 11,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 250  $\mu$ L de la solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM). Se agregaron 250  $\mu$ L de solución II (SDS 1%, NaOH 0.2 N) y se dejó reposar de 4-10 min, hasta que la solución fuera transparente. Se agregaron 250  $\mu$ L de la solución III fría (acetato de sodio 3 M, pH 5.2) y se incubó en hielo de 10 a 15 min. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 min a 11,000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se agregaron 700  $\mu$ L de isopropanol a temperatura ambiente. Se centrifugó por 30 min a 11,000 rpm, se removió el sobrenadante y se lavó el botón con 300  $\mu$ L de etanol al 70% frío. Se centrifugó por 2 min y se descartó el etanol teniendo cuidado de no perder la pastilla. Se repitió el lavado con etanol al 70% y el botón se secó con vacío, utilizando SpeedVac. El botón se resuspendió en 50  $\mu$ L de buffer TE (Tris 10 mM,-EDTA 1 mM) con RNasa (1  $\mu$ g/mL).

El DNAp obtenido se secuenció por medio de la técnica de dideoxinucleotidos (Sanger et al., 1977) en el Laboratory of Genomic Analysis and Technology Core de la Universidad de Arizona, Tucson, Arizona, USA, empleando diferentes iniciadores (Tabla 3). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante un BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y comparadas con la información contenida en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

**Tabla 3.** Secuencia nucleotídica de los iniciadores empleados en la secuenciación de p53

<b>Iniciador</b>	<b>Tm °C</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
p53F6	55.6	ATGCAGCGGTCCGGAC
p53F11rv	50.5	TTAGTTACTCTCCTCTTC
p53F4	56.4	GCAACAAAGATCGCAACAAG
p53F4R	56.4	CTTGTTGCGATCTTTGTTGC
Mx Intein 11R	59.3	GATTGCCATGCCGGTCAAGG
T7	47.5	TAATACGACTCACTATAGGG



## Sobreexpresión y purificación de la proteína p53

Obtenida y analizada la secuencia, se realizó la transformación del plásmido recombinante en células químicamente competentes de *E. coli* ER2566 mediante la técnica de transformación anteriormente descrita. Para la sobreexpresión y purificación de la proteína p53 recombinante se empleó el sistema comercial IMPACT Kit® (New England BioLabs). Para la sobreexpresión de p53 se utilizaron las células de *E. coli* ER2566. El cultivo celular se preparó de la siguiente manera: se inocularon 5 mL de medio LB conteniendo ampicilina a una concentración de 125 µg/mL con una colonia recién crecida. Se incubó a 37 °C a 200 rpm de 12-16 h. Transcurrido el tiempo se inocularon 25 mL de medio LB con ampicilina con la 1/40 parte del volumen del cultivo a inocular (625 µL) y se incubó a 37 °C agitando a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) de 0.6.

Después, se inocularon 500 mL de medio LB con ampicilina utilizando la 1/40 parte del volumen del cultivo a inocular (12.5 mL) con el cultivo celular. Se monitoreó hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de aprox 0.6, y una vez que se alcanzó, se le agregó al medio el inductor IPTG (isopropil-B-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración de 0.4 mM y se incubó a 37 °C durante 4 h. Finalmente, se centrifugó el cultivo durante 15 min a 15,000xg a 4 °C y el botón celular se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis.

Inicialmente se evaluaron diferentes tiempos y concentraciones de IPTG para la sobreexpresión. Se probó inducir a las 2, 4 y 6 horas de incubación a 37 °C después de agregar 0.1, 0.2 y 0.4 mM de IPTG. Para el análisis se tomaron alícuotas de 120 µL del cultivo a los diferentes tiempos y concentraciones evaluadas y se centrifugaron durante 15 minutos a 15,000xg y 4°C para coleccionar las bacterias. El botón resultante se resuspendió en buffer carga 2X (Tris HCl 100 mM, pH 6.8, SDS 4%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 200 mM) y se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras SDS-PAGE (Laemmli; 1970) en gel de poliacrilamida al 10% teñidos con Coomassie coloidal (sulfato de amonio 10%, Coomassie G-250 0.1%, ácido orto-fosfórico 3%, etanol 20%, agua) toda la noche, finalmente se destiñó

sumergiendo el gel en agua y dejando en agitación hasta que desapareciera el fondo azul del gel (Kang y cols., 2002).

### **Prueba de solubilidad de p53 recombinante**

Una vez verificada la sobreexpresión, se hizo un cultivo de 100 mL para evaluar la solubilidad de la proteína sobreexpresada. El botón de células colectado del cultivo de 100 mL se resuspendió en 15 mL de buffer lisis (Tris-HCl pH, 8.5 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, PMSF 20  $\mu$ M) frío. Las células se lisaron mediante sonicación (Sonifier™ S-450<sup>a</sup>, Branson); las condiciones de la sonicación fueron 50 de voltaje, y 40 segundos en ciclos de 10 segundos de sonicación (4 pulsos) y 10 segundos de descanso. Después, el lisado (fracción completa) se centrifugó durante 30 minutos a 15,000xg a 4 °C (Avanti™ J26-XPi, Beckman Coulter). Se evaluaron las fracciones completa, soluble e insoluble mediante electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10% Teñidos con Coomassie coloidal.

### **Solubilización de la proteína p53 sobreexpresada**

En las condiciones anteriormente descritas, la p53 sobreexpresada se mantenía en la fracción proteica insoluble, dificultando su manejo posterior. La solubilización de p53 se logró mediante una incubación previa a la sonicación. El botón celular previamente colectado se resuspendió con buffer lisis más 0.5 % de Tritón X-100 y se incubó durante 2 horas en hielo y sin agitación. Posteriormente, se realizó la sonicación como se describió anteriormente y se centrifugó a 15,000xg durante 30 min a 4 °C, se separó la fracción soluble, se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE en gel al 10% y se tiñó con Coomassie coloidal.

### **Purificación y cuantificación de p53 recombinante**

La proteína se purificó por cromatografía de afinidad por unión a quitina siguiendo las especificaciones del IMPACT Kit ®. Primero, se empacó una columna con la matriz conteniendo quitina inmovilizada con un volumen de 5 mL. La columna se lavó con 10 volúmenes de buffer columna (Tris-HCl 20 mM pH, 8.5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM) frío a un flujo de 1 mL/min. Después, se aplicó a la columna la fracción soluble con un

flujo de 0.5-1 mL/min. Posteriormente se lavó la columna con 20 volúmenes del buffer columna con un flujo de 2 mL/min y se eluyó la proteína con 3 volúmenes (15 mL) del buffer de corte (Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, NaCl 500 mM, DTT 100 mM, EDTA 1 mM) a una velocidad de 1 mL/min. La columna se incubó durante 40 h a 21 °C. Finalmente, se procedió a la elución de la proteína colectando las 15 primeras fracciones de 1 mL. Las fracciones fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE al 10% y teñidas con Coomassie coloidal.

Una vez purificada la proteína, se cuantificó por el método de Bradford (1976). Se realizó una curva estándar empleando diluciones seriadas de BSA (albúmina de suero bovino) con una concentración inicial de 100 µg/mL (100, 50, 25, 5, 0 µg/mL). Para la cuantificación se hizo un microensayo, en donde se mezclaron partes iguales (1:1) del reactivo de Bradford (azul de Coomassie G-250 0.01%, etanol 4.7%, ácido fosfórico 8.5%) con la fracción de la proteína a cuantificar. Se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 min y se midió la absorbancia en un Nanodrop a 595 nm.

#### Producción de anticuerpos anti-p53

Para la producción de los anticuerpos policlonales anti-p53, se inmunizó un conejo macho de aproximadamente 4 meses de edad. Una vez obtenida la proteína purificada se realizó la inmunización del conejo siguiendo el protocolo de Pierce-Antibodies ([www.pierce-antibodies.com/custom-antibodies/rabbit-antibody-production-protocols.cfm](http://www.pierce-antibodies.com/custom-antibodies/rabbit-antibody-production-protocols.cfm)) (Thermo Scientific) al que se le realizaron modificaciones (Tabla 4). El procedimiento constó de tres inmunizaciones, una inyección primaria con la proteína diluida en adyuvante completo de Freund (*Mycobacterium tuberculosis*, aceite mineral, manoleato; Sigma), seguido de la inyección de dos boosters con la proteína diluida en el adyuvante incompleto de Freund (aceite mineral, manoleato), cada inyección se hizo con un espacio de dos semanas.

**Tabla 4.** Protocolo de inmunización

<b>Día</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Descripción</b>
0	Primer sangrado. Inyección primaria	Obtención del suero preinmune. Inmunización con 161.1 µg de p53
14	Primer booster	Inmunización con 201.37 µg de p53
28	Segundo booster	Inmunización con 201.37 µg de p53
35	Sangrado final	Obtención del suero anti-p53

Para obtener el suero preinmune y el suero inmune, se realizaron dos punciones venosas en la oreja del conejo. La sangre completa obtenida de las punciones se dejó incubando a temperatura ambiente durante 4 h para la formación del coágulo, pasado el tiempo se separó el suero del coágulo y se centrifugó durante 15 min a 2000 rpm y se guardó el sobrenadante a -20 °C hasta su posterior análisis.

### **Dot blots**

Una vez obtenido el suero, se evaluó la presencia de anticuerpos anti-p53 mediante la técnica de manchas (dot blots). Previamente se preparó el antígeno a analizar. Para ello, el pellet obtenido a partir de 120 µL de cultivo no inducido e inducido se trató con 50 µL de buffer lisis con 2% de Tritón X-100, el pellet se resuspendió en vortex durante 1 min y posteriormente se centrifugó a 15,000 xg por 15 min. Se separó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en buffer lisis con Tritón X-100 al 2%.

Las fracciones proteicas fueron fijadas en una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) en donde se cargó 1.5 µL de la fracción soluble e insoluble de las muestras sin inducir e inducida. Se probaron 3 diluciones del suero anti-p53, 1:100, 1:500 y 1:1000 en TBS. Como control se utilizó el suero preinmune a una dilución 1:500. Se dejaron secar las muestras y posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos incubando la membrana en buffer TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5; Tween 20 0.05%) con 5% de leche en polvo, se dejó incubando durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.

Posteriormente, se incubó la membrana con el antisuero a las diferentes concentraciones con TBS-leche en polvo al 1% a temperatura ambiente durante 30 min con agitación y a 4 °C toda la noche. Enseguida, se lavó la membrana 3 veces con TBS-T, cada lavado de 5 min con agitación. Después, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario GAR-AP (Goat anti-rabbit-alkaline phosphatase; BIO-RAD) a una dilución 1:3000 en TBS durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. La membrana se lavó 3 veces con TBS-T, un lavado de 15 min y dos de 5 min. Posteriormente, se lavó con buffer TBS durante 2 min. Finalmente la membrana se incubó con el kit de sustrato para revelado (AP Conjugate Substrate Kit, BIORAD), donde se diluyó al 1% del volumen total del buffer de revelado (MgCl<sub>2</sub>, Tris base; pH 9.5) de cada uno de los reactivos, la reacción se detuvo lavando la membrana en agua.

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos se realizaron Western blots probando las diluciones 1:2000 y 1:3000. Previo al análisis, se indujo el corte de la proteína de fusión agregando a un pellet de 120 µL provenientes de la lisis bacteriana, 120 µL de buffer columna con DTT 50 mM. El pellet se homogenizó en vórtex a velocidad máxima y se dejó incubando a 23 °C durante 24 h. Posteriormente se centrifugó a 15,000xg durante 15 min, se separó el sobrenadante y la fracción insoluble se cargó en el gel.

### Detección de la proteína p53 en tejidos de camarón

#### **Extractos nucleares y citoplasmáticos**

Para la inmunodetección de la proteína p53 en hepatopáncreas y branquias de camarones sometidos a 3, 24 y 48 h de hipoxia se prepararon extractos nucleares y citoplasmáticos utilizando el kit comercial NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE, Biotechnology). Para ello, se pesaron 100 mg de tejido y se le agregaron 500 µL del reactivo CER I, se homogenizó la muestra de forma manual utilizando un pistilo. El pellet celular obtenido se resuspendió agitando (vortex) durante 15 segundos y se dejó incubar durante 10 minutos en hielo. Posteriormente, se agregaron 27.5 µL del reactivo CER II y se mezcló (vortex) por 5 segundos, se dejó incubar en hielo por 1 minuto. Se agitó (vortex) por 5 segundos a velocidad máxima y se centrifugó a

16,000xg durante 5 minutos. Inmediatamente después, el sobrenadante se transfirió a un tubo y se almacenó a -20 °C, esta fracción es el extracto citoplasmático. El pellet restante se resuspendió en 100 µL del reactivo NER frío. La muestra se mezcló (vortex) durante 15 segundos y se dejó incubar en hielo durante 10 minutos. El último paso se repitió 4 veces. Finalmente, la muestra se centrifugo a 16,000xg por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo y se almacenó a -80 °C, esta fracción es el extracto nuclear. Los extractos proteicos obtenidos se cuantificaron mediante la técnica de Bradford.

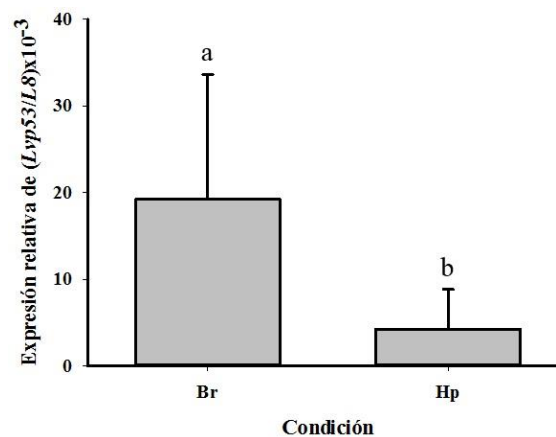
### **Detección de la proteína p53 mediante Western blots**

Una vez cuantificados los extractos obtenidos, se realizaron Western blots para evaluar la presencia de p53 en los tejidos mediante inmunodetección. El procedimiento se describe a continuación: se corrió un gel de poliacrilamida al 8% con las muestras de tejido de hepatopáncreas y branquias utilizando como marcador de peso molecular el Kaleidoscope™ Prestained Standards (BIORAD). Seguido se realizó la transferencia utilizando una cámara Trans-Blot® SD cell (BIORAD) y empleando el buffer de transferencia de Bjerrum and Schafer-Nielsen (Tris 48 mM, glicina 39 mM, pH 9.2). Previo a la transferencia, la membrana de PVDF se humedeció con metanol absoluto. La transferencia se realizó durante 20 min a 15 V constantes. Después, el gel de poliacrilamida se tiñó con Coomassie coloidal para verificar la eficiencia de la transferencia. La membrana se incubó en buffer TBS-T con 5% de leche en polvo durante toda la noche para bloquear los sitios inespecíficos. Transcurrido el tiempo, la membrana se incubó en buffer TBS-T con 1% de leche en polvo y el anticuerpo primario (anti-p53) a una dilución 1:3000 durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con buffer TBS-T a temperatura ambiente durante 5 min cada uno y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario GAR-AP a una dilución 1:3000 en TBS-T con leche al 1% durante 1.5 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T, un primer lavado de 15 min y el resto por 5 min y después se lavó con buffer TBS durante 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se incubó con los sustratos de AP para revelado por color (AP Conjugate Substrate Kit. Biorad), deteniendo la reacción con agua.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

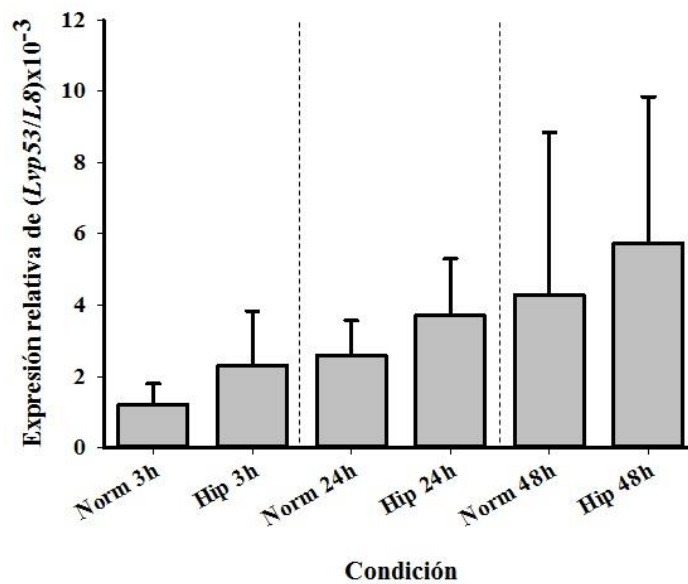
### Evaluación de la expresión génica de p53 en tejidos

Se analizó la expresión de p53 en hepatopáncreas y branquias de camarones bajo condiciones normales. Se encontró que la expresión en branquias es 4.5 veces más alta que en hepatopáncreas bajo condiciones normales ( $p < 0.05$ ) (Figura 3). Los resultados encontrados son contrarios a lo reportado por Qian y cols. (2014) en donde se realizó la cuantificación del mRNA de 11 tejidos del camarón bajo condiciones normales. Los tejidos se dividieron en tres grupos, los de mayor expresión, expresión media y expresión baja, y se reportó que el hepatopáncreas se encontraba dentro de los tejidos con mayor expresión y branquias con expresión media. Estas diferencias podrían deberse a variaciones en la expresión génica debido a la etapa de crecimiento en la que se encontraban los camarones. En el caso de los camarones empleados en el trabajo de Qian y cols (2014), se utilizaron camarones adultos con un peso de 20-26 g, mientras que los camarones utilizados en este trabajo durante el bioensayo, fueron camarones juveniles con un peso de 10.6-12.2 gr.



**Figura 3.** Expresión diferencial de *Lvp53* entre hepatopáncreas y branquias de camarones bajo condiciones normales.

También se realizó el análisis de la expresión de p53 en branquias y hepatopáncreas de camarones sometidos a condiciones de normoxia e hipoxia. En el caso de hepatopáncreas, el tratamiento de los camarones a las 3, 24 y 48 h bajo hipoxia, no causó un cambio significativo en el nivel de los transcritos de p53 comparados con su control en normoxia en ninguna de las horas evaluadas ( $p < 0.05$ ) (Figura 4). Esto es contrario a lo reportado por Qian y cols. (2014) en donde la exposición del camarón blanco a ambientes con pH ácido (6.1) y cadmio ( $6.6 \mu\text{M}$ ), causaban un incremento en la expresión relativa de *Lvp53* en hepatopáncreas a las 24 h y 48 h respectivamente.



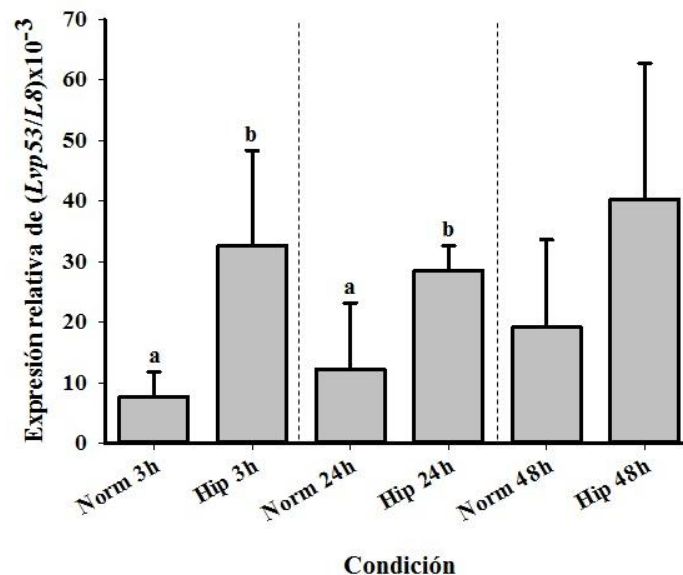
**Figura 4.** Expresión relativa de *Lvp53* en hepatopáncreas de camarones sometidos a condiciones de normoxia (norm) e hipoxia (hip).

En el caso de branquias, el nivel de los transcritos de *Lvp53* aumentó 4.3 veces a las 3 h de hipoxia con respecto a su control en normoxia ( $p < 0.05$ ), así como a las 24 h en donde se presentó un aumento en los transcritos de 2.3 veces más que en su control en normoxia ( $p < 0.05$ ) (Figura 5). Estudios realizados en el copépodo *Tigriopus japonicus*, demostraron un aumento significativo en la expresión del gen de p53 cuando fueron expuestos a tres alquilfenoles indicando que probablemente la proteína p53 está involucrada en la respuesta al daño inducida por ese disruptor endócrino (Hwang y cols., 2010).



Existen pocos reportes de estudios de factores transcripción de camarón y su expresión durante la hipoxia. Un ejemplo es el del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , que en branquias se encontró una disminución de 35 veces a la hora 24 de ser sometido a hipoxia (1.5 mg/L DO) con respecto a su control (Soñanez-Organis y cols., 2009). Se ha reportado que cuando p53 se acumula por efecto de hipoxia severa, interacciona con HIF-1 $\alpha$  causando su desestabilización y por consiguiente su degradación. Esto sugiere a p53 como un mecanismo de regulación de HIF-1 $\alpha$  en condiciones de hipoxia (Schmid y cols., 2004; Fels y Koumenis).

En otro estudio se reportó un comportamiento similar al observado en p53 en MT (metalotioneína) del camarón blanco. En ese estudio se evaluó la cantidad de transcritos en varios tejidos de camarones sometidos a condiciones hipóxicas, y se encontró que a la hora 3 de hipoxia había un incremento de 4 veces con respecto al control (Félix-Portillo y cols., 2014). La MT es una proteína importante en la respuesta celular del camarón contra las EROS (Especies reactivas de oxígeno) generadas por la hipoxia y se ha reportado como un posible modulador de p53 (Méplan y cols., 2000).

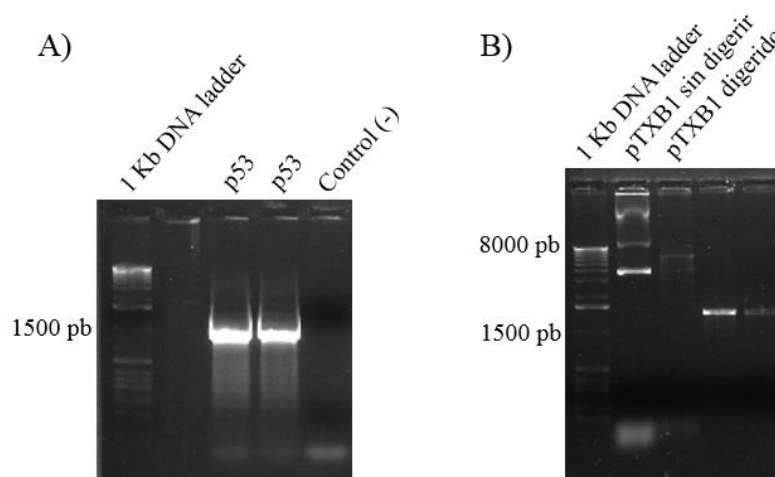


**Figura 5.** Expresión relativa de *Lvp53* en branquias de camarones sometidos a condiciones de normoxia e hipoxia.

### Clonación de p53 para sobreexpresión

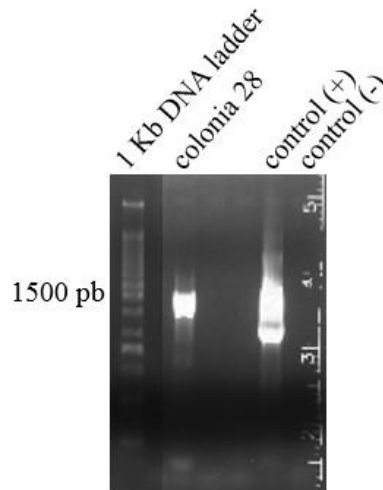
Para la construcción del plásmido recombinante, se obtuvo la secuencia codificante completa de *Lvp53* de 1359 pb por PCR convencional utilizando como templado DNAp y oligonucleótidos específicos. El producto de PCR obtenido de la primer amplificación, se purificó y reamplificó utilizando los oligonucleótidos que contenían los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *SapI* (Figura 6A).

Se obtuvieron los productos esperados, en el caso del vector digerido se observa la única banda esperada que corresponde al vector digerido con ambas enzimas, a diferencia del vector sin digerir, en donde se observan las tres bandas que corresponden a las diferentes conformaciones del plásmido. Además, se observa una diferencia en la intensidad de la banda del fragmento amplificado digerido en comparación con el fragmento que no está digerido (Figura 6B).



**Figura 6.** Obtención por PCR y clonación de p53. A) Reamplificación de p53 con los iniciadores diseñados para agregar sitios de restricción para las enzimas *SapI* y *NdeI*. B) Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos de la digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *SapI*, del vector pTXB1 y de p53.

Los fragmentos obtenidos fueron empleados para la construcción del plásmido recombinante en el vector de sobreexpresión pTXB1. De la transformación de *E. coli* TOP10 competentes se obtuvieron un total de 43 colonias que fueron evaluadas mediante PCR para verificar que tuvieran el fragmento de p53 en el vector, de las cuales solamente una resultó positiva (Figura 7).



**Figura 7.** Análisis de las colonias obtenidas de la transformación con el plásmido recombinante.

La colonia que resultó positiva se usó para preparar DNAp y determinó la secuencia nucleotídica, de la que se dedujo una proteína de 453 aminoácidos (Figura 8), la cual se comparó mediante un alineamiento con la secuencia de p53 del camarón blanco reportada por Qian y cols. (2014), encontrándose una similitud del 98% a nivel aminoácidos (Figura 9). Para evaluar las diferencias encontradas se realizó un alineamiento de la secuencia nucleotídica, en donde se observaron diferencias puntuales que resultan en cambios en 7 aminoácidos (Figura 9). Además, se hizo un alineamiento de la secuencia de p53 obtenido con la secuencia del camarón *Marsupenaeus japonicus* donde se encontraron similitudes en 4 de los aminoácidos (Figura 10). Los tres aminoácidos restantes resultaron ser cambios conservados. Como la proteína recombinante obtenida fue empleada para la producción de anticuerpos policlonales anti-p53 y no para estudios funcionales, en donde el cambio de aminoácidos es un impedimento, se procedió a la sobreexpresión de p53.

atgcagcgggtcggactccgagctgctggttcggcgaggacgagatcacctgctcagggatgactctctcctg  
M Q R S D S E L L F G E D E Y H L L R D D S L L  
caagcgcacgtccaccaactccgcaccctgttggagaccagacattgtcgcggtgcccagctgaaa  
Q R I G S T N F R T L L E T P D I V A V P E L K  
gatgaggacgaacagcatcagcagcaacatcaaaatcagcggcaacagcaacctcagcagcagcagcaaca  
D E D E Q H Q Q Q H Q N Q R Q Q Q P Q Q Q Q Q Q  
cagcagcagcagccagtcgcgcaacaagtggcttaccgatccagaatattgataaccagctgatcctggcg  
Q Q Q Q P V A Q Q V A Y P I Q N I D N Q L I L A  
aatccccacatccacggagatatctttcaaactgttcaagttcagcagcacacttcacagcaacagcagctg  
N P H I H G D I F Q T V Q V Q Q H T S Q Q Q Q L  
ccacagctccagccaggacagcaaatcccgtgggattctctccagactcttgatacagaaaaatgtggaagt  
P Q L Q P G Q Q I P W D S L Q T L D T E N V E V  
ttgccaagcagcaatgtgtcagtcggtggtgtatcagccgcattgccttgattgaaggctctaccacttcc  
L P S S N V S V G G V S A A I A L I E G S T T S  
tgcttggtgactctactctggcacattcagtgccatcactccagccatgggaggtcgtcacaaattcggc  
C L A D S T L A H S V P S L Q P W A G R H K F G  
atctccctcccaactggcaacaagatcgcaacaagtgggtgtacagtcaggatctaggcaaaactctacctc  
I S L P T G N K D R N K W C Y S Q D L G K L Y L  
tgcccaaatgttgccgtaccagtgatgtaacattggatgactgggtgaatgtaacatcccatgacccca  
C P N V A V P V N V T L D D W V N A N I T M T P  
gtgttcaagcaaagctgccaccgcacagaaccagtgaaacaggtgctacaactgcaagagtattcaaaactgt  
V F K Q S C H R T E P V N R C Y N C K S I Q N C  
gatccaaatttggctgagcatttagtgaggtcaggggtgagggctgtgaatacagcttcatcaacgacaga  
D P N L A E H L V Q V E G E G C E Y S F I N D R  
tacatggtcacctgccccctccgccccccacccccctggggaggtctcctcaacgctcctgatcaagattatg  
Y M V T V P L R P P P P G E V S S T L L I K I M  
tgtctgacttcatgcggttgaggccccaacagacgtcccttctgtattgttcttactcttagaaactctggt  
C L T S C V G G P N R R P F C I V L T L R N S V  
actggtgaagagattggtaggcagatcctggacattaagtgtgcaagtgcccatctcgtgatctgactaat  
T G E E I G R Q I L D I K C C K C P S R D L T N  
gatgagaaaagcaggactcccacagcccctgctgcaccatcagctgaagaagaaaaacgtacaaaggtacga  
D E K S R T P T A P A A P S A E E E K R T K V R  
aagttggcaacagaaattgccggtggccagaagcgcaagagaccaaagatcaaaactagaaccaggaacagat  
K L A T E I A V G Q K R K R P K I K L E P G T D  
tctcgaatggtcaacattgctgtcccaatagagtatgaagctgaggtgaagtcttatatcaacaagctcatt  
S R M V N I A V P I E Y E A E V K S Y I N K L I  
gccgctgatttaatacaagaagtggcagcctgacgcgctcatgtatcctgaagaggagagtaac  
A A D L I K K W Q P D A L M Y P E E E S N

**Figura 8.** Secuencia nucleotídica y secuencia aminoacídica deducida de p53 obtenida.

p53	ATGCAGCGGTCCGACTCCGAGCTGCTGTTTCGGCGAGGACGAGTATCACCTGCTCAGGGAT	60
p53Qian	ATGCAGCGGTCCGACTCCGAGCTGCTGTTTCGGCGAGGACGAGTATCACCTGCTCAGGGAT	60
p53	GACTCTCTCCTGCAACGCATCGGCTCCACCAACTTCCGCACCCCTGTTGGAGACCCAGAC	120
p53Qian	GACTCTCTCCTGCAACGCATCGGCTCCACCAACTTCCGCACCCCTGTTGGAGACCCAGAC	120
p53	ATTGTCGCCGTGCCGAGCTGAAAGATGAGGACGAACAGCATCAGCAGCAACATCAAAAT	180
p53Qian	ATTGTCGCCGTGCCGAGCTGAAAGATGAGGACGAACAGCATCAGCAGCAACATCAAAAT	180
p53	CAGCGGCAACAGCAACCTCAGCAGCAGCAGCAACACAGCAGCAGCAGCCAGTCGCGCAA	240
p53Qian	CAGCGGCAACAGCAACCTCAGCAGCAGCAGCAACACAGCAGCAGCAGCCAGTCGCGCAA	240
p53	CAAGTGGCTTACCCGATCCAGAATATTGATAACCAGCTGATCCTGGCGAATCCCCACATC	300
p53Qian	CAAGTGGCTTACCCGATCCAGAATATTGATAACCAGCTGATCCTGGCGAATCCCCACATC	300
p53	CACGGAGATATCTTTCAAACCTGTTCAAGTTCAGCAGCACACTTCACAGCAACAGCAGCTG	360
p53Qian	CACGGAGATATCTTTCAAACCTGTTCAAGTTCAGCAGCACACTTCACAGCAACAGCAGCTG	360
p53	CCACAGCTCCAGCCAGGACAGCAAAATCCCGTGGGATTCTCTCCAGACTCTTGATACAGAA	420
p53Qian	CCACAGCTCCAGCCAGGACAGCAAAATCCCGTGGGATTCTCTCCAGACTCTTGATACAGAA	420
p53	AATGTGGAAGTGTGCAAGCAGCAATGTGTGAGTCCGTTGGTGTATCAGCCGCCATTGCC	480
p53Qian	AATGTGGAAGTGTGCAAGCAGCAATGTGTGAGTCCGTTGGTGTATCAGCCGCCATTGCC	480
p53	TTGATTGAAGGCTCTACCACTTCCGCTGGCTGACTCTACTCTGGCACATTCAGTGCCA	540
p53Qian	TTGATTGAAGGCTCTACCACTTCCGCTGGCTGACTCTACTCTGGCACATTCAGTGCCA	540
p53	TCACTCCAGCCATGGGCAGGTCGTCACAAATTCGGCATCTCCCTCCCAACTGGCAACAAA	600
p53Qian	TCACTCCAGCCATGGGCAGGTCGTCACAAATTCGGCATCTCCCTCCCAACTGGCAACAAA	600
p53	GATCGCAACAAGTGGTGTACAGTCAGGATCTAGGCAAACTCTACCTCTGCCAAATGTT	660
p53Qian	GATCGCAACAAGTGGTGTACAGTCAGGATCTAGGCAAACTCTACCTCTGCCAAATGTT	660
p53	GCCGTACCAGTGAATGTAACATTGGATGACTGGGTGAATGCTAACATCACCATGACCCCA	720
p53Qian	GCCGTACCAGTGAATGTAACATTGGATGACTGGGTGAATGCTAACATCACCATGACCCCA	720
p53	GTGTTCAAGCAAAGCTGCCACCGCCAGAACCCAGTGAACAGGTGCTACAACCTGCAAGAGT	780
p53Qian	GTGTTCAAGCAAAGCTGCCACCGCCAGAACCCAGTGAACAGGTGCTACAACCTGCAAGAGT	780
p53	ATTCAAAACCTGTGATCCAAATTTGGCTGAGCATTTAGTGCAGGTCGAGGGTGAGGGTGT	840
p53Qian	ATTCAAAACCTGTGATCCAAATTTGGCTGAGCATTTAGTGCAGGTCGAGGGTGAGGGTGT	840
p53	GAATACAGCTTCATCAACGACAGATACATGGTCACCGTGCCCTCCGCCCCCACCCT	900
p53Qian	GAATACAGCTTCATCAACGACAGATACATGGTCACCGTGCCCTCCGCCCCCACCCT	900
p53	GGGGAGGTCTCCTCAACGCTCCTGATCAAGATTATGTGTCTGACTTCATGCGTTGGAGGC	960
p53Qian	GGGGAGGTCTCCTCAACGCTCCTGATCAAGATTATGTGTCTGACTTCATGCGTTGGAGGC	960
p53	CCCAACAGAGCTCCCTTCTGTATTGTTCTTACTCTTAGAACTCTGTTACTGGTGAAGAG	1020
p53Qian	CCCAACAGAGCTCCCTTCTGTATTGTTCTTACTCTTAGAACTCTGTTACTGGTGAAGAG	1020
p53	ATTGGTAGGCAGATCCTGGACATTAAGTGTGCAAGTGCCCATCTCGTGATCTGACTAAT	1080
p53Qian	ATTGGTAGGCAGATCCTGGACATTAAGTGTGCAAGTGCCCATCTCGTGATCTGACTAAT	1080
p53	GATGAGAAAAGCAGGACTCCCAAGCCCTGCTGCACCATCAGCTGAAGAAGAAAAACGT	1140
p53Qian	GATGAGAAAAGCAGGACTCCCAAGCCCTGCTGCACCATCAGCTGAAGAAGAAAAACGT	1140
p53	ACAAAGGTACGAAAGTTGGCAACAGAAATTCGGTGGCCAGAAGCGCAAGAGACCAAAG	1200
p53Qian	ACAAAGGTACGAAAGTTGGCAACAGAAATTCGGTGGCCAGAAGCGCAAGAGACCAAAG	1200
p53	ATCAAACCTAGAACCAGGAACAGATTCTCGAATGGTCAACATTGCTGTCCCAATAGAGTAT	1260
p53Qian	ATCAAACCTAGAACCAGGAACAGATTCTCGAATGGTCAACATTGCTGTCCCAATAGAGTAT	1260
p53	GAAGCTGAGGTGAAGTCTTATATCAACAAGCTCATTGCCGCTGATTTAATCAAGAAGTGG	1320
p53Qian	GAAGCTGAGGTGAAGTCTTATATCAACAAGCTCATTGCCGCTGATTTAATCAAGAAGTGG	1320
p53	CAGCCTGACGCGCTCATGTATCCTGAAGAGGAGAGTAAC	1359
p53Qian	CAGCCTGACGCGCTCATGTATCCTGAAGAGGAGAGTAAC	1359

**Figura 9.** Comparación de la secuencia nucleotídica de p53 obtenida con p53 reportada por Qian y cols. (2014).

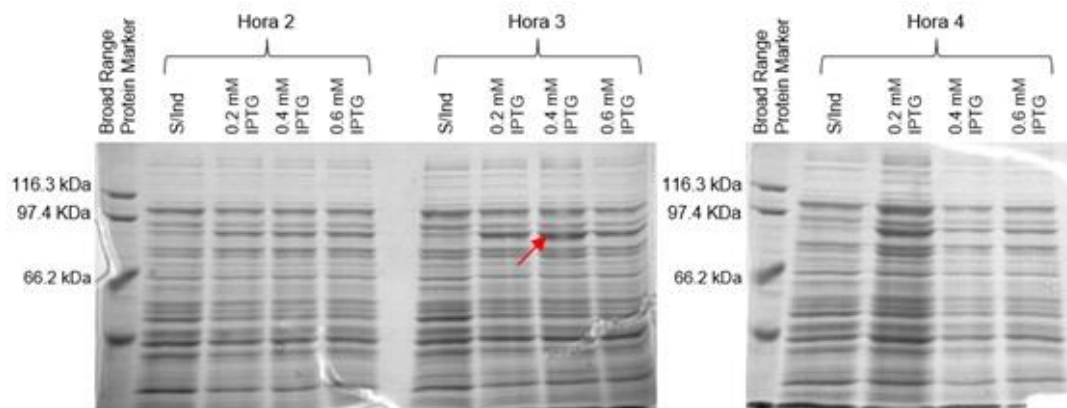
p53	-----MQRSDSELLFGEDEYHLLRDDSLLQRIGSTNFRITLLETPE	DIVAVPELKDEEEQHQ	55
p53Qian	-----MQRSDSELLFGEDEYHLLRDDSLLQRIGSTNFRITLLETSD	DIVAVPELKDEEEQHQ	55
p53Mjaponicus	MQQGGMQRSDSELLFGEDEYHLLRDDSLLQRFSGSANFHTLLDGP	DVEPPVTEQEVEDQQQ	60
p53	QQHQNRQQQPQQQQQQ--QQQP---	VAQQVAYPIQNIDNQLILANPHIHGDIFQTVQVQ	111
p53Qian	QQHQNRQQQPQQQQQQ--QQQP---	VAQQVAYPIQNIDNQLILANPHIHGDIFQTVQVQ	111
p53Mjaponicus	QQQQQQQPQQQQQQIQQQQP	QAPQIAYPIQNIDNQLILNLSHIHGEIFQTVQVQ	120
p53	QHTSQQQQLPQLQPGQQIPWDSLQTLDTENVEVLPSSNVS	SVGGVSAAIALIEGSTTSCLA	171
p53Qian	QHTSQQQQLPQLQPGQQIPWDSLQTLDTENVEVLPSSNVS	SVGGVSAAIALIEGSTTSCLA	171
p53Mjaponicus	QQP-QQQQIQQLQPGQPIWDSLQTLDTENVEVLPNNNVP	GGVSAAITLIEGSATSCLA	179
p53	DSTLAHSVPSLQPWAGRHKFGISLPTGNKDRNKWCYSQDLGKLYL	CPNVAVPVNVTLDDW	231
p53Qian	DSTLAHSVPSLQPWAGRHKFGISLPTGNKDRNKWCYSQDLGKLYL	CPNVAVPVNVTLDDW	231
p53Mjaponicus	DSTLAHSVPSLQPWAGRHKFGISLPTGNKDRNKWCYSQDLGKLYL	CPNVAVPVNVMLEDW	239
p53	VNANITMTPVFKQSCHRTEP	VNRCYNCKSIQNCDPNLAEHLVQVEGEGCEYSFINDRYMV	291
p53Qian	VNANITMTPVFKQSCHRTEP	VNRCYNCKSIQNCDPNLAEHLVQVEGEGCEYSFINDRYMV	291
p53Mjaponicus	VNATITMTPVFKQSCHRTEP	VNRCYNCKSIQNCDPNLAEHVVQIEGEGCEYSFINDRYLV	299
p53	TVPLRPPPPGEVSSSTLLIKIMCLTSCVGGPNRRPFCIVLTLRNSVT	GEEIGRQILDIKCC	351
p53Qian	TVPLRPPPPGEVSSSTLLIKIMCLTSCVGGPNRRPFCIVLTLRNSVT	GEEIGRQILDIKCC	351
p53Mjaponicus	TVPLRPPPPGEVSPSTLLIKIMCLTSCVGGPNRRPFCIVLTLRNSVT	GEEIGRQILDIKCC	359
p53	KCPSRDLTNDKESRTP	TAPAAPSAAEEKRTKVRKLATEIAVGQKRKRPKIKLEPGTDSRM	411
p53Qian	KCPSRDLTNDKESRARGAP	AAPSAAEEKRTKVRKLATEIAVGQKRKRPKIKLEPGTDSRM	411
p53Mjaponicus	KCPSRDLTNDKESRTP	TAPSTPSVDEEKRTKVRKLANEIAVGQKRKRPKIKLEPGTDSRM	419
p53	VNIAVPIEYEA	EVKSYINKLIAADLIKKWQPDALMYPEEESN	453
p53Qian	VNIAVPIEYEA	EVKSYINKLIAADLIKKWQPDALMYPEEESN	453
p53Mjaponicus	VNIAVVEYEA	EVKSYINKLIAADLIKKWQPDALMYPEEESN	461

**Figura 10.** Comparación de la secuencia aminoacídica de p53 de *L. vannamei* obtenida con p53 reportada por Qian y cols. (2014) y p53 de *M. japonicus*.

### Sobreexpresión y purificación de p53 recombinante

La sobreexpresión de proteínas en organismos procariotas es la más utilizada, principalmente en la bacteria *E. coli*. Esta bacteria presenta ventajas sobre otros organismos como la facilidad de manipulación del material genético, el gran número de vectores de expresión disponibles y el poco tiempo necesario para la producción de las proteínas, además del empleo de medios de cultivo económicos (Baneyx, 1999; Swartz, 2001).

La sobreexpresión de p53 se realizó en células de *E. coli* ER2566 con el clon recombinante obtenido, donde se obtuvo una proteína recombinante de 84 kDa. De las distintas concentraciones de IPTG y tiempos evaluados se encontró que las mejores condiciones para la sobreexpresión fueron a las 4 horas después de agregar 0.4 mM IPTG (Figura 11), donde se observa un ligero aumento en la intensidad de la banda en comparación con el control de la muestra sin inducir.

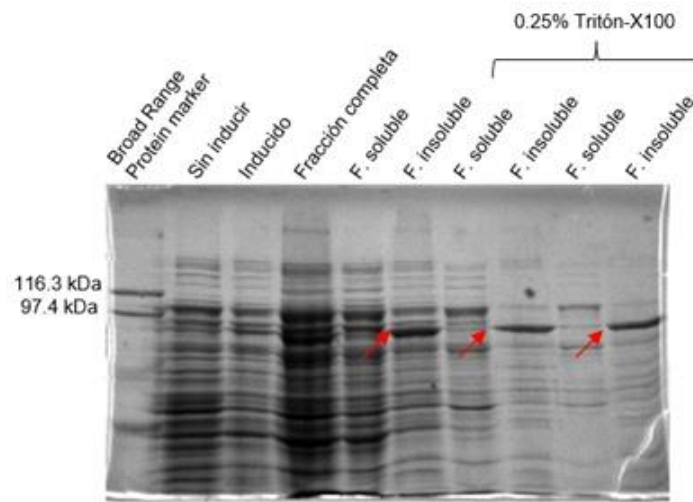


**Figura 11.** Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de la prueba de sobreexpresión a diferentes tiempos con distintas concentraciones de IPTG.

Seguido a la sobreexpresión, se realizó la prueba de solubilidad de la proteína para ello, el botón celular fue sonificado y se separó la proteína soluble de la insoluble, encontrándose que p53 estaba en la fase insoluble. Esto concuerda con trabajos similares, en donde p53 de humanos se sobreexpresó en células de *E. coli* BL21 y que resultó en la formación de cuerpos de inclusión (La Fevre-Bernt 2008). Bell y cols. (2002) clonaron p53 de humanos en el vector de sobreexpresión pET3a y reportan que la expresión de p53 a 37 °C resultaba en su producción en cuerpos de inclusión; para mejorar la solubilidad disminuyeron la temperatura de incubación a 22 °C lo que resultó en la producción de proteína soluble. Pero, para obtener cantidades más grandes sobreexpresaron p53 en forma de cuerpos de inclusión. Para solubilizar la proteína, los cuerpos de inclusión fueron tratados con guanidinio-HCl 6 M mejorando considerablemente la cantidad de p53 soluble.

Para tratar de solubilizar p53 recombinante, se agregó al buffer lisis el detergente no iónico Tritón X 100. El botón celular se homogenizó con el buffer lisis y se sonicó para posteriormente separar las fracciones solubles e insoluble mediante centrifugación. Las fracciones obtenidas se evaluaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% donde se encontró que la proteína de fusión se encontraba de nuevo en la fracción insoluble (Figura 12). Se realizaron varias pruebas para tratar de solubilizar la proteína, modificando la composición del buffer lisis así como las condiciones de sobreexpresión, centrifugación

o sonicación (Tabla 5), ninguna de las cuales resultó con mejorías en la solubilidad de la proteína de fusión p53.



**Figura 12.** Prueba de solubilidad de la proteína p53. Solubilización de p53 utilizando Tritón X 100. Las flechas indican p53 de fusión (84 kDa).

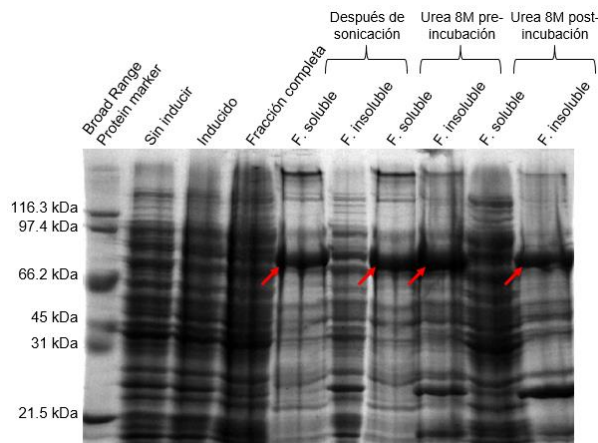
**Tabla 5.** Estrategias para solubilizar p53

<b>PRUEBA</b>	
1.	4 pulsos de sonicación de 10 seg, buffer lisis.
2.	4 pulsos de sonicación de 10 seg, buffer lisis con 0.1% Tritón X 100
3.	Homogenización con politrón, buffer lisis con 0.25% Tritón X 100
4.	6 pulsos de sonicación de 10 seg, buffer lisis con 0.25% Tritón X 100
5.	Homogenización con politrón, buffer lisis con deoxicolato de sodio 2%
6.	Sobreexpresión a 30 °C, 6 pulsos de sonicación de 10 seg, buffer lisis con 0.5% Tritón X 100
7.	Homogenización con politrón, buffer lisis con 0.25% Tritón X 100 y 2 M Urea
8.	Homogenización con politrón, buffer lisis (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) con 0.25% Tritón X 100
9.	Velocidad de centrifugación (3000- 12000 g)
10.	Sobreexpresión a 20 y 25 °C
11.	Inducción de corte con DTT en tubo
12.	Construcción de nuevo plásmido con fragmento de p53 de 1122 pb
13.	Solubilización con guanidinio-HCl 7M
14.	Solubilización con urea 8M

La proteína de fusión logró solubilizarse con urea 8 M. El botón celular se homogenizó con buffer lisis con Tritón X 100 a una concentración de 0.5%, se incubó en hielo durante 2 horas para posteriormente llevar a cabo la sonicación. La fracción

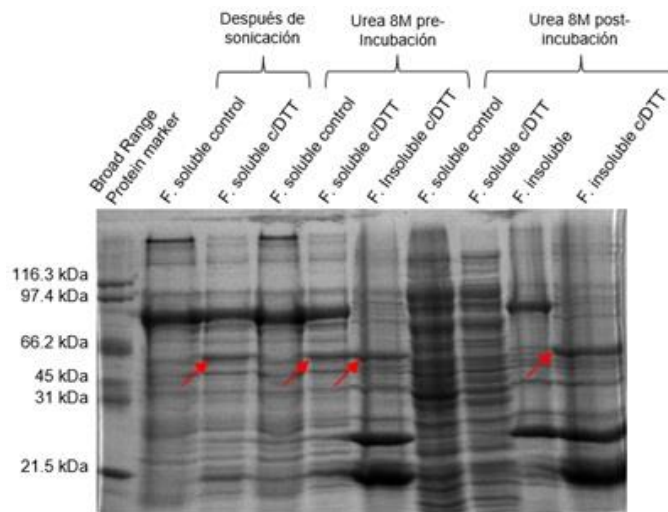


insoluble obtenida de la sonicación se homogenizó utilizando un politrón, el homogenizado se incubó durante 1 hora en agitación a 4 °C. En la figura 13 pueden observarse las fracciones solubles e insolubles obtenidas en cada paso del procedimiento. La banda del tamaño aproximado de la proteína de fusión (84 kDa) la cual se encuentra en la fracción soluble sin tratar con urea así como en la fracción soluble tratada con urea antes de la incubación de 1 hora. También, se observó la proteína en las fracciones insolubles después de tratadas con urea.



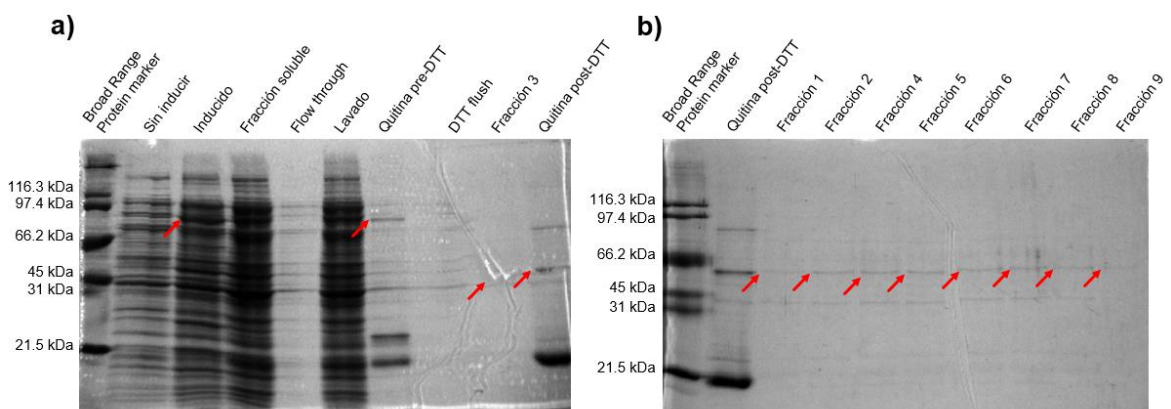
**Figura 13.** Evaluación de las fracciones obtenidas durante el procedimiento de solubilización de p53 de fusión utilizando urea 8M. Las flechas indican p53 de fusión.

Para verificar que la banda encontrada en dichas fracciones fuera la proteína de fusión, se indujo el corte mediado por inteína en tubo con el DTT. En la figura 14 se presenta el gel de poliacrilamida; las fracciones solubles que fueron tratadas con el DTT presentan una ligera disminución en la intensidad de la banda de la proteína de interés, esto en comparación con las muestras control. La disminución en la intensidad de la banda indica que se ocurrió el corte de la proteína de fusión sin embargo no fue total, ya que a diferencia de las fracciones insolubles que fueron tratadas con DTT, la banda que corresponde al tamaño aproximado de la proteína de fusión desapareció. Además, en las muestras tratadas se observa una banda con el tamaño aproximado de p53 (50.84 kDa) misma que no se encuentra en las muestras control. Esto indica que sí ocurrió el corte con el reactivo tiol, por lo que la banda si corresponde a la proteína de fusión y se encuentra en la fracción soluble.



**Figura 14.** Inducción del corte mediado por inteína con DTT de las muestras que contenían la banda de interés. Las flechas indican a p53 cortada.

Las fracciones obtenidas así como las muestras tomadas durante el proceso de purificación fueron analizadas por SDS-PAGE (Figura 15). En la figura 15b se muestran las fracciones obtenidas de la elución de la proteína de la columna de quitina, la cual no se encuentra pura, ya que se pueden apreciar bandas adicionales a p53.

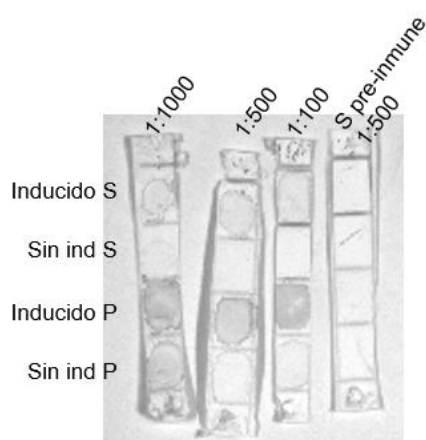


**Figura 15.** Purificación de p53 por cromatografía de afinidad. a) Evaluación de las muestras tomadas del procedimiento de purificación por cromatografía de afinidad. b) Fracciones eluidas de la columna de quitina con la proteína p53. Las flechas indican p53 recombinante.

## Producción de anticuerpos policlonales anti-p53

Para la producción de los anticuerpos policlonales, se utilizaron las fracciones 2 y 6 obtenidas de la elución. En el día cero de la inmunización al conejo, se realizó el primer sangrado para la obtención del suero pre-inmune, en donde se obtuvieron 3.5 mL de suero. Además, se realizó la inyección primaria donde se tomaron en donde se inyectó un total de 161.1  $\mu\text{g}$  de proteína.

Para realizar el primer y segundo booster, se tomó la fracción 6 concentrada, la cual tenía una concentración de 805.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para cada uno de los boosters, se inyectó un total de 201.37  $\mu\text{g}$  de proteína. Al día 35 después de la inmunización primaria se realizó el sangrado final mediante punción venosa, obteniéndose un total de 8.5 mL de suero anti-p53. Para probar la presencia de anticuerpos en el suero obtenido después de las inmunizaciones se realizaron los dot blots. Se detectó señal del anticuerpo en las fracciones soluble e insoluble de las muestras de sobreexpresión inducidas, siendo más evidente en la fracción insoluble lo que corresponde a los resultados obtenidos de la prueba de solubilidad, en donde la proteína de fusión se obtuvo mayormente en su forma insoluble. Además, se observa un aumento en la intensidad de la señal conforme disminuye la dilución del anticuerpo. El suero pre-inmune no presentó señal de anticuerpo (Figura 16).



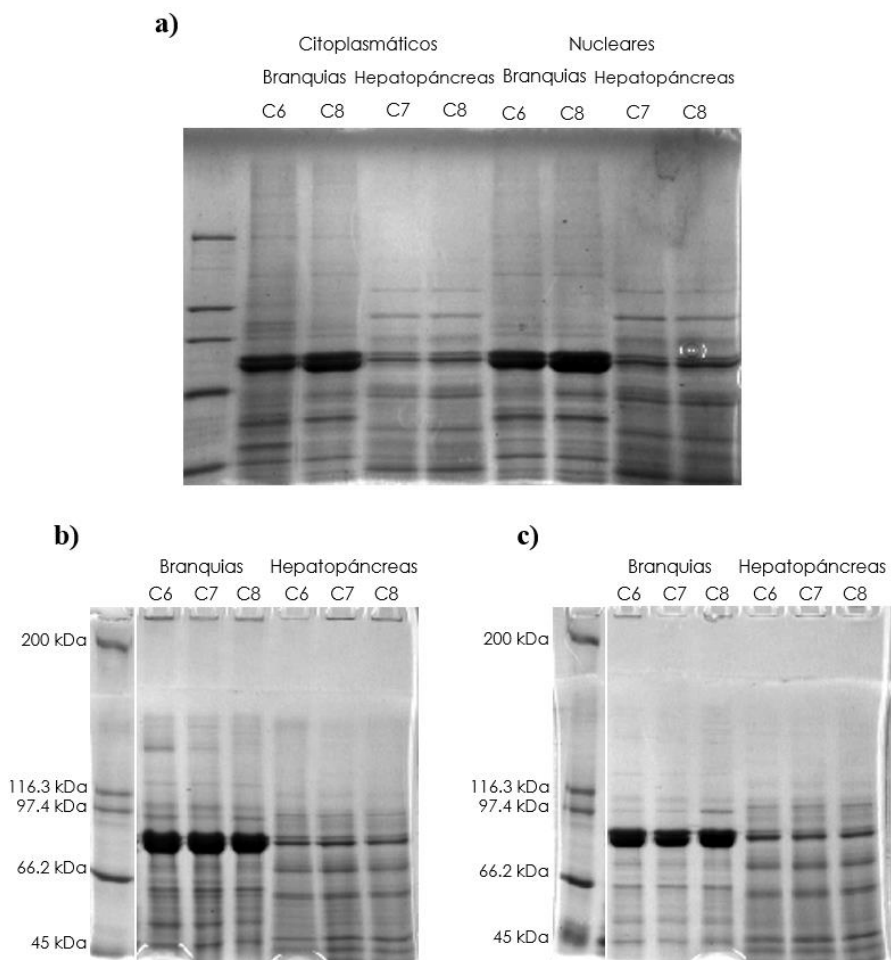
**Figura 16.** Evaluación del antisuero mediante Dot blots, probando 3 diluciones. Los puntos indican la presencia de anticuerpos.

### Detección de p53 en tejidos

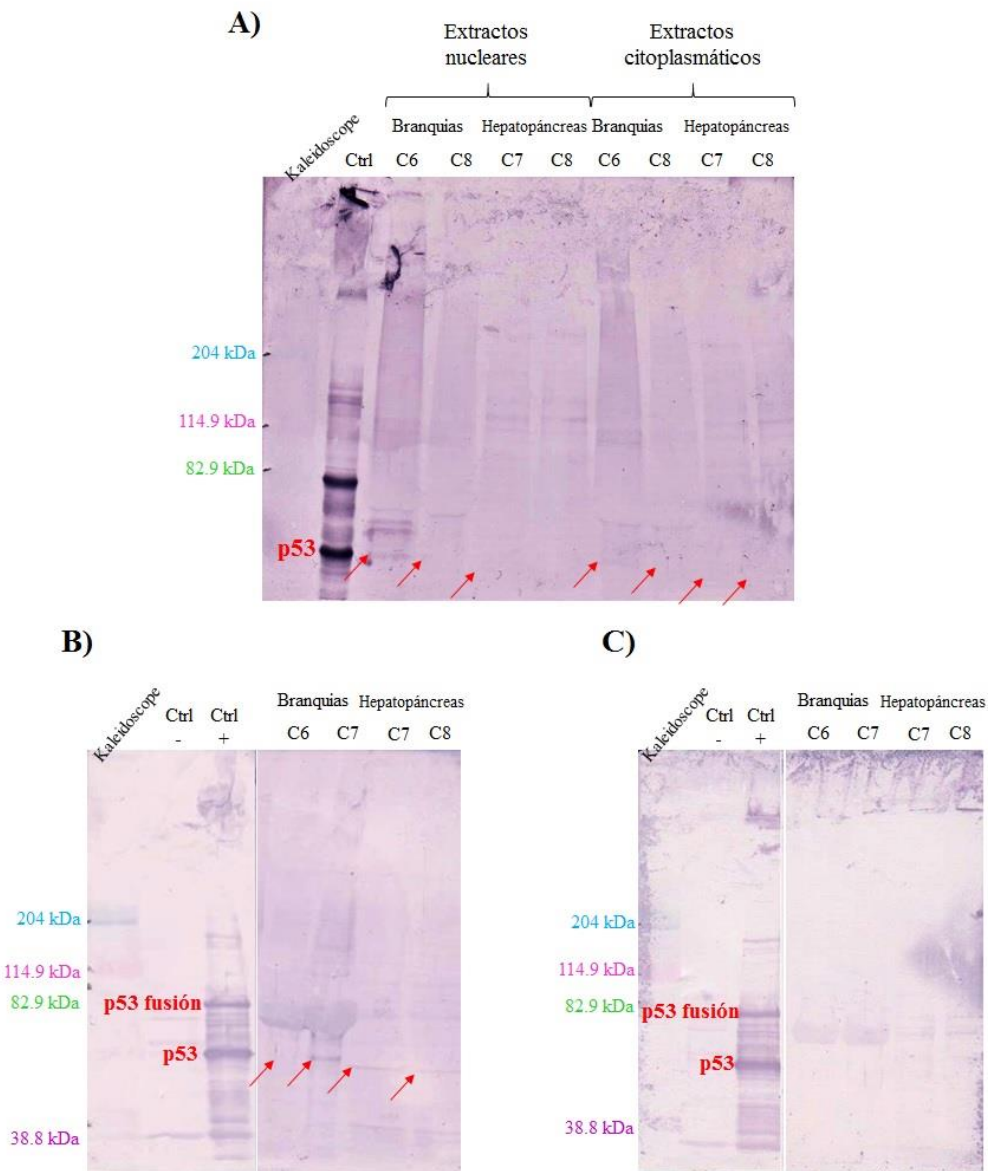
Para detectar p53 en tejidos de camarón mediante western blot, se prepararon extractos nucleares y citoplasmáticos de hepatopáncreas y branquias bajo condiciones de normoxia e hipoxia. Los extractos obtenidos se analizaron por electroforesis SDS-PAGE en donde se pueden observar las diferencias en el patrón de bandeo de los extractos nucleares con respecto a los citoplasmáticos (Figura 17).

En ambos tejidos de camarón sometidos a condiciones de normoxia se detectó p53. En el caso de branquias fue más notoria la señal en los extractos nucleares que en los extractos citoplasmáticos. En hepatopáncreas, se detectó p53 en ambos extractos sin embargo, la señal fue muy baja (Figura 18A). Comparando ambos tejidos la señal de p53 fue más evidente en branquias en ambos extractos. En el caso de los tejidos sometidos a hipoxia, se detectó p53 en los extractos nucleares de ambos tejidos principalmente en branquias (Figura 18B). En los extractos citoplasmáticos bajo condiciones de hipoxia no se detectó p53 (Figura 18C)

Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Graeber y cols. (1994) en donde se encontró que en células cancerígenas de humano (GM02184B, DU-145, PC-3, HL-60, NIH 3T3, HTB33, RKO, MCF-7) que fueron sometidas a bajas concentraciones de oxígeno había un incremento en la acumulación de p53 en extractos nucleares. En hepatopáncreas, la banda de p53 migró más abajo de la banda control de p53 cortada, pudiéndose deber a que la proteína sufrió modificaciones post-traduccionales como la acetilación, fosforilación, metilación o SUMOylación que afectaron su migración en el gel.



**Figura 17.** Extractos nucleares y citoplasmáticos. a) Extractos nucleares y citoplasmáticos de branquias y hepatopáncreas de camarones sometidos a normoxia. b) Extractos nucleares de branquias y hepatopáncreas de camarones sometidos a hipoxia. c) Extractos citoplasmáticos de branquias y hepatopáncreas de camarones sometidos a hipoxia.



**Figura 18.** Western blot de los extractos nucleares y citoplasmáticos de hepatopáncreas y branquias. a) Western blot de extractos nucleares y citoplasmáticos de branquias y hepatopáncreas de camarones sometidos a normoxia. b) Western blot de extractos nucleares de branquias y hepatopáncreas de camarones sometidos a condiciones de hipoxia. c) Western blot de extractos citoplasmáticos de branquias y hepatopáncreas de camarones sometidos a condiciones de hipoxia.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Es sabido que la inducción de p53 en respuesta al estrés ocurre principalmente por la modificación de la proteína y no por la inducción de la transcripción del gen que codifica a p53. Esta proteína bajo condiciones normales se encuentra en forma latente e inactiva, gracias a su estabilización mediante la formación del complejo p53-Mdm-2. Algunos tipos de estrés como la hipoxia causan la activación de p53 por medio de la disociación de este complejo, además de que p53 sufre modificaciones postraduccionales que permiten su traslocación al núcleo para así poder llevar a cabo su función como un factor de transcripción y promover la activación de genes que tienen diversas funciones en respuesta al estrés. En este trabajo se demostró que la hipoxia causa un aumento en el nivel de transcritos de p53 en branquias a horas tempranas después de haber sido sometidos a bajas concentraciones de oxígeno. A nivel proteína, se encontró que en hepatopáncreas y branquias que fueron sometidos a hipoxia hubo una acumulación de p53 en el núcleo. Estos resultados sugieren que p53 es inducida y activada principalmente a nivel proteína en respuesta al estrés por hipoxia en el camarón blanco. Por esto, es necesario seguir investigando el efecto que tiene p53 en las células del camarón lo que le permite su supervivencia en estas condiciones.

## REFERENCIAS

- Abbas T, Dutta A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*. 9(6): 400-414
- Alarcón R, Koumenis C, Geyer RK, Maki CG, Giaccia AJ. 1999. Hypoxia induces p53 accumulation through Mdm2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation. *Cancer Research*. 59:6046-6051
- Bai L, Zhu W-G. 2006. p53: Structure, function and therapeutic applications. *Journal of Cancer Molecules*. 2: 141-153
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Expression Vectors and Delivery Systems*. 10:411-421
- Bell S, Hansen S, Buchner J. 2002. Refolding and Structural Characterization of the Human p53 Tumor Suppressor Protein. *Biophysical Chemistry*. 96:243-257
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Calvo VMN, Nakano K, Bartons R, Gottlieb E, Vousden KH. 2006. TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Journal of Cell Science*. 126:107-120
- Bourdon JC, De Laurenzi V, Melino G, Lane D. 2003. p53: 25 years of research and more questions to answer. *Cell Death and Differentiation*. 10:397-399
- Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP. 2005. P53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & Development*. 19:2122-2137
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254
- Brooks CL, Gu W. 2010. New insights into p53 activation. *Cell Research*. 20:614-621
- Burns TF, El-Deiry WS. 1999. The p53 pathway and apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*. 181:231-239
- Castellanos-Serra LR, Fernandez-Patron C, Hardy E, Santana H, Huerta V. 1997. High yield elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels at the low-picomole level. Application to N-terminal sequencing of a scarce protein and to in-solution biological activity analysis of on-gel renatured proteins. *Journal of Protein Chemistry*. 16:415-419



- Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E. 2010. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21<sup>CDKN1A</sup> in the DNA damage response. *Mutation Research*. 704:12-20
- Chen X, Chen J, Gan S, Guan H, Zhou Y, Ouyang Q, Shi J. 2013. DNA damage strength modulates a bimodal switch of p53 dynamics for cell-fate control. *BMC Biology*. 11:73
- Chung SK, Zhu S, Xu Y, Fu X. 2014. Functional analysis of the acetylation of human p53 in DNA damage responses. *Protein & Cell*. 5:544-551
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 356:215-221
- Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. 2010. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 00:a004887
- Espinosa JM, Verdun RE, Emerson BM. 2003. p53 functions through stress- and promoter- specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Molecular Cell*. 12:1015-1027
- Félix-Portillo M, Martínez-Quintana JA, Peregrino-Uriarte AB, Yepiz-Plascencia G. 2014. The metallothionein gene from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and expression in response to hypoxia. *Marine Environmental Research*. 101:91-100
- Fels DR, Koumenis C. 2005. HIF-1 $\alpha$  and p53: the ODD couple?. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 30:426-429
- Fridman JS, Lowe SW. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 22:9030-9040
- George P. 2011. p53 how crucial is its role in cancer?. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 3:19-25
- Girardini JE, Marotta C, Del Sal G. 2014. Disarming mutant p53 oncogenic function. *Pharmacological Research*. 79:75-87
- Green D R, Kroemer G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. 458:1127-1130
- Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Giaccia AJ. 1994. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G<sub>1</sub> phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Molecular and Cellular Biology*. 14:6264-6277
- Harris SL, Levine AJ. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 24:2899-2908
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. 2003. Apoptosis- the p53 network. *Journal of Cell Science*. 116:4077-4085

- Hollander MC, Sheikh MS, Bulavin DV, Lundgren K, Augeri-Henmueller L, Shehee R, Molinaro TA, Kim KE, Tolosa E, Ashwell JD, Rosenberg MP, Zhan Q, Fernández-Salguero PM, Morgan WF, Chu-Xia D, Fornace AJ. 1999. Genomic instability in Gadd45 deficient mice. *Nature Genetics*. 23:176-184
- Hwang DS, Lee JS, Rhee JS, Han J, Lee YM, Kim IC, Soo PG, Lee J, Lee JS. 2010. Modulation of p53 gene expression in the intertidal copepod *Tigriopus japonicas* exposed to alkylphenols. *Marine Environmental Research*. 69:S77-S80
- Irwin MS, Kaelin WG. 2001. p53 Family update: p73 and p63 develop their own identities. *Cell Growth & Differentiation*. 12:337-349
- Jin S, Martinek S, Joo WS, Wortman JR, Mirkovic N, Sali A, Yandell MD, Pavletich NP, Young MW, Levine AJ. 2000. Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 97:7301-7306
- Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C. 2002. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 23:1511-1512
- Ko LJ, Prives C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes and Development*. 10:1054-1072
- Koumenis C, Alarcón R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, Derr J, Taya Y, Lowe SW, Kastan M, Giaccia A. 2001. Regulation of p53 by hypoxia: Dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Molecular and Cellular Biology*. 21:1297-1310
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685
- LaFevre-Bernt M, Wu S, Lin X. 2008. Recombinant, refolded tetrameric p53 and gonadotropin-releasing hormone-p53 slow proliferation and induce apoptosis in p53-deficient cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 7:1420-1429
- Lee JH, Jin Y, He G, Zeng SX, Wang V, Wahl GM, Lu H. 2012. Hypoxia activates the tumor suppressor p53 by inducing ATR-Chk1 kinase cascade-mediated phosphorylation and consequent 14-3-3g inactivation of MDMX. *The Journal of Biological Chemistry*
- Liang SH, Clarke MF. 2001. Regulation of p53 localization. *European Journal of Biochemistry*. 268:2779-2783
- Liebermann DA, Hoffman B. 2008. Gadd45 in stress signaling. *Journal of Molecular Signaling*. 3:15-23
- Loughery J, Meek D. 2013. Switching on p53: an essential role for protein phosphorylation?. *BioDiscovery*. 8:1-20
- Marcel V, Dichtel-Danjoy ML, Sagne C, Hafsi H, Ma D, Ortiz-Cuaran S, Olivier M, Hall J, Mollereau B, Hainaut P. 2011. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death and Differentiation*. 18:1815-1824

- Martinez-Quintana JA, Peregrino-Uriarte AB, Gollas-Galván T, Gómez-Jiménez S, Yepiz-Plascencia Gloria. 2014. The glucose transporter 1 –GLUT1- from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* is up-regulated during hypoxia. *Molecular Biology Reports*. 41:7885-7898
- Maximov GK, Maximov KG. 2008. The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*. 22:664-668
- McLure KG, Lee PWK. 1998. How p53 binds DNA as a tetramer. *The EMBO Journal* 17: 3342-3350
- Molls UE, Riou G, Levine AJ. 1992. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 89:7262-7266
- Moskalev AA, Smit-Mcbride Z, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Tacutu R, Fraifeld VE. 2012. Gadd45 proteins: Relevance to aging, longevity and age-related pathologies. *Ageing Research Reviews*. 11:51-66
- Mugnier C, Zipper E, Goarant C, Lemonnier H. 2008. Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus vannamei* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture*. 274:398-407
- Müller M, Schulze SE, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T. 2007. One, two, three- p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resistance Updates*. 9:288-306
- Naccarati A, Polakova V, Pardini B, Vodickova L, Hemminki K, Kumar R, Vodicka P. 2012. Mutations and polymorphisms in *TP53* gene-an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis*. 27:211-218
- Nakano K, Vousden KH. 2001. *PUMA*, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell*. 7:683-694
- Oren M. 1999. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:36031-36034
- Okorokov AL, Sherman MB, Plisson C, Grinkevich V, Sigmundsson K, Selivanova G, Milner J, Orlova EV. 2005. The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 25:5191-5200
- Patiño GPJ. 2009. *Inmunología, una ciencia activa*. Universidad de Antioquia. 2da Edición. Página 294
- Qian Z, Liu T, Liu Q, He S, Liu Y, Hou F, Wang X, Mi X, Cai C, Liu X. 2014. p53 is involved in shrimp survival via its regulation roles on MnSOD and GPx in response to acute environmental stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 159:38-51
- Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ. 2009. *Fish physiology: hypoxia*. Academic Press. 2º Edición.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Volume. CSHL Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 74:5463-5467

- Scmid T, Zhou J, Brüne B. 2004. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Biology*. 8:423-431
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C<sub>T</sub> method. *Nature protocols*. 3:1101-1108
- Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR. 2000. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:7337-7342
- Senturk E, Manfredi JJ. 2013. p53 and cell cycle effects after DNA damage. p53 protocols. Second Edition. Springer Protocols. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 962
- Sheikh MS, Hollander MC, Fornace AJ. 2000. Role of Gadd45 in apoptosis. *Biochemical Pharmacology*. 59:43-45
- Soengas MS, Alarcón RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, Lowe SW. 1999. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*. 284:156-159
- Sogame N, Kim M, Abrams JM. 2003. *Drosophila* p53 preserves genomic stability by regulating cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 100:4696-4701
- Soñanez-Organis JG, Peregrino-Uriarte AB, Gómez-Jiménez S, López-Zavala A, Forman HJ, Yepiz-Plascencia G. 2009. Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 150:395-405
- Souza-Pinto NC, Harris CC, Bohr VA. 2004. p53 functions in the incorporation step in DNA base excision repair in mouse liver mitochondria. *Oncogene*. 23:6559-6568
- Sun T, Chen C, Wu Y, Zhang S, Cui J, Shen P. 2009. Modeling the role of p53 pulses in DNA damage- induced cell death decision. *BMC Bioinformatics*. 10:190
- Swartz JR. 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Biochemical Engineering*. 12:195-201
- Tan M, Li S, Swaroop M, Guan K, Oberley LW, Sun Y. 1999. Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:12061-12066
- Vaquer-Sunyer R, Duarte CM. 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 105:15452-15457
- Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G<sub>1</sub> arrest in human cancer cells. *Cancer Research*. 55:5187-5190
- Wei J, Zaika E, Zaika A. 2011. p53 family: role of protein isoforms in human cancer. *Journal of Nucleic Acids*. 2012:687359

- Wei WX, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Kontny HU, Yu L, Hollander MC, O'connor PM, Fornace AJ, Harris CC. 1999. GADD45 induction of a G<sub>2</sub>/M cell cycle checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 96:3706-3711
- Wu RSS. 2002. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin.* 45:35-45
- Yu J, Zhang L. 2009. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene.* 27:S71-S83