



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

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ARGININA
CINASA DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus
vannamei* Y SU PARTICIPACIÓN EN LA
FOSFORILACIÓN DE NUCLEÓTIDOS**

por:

José Max Hernández Flores

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

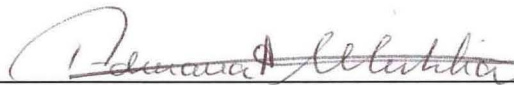
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del Q.B.C. José Max Hernández Flores la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



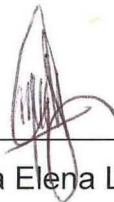
M. en C. Karina Dalila García Orozco
Director de Tesis



Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Asesor



Dra. Adriana Muhlia Almazán
Asesora



M. en C. María Elena Lugo Sánchez
Asesora

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 de 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

Al Conacyt, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por todo el apoyo brindado para concluir mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del proyecto CB-2009-01-131859, "Inhibición del metabolismo de nucleótidos como estrategia contra el virus de la mancha blanca del camarón" y de la beca de estudios de maestría otorgada por CONACyT.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

A la Coordinación de Docencia.

A la M. en C. Karina García Orozco por todo su apoyo, comprensión y paciencia.

A mi comité de tesis, Dra. Adriana Muhlia, Dr. Aldo Arvizu y M. en C. Maria Elena Lugo, por sus acertadas observaciones y consejos.

A todo el grupo del LBMOA, Dr. Rogerio, Eduardo, Chava, Alonso, Alberto e Idania, por la sana amistad y todos sus consejos durante la maestría.

Al DIPM de la universidad de Sonora, En especial a la Dra. Rocío Sugich y al Dr. Refugio Pérez, por su tiempo y dedicación.

DEDICATORIA

A Dios primero que todo.

A mi esposa Leslie Valdez, por ser mi compañera, mi amiga, mi guía.

A mis padres, José Hernández y María de Jesús Flores, gracias por hacerme saber que siempre cuento con ustedes.

A mis suegritos, Jesús Valdez y Guillermina Acosta, por todo el apoyo que nos han brindado.

A mis amigos, compañeros y maestros, gracias a todos.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	2
Importancia económica del camarón blanco	
<i>Litopenaeus vannamei</i>	2
Metabolismo energético en invertebrados.....	3
Enzimas Fosfocinasas.....	6
Arginina cinasa.....	7
Importancia biológica de la arginina cinasa (AC)	
en invertebrados.....	10
Metabolismo de nucleótidos.....	11
Antivirales en la camaronicultura.....	14
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Purificación de la AC del camarón.....	18
Determinación de la estructura y el	
peso molecular de la AC del camarón.....	19

CONTENIDO (Continuación)

	Página
Actividad enzimática de la arginina cinasa.....	19
Determinación de las constantes cinéticas de la AC por calorimetría de titulación isotérmica (ITC).....	22
Determinación de las constantes de disociación de la AC por emisión de fluorescencia.....	23
Monitoreo de la formación de productos de la reacción de la AC con arginina y dTDP mediante HPLC.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Purificación de la AC del camarón.....	26
Determinación de la estructura y el peso molecular de la AC del camarón.....	28
Ensayos Acoplados de Actividad Enzimática de la AC.....	30
Obtención de las constantes cinéticas de la AC del camarón por calorimetría de titulación isotérmica (ITC).....	32
Análisis de espectros de emisión de fluorescencia de la AC del camarón.....	37
Monitoreo de la formación de productos de la reacción de la AC mediante HPLC.....	40
CONCLUSIONES.....	42
RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Mezcla de reacción para el ensayo de actividad enzimática de la AC.....	20
Tabla 2. Componentes de la reacción de actividad enzimática de la AC.....	21
Tabla 3. Actividad enzimática de la AC obtenida con cada sustrato.....	31
Tabla 4. Valores de K_m de la enzima arginina cinasa obtenidas de diferentes especies con sus distintos sustratos.....	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de la AC de <i>Litopenaeus vannamei</i>	9
Figura 2. Síntesis <i>de novo</i> y vía de reciclaje de la timidina trifosfato.....	13
Figura 3. Reacciones acopladas que ocurren durante el ensayo enzimático de la AC.....	20
Figura 4. Cromatograma obtenido de la purificación de AC.....	27
Figura 5. Cromatograma de AC obtenido por filtración en gel.....	29
Figura 6. Actividad enzimática de la AC con los distintos sustratos.....	31
Figura 7. Termograma obtenido por ITC con el sustrato ATP.....	33
Figura 8. Termograma obtenido por ITC con el sustrato arginina.....	34
Figura 9. Termograma obtenido por ITC con el sustrato dTDP.....	35
Figura 10. Espectros de emisión de fluorescencia de la AC de camarón.....	38
Figura 11. Análisis de regresión no lineal a partir de los datos de fluorescencia al titular AC con el sustrato dTDP.....	39
Figura 12. Cromatograma de la reacción AC-Arg obtenida por HPLC.....	41
Figura 13. Cromatograma de la reacción AC-dTDP obtenida por HPLC.....	41

RESUMEN

La camaronicultura es una de las actividades con mayor crecimiento en los últimos años, esto debido a la gran demanda que existe a nivel mundial. En México dicha actividad ha tenido un desarrollo exponencial, con un gran impacto social y económico. Por tal motivo es importante realizar estudios encaminados a conocer los procesos metabólicos del camarón que permitan conocer la biología y desarrollar nuevas técnicas de tratamiento y prevención de enfermedades que afectan al camarón.

La arginina cinasa (AC) es una proteína de 40 kDa que cataliza la transfosforilación reversible dependiente de magnesio entre la arginina (arg)/ fosfoarginina (PArg) y el ATP/ADP, resultando en una regeneración de éste último durante el aumento de la actividad celular. Esta enzima es de gran importancia biológica, ya que la fosfoarginina es la forma de almacenamiento y movilización de energía química en el músculo de los invertebrados marinos como los crustáceos.

En experimentos previos se ha visto que la AC del camarón podría tener un papel importante en la fosforilación de los precursores de timina, además de la función anteriormente mencionada. Debido a que no existen estudios que documenten esta bifuncionalidad en dicha enzima, este trabajo propone demostrar la participación de la AC en la fosforilación de los desoxinucleótidos de timina dTMP y dTDP, ya que se presume, puede tener un papel clave en la síntesis del ADN del camarón, así como participar en la síntesis del ADN viral que afecte al mismo.

Se purificó AC a partir del músculo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, para realizar ensayos de actividad por métodos espectrofotométricos

con su sustrato cognado, la arginina, así como con otros sustratos, como dTMP y dTDP. Se logró apreciar la actividad de la enzima con dichos compuestos con excepción del dTMP, por lo que se concluyó que la AC tiene una actividad cinco veces mayor con la arginina, que con el dTDP.

Se determinaron las constantes cinéticas y fisicoquímicas por medio de calorimetría de titulación isotérmica (ITC), con cada uno de los sustratos (arginina, dTDP y ATP), encontrándose una mayor afinidad por el ATP, lo que sugiere una unión secuencial de dichos compuestos en el mecanismo de reacción.

Posteriormente, se hicieron ensayos de fluorescencia, donde se pudo apreciar un efecto de apagamiento (*quenching*) al titular la enzima con el sustrato dTDP, mientras que con los otros dos sustratos (arginina y ATP) no hubo cambios apreciables, lo cual sugiere que la enzima tiene un sitio de unión diferente para cada sustrato. Finalmente se monitoreó la formación de los productos de cada reacción, fosfoarginina y dTTP por medio de HPLC y se corroboró cualitativamente la síntesis de estos compuestos.

Palabras clave: Arginina cinasa, fosforilación, dTDP

ABSTRACT

Shrimp farming is one of the fastest growing activities in recent years, this due to the great demand worldwide. In Mexico such activity has had an exponential development, with great social and economic impact. For this reason it is important to conduct studies aimed at understanding the metabolic processes that reveal shrimp biology and develop new techniques for treatment and prevention of diseases affecting the shrimp.

Arginine kinase (AC) is a 40 kDa protein which catalyzes magnesium-dependent reversible transphosphorylation between arginine (arg) / phosphoarginine (PARG) and ATP / ADP, resulting in regeneration of the latter during increased activity cell. This enzyme is of great biological importance, as is the way phosphoarginine storage and mobilization of chemical energy in the muscle of marine invertebrates such as crustaceans.

In previous experiments we have seen that the shrimp AC could have an important role in the phosphorylation of thymine precursors, in addition to the aforementioned function. Because there are no studies documenting this bifunctionality in this enzyme, this paper aims to demonstrate the involvement of AC in the phosphorylation of thymine deoxynucleotides dTMP and dTDP, as it is presumed, can play a key role in DNA synthesis shrimp and participate in viral DNA synthesis affecting the same.

AC was purified from muscle of white shrimp *Litopenaeus vannamei*, for testing activity by spectrophotometric methods with its cognate substrate, arginine, as well as other substrates such as dTDP and dTMP. Enzyme activity was observed with such compounds except dTMP, therefore concluded that the AC has a five times higher activity with arginine than with the dTDP.

Kinetic constants were determined by physicochemical and isothermal titration calorimetry (ITC), with each of the substrates (arginine, dTDP and ATP), being a greater affinity for ATP, suggesting a sequential binding of said compounds on the reaction mechanism.

Subsequently, tests were made with fluorescence technique, where it was observed an effect of quenching with the substrate dTDP, while the other two substrates (ATP and arginine) has not changed significantly, which suggests that the enzyme has a different binding site for each substrate. Finally formation for each reaction product (dTTP and phosphoarginine) was monitored and qualitatively confirmed the synthesis of these compounds by HPLC.

Key words: Arginine kinase, phosphorylation, dTDP.

INTRODUCCIÓN

La industria camaronícola en México es una de las actividades económicas de mayor rentabilidad y crecimiento en los últimos años, esto debido a la gran demanda que existe en países como Estados Unidos y Japón, que son grandes consumidores de este producto. Lo anterior ha llevado a un crecimiento explosivo en este sector, registrándose una producción alrededor de las 20 000 toneladas. Sin embargo, esta actividad puede verse gravemente afectada por la aparición y diseminación de patógenos (FAO, 2010).

La arginina cinasa (AC, E.C. 2.7.3.3.), es una enzima que cataliza la transfosforilación reversible magnesio-dependiente entre la fosfoarginina (PArg) y el ATP, resultando en una regeneración de éste último durante el aumento de la actividad celular. También se sabe que en el camarón, esta enzima tiene un papel crítico en el almacenamiento y movilización de energía, así como en la regulación de la disponibilidad de ATP (García-Orozco *et al.*, 2007).

Diversos estudios han mostrado una expresión diferencial del gen de AC en músculo de camarones sometidos a diversos factores de estrés como infecciones por patógenos o hipoxia (Astrofsky *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006). Por lo que elucidar la funcionalidad de esta enzima y su participación en más de un proceso fisiológico proporcionaría información muy importante acerca del metabolismo del camarón y como responde a un factor de estrés.

A su vez con el entendimiento de las rutas metabólicas como la síntesis de los ácidos nucleicos, se podrían encontrar nuevos enfoques para el desarrollo de técnicas eficaces de tratamiento y prevención de enfermedades. Un claro ejemplo de esto es el diseño de fármacos que inhiben específicamente enzimas clave de organismos patógenos, como los virus, evitando así, la replicación y diseminación de estos (Arvizu-Flores, 2009).

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Importancia Económica del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*

La industria de la camaronicultura ha incrementado potencialmente, destacándose como una actividad de gran crecimiento y expansión a nivel mundial. Los volúmenes alcanzados por esta industria en el mundo rebasan los 60 millones de toneladas, equivalente a más del 40% de la producción total de este crustáceo (Córdova, 2002; FAO 2010). El valor presente de las exportaciones anuales de camarón supera los 10 mil millones de dólares, equivalentes al 16% de todas las exportaciones pesqueras (FAO, 2010).

Hoy en día la mayoría de las industrias pesqueras a nivel mundial están experimentando su máxima producción acercándose críticamente a la sobre explotación, mientras que la producción de camarón puede seguir en aumento con el establecimiento de nuevas granjas productoras. La camaronicultura puede seguir en constante crecimiento a pesar de todos los factores adversos y los nuevos desafíos que experimentan los acuacultores (FAO, 2010). Actualmente los países que se destacan por sus altos niveles de producción de camarón cultivado son China, Tailandia, Indonesia, Vietnam, Malasia e India en el hemisferio oriental, mientras que en el occidental están Ecuador, México, Brasil y Chile (Martínez-Córdova *et al.*, 2009; FAO 2010).

En México el cultivo de camarón se inició desde 1985, incrementándose de manera progresiva en los últimos años. En el ámbito mundial ocupa el sexto lugar en producción, teniendo una producción de más de 105 000 toneladas y una derrama económica significativa, siendo los estados de Sinaloa, Sonora, Baja California Sur, Nayarit y Tamaulipas los principales productores. El estado

de Sinaloa se ubica como líder con una cosecha anual de 50 mil toneladas en 2011, equivalente a la mitad de la producción total del país (Alatorre, 1998; Córdova, 2002; Martínez-Córdova *et al.*, 2009; CONAPESCA 2012).

Debido al estancamiento de la producción pesquera en México, la solución para alimentar una población creciente recae en la acuicultura, donde la investigación se encarga del desarrollo de tecnología y reproducción que luego transfieren a productores del sector social y comercial. Por esto es prioritario el resolver los problemas que afectan e influyen de manera negativa en el desarrollo de este sector, como lo es la infección del camarón por el virus de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés), vibriosis, hepatopancreatitis necrotizante (NHP), entre otras (Gomez-Gil, 2002; Molina-Ocampo *et al.*, 2011).

Metabolismo Energético en Invertebrados

Una célula viva se puede describir termodinámicamente como un sistema isotérmico abierto el cual puede subsistir y replicarse por medio de una serie de reacciones orgánicas relacionadas que son promovidas por catalizadores que la misma célula sintetiza. Todas estas reacciones consecutivas en conjunto son llamadas metabolismo. Cada participante en una reacción metabólica, ya sea sustrato, intermediario o producto es llamado metabolito (Mathews, 2000).

El metabolismo puede ser dividido en dos grandes categorías: anabolismo, que son todos los procesos que se encargan de formar y sintetizar complejas moléculas orgánicas, y catabolismo, que es la parte del metabolismo que se encarga de degradar sustancias complejas, con la respectiva formación de energía. Esta distinción puede ser confusa ya que muchos sustratos pertenecientes a las vías anabólicas forman parte como intermediarios en procesos catabólicos (Mathews, 2000).

Se le llama metabolismo energético, a todas las reacciones y vías metabólicas involucradas en la generación y almacenamiento de energía dentro

de una célula. Las tres rutas metabólicas más importantes son: glucólisis, ciclo de Krebs y transporte de electrones acoplado a la fosforilación oxidativa. Sustancialmente estas vías son las mismas en un gran número de especies, y representan la transferencia de una gran cantidad de masa y energía dentro de la célula y cuantitativamente son las principales rutas (Mathews, 2000).

El término invertebrado se refiere a todas las especies animales que carecen de columna vertebral y esqueleto óseo. Aunque invertebrado no es un término científico que englobe algún rango taxonómico, este grupo incluye especies representadas por alrededor de 30 *phyla* e incluye los primeros animales que habitaron la tierra de manera exitosa. Este grupo está compuesto por un gran número de *phyla*, tales como anélidos, moluscos, esponjas, cnidarios, equinodermos y todas las especies del *phylum Arthropoda*, el cual es el más grande entre los invertebrados y comprende a los insectos, arácnidos y crustáceos (Martínez-Cruz *et al.*, 2012).

Desde que estos organismos aparecieron por primera vez, han jugado un papel ecológico muy importante, ya que son constituyentes clave en muchas cadenas tróficas. Estos ocupan virtualmente cada ecosistema disponible sobre la tierra, los cuales varían notablemente en temperatura, concentración de oxígeno, disponibilidad y calidad del alimento. También, muchas especies ocupan papeles altamente específicos e importantes en la naturaleza, como polinizadores, parásitos o vectores de enfermedades parasitarias afectando al humano y a la salud de los animales (Martínez-Cruz *et al.*, 2012).

Es clara la habilidad que tienen los organismos invertebrados de habitar casi cualquier ecosistema, esto debido a los diversos arreglos morfológicos y estrategias en el comportamiento que tienen para obtener nutrientes del ambiente. Esto otorga a este tipo de organismos la habilidad de solventar sus demandas energéticas. Desde los “chupadores de sangre” tales como los mosquitos, nemátodos intestinales y sanguijuelas, hasta pequeños organismos marinos que se alimentan de plancton, tales como los cnidarios y los bivalvos marinos, todas estas especies enfrentan cambios en la disponibilidad de

alimento a través de su ciclo de vida, lo cual afecta sus reservas energéticas y sus rangos de crecimiento (Peck, 2002; Popova-Butler y Dean, 2009).

A lo largo de la vida, muchas especies de invertebrados se enfrentan a grandes demandas de energía durante el trabajo extremo, y un claro ejemplo se puede encontrar en el vuelo de los insectos, el cual es considerado como uno de los procesos de locomoción animal más demandantes de energía (Harrison y Roberts, 2000). Además, este es un proceso aeróbico que requiere un permanente suministro de oxígeno y depende directamente de la producción de ATP a nivel celular. El alto costo energético de este proceso está relacionado con la elevada frecuencia en la contracción de los músculos de vuelo del insecto (Vishnudas y Vigoreaux, 2006).

La existencia de moléculas de alta energía en el músculo de organismos vertebrados durante el ejercicio tales como la fosfocreatina ha sido muy bien documentado (Jubrias *et al.*, 2001); sin embargo, en el caso de los invertebrados, la presencia de fosfo-cinasas que catalizan la síntesis de estas moléculas fosforiladas de alta energía no está ampliamente distribuida (Ellington y Hines, 1991). Algunas especies voladoras son capaces de satisfacer la demanda energética debido a una adaptación fisiológica que consiste en la proximidad de las mitocondrias a las miofibras del músculo, lo que facilita la exportación de nucleótidos ricos en energía, tales como el ATP a las miofibras (Vishnudas y Vigoreaux, 2006).

Otro *phylum* dentro de los invertebrados, como el de los crustáceos, son capaces de sintetizar un fosfógeno diferente de la fosfocreatina de los vertebrados, la fosfoarginina. Este es un fosfógeno de L-arginina que se encuentra en el músculo de camarones y cangrejos, siendo ésta la forma de almacenar energía química en estos tejidos para producir rápidamente ATP cuando éste es requerido (Wegener, 1996; Kotlyar *et al.*, 2000). La enzima responsable de la síntesis de fosfoarginina, a partir de ATP y L-arginina en los invertebrados es la arginina cinasa, la cual es también considerada una de las proteínas con mayor alergenicidad para el humano, siendo responsable de la alergia al camarón en individuos sensibles (García-Orozco *et al.*, 2007).

La gran mayoría de los animales que cuentan con niveles altos de energía en sus cuerpos presentan rápido crecimiento, un adecuado almacén de energía, estrategias de reproducción efectivas con descendientes viables y una mayor esperanza de vida. Sin embargo, bajos niveles de energía en un sistema biológico resulta en una expresión genética disminuida, bajos rangos de supervivencia y una reducida tasa metabólica. Además la recuperación del óptimo funcionamiento de estos mecanismos fisiológicos depende directamente de las condiciones ambientales, las cuales facilitan la regeneración de los almacenes de energía (Stuart y Brown, 2006).

En su hábitat natural, además de lidiar con los factores ambientales, muchas especies de invertebrados deben llevar a cabo durante su ciclo de vida diversos procesos fisiológicos endógenos, tales como la muda, ayuno, reproducción, metamorfosis, entre otros. Estos procesos implican un gasto energético importante, causando una baja en los suministros de energía, lo cual reduce la capacidad de estos organismos de alcanzar la etapa adulta. Debido a lo anterior, estos organismos deben encontrar la manera de adaptarse a las exigencias de su medio y poder así, satisfacer sus demandas energéticas (Hochachka y Somero, 2002).

Enzimas Fosfocinasas

Las fosfocinasas son enzimas que catalizan la transferencia reversible de grupos fosforilados de alta energía como el ATP a compuestos que contienen guanidina, como la creatina, glicosiamina, taurociamina y arginina, por lo que tienen un papel clave en la producción y uso de energía en los organismos (Suzuki *et al.*, 1997). En la siguiente reacción general la guanidina fosforilada es referida como fosfógeno:



Según Suzuki *et al.* (1997), el único fosfógeno en vertebrados es la fosfocreatina, y la correspondiente fosfoquinasas es la creatina cinasa (CK) por sus siglas en inglés. Existen tres isoformas de esta enzima: creatina cinasa muscular (M-CK), cerebral (B-CK) y mitocondrial (Mi-CK).

En los invertebrados se encuentran al menos seis tipos únicos de fosfógenos (fosfoarginina, fosfoglicosiamina, fosfotaurociamina, fosfolombricina, fosfohipotaurociamina y fosfo-ofelina) y con ello también han sido identificadas las correspondientes cinasas para los primeras cuatro, arginina cinasa (AC), glicosiamina cinasa (GC), taurociamina cinasa y lombricina cinasa (Suzuki *et al.*, 1997)

De igual manera, Strong y Ellington (1995) han reportado diferentes isoformas de AC en artrópodos. La similitud entre las diferentes secuencias de aminoácidos en las fosfoquinasas sugiere que han evolucionado de un origen común y, aunque la AC es la más ampliamente distribuida entre los invertebrados, no necesariamente significa que es la más ancestral (Suzuki *et al.* 1997).

Arginina Cinasa

Yao *et al.* (2005), reportaron una masa molecular de la AC del camarón chino *Fenneropenaeus chinensis* de 40,129.73 Da codificados en un cADN de 1184 pb. A su vez, algunos trabajos han reportado secuencias de cADN de la AC del camarón tigre *Penaeus monodon* y del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, ambos de 1.4 kpb que codifican a una proteína de 356 aminoácidos (Yu *et al.*, 2003; García-Orozco *et al.*, 2007).

Estudios realizados por Zhou *et al.* (1998), reportan la estructura molecular de arginina cinasa (EC 2.7.3.3) de cangrejo cacerola (*Limulus polyphemus*), la cual está conformada en su dominio N-terminal por una pequeña α -hélice seguida por un dominio C-terminal más largo (residuos 112-357). También contiene ocho β -plegados antiparalelos, flanqueados por siete α -hélices. Además durante el estado de transición se ha confirmado un ángulo de

torsión ADP glicosídico de 46° y una coordinación octaédrica del Mg^{2+} , que se encuentra unido por enlaces sencillos entre los oxígenos de los fosfatos α , β y γ .

Zhou *et al.* (1998), también revelaron información sobre la estructura y composición de la región que conforma el sitio activo de la arginina cinasa del cangrejo cacerola (*Limulus polyphemus*). Su estudio indicó que en el momento de transición, las posiciones de los reactantes son únicamente condicionadas por las interacciones naturales con la enzima. Los grupos fosforilados del ATP son estabilizados mediante enlaces con el Mg^{2+} y cinco argininas (Arg) en las posiciones 124, 126, 229, 280 y 309 de la secuencia polipeptídica.

Estos mismos autores encontraron que los dos glutamatos (Glu) en las posiciones 225 y 314, estabilizan a la guanidina del sustrato. Igualmente, señalan la existencia de interacciones entre los grupos amino y carboxilo del sustrato con los residuos (63 al 68) de la enzima y proponen que la cisteína en la posición 271 puede aumentar la actividad catalítica de la misma. En la Figura 1 se muestra la estructura de AC de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (apoenzima).

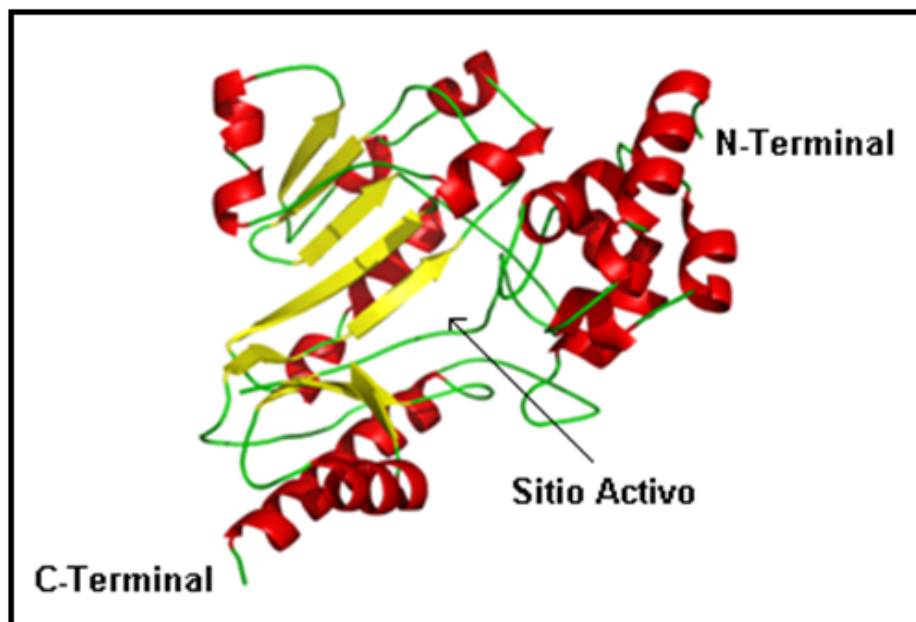
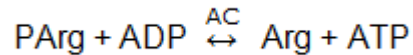


Figura 1. Diagrama de listones de la AC del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tomado de la base de datos. PDB:4AM1.

Importancia Biológica de Arginina Cinasa en Invertebrados

En los crustáceos, la arginina cinasa cataliza la transfosforilación reversible magnesio dependiente entre la arginina fosfato (PArg) y el ADP, resultando en una regeneración de éste último durante el aumento de la actividad celular (García-Orozco *et al.*, 2007).



Esta enzima representa un sistema análogo a la creatina cinasa de vertebrados. Fosfógenos tales como fosfoarginina y fosfocreatina, juegan un papel crítico como moléculas de almacenamiento de energía, ya que el fosfato de alta energía puede ser rápidamente transferido al ADP, cuando el ATP es requerido. Los fosfógenos apoyan requerimientos rápidos de energía en la actividad de la célula, hasta eventos catabólicos como la glucólisis y la fosforilación oxidativa (García-Orozco *et al.*, 2007).

También se ha observado que en organismos como *Trypanosoma cruzi*, la AC se sobreexpresa para aumentar la sobrevivencia a estrés por cambios de pH y a la falta de nutrientes, donde parece tener un rol crítico en la regulación de las reservas energéticas y el crecimiento celular (Fernández *et al.*, 2007). Otros procesos donde se puede observar la sobreexpresión de AC en el camarón, son la diferenciación sexual (Lo *et al.*, 2007), el estrés por hipoxia (Jiang *et al.*, 2009), así como el efecto que provocan las infecciones causadas por diversos patógenos como el virus de cabeza amarilla (Rattanarojpong *et al.*, 2007), el virus del síndrome de la mancha blanca (Wang *et al.*, 2006), y algunas bacterias como *Vibrio harveyi* (Soomboonwiwat *et al.*, 2010).

En dichos estudios se puede apreciar como la AC del camarón aumenta su expresión génica, lo cual se atribuye principalmente a la necesidad energética del organismo infectado. Sin embargo, en estudios recientes se ha visto que la AC puede llevar a cabo la fosforilación de precursores de desoxitimidina, por lo que podría tener un papel importante en la síntesis de ADN, tanto del organismo hospedero como de los patógenos involucrados.

Metabolismo de Nucleótidos

Los nucleótidos tienen una gran variedad de funciones dentro de una célula. Estos son los precursores del ADN y el ARN y son acarreadores esenciales de energía química, el cual es el papel primario del ATP y en menor medida del GTP. Son componentes de los cofactores NAD, FAD, S-adenosilmetionina y coenzima A, así como algunos intermediarios biosintéticos tales como la UDP-glucosa y el CDP-diacilglicerol. Otros funcionan como mensajeros celulares secundarios como el cAMP y el cGMP (Lenninger, 2000).

Los nucleótidos se dividen en purinas y pirimidinas los cuales se diferencian principalmente en el número de anillos de carbono-nitrógeno presentes en su estructura siendo dos anillos para las purinas (adenina y guanina) y uno solo para las pirimidinas (timina, uracilo y citocina). Existen dos tipos de rutas en la síntesis de nucleótidos: *de novo* y el de reciclaje. La síntesis *de novo* utiliza precursores metabólicos: aminoácidos, ribosa-5-fosfato, CO₂ y NH₃, mientras que las vías de reciclaje utiliza bases libres y nucleósidos liberados en la degradación de ácidos nucleicos. Ambos tipos son de gran importancia en el metabolismo celular (Lenninger, 2000).

Existen varios precursores importantes que son compartidos en las vías de síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas. Un ejemplo es el fosforibosil pirofosfato (PRPP), el cual es primordial en ambas vías ya que cede la estructura de ribosa para formar el producto nucleotídico final. Por otro lado los aminoácidos son importantes precursores de estos compuestos, como lo es la glicina para las purinas, el aspartato para las pirimidinas y la glutamina como principal fuente de grupos amino (Lenninger, 2000).

Existe otra característica que merece ser mencionada, donde se ha visto que el "pool" de nucleótidos diferentes de ATP presente en la célula es demasiado pequeño, alrededor del 1% o menos de la cantidad requerida para llevar a cabo la síntesis de ADN. Por lo que las células deben generar continuamente nucleótidos durante la síntesis de ácidos nucleicos, y en algunos

casos esto limita los niveles de replicación y transcripción del ADN (Lenninger, 2000).

En este trabajo se hará énfasis en la síntesis *de novo* y la vía de reciclaje de la timidina trifosfato (TTP), debido a que actualmente en el grupo de investigación del laboratorio de biología molecular de organismos acuáticos del CIAD unidad Hermosillo, se están estudiando las diferentes enzimas involucradas en dichos procesos.

En la figura 2 se muestra la síntesis *de novo* del TTP del camarón, la cual empieza con la desaminación de los desoxinucleótidos de citosina (dCTP y dCMP), para la formación de desoxiuracil monofosfato (dUMP). Posteriormente este compuesto se metila por acción de la timidilato sintasa, para formar timidina monofosfato (TMP) (Arvizu-Flores, 2006; Hernández-Flores, 2010). Una vez hecho esto, la enzima timidilato cinasa (TMK), que es altamente específica, fosforila al TMP para formar TDP. Finalmente este compuesto es trifosforilado por enzimas inespecíficas llamadas nucleótido difosfato cinasas (NDK), que dan como resultado la formación del TTP (Guevara-Hernández *et al.*, 2012; Quintero-Reyes *et al.*, 2012)

Por otro lado, la vía de reciclaje consiste en la recuperación de timina como base nitrogenada, proveniente de la degradación del ADN, a la cual se le une la ribosa y formar así el nucleósido timidina, el cual será el sustrato de la enzima timidina cinasa (TK) para la síntesis de TMP y posteriormente ser di- y tri- fosforilado por las enzimas anteriormente mencionadas (Lenninger, 2000).

Todos los organismos, desde los más sencillos como los virus, hasta los más complejos como las plantas, su existencia se rige en gran medida de la correcta síntesis de los ácidos nucleicos. Debido a esto, todas las enzimas que están relacionadas con este proceso, han sido el blanco para el diseño de fármacos que inhiban la función de estas moléculas, interviniendo en la replicación del ADN, y evitar así, el desarrollo de cualquier enfermedad que presente una proliferación celular descontrolada, como el cáncer o cualquier mecanismo infeccioso (Lenninger, 2000).

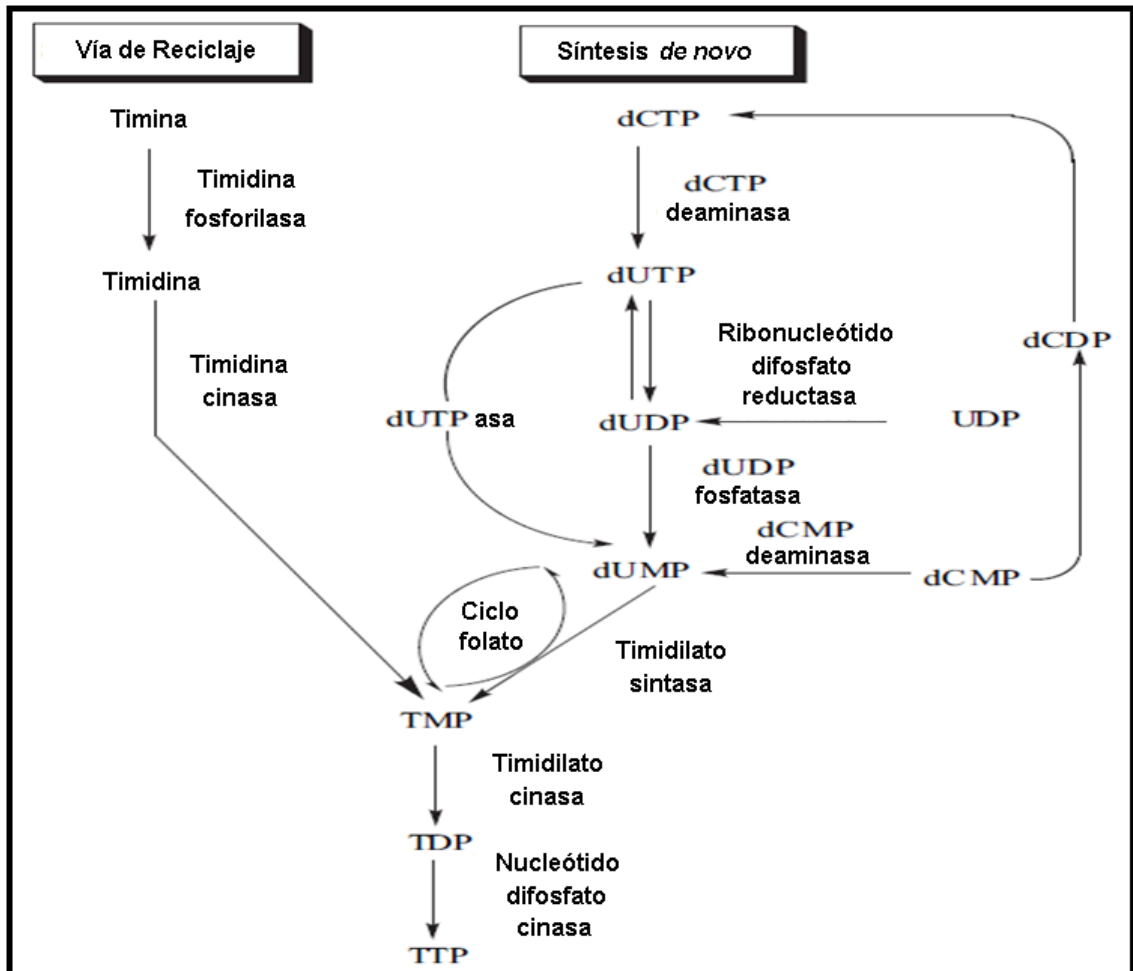


Figura 2. Síntesis *de novo* y vía de reciclaje de la timidina trifosfato (TTP). Tomado de Lavie y Konrad (2004).

Antivirales en la Camaronicultura

Existen diversos factores que impiden el correcto desarrollo de la camaronicultura, comprometiendo económicamente a las empresas que se dedican a esta actividad. Uno de los principales problemas que afectan hoy en día esta industria, es la diseminación y propagación de enfermedades. Estas pueden ser causadas por un gran número de patógenos diferentes (virus, bacterias y hongos), haciendo énfasis en las enfermedades de origen viral (Li *et al.*, 2006).

Debido a lo anterior, la importancia del estudio de la ciencia básica y la biología de los organismos, radica en la detección de potenciales proteínas blanco, para el posterior diseño de fármacos que impidan el desarrollo de las enfermedades. Muchas de las medidas de control de los virus son basadas en el uso de proteínas estructurales, ya que estas desempeñan funciones muy importantes en el proceso infectivo, como lo es la adhesión y la penetración del virión al interior de la célula hospedera, por lo que se ha buscado inhibir la función de estas moléculas (Li *et al.*, 2006).

Muchos estudios revelan que la inyección de proteínas recombinantes de la envoltura viral o de anticuerpos específicos de dichas proteínas a los camarones, producen un aumento en la supervivencia de estos. Debido a que no se ha demostrado la existencia de ningún tipo de inmunidad adaptativa en estos organismos, se ha propuesto un mecanismo de competencia, es decir, las proteínas recombinantes y los anticuerpos compiten con las proteínas estructurales del virus por los receptores de las células diana, lo que trae como consecuencia una disminución de la infección viral (Witteveldt *et al.*, 2004; Vaseeharan *et al.*, 2006).

Otra estrategia antiviral es el uso de ARN de interferencia, que se basa en el bloqueo de la expresión genética del virus, por medio del silenciamiento de ciertos genes. Al producir la degradación del ARN mensajero del gen de interés, se logra un desbalance en la síntesis de proteínas, reduciendo la eficiencia de la replicación viral (Robalino *et al.*, 2005).

Otra forma de atacar las infecciones causadas por virus, es el uso de análogos nucleosídicos (AN), los cuales fueron identificados como moléculas que podrían jugar un papel importante en la batería de drogas utilizadas en el tratamiento del cáncer. Se creía que estos eran anti-metabolitos que iban a interferir con el crecimiento de tumores, ya que funcionan como terminadores de la replicación del ADN (Mul *et al.*, 1989).

Durante las últimas dos décadas, los AN antivirales se han vuelto cruciales en el combate de múltiples infecciones de origen viral, tales como el virus del herpes (HSV), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y hepatitis B (HBV). Los AN pueden encontrarse de dos formas, fosforilados y no fosforilados, donde los segundos mencionados fueron los primeros en atender la demanda contra los virus. El DHPA (S)-9-(2',3'-dihidroxipropil) adenina es un análogo del nucleótido adenina y el AN no fosforilado más utilizado en la actualidad. Este compuesto ha sido la base para la elaboración de AN de nueva generación, y un ejemplo de esto es el Aciclovir, un análogo no fosforilado del nucleótido guanosina, que es utilizado para combatir el virus del herpes (De Clercq *et al.*, 2003).

Por otro lado, un ejemplo de los AN fosforilados es el Cidofovir, el cual es un compuesto que tiene un grupo fosfato en su cadena lateral, lo que le confiere una mayor estabilidad y biodisponibilidad al momento de entrar en competencia con su análogo citocina (De Clercq *et al.*, 2003). El mecanismo de acción de los AN es el de ser terminadores de la replicación del ADN viral, específicamente están dirigidos hacia la ADN polimerasa del virus (De Clercq y Holy, 2005).

Los AN no fosforilados presentan un gran problema, ya que para poder ejercer su función como terminadores, primeramente deben de ser monofosforilados, de lo cual se encarga la enzima timidina cinasa (TK) perteneciente al proteoma del virus. Dicho paso es muy específico, pues es posible que la TK no se encuentre disponible o que el virus no produzca la cantidad necesaria de esta enzima. Una vez que el AN es monofosforilado, el siguiente paso es ser di- y tri- fosforilado por las cinasas del organismo infectado. Estos últimos pasos ya no son específicos debido a la alta

disponibilidad de este tipo de enzimas en el hospedero. Al momento que dichos compuestos son trifosforilados, estos compiten con los nucleótidos del organismo, para entrar en la reacción de polimerización y poder ejercer su mecanismo de acción (De Clercq y Holy, 2005; Öberg *et al.*, 2006).

El inconveniente que genera el primer paso de fosforilación en los AN no fosforilados se empezó a solucionar con la aparición de los AN fosforilados, los cuales evitan el primer paso de fosforilación y pasan directamente a ser di- y trifosforilados por las cinasas del organismo hospedero, por lo que aumenta la efectividad de dichos fármacos (De Clercq *et al.*, 2007).

Este trabajo pretende ubicar a la arginina cinasa como una enzima blanco para el diseño de fármacos antivirales, ya que esta proteína es sobreexpresada en procesos infecciosos, propiciando la síntesis descontrolada de ácidos nucleicos, incluyendo los del patógeno. Por lo que, al utilizar este tipo de compuestos, estos podrían ser fosforilados específicamente por la enzima AC, para posteriormente formar parte del ADN viral ejerciendo su acción de frenar la replicación, evitando así, el desarrollo de la enfermedad.

Hoy en día se están estudiando un gran número de enzimas y moléculas que están involucradas en el proceso de replicación de los virus y su interacción con los organismos hospederos, entre ellas la arginina cinasa de camarón (Gómez-Gil., 2002). Existen diversos trabajos donde se han caracterizado bioquímica, biofísica y estructuralmente dichas moléculas, encontrándose resultados favorables y prometedores (Arvizu-Flores., 2009). Sin embargo, esto es solo una parte del reto, el resto se encuentra en aplicar todo el conocimiento generado y desarrollar tecnologías aplicables en campo, ya que la implementación de las estrategias antes mencionadas es muy poco viable debido a los altos costos que implicaría.

HIPÓTESIS

La enzima arginina cinasa de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es capaz de fosforilar a los precursores mono y difosforados de timina (dTMP y dTDP), por lo que podría tener un papel importante en la síntesis del ADN.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar la participación de la enzima arginina cinasa del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en la segunda y tercera fosforilación de precursores de timina mono y difosforados.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificar arginina cinasa a partir del músculo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Demostrar por medio de cromatografía de filtración en gel si la enzima cuenta con estructura cuaternaria.
- Evaluar la actividad de AC utilizando como sustratos desoxitimidina monofosfato (dTMP) y difosfato (dTDP).
- Determinar las constantes de unión, K_m y K_d de la enzima AC para arginina y dTDP por calorimetría de titulación isotérmica y emisión de fluorescencia.
- Demostrar por medio de HPLC la formación de fosfoarginina y dTTP durante la reacción enzimática catalizada por la AC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación de Arginina Cinasa

Para purificar la enzima se utilizó la metodología reportada por García-Orozco *et al.*, (2007). Se pesaron 5 g de músculo de camarón y se homogenizaron con 50 mL de buffer de extracción a 4°C (Tris-HCl 0.1 M pH 8, EDTA 1 mM, NaN₃ 5 µM, PMSF 25 µM, 2-mercaptoetanol (2-ME) 10 mM), utilizando un homogenizador Polytron (Glenn Mills Co., Clifton, N. J., USA) a 30,000 rpm, 3 veces de 10 segundos c/u en baño de hielo. El homogenizado se agitó en placa durante 16 h a 4°C y se centrifugó a 12,000 g durante 30 min a 4°C en una centrifuga Sorvall RC 25 C (Thermo scientific, USA).

Posteriormente, el sobrenadante resultante se sometió a saturaciones seriadas con sulfato de amonio, recuperando las fracciones del 70 al 90%. El precipitado obtenido se resuspendió en 500 mL buffer de corrida (buffer A, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0.1 mM, 2-ME 10 mM) y se dializó durante 24 h contra 4 recambios de 500 mL de buffer A.

La purificación de AC se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando un cromatógrafo ÄKTA purifier (GE Healthcare, Suecia). Las muestras clarificadas por centrifugación y equilibradas por diálisis con buffer A, se cargaron a una columna de Q-sepharosa Hi-Trap de 5 mL (GE Healthcare, N.Y., USA) previamente equilibrada con buffer A. La elución de la proteína unida a la matriz se realizó con un gradiente del 0 al 100% de NaCl 1 M en buffer A recolectándose fracciones de 5 mL.

Para determinar la pureza, las fracciones obtenidas fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% bajo condiciones

desnaturalizantes y reductoras (Laemmli, 1970). Después se utilizó la tinción con nitrato de plata bajo el criterio de observar una banda única en el gel (Switzer, 1979). Las fracciones conteniendo la proteína pura se juntaron y guardaron en el refrigerador a 4°C hasta su uso. Cada muestra fue preparada añadiendo buffer carga 2X conteniendo SDS y 2-ME, para después calentarlas a 95°C por 10 min para posteriormente cargarlas al gel y aplicar 15 mA por cada gel en una cámara electroforética Miniprotean 3 (BioRad), usando buffer cámara (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1 %).

Determinación de la Estructura y el Peso Molecular de la AC.

Para determinar el peso molecular de AC y su estructura cuaternaria, se llevó a cabo una cromatografía de filtración en gel con una columna Superdex 200 (GE Healthcare). La columna fue previamente equilibrada con 3 volúmenes de columna con buffer de corrida (fosfato de sodio 20 mM pH 7.5, NaCl 200 mM) y posteriormente calibrada con estándares de peso molecular, albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (44 kDa) e inhibidor de tripsina de soya (21.5 kDa) preparados en el buffer de corrida, para después inyectar la muestra pura, previamente dializada.

Actividad Enzimática de la Arginina Cinasa

La actividad enzimática fue medida mediante un ensayo acoplado descrito por Blethen, (1970) el cual se basa en la oxidación del NADH. En la primera reacción la L-arginina es fosforilada por la actividad de la enzima AC formando el fosfógeno y ADP. Después en la segunda reacción el ADP se fosforila nuevamente formando ATP por la acción de la piruvato cinasa (PK) en presencia de fosfoenolpiruvato y en la tercera reacción el piruvato es reducido a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) (Figura 3). La tasa de oxidación de NADH se midió espectrofotométricamente a 340 nm.

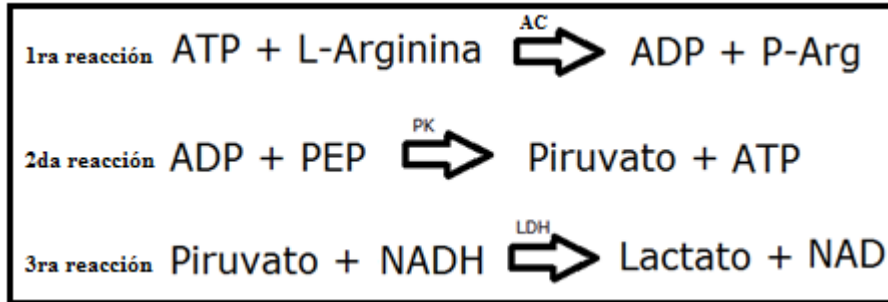


Figura 3. Reacciones acopladas que ocurren durante el ensayo enzimático. (Blethen, 1970).

Tabla 1. Mezcla de reacción para el ensayo de actividad enzimática.

COMPONENTE	Volumen (mL)
Buffer (glicina 250 mM, pH 8.6)	9.75
MgSO ₄ 200 mM	1.0
KCl 2 M	1.0
Fosfoenolpiruvato (PEP) 300 mM	1.0
ATP 200 mM	0.5
*NADH 7.5 mM	0.25
Vol. total	13.5

*Se disolvió previamente en buffer de glicina 250 mM, pH 8.6

La Tabla 1 muestra la mezcla de la reacción de actividad de la AC del camarón. En una celda de cuarzo, se agregaron: 1.35 mL de mezcla de reacción, 50 µL (20 U) de las enzimas PK/LDH (SIGMA-ALDRICH) previamente diluidas en buffer de glicina 100 mM, 2-ME 10 mM, y 50 µL de L-arginina 500 mM disuelta en agua mQ. Esta mezcla se monitoreó a A_{340nm} a 30°C hasta que la lectura permaneció estable. Inmediatamente después se agregaron 50 µL de la muestra de AC y se leyó la disminución de Abs a 340 nm, debido a la oxidación del NADH. En el mismo experimento se realizó un blanco con el buffer de la enzima (buffer de glicina 100 mM, 2-ME10 mM) (Tabla 2).

Tabla 2. Reacción de actividad enzimática.

COMPONENTE	rxn E (mL)	Blanco (mL)
Mezcla de reacción	1.35	1.35
PK/LDH 20U (Sigma)	0.05	0.05
L-arginina 500 mM	0.05	0.05
*Proteína purificada (AC)	0.05	----
Buffer Glicina 100 mM, 2-ME 10 mM	----	0.05
Vol. final	1.5 mL	1.5 mL

*La proteína se diluyó a una concentración de 10 µM con buffer de glicina 100 mM, 2-ME 10 mM

Las unidades de actividad se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades/ml enzima} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min rxnE} - \Delta A_{340}/\text{min blanco}) (1.5) (\text{fd})}{(6.22) (0.05)}$$

Donde:

1.5= Volumen total de la reacción (mL).

fd= Factor de dilución de la enzima.

6.22= Coeficiente de extinción milimolar del NADH a 340 nm.

0.05= Volumen de la enzima usada (mL).

Las unidades por mg de proteína se calcularon mediante:

$$\frac{\text{Unidades/mg Proteína}}{\text{Proteína}} = \frac{\text{Unidades/mL enzima}}{[\text{Proteína pura (ppm)}]}$$

Una unidad de actividad convierte: 1µmol de L-arginina y ATP en P-Arg y ADP por minuto, a pH 8.6 y 30°C (Blethen, 1970).

Determinación de las Constantes Cinéticas de la AC por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC), es una técnica termodinámica que mide directamente la afinidad entre un receptor y un ligando, en este caso entre un sitio activo y un sustrato. Además, ITC provee información sobre el modo de unión entre las moléculas, a través del calor absorbido o liberado durante la asociación en forma de cambio en entalpía (ΔH). A partir de estos parámetros, se pueden calcular el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) y el cambio en la entropía (ΔS). El ΔG es el principal parámetro que determina si se dará la formación del complejo entre la enzima y el ligando, mientras que la combinación entre ΔH y ΔS se relaciona con las fuerzas intermoleculares que determinan la interacción y el modo de unión (Arvizu-Flores, 2009). Por lo tanto, la obtención de dichos parámetros termodinámicos fue esencial para el cálculo de las constantes cinéticas de la enzima AC del camarón con cada sustrato.

Los experimentos de ITC fueron realizados utilizando un microcalorímetro de titulación VP-ITC (Microcal Inc., Northampton, MA, U.S.A.), facilitado por el departamento de investigación en polímeros y materiales (DIPM) de la Universidad de Sonora. La celda de referencia se llenó con buffer de diálisis limpio (buffer glicina 100 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, pH 8.6). La enzima AC fue dializada toda la noche previa al experimento contra cuatro recambios del buffer anteriormente descrito.

Las soluciones de los sustratos se prepararon con el buffer de diálisis. La celda se llenó con la solución 1 μ M de la enzima con 1.4 mM de magnesio como cofactor y se tituló con las soluciones de ATP 1 mM, arginina 5 mM y dTDP 5 mM a una temperatura de 30°C. Posteriormente los datos obtenidos se procesaron mediante el programa Microcal Origin, ajustándolos a un modelo de unión de un solo sitio catalítico por medio de un análisis de regresión no lineal, para obtener así, las constantes cinéticas y fisicoquímicas de la reacción catalizada por esta enzima.

Determinación de las Constantes de Disociación de la AC por Emisión de Fluorescencia

Esta metodología se utilizó con el propósito de calcular las constantes de disociación (K_d) de la enzima AC, con los distintos sustratos (arginina, ATP y dTDP) y poder así, obtener una comparación de la afinidad que tiene dicha enzima con cada uno de estos compuestos. Dicha técnica se basa en la medición de los cambios en la fluorescencia que ocurre cuando las moléculas absorben energía, se excitan y emiten la energía absorbida en forma de radiación, al regresar a su estado basal. La fluorescencia se utiliza ampliamente en el estudio de interacciones entre moléculas, ya que su fluorescencia de emisión se modifica al unirse a otras moléculas o cambiar de ambiente (Lakowicz, 1999).

Por lo anterior, esta técnica es utilizada ampliamente en el estudio de la dinámica del plegamiento de proteínas y como un indicador de cambios en la estructura terciaria, cuando se monitorea la emisión de triptófano (Lakowicz, 1999). En este caso se utiliza una longitud de onda de excitación de 295 nm, para excitar preferencialmente a los triptófanos sobre las tirosinas presentes en la proteína a analizar. Posteriormente, se colecta el espectro de emisión de fluorescencia, detectando el máximo de absorción y correlacionándolo con la variable independiente. Un ejemplo de esto sería la unión de un ligando que puede inducir la disminución o el apagamiento de la fluorescencia (*quenching*), la cual puede ser directamente proporcional a una constante de unión aparente del ligando con el sitio activo que contiene un triptófano (Lakowicz, 1999).

Los espectros de fluorescencia fueron colectados en un espectrofluorómetro modelo LS 55 (Perkin-Elmer Inc.), usando una lámpara de xenón como fuente de excitación. Las muestras se excitaron a 295 nm y la emisión del espectro se colectó de 300 a 400 nm. Las mediciones fueron realizadas en una celda de 10 mm de longitud a una temperatura de 30° C. Ya obtenido el rango de emisión de la solución de proteína, se colocaron 3 mL de la solución de AC 1 μ M y se procedió a titular la misma con inyecciones de 3 μ L

de las soluciones 50 mM de los sustratos ATP, arginina y dTDP hasta que no hubiera cambios. A partir de los espectros de emisión se procedió al cálculo de las constantes de disociación de la enzima con cada uno de ellos.

Monitoreo de la Formación de Productos de la Reacción de la AC con Arginina y dTDP Mediante HPLC

Esta técnica se utilizó para corroborar la formación del desoxinucleótido trifosforado dTTP en la reacción de AC con el compuesto dTDP, así como la síntesis de fosfoarginina en la reacción AC-arginina, para demostrar y comparar por medio de distintas metodologías, la capacidad de esta enzima de utilizar como sustrato tanto la arginina como el dTDP. Este tipo de metodología se empleó debido a la gran capacidad que tiene de separar todos los componentes de una muestra, al pequeño volumen que se necesita de esta y a su alta sensibilidad y precisión.

Para el monitoreo de la formación de los productos en la reacción enzimática de AC, se utilizaron dos metodologías diferentes en un cromatógrafo HPLC modelo 1100 (Hewlett Packard Inc.), facilitado por el laboratorio de bioquímica y calidad de productos pesqueros de CIAD unidad Hermosillo. Para la formación de P-Arg se hizo la técnica descrita por Viant *et al.*, (2001), donde las muestras se someten a un tratamiento con ácido tricloroacético al 7.5 % para precipitar la enzima presente, es decir, remover la fracción proteica. Posteriormente, los sobrenadantes obtenidos junto con los estándares a una concentración de 1 mM de ATP, arginina y P-Arg, se sometieron a una corrida isocrática en buffer de fosfatos monobásico 20 mM pH 2.6 y acetonitrilo a una proporción 72:28 en una columna de fase reversa C18 (100 x 4.6 mm., 3 µm Tamaño de partícula).

Para el monitoreo de la formación de dTTP se hizo la metodología descrita por Ryder *et al.*, (1985) donde la fracción proteica de las muestras es removida con HClO₄ 0.6 mM a 0°C. Posteriormente, el ácido es neutralizado con KOH 1 M y el KClO₄ formado, es removido por filtración. Después las

muestras y los estándares se corren isocráticamente con buffer de fosfatos de potasio (KH_2PO_4 0.04 M, K_2HPO_4 0.06 M pH 7.0) en una columna de fase reversa $\mu\text{Bondapak C18}$ (3.9 mm I.D. x 30 cm).

Las señales fueron cualitativamente identificadas con la superposición de las diferentes señales de los estándares y las muestras, y/o con la aparición o desaparición de señales reconocidas para los distintos componentes de cada reacción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de la AC del Camarón

Se purificó a homogeneidad la enzima AC a partir del músculo congelado del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, el cual fue homogenizado con buffer de extracción y sometido posteriormente a una saturación seriada con sulfato de amonio al 70 y 90 %, para obtener así, un extracto libre de la mayoría de las proteínas indeseables, conservándose una alta concentración de la proteína de interés (García-Orozco *et al.*, 2007).

Existen protocolos ya estandarizados para la purificación de AC donde se utiliza un solo paso cromatográfico de intercambio iónico, el cual es suficiente para obtener la proteína pura, lo que se corroboró por medio de un SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes y reductoras, bajo el criterio de la obtención de bandas únicas (García-Orozco *et al.*, 2007).

A pesar de que algunas fracciones eluidas mostraron bandas contaminantes, éstas pudieron eliminarse por un segundo paso cromatográfico, bajo las mismas condiciones. Dichas bandas pueden deberse a la degradación de la proteína. El cromatograma de las fracciones eluidas de la matriz de intercambio iónico se presenta en la Figura 4, donde se puede apreciar que la proteína AC eluye con 7 % de NaCl.

En la misma figura se muestra el patrón de migración electroforético de las distintas fracciones resultantes del proceso de purificación. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de amplio rango, mientras que en los carriles 2 al 6 se puede observar una banda correspondiente a un peso molecular aproximado de 40 kDa, peso correspondiente a la proteína de interés, la cual es más intensa en los carriles 3, 4 y 5.

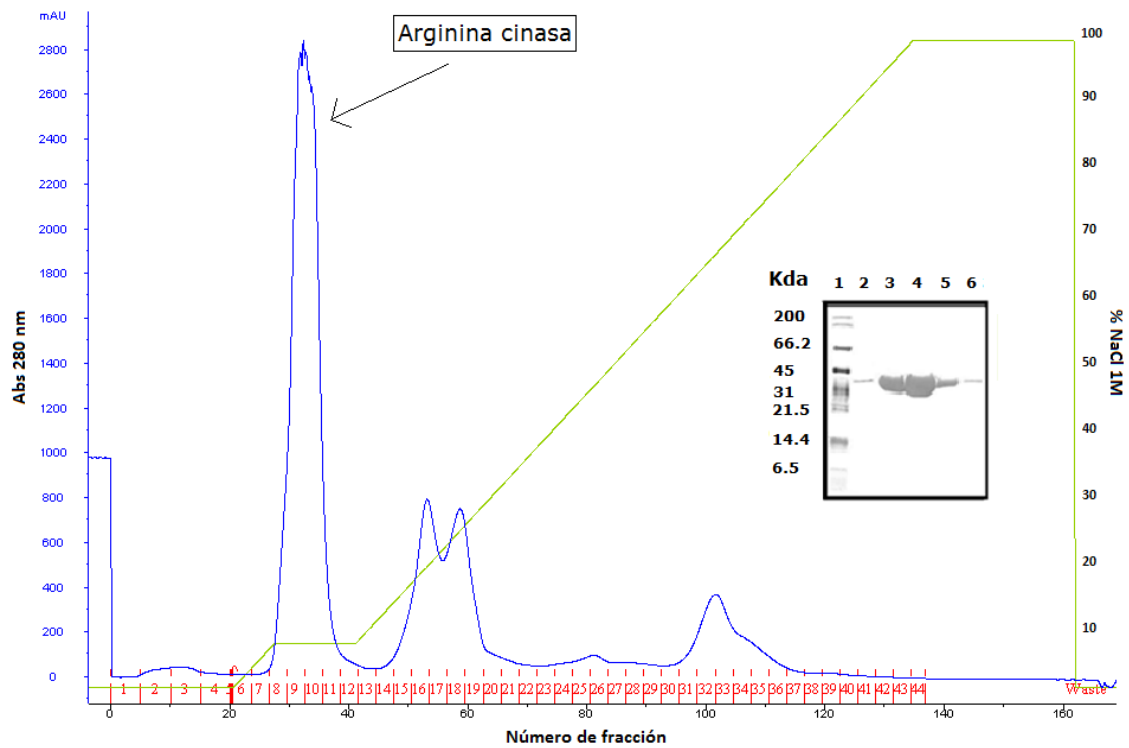


Figura 4. Cromatografía de intercambio iónico de la AC del camarón utilizando una columna de Q-sepharosa de 5 ml. La elución se logró aplicando un gradiente salino de NaCl 1 M de 0 a 100% en buffer A. El gradiente salino se aplicó a partir de la fracción 6, de tal manera que el pico formado por las fracciones 8 – 12 indica la elución de la proteína. En la figura de la derecha se muestra el análisis electroforético de las fracciones obtenidas en el paso de purificación por cromatografía de intercambio iónico.

Determinación de la Estructura y Peso Molecular de la AC del Camarón

La proteína pura se inyectó a una columna Superdex 200 (GE, Healthcare), donde el volumen de elusión fue de 15.5 mL. Posteriormente se hizo un análisis de regresión lineal, para obtener así un PM de 38 kDa. Este valor concuerda con el valor obtenido en el programa ExPASy, el cual calculó un PM teórico de 40.159 kDa. La pequeña diferencia en los valores puede deberse a la forma de la proteína o al buffer que se utilizó en la corrida.

Debido a que esta técnica da un valor aproximado por subunidad, este resultado permite sugerir que se trata de una proteína monomérica, lo cual concuerda con lo reportado en otras especies de moluscos y artrópodos como el ostión *Crassostrea virginica*, la polilla *Manduca sexta* y la cucaracha *Periplaneta americana*, donde el peso molecular varía alrededor de 40 kDa con una estructura monomérica (Rosenthal *et al.*, 1977; Brown y Grossman, 2004; Fujimoto *et al.*, 2005). Sin embargo, también existen especies como el pepino de mar *Stichopus japonicus* donde esta enzima cuenta con una estructura dimérica y un peso aproximado de 84 kDa (Susuki *et al.*, 1999).

En la Figura 5 se muestran con líneas punteadas los picos de los estándares de PM, con una línea continua el pico obtenido de la proteína de estudio y en la parte superior el análisis de regresión lineal de los pesos moleculares de los estándares utilizados.

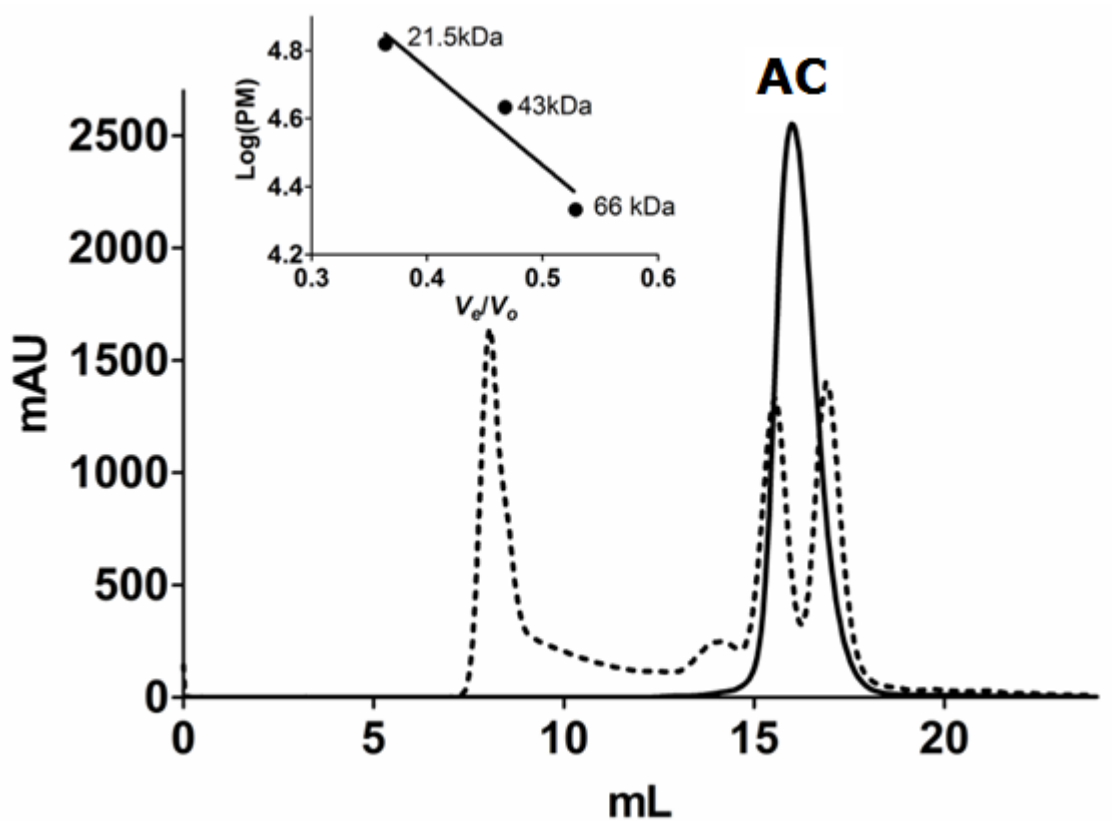


Figura 5. Cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superdex 200. La elución de la proteína se logró con un flujo de 0.5 mL de buffer de fosfatos de sodio 50 mM pH 7.5, 150 mM NaCl. Los estándares de peso molecular fueron albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (44 kDa) y tripsina de soya (21.5 kDa). El volumen de elución de la AC fue de 15.5 mL, lo que corresponde a un peso molecular aproximado de 38 kDa y a una estructura monomérica.

Ensayos Acoplados de Actividad Enzimática de la AC

Una vez obtenida la proteína pura se procedió a hacer los ensayos de actividad de AC con su sustrato cognado la arginina y con los precursores de timina dTMP y dTDP. Estos resultados se efectuaron con un ensayo acoplado donde se mide la actividad enzimática indirectamente por medio de la oxidación del NADH presente en la mezcla de reacción.

En la Figura 6 se muestran las graficas obtenidas de la actividad de AC con los tres sustratos diferentes, donde se muestra que la enzima AC presentó actividad con la arginina. El valor obtenido (7.4 U/mg de proteína) fue congruente con el valor reportado también en *Litopenaeus vannamei* por García *et al.*, (2007) de 8.78 U/mg de proteína. Comparado con otras especies, el resultado se encuentra dentro del rango, donde las actividades enzimáticas varían entre 3.0 U/mg (*Cissites cephalotes*) y 17.0 U/mg (*Homarus vulgaris*) (Newsholme *et al.*, 1978; Tanaka *et al.*, 2007).

Por otro lado, la enzima AC también presentó actividad con el precursor difosforado de timina dTDP (1.42 U/mg de proteína), la cual fue cinco veces menor a la obtenida con arginina, mientras que la actividad con el dTMP fue nula. Esto sugiere una bifuncionalidad de la enzima, donde ésta puede desempeñar ambos papeles, siendo la actividad arginina-cinasa, su principal función. En la Tabla 3 se muestran los valores de unidades de actividad (U) obtenidos con cada sustrato, donde una unidad de actividad convertirá 1.0 μmol de L-arginina y ATP a P-Arg y ADP por minuto a pH 8.6 a 30°C (Blethen, 1970).

Estos resultados son interesantes ya que lo anterior puede significar que la enzima AC del camarón además de tener un rol importante en la movilización de energía en invertebrados, podría tener participación en la tercera fosforilación de la timina, resultando en el producto trifosforado dTTP. Este compuesto es un precursor de la síntesis de ADN, incluso para un virus como el WSSV.

En estudios previos se ha observado un aumento en los niveles de expresión de AC en camarones infectados por diferentes agentes patógenos

(Rattanarojpong *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009). Además, desde el punto de vista de la farmacología, esta enzima es un potencial blanco para el diseño de compuestos antivirales, en específico análogos nucleosídicos de timina, ya que al ser reconocidos como sustrato de AC, esta podría fosforilarlos para su activación y que posteriormente lleven a cabo su acción de frenar la proliferación del patógeno.

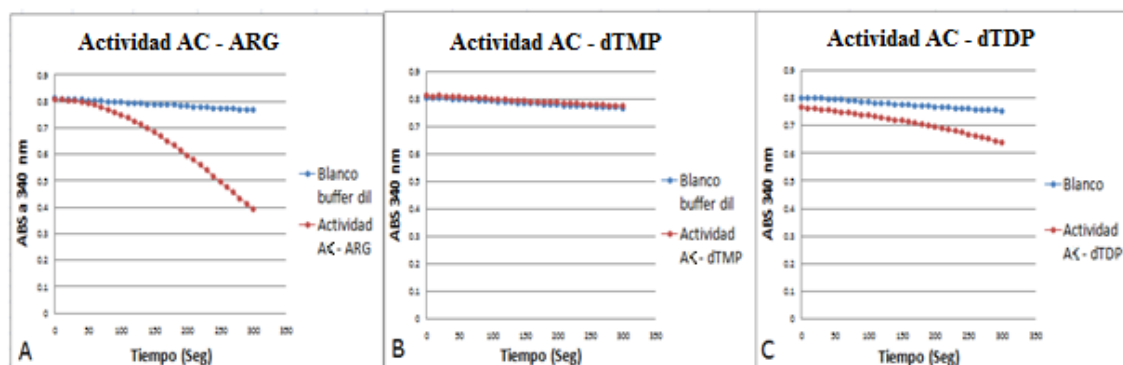


Figura 6. Gráficas de las pendientes obtenidas de la actividad de arginina cinasa con los diferentes sustratos (**A**, arginina; **B**, dTMP; **C**, dTDP).

Tabla 3. Valores de Unidades de actividad enzimática obtenidos con cada sustrato

Actividad Enzimática	Arginina	dTMP	dTDP
Unidades/mg de proteína	7.4	ND	1.427

ND. No Detectada

Obtención de las Constantes Cinéticas de la AC del Camarón por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

Ya evaluada la actividad enzimática con los distintos sustratos, se procedió a obtener las constantes cinéticas de la enzima con los diferentes sustratos, por medio de calorimetría de titulación isotérmica. Aquí se probaron diversas concentraciones de los sustratos, hasta encontrar las condiciones óptimas para el correcto desarrollo del experimento y obtener así valores confiables.

De acuerdo a los valores obtenidos de K_m con los distintos sustratos, estos sugieren que la enzima tiene mayor afinidad por el ATP ($K_m = 0.0986 \mu\text{M}$), en comparación con la arginina ($K_m = 0.322 \mu\text{M}$) y el dTDP ($K_m = 0.653 \mu\text{M}$), ya que esta necesita una menor concentración de ATP para llegar a la mitad de la velocidad máxima. Esto significa que la enzima tiene un mecanismo secuencial para unir a los sustratos, empezando con el complejo Mg-ATP y posteriormente la arginina (Tanaka *et al.*, 2007). En la Tabla 4 se puede apreciar que los resultados del estudio se asemejan a los obtenidos para otras especies, y se ve como esta enzima tiene una mayor afinidad por el ATP, exceptuando lo publicado por Fujimoto *et al.*, (2005), donde la enzima tiene una mayor afinidad por la arginina.

Comparando los valores obtenidos de K_m de arginina y dTDP, estos concuerdan con lo observado en los ensayos de actividad, ya que la enzima es más activa con su sustrato cognado la arginina que con el dTDP. Con estos resultados obtenemos una prueba tangible de que la AC además de fosforilar a su sustrato cognado la arginina, esta es capaz de fosforilar al precursor dTDP, por lo que posiblemente tenga un papel en la síntesis del ADN. Como se mencionó anteriormente, esta enzima podría ser un potencial blanco para el desarrollo de compuestos antivirales, en este caso, análogos nucleosídicos difosforados, ya que al ser reconocidos por AC como sustratos, ésta podría fosforilarlos para su activación.

En las Figuras 7, 8 y 9 se muestran los termogramas con los picos de los calores obtenidos, así como el ajuste efectuado por regresión no lineal para la obtención de las constantes cinéticas.

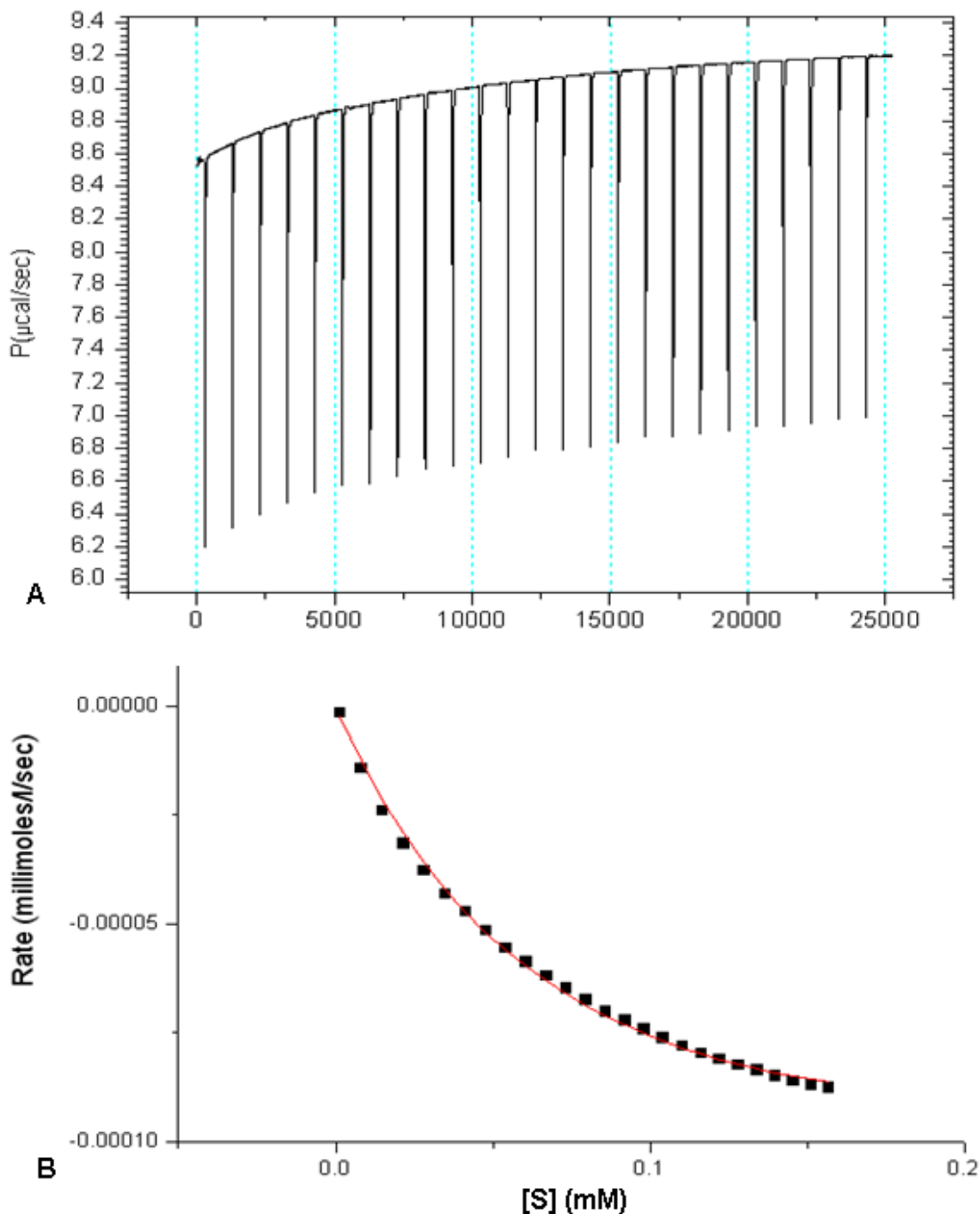


Figura 7. A) Termograma obtenido por ITC con el sustrato ATP; B) ajuste por regresión no lineal elaborado con el programa Origin 7.0, titulando con 1 mM de ATP y obteniendo una $K_m = 0.0986 \mu\text{M}$.

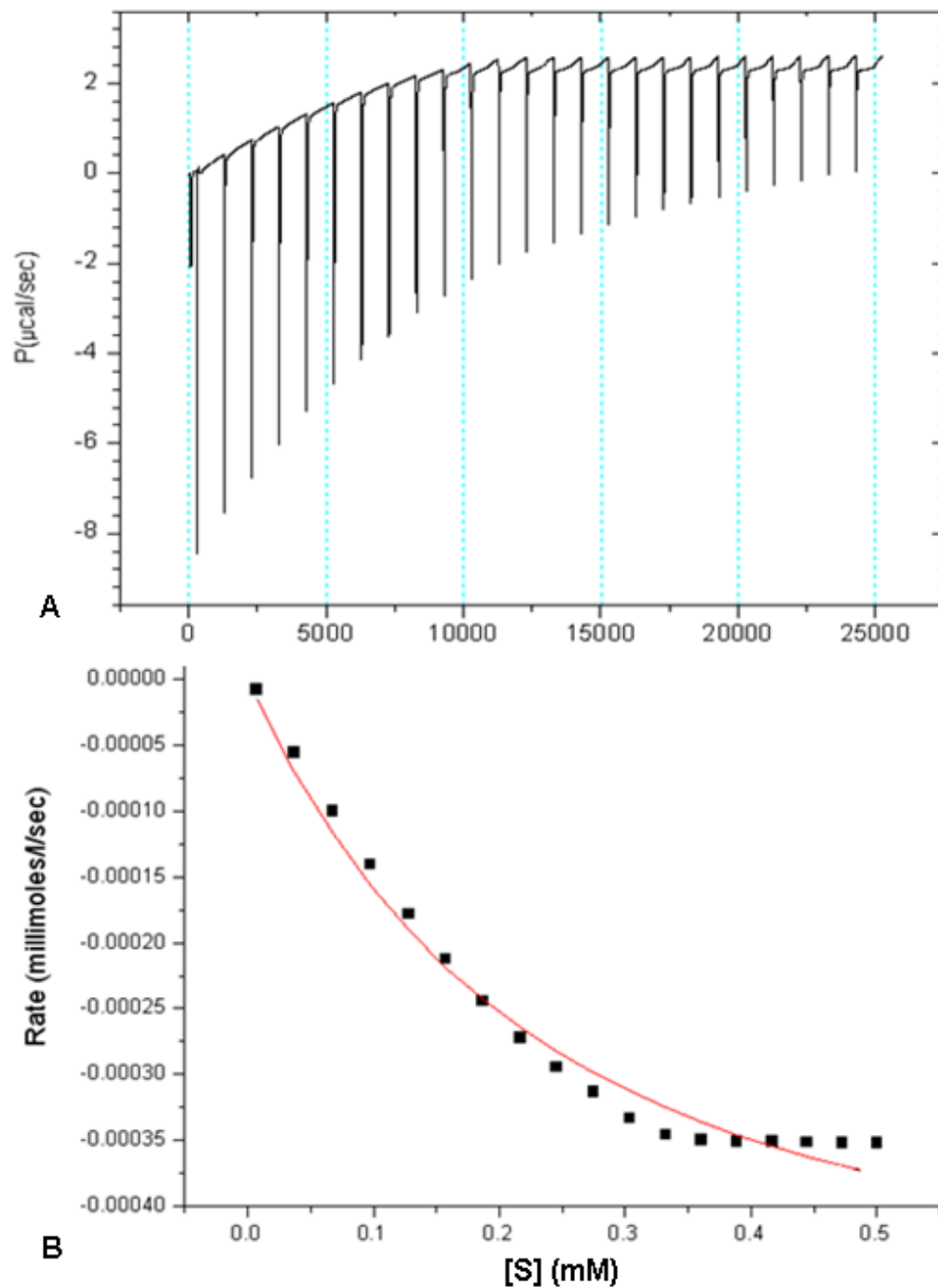


Figura 8. A) Termograma obtenido por ITC con el sustrato arginina; B) ajuste por regresión no lineal elaborado con el programa Origin 7.0, titulando con 5 mM de arginina y obteniendo una $K_m = 0.322 \mu\text{M}$.

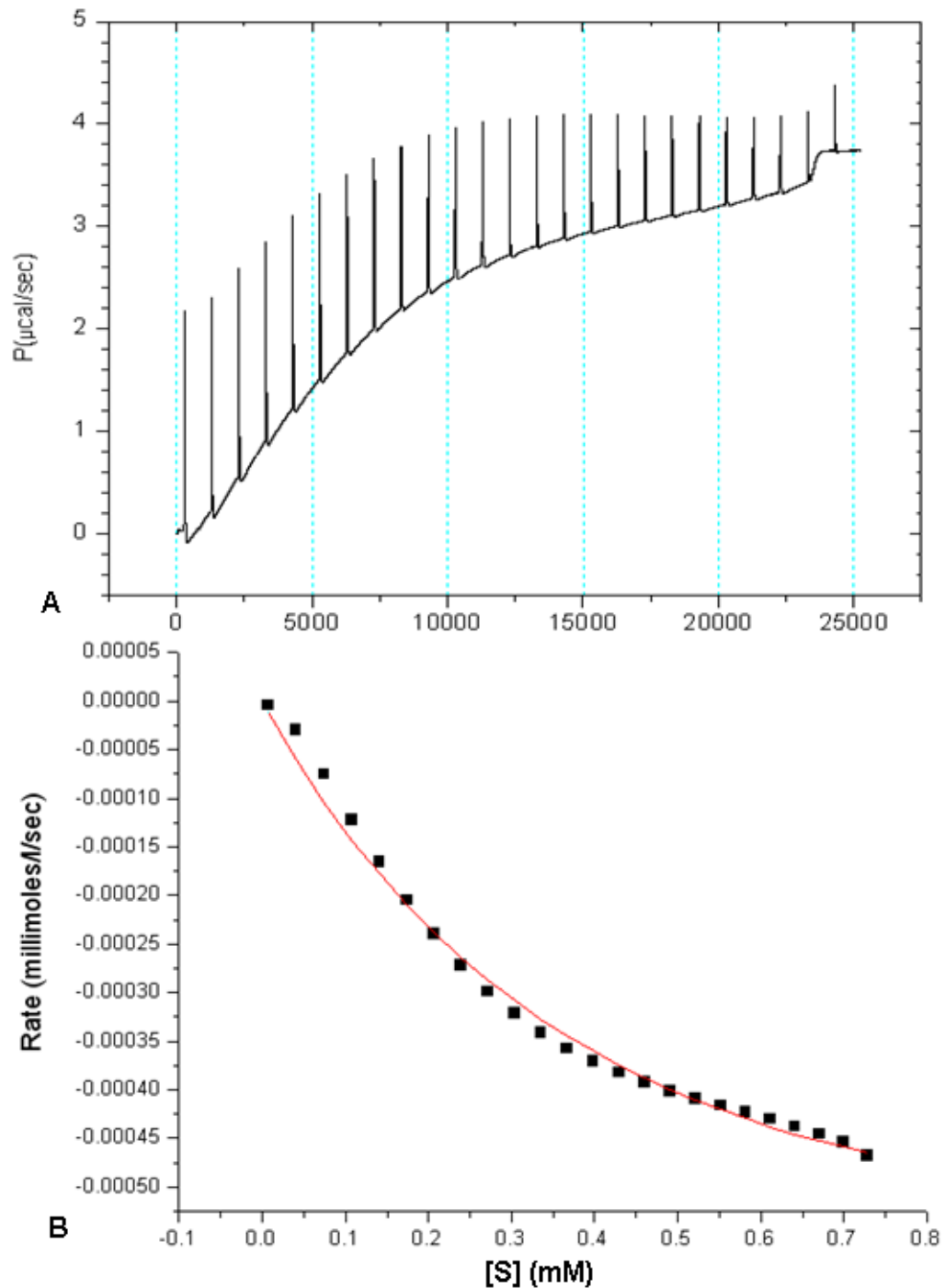


Figura 9. A) Termograma obtenido por ITC con el sustrato dTDP; B) ajuste por regresión no lineal elaborado con el programa Origin 7.0, titulando con 5 mM de dTDP y obteniendo una $K_m = 0.653 \mu\text{M}$.

Tabla 4. Valores de K_m de la enzima arginina cinasa obtenidas de diferentes especies con sus distintos sustratos.

Especie	K_m ARG	K_m ATP	K_m dTDP
<i>Litopenaeus vannamei</i> (ITC)	0.322 ±0.043	0.0986 ±0.0037	0.653 ±0.060
<i>P. americana</i>			
Brown and Grossman (2004)	0.49	0.14	
<i>M. sexta</i>			
Rosenthal et al. (1977)	0.5	2.5	
<i>C. virginica</i>			
Fujimoto et al. (2005)	0.35	0.97	

Análisis de Espectros de Emisión de Fluorescencia de la AC

La medición de la emisión de fluorescencia de triptófano se realizó a partir de una solución de AC 1 μ M a una longitud de excitación de 295 nm, colectándose un espectro de emisión de 300 a 400 nm. En la figura 10 se muestran los espectros de emisión con Mg y los sustratos arginina 50 mM, ATP 50 mM y la enzima sola a una concentración 1 μ M, respectivamente, donde no se aprecia ningún cambio. Por otro lado, en el espectro de emisión de fluorescencia para el caso de la titulación con dTDP (Figura 11), se muestra un efecto de apagamiento (*quenching*) de la fluorescencia a 333 nm, logrando por medio de un análisis de regresión no lineal, la obtención de una $K_d = 520 \mu\text{M}$ para dicho compuesto.

Con este resultado, además de corroborar la afinidad de la enzima por el sustrato dTDP, el hecho de que exista apagamiento con un sustrato y con otros no, sugiere que la enzima tiene un sitio de unión diferente para el dTDP, con respecto a la arginina y el ATP. Esto se traduce a que el dTDP se une a un sitio de la enzima que posee un triptófano disminuyendo así, la emisión de fluorescencia. Sin embargo esta unión también pudo haber ocasionado cambios conformacionales en la estructura de la proteína que ocultaron triptófanos que estaban expuestos en la conformación nativa, disminuyendo la intensidad de la fluorescencia emitida.

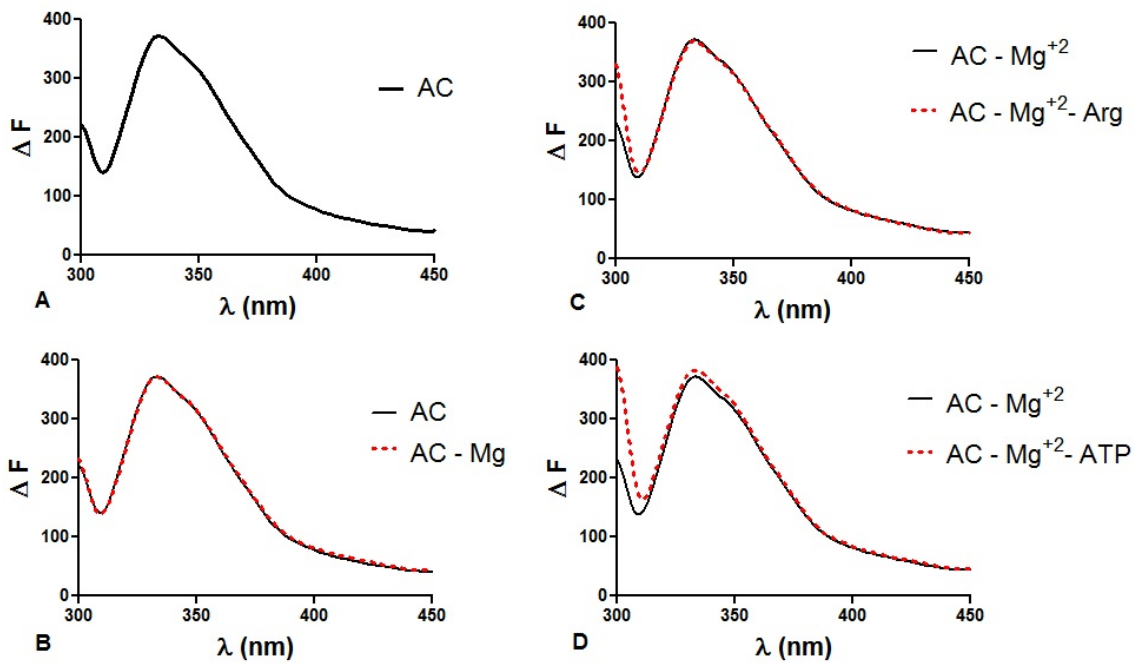


Figura 10. Espectros de emisión de fluorescencia donde se tituló la enzima AC con los distintos sustratos. A) Solución de AC; B) titulación con Mg; C) titulación con arginina y D) titulación con ATP.

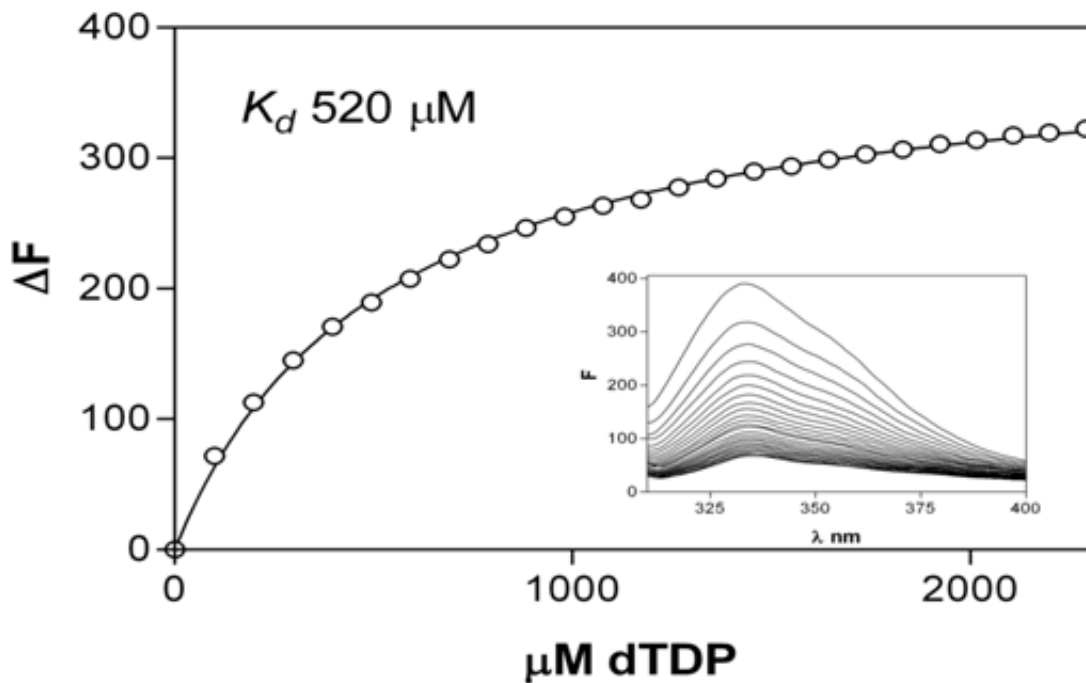


Figura 11. Gráfica obtenida del análisis de regresión no lineal de la titulación de la enzima AC con el sustrato dTDP, donde se obtuvo una $K_d = 520 \mu\text{M}$. En la parte inferior de la figura se muestra los espectros de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones del sustrato, con un pico máximo a una longitud de onda de 333 nm.

Monitoreo de la Formación de Productos de la Reacción de AC Mediante HPLC

Los cromatogramas obtenidos se hicieron a partir de reacciones enzimáticas que se detuvieron a los cinco minutos de reacción. Para la formación de P-Arg se hizo una reacción de 500 μ L con 10 μ M de enzima, 6.7 mM de ATP, 13 mM de Mg y 17 mM de arginina, la cual se detuvo con un volumen de 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 7.5%, para posteriormente separar la fase proteica por centrifugación. Posteriormente la muestra se corrió en el HPLC, y para la identificación se analizaron también estándares de ATP, Arg y P-Arg a una concentración de 1 mM. En la Figura 12 se muestra el cromatograma obtenido de la reacción AC-Arg, donde se aprecia la disminución en las concentraciones de arginina y ATP, mientras que la P-Arg aumenta.

Posteriormente se hizo una segunda reacción con 10 μ M de enzima AC, 6.7 mM de ATP, 13 mM de Mg y 17 mM de dTDP, la cual se detuvo con ácido perclórico 0.6 mM. Ya neutralizada y filtrada la muestra, ésta se inyectó al HPLC. También se inyectaron los estándares de ATP, ADP, dTDP y dTTP a una concentración 1 mM. En la Figura 13 se muestra el cromatograma obtenido de la reacción AC-dTDP, donde se puede apreciar la formación de ADP y dTTP, con la correspondiente disminución de las concentraciones de ATP y dTDP, corroborando mediante la aparición de los productos de la reacción enzimática, la capacidad de AC de fosforilar al compuesto dTDP.

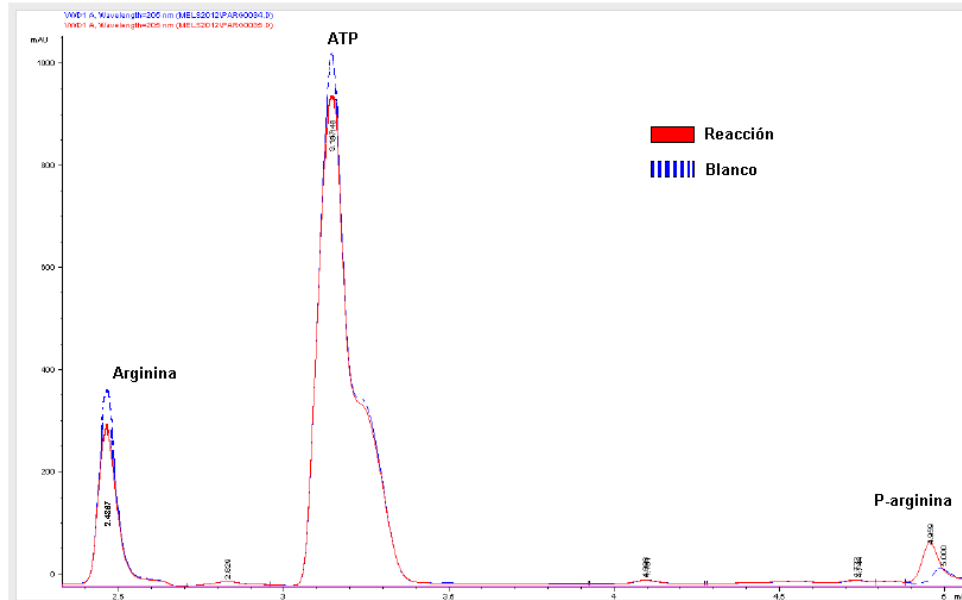


Figura 12. Cromatograma de la reacción AC-Arg obtenido por HPLC. La línea punteada muestra el blanco de la reacción, mientras que la línea continua corresponde a la reacción y se puede apreciar la generación de la fosfoarginina.

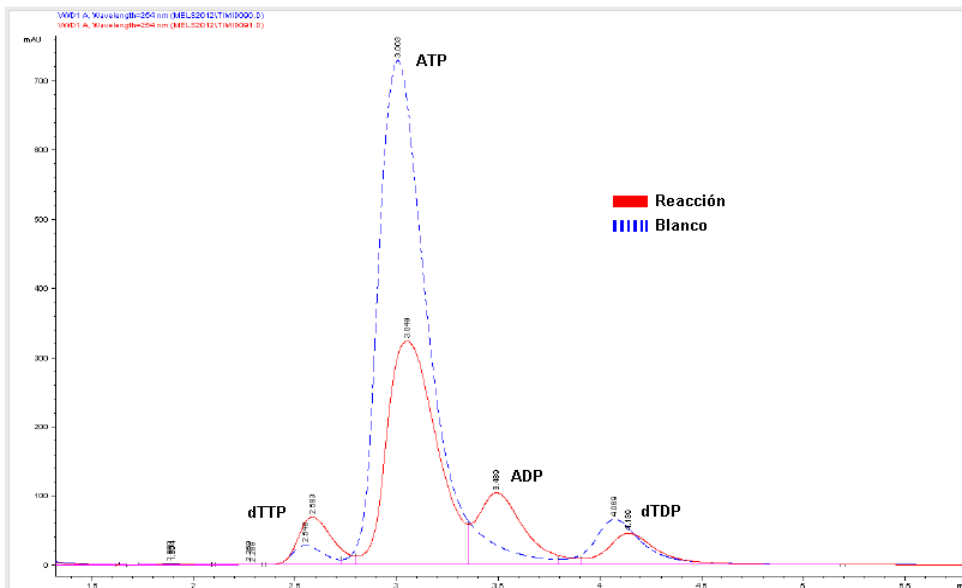


Figura 13. Cromatograma de la reacción AC-dTDP obtenido por HPLC. La línea punteada muestra el blanco de la reacción, mientras que la línea continua corresponde a la reacción y se puede apreciar la generación del compuesto dTTP.

CONCLUSIONES

Se obtuvo arginina cinasa de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con éxito, obteniéndose un alto rendimiento y pureza, ratificado por el análisis electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). La proteína AC obtenida presentó actividad enzimática específica al sustrato arginina, la cual fue 5 veces mayor que la obtenida con el dTDP y no mostró actividad específica con el dTMP.

Ya con estos resultados se procedió a evaluar las cinéticas por ITC, para la obtención de las constantes fisicoquímicas. La enzima arginina cinasa del camarón tiene una mayor afinidad por el ATP, lo que sugiere un mecanismo secuencial en la unión de los sustratos, además de corroborar por medio de un método más sensible, que esta enzima es capaz de fosforilar al dTDP para producir dTTP.

No se detectaron efectos en los espectros de fluorescencia mediante la titulación con Arg y ATP, mientras que con dTDP se observó un efecto de apagamiento (*quenching*), calculándose una K_d de 0.52 mM, lo que sugiere un sitio de unión diferente para éste.

La combinación de técnicas espectrofométricas y de calorimetría de titulación isotérmica fue útil para evaluar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas de la enzima arginina cinasa, e indicar que la AC de camarón blanco puede llevar a cabo la tercera fosforilación en la síntesis de la desoxitimina, por lo que podría estar involucrada en la síntesis de dTTP para la replicación del ADN, tanto del camarón como del patógeno que lo infectaría.

Por lo anterior, es importante seguir estudiando a la AC complementando los resultados obtenidos con otras técnicas y además determinar si esta enzima es un potencial blanco para el diseño de fármacos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda completar la caracterización cinética de la enzima, obteniendo las constantes de disociación (K_d) con los sustratos arginina y ATP, por medio de calorimetría de titulación isotérmica.

Además, por medio de la misma técnica se recomienda obtener las K_d de AC con cada desoxinucleótido y ribonucleótido, para determinar si tiene afinidad por sustratos distintos al dTDP.

También se recomienda complementar este estudio con la técnica de mutagénesis dirigida, para identificar los residuos que interactúan con cada sustrato y cuales son clave para realizar la actividad catalítica. Otra técnica que ayudaría es la cristalografía de rayos X, con la que se obtendría valiosa información de la estructura de la enzima, así como de los cambios conformacionales que suceden al interactuar con los distintos sustratos, para resolver la hipótesis generada con los resultados de fluorescencia, donde se propone que la enzima posee distintos sitios activos para cada sustrato.

Por último, es necesario realizar ensayos de actividad con análogos nucleosídicos para determinar si esta enzima es capaz de utilizarlos como sustrato y posteriormente hacer una caracterización fisicoquímica, así como estudios de cinética enzimática.

BIBLIOGRAFÍA

- Alatorre F.M.R., (1998). La acuacultura en México: Un sector del futuro. Panorama acuícola. México, p. 175.
- Arvizu-Flores A. A., (2004). Uso de la descomposición en valores singulares para el análisis de cambios conformacionales en timidilato sintasa. Presentada en el centro de investigación en alimentación y desarrollo, A. C. Para la obtención del grado de maestría en ciencias.
- Arvizu-Flores A. A., (2009). Estudios de inhibición diferencial en timidilato sintasa de camarón *Litopenaeus vannamei* y del virus del síndrome de la mancha blanca. Presentada en el centro de investigación en alimentación y desarrollo, A. C. Para la obtención del grado de doctorado en ciencias.
- Astrosfy K. M., Roux M. M., Klimpel K. R., Fox J. G., Dhar A. K., (2002). Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). Arch Virol (2002) **147**:1799-1812.
- Blethen S., (1970). Arginine kinase (arthropod muscle). Methods in enzymology, 17A, 330-335. Brown, A.E., Grossman, S.H., (2004). The mechanism and modes of inhibition of arginine kinase from the cockroach (*Periplaneta americana*). Arch. Insect Biochem. Physiol. **57**, 166–177.
- CONAPESCA., (2012). Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/30_de_Enero_de_2012_Mazatlan_Sinaloa.
- Córdova L.R., (2002). "Camaronicultura: Avances y Tendencias". México, D.F., AGT Editor, S.A.
- De Clercq E., (2003). Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus

- infections. *Clinical Microbiology Reviews* **16**(4): 569:96.
- De Clercq E., (2007). Acyclic nucleoside phosphonates: Past, present and future bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes-, and poxvirus infections: The phosphonate bridge. *Biochemical pharmacology* **73**(7): 911-922.
- De Clercq E. y Holy A., (2005). Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**(11): 928:940.
- Ellington W.R. y Hines A.C., (1991). Mitochondrial activities of phosphagen kinases are not widely distributed in the invertebrates. *The biological bulletin*, Vol. 180, No.3, (june, 1991), pp. 505-507, ISSN 1062-3590.
- FAO., (2010). Estudio mundial sobre las pesquerías del camaron. Documento técnico de pesca no. 475. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 2010.
- Fernández P., Haouz A., Pereira C. A., Aguilar C., Alzari P. M., (2007). The crystal structure of *Trypanosoma cruzi* arginine kinase. *Proteins*. 2007 Oct **1**;69(1):209-12.
- Fujimoto N., Tanaka K., Suzuki T., (2005). Amino acid residues 62 and 193 play the key role in regulating the synergism of substrate binding in oyster arginine kinase. *FEBS Lett.* **579**, 1688–1692.
- García-Orozco K. D., Aispuro-Hernández E., Yépiz Plascencia G., Calderón de la Barca A. M., Sotelo Mundo R. R., (2007). Molecular characterization of Arginine Kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Int arch Allergy immunol* **144**: 23-28.
- Gómez-Gil B., (2002). “Enfermedades Infecciosas más comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos”. Sinaloa, México., UAS, **14**: 315-346.
- Guevara-Hernández E., García-Orozco K. D., Sotelo-Mundo R. R., (2012). Biochemical Characterization of Thymidine Monophosphate Kinase from White Spot Syndrome Virus: A Functional Domain from the Viral ORF454. *Protein & Peptide Letters*, 2012, **19**, 1220-1224.

- Harrison J.F. y Roberts, S.P., (2000). Flight respiration and energetic. Annual review of physiology, Vol. 62, (March, 2000), pp. 179-205, ISSN 0066-4278.
- Hernández-Flores J. M., (2010). Obtención de anticuerpos policlonales dirigidos a la enzima timidilato sintasa recombinante del virus de la mancha blanca (WSSV) y del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Presentada en la Universidad de Sonora para la obtención del grado de Licenciatura.
- Hochachka P.W., Somero G.N., (2002). Influence of oxygen availability, in: Biochemical adaptation, (Ed.), 107-157, Oxford university press, ISBN 0-19-511702-6, NY, USA.
- Jiang H., Li F., Xie W., Huang B., Zhang J., Zhang J., Zhang C., Li S., Xiang j., (2009). Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress. Proteomics 2009, **9**, 3353-3367.
- Jubrias S.A., Esselman P.C., Price L.B., Cree M.E. y Conley K.E., (2001). Large energetic adaptations of elderly muscle to resistance and endurance training. *Journal of apply physiology*, Vol. 90, No.5, (May 2001), pp. 1663-1770, ISSN 0363-6143.
- Kotlyar S., Weihrauch D., Paulsen R., Towle D. W., (2000). Expression of arginina kinase enzymatic activity and mRNA in gills of euryhaline crabs *Carcinus maenas* and *Callinectes sapidus*. *The journal of experimental biology*. Vol.203, (July 2000), pp. 2395-2404, ISSN 0022-0949.
- Laemli U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during de assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lavie A., Konrad M., (2004). Structural requirements for efficient phosphorylation of nucleotide analogs by human thymidylate kinase. *Mini Rev Med Chem*. 2004. May; 4(4):351-9. Review.
- Li L. J., Yuan J. F., Cai C. A., Gu W. G. y Shi Z. L., (2006). Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. *Archives of virology* **151**: 1309-1317.

- Lo T., Cui Z., Mong J., Wong Q., Chang S., Kwan H., Chu K., (2007). Molecular coordinated regulation of gene expression during ovarian development in the penaeid shrimp. DOI: 10.1007/s10126-007-9006-4, **9**, 459-468.
- Martínez Cruz O., Sanchez Paz A., García Carreño F., Jiménez Gutiérrez L., Navarrete del Toro Ma. De los Angeles., Muhlia Almazán A., (2012). Invertebrates mitochondrial function and energetic challenges. Kevin B. Clark, 2012). *Bioenergetics*. **8**: 181-218.
- Martínez-Cordova L., Porchas M. y Villareal H., (2009). Efecto de tres diferentes estrategias de alimentación sobre el fitoplancton, zooplancton y bentos en estanques de cultivo de camarón café *Penaeus californiensis* (Holmes, 1990). *Cienc. Mar.* **24**: 267-281.
- Mathews C. K., van Holde K. E., (2000). "Biochemistry". E.U.A., Benjamim/Cummings Publishing company, Inc. **20**: 404-409.
- Molina-Ocampo G., (2011). Duplica Sonora producción en acuicultura. [WWW]recuperado:panoramaacuicola.com/noticias/2011/02/14/duplica_sonora_produccion_en_acuicultura.html.
- Mul Y., Van Miltenburg R. T., De Clercq E., Van del Vliet P. C., (1989). Mechanism of inhibition of adenovirus DNA replication by acyclic nucleoside triphosphate analogue (S)-HPMPApp: Influence of adenovirus DNA binding protein. *Nucleic Acids Research* **17**(22): 8917-29.
- Nelson M., Cox M., (2008). Lehninger. Principles of biochemistry. W. H. Freeman and Company 5th Ed. 41 Madison Avenue, New York, NY 10010: 882:896.
- Öberg B., (2006). Rational design of polymerase inhibitors as antiviral drugs. *Antiviral Research* **71**(2-3): 90-95.
- Peck L.S., (2002). Ecophysiology of antarctic marine ectotherms: limits to life. *Polar biology*, Vol. 25, No.1, (September 2001), pp. 31-40, ISSN 0722-4060.
- Popova-Butler A. y Dean D.H., (2009). Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *Journal of the*

insect physiology, Vol. 55, No.3, (March, 2009), pp. 264-272, ISSN: 0022-1910.

- Quintero-Reyes I. E., Garcia-Orozco K. D., Sugich-Miranda R., Arvizu-Flores A. A., Velazquez-Contreras E. F., Castillo-Yañez F. J., Sotelo-Mundo R. R., (2012). Shrimp oncoprotein nm23 is a functional nucleoside diphosphate kinase. *J Bioenerg Biomembr* (2012) **44**:325–331.
- Rattanarojpong T., Wang H., Lo C., Flegel T., (2007). Analysis of differently expressed proteins and transcripts in gills of *Penaeus vannamei* after yellow head virus infection. *Proteomics* 2007, **7**, 3809-3814.
- Robalino J, Bartlett T. Shepard E.F., Prior S., Jaramillo G., Scura E., Chapman R.W., Gross P.S., Browdy C.L. y Warr G.W., (2005). Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to non-specific immunity in marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *Journal of Virology* **79**: 13561-13571.
- Rosenthal G.A., Dahlman D.L., Robinson G.W., (1977). L-Arginine kinase from tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). Purification, properties, and interaction with L-canavanine. *J. Biol. Chem.* **252**, 3679–3683.
- Ryder J. M., (1985). Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1985, **33**: 678-680.
- Somboonwiwat K., Chaikeratisak V., Wang H., Lo C., Tassanakajon A., (2010). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harveyi* infection. *Somboonwiwat et al. Proteome Science* 2010, **8**:39-42.
- Stuart J.A., Brown M.F., (2006). Energy, quiescence and the cellular basis of animal life spans. *Comparative biochemistry and physiology part A.* Vol.143, No.1, (January 2006), pp. 12-23, ISSN 1095-6433.
- Strong S. J., Ellington W. R., (1995). Isolation and sequence analysis of the gene for arginina kinase from the chelicerate arthropod, *Limulus polyphemus*: insights into catalytically important residues. *Biochim.*

- Biophys. Acta **1246**: 197-200.
- Suzuki T., Kawasaki Y., Furokohri T., (1997). Evolution of phosphagen kinase; Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of two-domain arginine kinase from the sea anemone *Anthapleura japonicus*. Biochemistry journal **328**: 301-306.
- Suzuki T., Kamidochi M., Inohue N., Kawamichi H., Yazawa Y., Furukohri T., Ellington R., (1999). Arginine kinase evolved twice: evidence that echinoderm arginina kinase originated from creatine kinase. Biochemistry journal **340**: 671-675.
- Switzer, R. C., Merril, C. R. and Shifrin, S., (1979) "A Highly Sensitive Silver Stain for Detecting Proteins and Peptides in Polyacrylamide Gels," Anal. Biochem., **98**: 231.
- Tanaka K., Ichinari S., Iwanami K., Yoshimatsu S., Susuki T., (2007). Arginine kinase from the beetle *Cissites cephalotes* (Olivier). Molecular cloning, phylogenetic analysis and enzymatic properties. Insect Biochemistry and Molecular Biology **37**: 338-345.
- Vaseeharan B., Anand P.T., Murugan T. y Chen J.C., (2006). Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of the white spot syndrome virus. Letters in applied Microbiology **43**: 137-142.
- Viant R., Roseblum E., Tjeerdema R., (2001). Optimized method for the determination of phosphoarginine in abalone tissue by high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography B, **765**: 107-111.
- Vishnudas V. y Vigoreaux J.O., (2006). Sustaned high power performance possible strategies for integrating energy supply and demand in flight muscle, in: *Nature's versatile engine: insect flight muscle inside and out*, J.O. Vigoreaux, (Ed.), 188-196, Springer, ISBN 978-03872579, NY, USA.
- Wang B., F Li., B Dong., X Zhang., C Zhang and J Xiang., (2006). Discovery of the genes in response to WSSV infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. Marine Biotechnology **8**: 491-500.
- Wegener G., (1996). Flying insects: Model systems in exercise physiology. Experientia, Vol.52, No.5, (May 1996), pp. 404-12, ISSN 0014-4754.

- Witteveldt J., Cifuentes C.C., Vlak J.M. & Van Hulten M.C., (2004). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish and Shellfish Immunology* **16**: 571-579.
- Cui-Luan Y., Chang-Gong W., Jian-Hai X. y Bo D., (2005). Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish immunology* **19**: 456-470.
- Chia-Jung Y., Yu-Fen Y., Bor-Luen C. y Lu-Ping C., (2003). Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, pen m 2. *The journal of immunology* **170**: 445-453.
- Genfa Z., Thayumanasamy S., Blanc E., Golapakrishnan P., Ellington W. y Chapman M. S., (1998). Transition state structure of arginine kinase: Implications for catalysis of bimolecular reactions. *Biochemistry, USA*, Vol. 95, Issue **15**, 8449-8454.