



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

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ESTRUCTURAL DE
UNA LIPASA DE *Vibrio parahaemolyticus* CAUSANTE
DE SINDROME DE MORTALIDAD TEMPRANA EN
CAMARÓN BLANCO**

Por:

Cristóbal Joel González Pérez

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

Agosto del 2016

APROBACIÓN

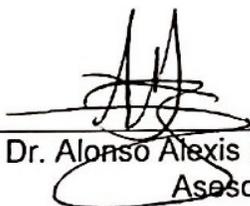
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Cristóbal Joel González Pérez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



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



Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara
Asesor



Dr. Alonso Alexis López Zavala
Asesor



Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
Asesor

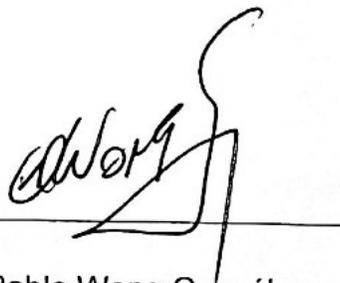


Dr. Rogério Rafael Sotelo Mundo
Asesor

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de Maestría en Ciencias y el apoyo otorgado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD A.C.) por abrir sus puertas y apoyar en cada etapa de este posgrado.

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

A la Coordinación de Programas Académicos por el apoyo parcial para la asistencia al "5° Congreso de la Rama de Físicoquímica, Estructura y "4th International Workshop Frontiers in Protein Folding, Diseño de Proteínas de la SMB" and Evolution and Function" en la Cd. De Oaxaca, Oax. del 3 al 7 de noviembre del 2015.

A mí Directora de tesis M. en C. Karina García Orozco por aceptarme como alumno y apoyarme en todo el desarrollo de este proyecto, por sus enseñanzas, por su paciencia, por su aceptación de ideas, por su confianza, por todas sus porras y la facilidad prestada para trabajar con ella.

A los integrantes de mi comité de tesis Dra. Carmen Contreras, Dra. Adriana Muhlia, Dr. Alonso López y Dr. Rogerio Sotelo, por su gran apoyo académico, por su paciencia, por su disponibilidad de compartir conocimiento y por su dedicación en el desarrollo de este trabajo.

Al Laboratorio de Estructura Biomolecular dirigido por el Dr. Rogerio Sotelo y la M. en C. Karina García por el apoyo para la realización de este trabajo: reactivos, infraestructura, equipos, libros, etc.

Al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas dirigido por la Dra. María Islas y la Dra. Carmen Contreras por su apoyo en préstamos de equipos y reactivos, así como invaluable asesoría académica.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio: Ignacio, Leonardo, Alfredo, Bruno, Daniel, Eva y Lucía por su apoyo académico y conversaciones tan divertidas.

A mis amigos y compañeros de generación: Deyanira <3, Cynthia, Yuri, Víctor, Rocío, Ariel, Ale Preciado, Julián, Karen, Carmen, Pepe, por las ocurrencias, fiestas, horas de estudio y por aquellas pláticas que a veces no tenían razón pero servían de algo, sin ustedes no hubiera sido lo mismo.

A mis amigos y compañeros con lo que he coincidido Chema, Eliezer, David, Luz, porque han hecho más llevaderas las horas dentro de CIAD.

A mis amigos externos a CIAD: Víctor Mariscal, Astrid, Samuel, María, José por su amistad y buenos momentos durante este proceso.

A mis suegros y cuñado quienes me han aceptado casi como un integrante más de la familia, así como a toda la familia de mi novia que me han recibido con los brazos abiertos y siempre me han hecho sentir su apoyo y cariño.

A mi hermano, su esposa y mis sobrinitas que me han apoyado y han estado conmigo en buenos y no tan buenos momentos.

A mis hermanitos que aunque no tenemos mucho contacto siempre me demuestran su cariño y apoyo.

A mi padre quien me ha enseñado más de lo que él piensa, y que siempre ha estado para darme una palabra de apoyo y de cariño.

A mi madre que siempre ha sido un ejemplo a seguir, y que gracias a ella he logrado lo que he logrado, con apoyo y mucho amor.

A toda mi familia porque cada uno de ellos me ha enseñado algo, y me ha hecho mejorar como persona.

A la persona por la que estoy en esta etapa, la que día a día me enseña cosas nuevas, la que me ha apoyado y motivado, la que me ha dado su confianza y amor, a la mujer que espero sea la compañera de mi vida y a la que amo tanto, a mi novia hermosa Deyanira Fimbres.

Y por último, pero muy importante, gracias a Dios, por darme vida, salud y la oportunidad de vivir esta etapa tan linda, y también por unirme a las personas que me rodean porque sin ellas nada sería lo mismo.

DEDICATORIA

A Dios, ya que por él somos lo que somos y estamos donde estamos, además me ha dado la fuerza, inteligencia y salud para realizar este proyecto.

A mi madre, ya que es un apoyo invaluable y también decirle que es una muestra de que su lucha no ha sido en vano y todo lo que se siembra algún día se cosechará.

A mi padre, quien me ha apoyado incondicionalmente y quien también un día podrá cosechar lo que ha sembrado.

A mi hermano y su familia, por su apoyo y para que vean que todo el tiempo que no he estado a su lado, tiene una gratificación.

A mi novia, ya que es la persona por la que inicié en la investigación y de poco a poco se ha convertido en mi gran motor, en mi motivación y en la razón para llegar a ser más y más. Te amo!

Y por último, a mi abuelo donde quiera que esté! Lo extrañamos!

CONTENIDO

	Página
Listado de Figuras.....	ix
Listado de Tablas.....	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Características e Importancia Comercial del Camarón Blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	3
2.2. El Síndrome de Mortalidad Atípica Afecta a <i>Litopenaeus vannamei</i> de Manera Grave.....	5
2.3. Función Bioquímica, Clasificación y Características de las Lipasas.....	7
2.4. Importancia de las Lipasas como Moléculas Diana para Controlar la Proliferación Bacteriana.....	13
2.5. Genómica y Proteínas Recombinantes.....	18
III. HIPÓTESIS.....	20
IV. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos particulares.....	21
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1. Alineamiento de la Secuencia Aminoacídica Identificada en el Análisis Genómico de <i>V. parahaemolyticus</i> contra Secuencias de Lipasas.....	22
5.2. Modelación de la Secuencia Aminoacídica Correspondiente a una Posible Lipasa Obtenida del Genoma de <i>V. parahaemolyticus</i>	23
5.3. Sobreexpresión de la Proteína.....	23

CONTENIDO (Continuación)

	Página
5.4. Extracción de LipVp Recombinante de Cuerpos de Inclusión.....	24
5.5. Purificación de LipVp Recombinante.....	26
5.6. Replegamiento de LipVp Recombinante.....	26
5.7. Actividad Enzimática.....	27
5.8. Caracterización enzimática.....	27
5.9. Cinética enzimática.....	28
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
6.1. Alineamiento de Secuencias y Modelación de Lipasa de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	29
6.2. Sobreexpresión, Extracción de Cuerpos de Inclusión, Purificación y Replegamiento de LipVp Recombinante.....	34
6.3. Actividad, Cinética e Inhibición Enzimática.....	38
VII. CONCLUSIÓN.....	42
RECOMENDACIONES.....	43
REFERENCIAS.....	44

LISTADO DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de reacción catalizada por lipasas	8
2	Mecanismo de hidrólisis de ésteres llevado a cabo por lipasas.....	12
3	Estructura de sitio activo de lipasa monoacilglicerol de <i>Bacillus sp</i>	16
4	Similitud de ciclipostina con monoacilglicerol	17
5	Alineamiento de lipasa putativa de <i>V. parahaemolyticus</i> contra lipasas verdaderas.....	31
6	Alineamiento de lipasa putativa de <i>V. parahaemolyticus</i> contra hemolisina dependiente de lecitina (LDH).....	32
7	Alineamiento de lipasa putativa de <i>V. parahaemolyticus</i> contra lipasas de otros microorganismos.....	33
8	Modelo de LipVp.....	34
9	Sobreexpresión y extracción de cuerpos de inclusión de LipVp Recombinante.....	35
10	Esquema de plegamiento de una lipasa extracelular catalizado por una foldasa específica de lipasa (Lif).....	36
11	Cromatograma de purificación de LipVp por cromatografía de afinidad a metales (IMAC) y su respectivo SDS-PAGE...	37
12	Gráfica de Lineweaver-Burk.....	41
13	Gráfica de actividad residual agregando Orlistat®.....	41

LISTADO DE TABLAS

Tabla		Página
1	Actividad enzimática de diferentes lipasas.....	39
2	Constantes cinéticas de diferentes lipasas.....	40

RESUMEN

En 2013 en México, se presentó una grave disminución en la producción de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, la cual fue asociada a la presencia de cepas patógenas de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. Estas mortalidades se asocian al síndrome de mortalidad atípica (*early mortality syndrome* o EMS, *acute hepatopancreatic necrosis disease* o AHPND). En un trabajo previo se estudió el genoma de dos cepas de *Vibrio*, una patógena y una inocua para el camarón. En dichos genomas se identificaron enzimas lipasas, de las cuales se seleccionó una para su estudio y caracterización, designada LipVp (Lipasa de *Vibrio parahaemolyticus*). Las lipasas confieren a las bacterias la capacidad de utilizar lípidos como única fuente de carbono e incluso pueden tomar parte en la virulencia de éstas. Después de seleccionar a LipVp se alineó contra otras lipasas y se modeló con el algoritmo PHYRE2, encontrándose mayor similitud con una lipasa de *Pseudomonas aeruginosa*. En el modelo teórico de LipVp se localizó la tríada catalítica conformada por S86, D233 e H255, 5 laminas- β interconectadas con 10 hélices- α , el agujero oxianiónico y posibles aminoácidos para formar un sitio de unión a calcio. Se diseñó un gen sintético con la secuencia de LipVp el cual fue utilizado para transformar bacterias *E. coli* BL21 (DE3). La LipVp recombinante se obtuvo en cuerpos de inclusión, los cuales fueron solubilizados con urea 8 M, posteriormente se dializó contra urea 4 M, para proceder a purificar la proteína por cromatografía de afinidad a metales (IMAC). El repliegamiento de LipVp se realizó mediante diálisis con buffer conteniendo: Tris-HCl 55 mM pH 8.0, NaCl 10.56 mM, KCl 0.44 mM, polietilenglicol 3350 0.055%, MgCl₂ 2.2 mM, CaCl₂ 2.2 mM, L-arginina 550 mM, glutatión reducido 0.5 mM y glutatión oxidado 0.05 mM. Se determinó una $K_m= 4.34$ mM y una $V_{max}= 0.018$ μ M/min utilizando *p*-nitrofenil laurato como sustrato. Por último, se comprobó la inhibición de la actividad enzimática con Orlistat® (tetrahidro lipstatin: (S)-((S)-1-((2S,3S)-3-hexil-4-oxooxetan-2-il) tridecan-2-il) 2-formamido-4-metil pentanoato). En conclusión se corroboró que LipVp codifica para una lipasa funcional, donde se predice una estructura similar a otras. La

enzima LipVp tiene constantes cinéticas similares a las ya reportadas para sustratos lipídicos y esta actividad fue disminuida con un inhibidor específico de lipasas.

Palabras clave: Agujero oxianiónico, Tríada catalítica, Lipasa recombinante, Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados.

ABSTRACT

The white shrimp *Litopenaeus vannamei* production had a serious drawback in Mexico in 2013, associated with the presence of the *Vibrio parahaemolyticus* pathogenic bacteria. Such mortalities are related to the *Early Mortality Syndrome* (EMS), or *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND). Some lipases enzymes were identified in a study previously performed by means of a differential analysis of two shrimp *Vibrio* strains genomes, pathogenic and non-pathogenic, having one selected for characterization. Lipases confer the ability to survive in the presence of lipids to the bacteria as the sole carbon source and they may even become part of their virulence. After having selected the LipVp it was aligned against some other lipases and modeled throughout the PHYRE2 algorithm, being more similar to a lipase from *Pseudomonas aeruginosa*; the catalytic triad S86, D233 and H255, a total of 5- β sheets interconnected with 10 α -helices, the oxyanion hole and possible calcium binding amino acids were identified in the model. A synthetic gene LipVp sequence was used to transform the *E. coli* BL21 (DE3) strain with this plasmid. The recombinant LipVp was obtained insoluble in inclusion bodies which were solubilized with 8 M urea, then dialyzed against 4 M urea, in order to proceed to purify the protein by metal affinity chromatography (IMAC). Refolding LipVp was performed using dialysis buffer containing: 55 mM Tris-HCl pH 8.0, 10.56 mM NaCl, 0.44 mM KCl, 0.055% polyethyleneglycol 3350, 2.2 mM MgCl₂, 2.2 mM CaCl₂, 550 mM L-Arginine, 0.5 mM Glutathione reduced and 0.05 mM oxidized Glutathione. A $K_m = 4.34$ mM and $V_{max} = 0.018$ μ M/min were determined using *p*-nitrophenyl laurate as substrate. Finally, inhibition of enzymatic activity was corroborated with Orlistat® (tetrahydro lipstatin: (S)-((S)-1-((2S,3S)-3-hexyl-4-oxooxetan-2-yl) tridecan-2-yl) 2-formamide-4-methyl pentanoate). In conclusion, it was confirmed that the chosen gene coding for a lipase, which has similar structural characteristics than other lipases, has the ability to hydrolyze lipids

and has kinetic constants similar to those reported for these enzymes, and this activity can even be decreased by a lipase specific inhibitor.

Keywords: Oxyanion hole, catalytic triad, recombinant lipase, immobilized-methal affinity chromatography.

I. INTRODUCCIÓN

El camarón blanco (*Litopennaeus vannamei*) ha tomado relevancia por su gran aporte económico a nivel global, principalmente entre países como China, Malasia y México, entre otros. Debido a la adaptación del camarón blanco a los procesos de cultivo intensivo, esta especie es la más cultivada por técnicas de acuicultura nivel mundial (FAO, 2012). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), también indican que el camarón es una de las especies marinas más importantes con una producción en el 2012 de 7.6 millones de toneladas (t). En México la producción de camarón del 2011 supera las 184 mil t, siendo el estado de Sonora el segundo productor más importante con alrededor de 52 mil t (CONAPESCA, 2012). El camarón es un recurso que genera empleo y divisas, por lo tanto es de suma importancia mantener su bienestar y que no sea afectado por ningún tipo de enfermedad.

Existen diversos agentes patógenos para el camarón, los cuales de forma cíclica han afectado su producción. Anteriormente virus como el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), de la mancha blanca, Taura, han sido devastadores para la actividad. A partir del 2013 y procedente de Asia, aparece un síndrome de mortalidad temprana o atípica asociado a cepas específicas de *Vibrio parahaemolyticus* (Tran et al., 2013). En el año 2013 se observó un decremento en la producción de camarón en México, lo cual fue atribuido al síndrome de mortalidad atípica, a su vez asociado a *V. parahaemolyticus*. Este agente patógeno del camarón ha tomado gran importancia por las considerables pérdidas que provoca, por lo que es importante la búsqueda de tratamientos para el combate y prevención de

infecciones. En este sentido es importante el estudio y caracterización de las proteínas propias de la bacteria, como potenciales sitios blanco para un posible tratamiento.

Entre las proteínas que pueden utilizarse como objetivo de la sanidad acuícola se encuentran las lipasas. Estas enzimas poseen características y función bioquímica que las vuelven importantes sitios de ataque. La actividad funcional de las lipasas se sustenta en la tríada de aminoácidos clásica: nucleófilo-ácido-histidina, y su función es hidrolizar los enlaces ésteres de acilgliceroles *in vivo* (González-Bacero et al., 2010). La serina (S) como nucleófilo se ha conservado en gran parte de las lipasas, mientras que los ácidos son ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E). Esta tríada permite inferir el compuesto que pudiera interaccionar con el sitio catalítico y por lo tanto, bloquear su actividad. De tal manera, las características de estas enzimas pueden permitir desarrollar inhibidores específicos para estas proteínas, los cuales no permitirían a las lipasas realizar su función bioquímica lo que repercutiría en la proliferación del patógeno.

Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo es estudiar las características bioquímicas y estructurales de una lipasa de *V. parahaemolyticus*, cuya secuencia fue obtenida del genoma de una cepa patógena para el camarón (Gomez-Jimenez et al., 2014). Este trabajo proporcionará las bases para estudios posteriores de proteínas que pudieran funcionar como sitios diana para fármacos que detengan la proliferación de la mencionada bacteria.

II. ANTECEDENTES

2.1. Características e Importancia Comercial del Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*).

La industria de los productos marinos contribuye de gran forma a la economía mundial, se ha estimado que en el 2012, se generaron \$144 400 millones de dólares mediante la pesca y acuicultura (FAO, 2014). Dentro del consumo de productos marinos, el camarón es uno de los que más se consume en el mundo y al presentar un problema en cuanto al agotamiento de éste de forma silvestre se ha recurrido a su cultivo, lo cual satisface de gran manera la demanda de este alimento (Rodríguez-Valencia et al., 2010). A nivel mundial también este crustáceo es una de las especies marinas mas cultivadas, alcanzando en el 2010 hasta 2.6 millones de toneladas (FAO, 2012). Por consiguiente, el camarón representa grandes ganancias económicas, tanto para el país que lo produce como para el que lo procesa y comercializa.

En el año 2010, la producción mundial de crustáceos era de: 29.4% de especies de agua dulce y del 70.6% de especies provenientes del mar. Dentro del porcentaje de especies marinas se encontraba mayormente el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), el cual también se puede incluir dentro de la producción de agua dulce. Debido a la gran adaptación del camarón blanco a los procesos de producción, es la especie que más éxito ha tenido a nivel internacional en la acuicultura. De las diversas especies cultivadas de camarón, en el 2010 *L. vannamei* alcanzó hasta un 71.8% de la producción mundial, porcentaje del cual el 77.9% se produjo en Asia, continente diferente al continente de su origen, en el cual se produjo el porcentaje restante

(FAO, 2012). El camarón blanco es el producto pesquero que más auge ha tomado en cuanto a su producción en la actualidad y por ende, gran relevancia económica.

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

El cultivo de camarón en el Golfo de California solo requirió de 20 años para representar el 90% de la producción nacional de este crustáceo, tomando con ello gran importancia (Rodríguez-Valencia et al., 2010). En el año 2013 se produjeron 127,517 toneladas de camarón en México, destacando los estados de Sinaloa (61,002 t) y Sonora (25,639 t), como primer y segundo productor respectivamente, lo que muestra la disminución con respecto al 2011 donde se produjeron más de 184 mil toneladas (CONAPESCA, 2013). Sin embargo, es importante resaltar que en este informe no se cuenta con datos exactos acerca del camarón blanco, pero debido a que este peneido es el más cultivado en estas costas, se puede asumir que es el mayormente producido.

México se ha convertido en la actualidad en uno de los principales exportadores de camarón a nivel mundial, siendo Estados Unidos de América (E.U.A.) el destino principal de éste crustáceo (FAO, 2013). Estados Unidos de América es el principal importador de camarón en el mundo, en este contexto, México en el

2007 se convirtió en el cuarto país en cuanto a valor, exportando a esta nación (Gonzalez, 2008). México al convertirse en un importante exportador de camarón debe prestar atención en este producto, y desarrollar sistemas que dificulten la llegada de patógenos a este crustáceo, ya que existen varias enfermedades que le pueden afectar de gran manera y disminuir gravemente su producción.

En los últimos años se ha observado un decremento grave en la producción de camarón, situación que se le atribuía al virus de la mancha blanca, al virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), a las bacterias causantes de hepatopancreatitis necrotizante (NHP) pero principalmente al síndrome de mortalidad atípica (SMA), el cual causó pérdidas económicas importantes en varios lugares del mundo. A pesar de los estudios estadísticos que se han realizado, aún faltan detalles acerca de las cifras exactas del camarón blanco en la actualidad, ya que se mencionan cifras de todas las especies de camarón en conjunto.

2.2. El Síndrome de Mortalidad Atípica Afecta a *Litopenaeus vannamei* de Manera Grave

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

final de esta infección. Esta enfermedad es de suma importancia ya que está atacando de manera grave las granjas camaronícolas en los años recientes.

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria Gram negativa, que se puede encontrar en ambientes marinos por su capacidad de tolerar salinidad, además tiene la característica de producir toxinas, las cuales son de las moléculas más estudiadas de su patogénesis (Letchumanan et al., 2014). Esta bacteria es un patógeno emergente en Norteamérica (Makino et al., 2003). Tran et al. (2013) demostraron que un caldo de cultivo al que se le retiraron las bacterias provocaba el SMA, demostrando así la producción de toxinas y su posterior liberación al medio en el que se encuentra este microorganismo. Algunas de estas toxinas son hemolisinas y la toxina relacionada con insectos (Pir). Las hemolisinas pueden actuar formando poros en la membrana de las células del hospedero, así como pueden tener actividad de lipasa al degradar componentes de esta membrana (Joshi et al., 2014). Incluso con estas hemolisinas se puede diferenciar la cepa de *V. parahaemolyticus* que es patógeno para humano, de la cepa que afecta al camarón. Las tres hemolisinas que puede tener este patógeno son: hemolisina dependiente de lecitina (ldh), directa termoestable (tdh) y la relacionada con tdh (trh). La cepa patógena para humano es tdh+ y trh+, mientras que la patógena para camarón tiene un genotipo tdh-, trh- y ldh+. Por otra parte, Pir se ha investigado por su gran patogenicidad y se ha implicado fuertemente con el SMA (Lee et al., 2015). Este hallazgo permite orientar estudios futuros a estas moléculas y a otras de la cepa patógena de *V. parahaemolyticus*.

En México, se logró determinar que grandes mortalidades en el camarón fueron debido al SMA, lo cual vuelve a este síndrome en un problema global para la camaronicultura. En 2013 se observó una caída en la producción de camarón blanco del 65% en los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit, pero se desconocía la causa de esta disminución (Nunan et al., 2014). Después de estudios realizados en diferentes granjas de la región del Noroeste de México,

Nunan et al. (2014) lograron demostrar que el SMA fue el causante del decremento en la producción de este organismo. Por tal motivo, se puede confirmar que este síndrome es un problema que aqueja al cultivo de camarón de manera global, ya que se ha extendido desde las costas de Asia hacia las costas de América.

Dentro de las enfermedades que afectan al camarón blanco existe mucha información, pero no así de los posibles tratamientos a los que se pudiera someter este peneido. Por lo anterior, resulta de gran importancia realizar estudios de posibles moléculas diana para atacar a los diferentes patógenos que afectan a este peneido y con esto, poder generar un tratamiento en contra del microorganismo infeccioso. Es por esta razón, que las lipasas se convierten en un modelo de estudio relevante del *V. parahaemolyticus*, ya que éstas pudieran funcionar como un buen blanco de ataque a este patógeno. Lo anterior se menciona debido a que estas enzimas regulan actividades primordiales de los microorganismos e incluso, en algunas situaciones, son esenciales para algunas rutas metabólicas. De la misma manera estas proteínas poseen características bioquímicas y estructurales que pueden ser específicas de cada microorganismo, lo que sería de gran trascendencia para poder diferenciarlas e inhibirlas de manera específica.

2.3. Función Bioquímica, Clasificación y Características de las Lipasas.

Las lipasas (E.C.3.1.1.3) son enzimas esenciales para diferentes organismos cuando su única fuente de energía o de carbono es lipídica. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces éster de grasas y aceites con la posterior liberación de diacilglicerolos, monoacilglicerolos, ácidos grasos libres y/o glicerol, como se muestra en la figura 1 (Arpigny y Jaeger, 1999; Zhang y Kim, 2010). Además, estas proteínas pueden realizar otras funciones como son la

esterificación, transesterificación e interesterificación de grasas y aceites (Mala y Takeuchi, 2008). Las lipasas tienen tamaños que van desde 20 kDa a los 60 kDa y son estables en un amplio rango de pH, temperatura y solventes orgánicos, así como también, algunas son dependientes de iones como el calcio (Mala y Takeuchi, 2008; Nardini et al., 2000; Navarro González y Periago Castón, 2012). También, se ha demostrado que existen lipasas indispensables en el catabolismo de lípidos, como *volA*, en *Vibrio cholerae*, la cual es independiente de iones metálicos (Pride et al., 2014). Una característica fundamental de esta enzima es su activación en la interfase polar/no-polar, donde ocurre un cambio conformacional para poder ejercer su catálisis, este proceso ha sido ampliamente estudiado en enzimas de células eucariotas (Arpigny y Jaeger, 1999). Dentro de las lipasas existe una gran variedad, ya que pueden poseer características similares, pero también algunas que las diferencian fácilmente, algunas de éstas muy diversas son los parámetros cinéticos.

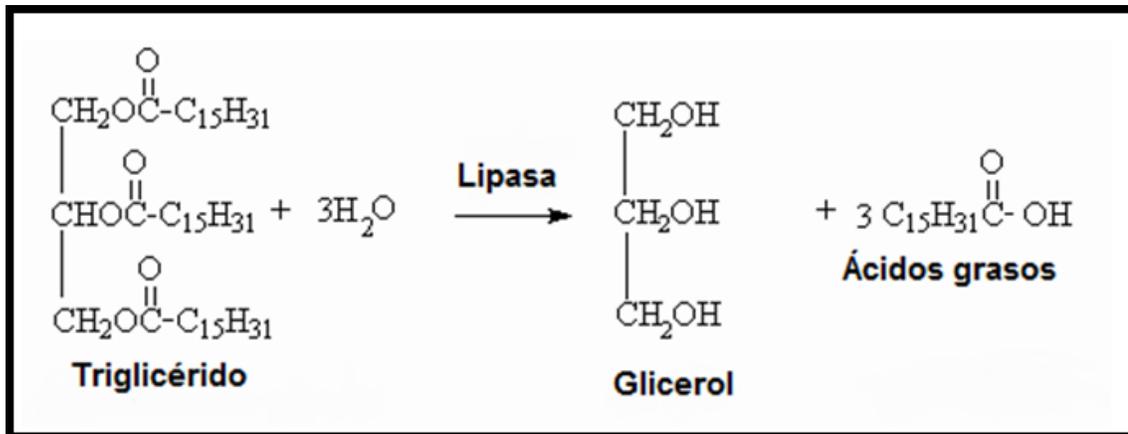


Figura 1. Esquema de reacción catalizada por lipasas. Lipasa hidroliza un triglicérido de cadena larga (> 10 carbonos), liberando en una reacción completa un glicerol y tres ácidos grasos libres.

Para lograr la caracterización bioquímica de una enzima es de gran importancia determinar parámetros cinéticos los cuales explicarán detalles importantes de su actividad, entre estos valores cinéticos se encuentran la K_m y la V_{max} , donde

la primera es la constante de Michaelis-Menten, que se relaciona con la afinidad de la enzima por el sustrato, y la segunda es la velocidad máxima que alcanza la reacción catalítica, siendo estos valores correspondientes a una cinética de Michaelis-Menten (Sharma et al., 2001). Los valores de K_m en lipasas de bacterias pueden variar dentro de un rango de 1.8 a 12 mM mientras que sus valores de V_{max} se encuentran entre 0.416 y 30 micromoles por minuto (Hasan et al., 2009; Sharma et al., 2001). Por lo tanto, es importante determinar estos parámetros cinéticos de cualquier lipasa que sea estudiada, para conocer su eficiencia catalítica, preferencia por sustrato, necesidad de iones o cofactores, entre otras características.

Las enzimas lipolíticas se han logrado clasificar en función de su especificidad al sustrato, de la secuencia aminoacídica conservada y por la sensibilidad a diversos inhibidores de estas enzimas (Park et al., 2006). En la actualidad, una clasificación que ha sido aceptada es la basada en la secuencia de aminoácidos y en sus propiedades biológicas (Arpigny y Jaeger, 1999). En dicho estudio se clasificaron estas enzimas en 8 familias. Cada una de estas familias tiene peculiaridades que se diferencian de las demás (Arpigny y Jaeger, 1999; Bornscheuer, 2002; Jaeger et al., 1994):

- La familia I de enzimas lipolíticas bacterianas, también llamada Familia de lipasas verdaderas cuenta con 22 miembros, los cuales se han dividido en 6 subfamilias, teniendo la particularidad de ser secretadas al medio, siendo las subfamilia 1, 2 y 3 aquellas que conservan características muy similares, y tener miembros de *Pseudomonas spp.*
- La familia II, se distingue por no preservar el pentapéptido característico de las lipasas, rodeando a la Ser catalítica una secuencia de GDSE, siendo no muy comprendida su función ya que en lugar de una triada contiene una diada catalítica formada por Serina e Histidina.
- La familia III, contiene lipasas extracelulares.

- La familia IV son las lipasas adaptadas al frío y presentan una secuencia conservada muy similar a las lipasas sensibles a hormonas de mamíferos (HSL), lo cual pudiera ser la explicación de su actividad a bajas temperaturas.
- La familia V está conformada por lipasas de bacterias mesofílicas, tanto adaptadas al frío como al calor, además de presentar homología con enzimas no lipolíticas, como la haloperoxidasa.
- La familia VI está formada por las esterasas más pequeñas conocidas, con un peso de 23-26 kDa, y no se tiene mucha información acerca de ellas, solo que hidroliza pequeños sustratos pero no triglicéridos de cadena larga.
- La familia VII está formada por enzimas de alrededor de 55 kDa y tienen una identidad aproximada del 30% con esterasas de células eucariotas.
- Y por último, la familia VIII es de las menos estudiadas, con pocos miembros y teniendo como característica principal un dominio S-X-X-L (X = cualquier aminoácido) en el sitio activo.

Es importante mencionar esto debido a que las lipasas bacterianas que se estudian pueden ser colocadas en alguna de estas familias, para lograr su clasificación.

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

Las esterasas (E.C. 3.1.1) son enzimas que rompen o forman enlaces éster, son un diverso grupo de enzimas ya que están presentes en animales, plantas y en microorganismos. Dentro de las esterasas hay dos subgrupos principales, las lipasas (E.C. 3.1.1.1) y las esterasas verdaderas (E.C. 3.1.1.3). Las lipasas, también llamadas triacilglicerol hidrolasas, se diferencian de las esterasas verdaderas (carboxil éster hidrolasas) ya que sufren una activación interfacial (Bornscheuer, 2002). Por otro lado, las esterasas siguen una cinética clásica de Michaelis-Menten, mientras que las lipasas para poder seguir este comportamiento requieren de baja concentración de sustrato. Además, las esterasas tienen un motivo adicional **G-X-X-L** en su secuencia de aminoácidos. Este motivo es adicional al pentapéptido observado en las lipasas el cual no tiene relevancia en estas enzimas.

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la hidrólisis de los esterres por lipasas o esterasas es conservado. Primero se lleva a cabo un ataque nucleofílico del O^- de la serina catalítica al carbono del grupo carbonilo del éster, formando un intermediario tetrahédrico que será estabilizado por la histidina y el aspartato catalíticos, así como por dos residuos que tengan una amida (aminoácidos del agujero oxianiónico) para que formen puentes de hidrógeno. Posteriormente el alcohol es liberado, formándose un complejo acil-enzima para que, por un ataque nucleofílico de un ion hidroxilo, sea liberado el ácido graso y la enzima quede libre (Figura 2) (Bornscheuer, 2002; Jaeger et al., 1994).

Para precisar detalles en cuanto a características bioquímicas de las lipasas se puede mencionar que los pH óptimos para estas enzimas se manejan entre 6 y 10, mientras que las temperaturas suelen estar entre 30-60°C (Hasan et al., 2009; Sharma et al., 2001). Se ha demostrado que los pH de 7 a 8 pueden favorecer la actividad catalítica de las lipasas, ya que, a este pH la histidina y el ácido aspártico o glutámico se cargan negativamente (debido al pK del grupo imidazol de la cadena lateral de la histidina y al del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido aspártico o ácido glutámico), permitiendo la liberación del ácido

graso (Pride et al., 2014). También, las temperaturas entre los 35 °C y 40 °C favorecen la actividad de la mayoría de las lipasas, sin embargo existen lipasas que actúan a temperaturas mayores y menores (Hasan et al., 2009). Por estos rangos, tanto de pH como de temperatura, se puede inferir la flexibilidad de la enzima en su sitio catalítico pero se debe de estudiar la actividad específica de la lipasa de interés, para encontrar los parámetros idóneos de su actividad.

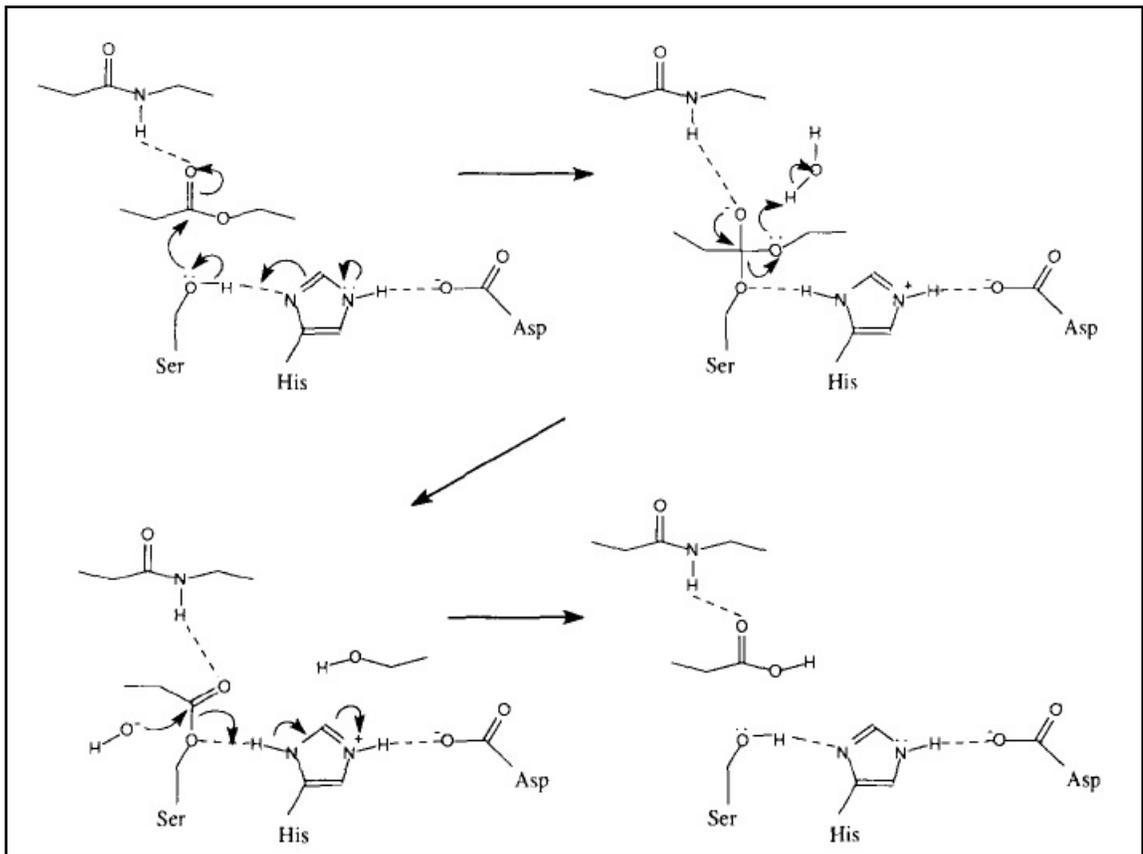


Figura 2. Mecanismo de hidrólisis de ésteres llevado a cabo por lipasas (Jaeger et al., 1994).

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

Los estudios acerca de estas enzimas han elucidado sus aplicaciones, su función bioquímica y sus características estructurales. Las lipasas se han estudiado debido a que hidrolizan a su sustrato en sitios específicos lo que ha llevado a muchas aplicaciones, entre éstas se encuentra la síntesis de compuestos orgánicos, así como la formulación de detergentes, entre otras (Mala y Takeuchi, 2008). Estas proteínas tienen una estructura central de laminas β interconectadas por hélices α . Además, el centro catalítico es una tríada conservada entre las lipasas, compuesta por serina, ácido aspártico o glutámico e histidina (Navarro González y Periago Castón, 2012). Además, la serina catalítica se encuentra en un pentapéptido generalmente conservado Gly o A-X-S-X-G. Por todo lo anterior, resulta importante el estudio estructural de las lipasas bacterianas para encontrar sitios conservados y posibles inhibidores específicos de éstas.

2.4. Importancia de las Lipasas como Moléculas Diana para Controlar la Proliferación Bacteriana.

Las lipasas son enzimas que se estudian con varios objetivos, además del conocimiento básico se han buscado aplicaciones para controlar enfermedades humanas no infecciosas, mientras que el tema de enfermedades infecciosas ha

sido poco estudiado desde este punto de vista. El objetivo de muchos estudios ha sido la lipasa pancreática, la cual se relaciona con temas de obesidad (Birari y Bhutani, 2007). Esta lipasa se ha estudiado con el fin de descifrar su acción específica y rol en el metabolismo lipídico en humanos. Al conocer detalles específicos de esta enzima como sus sustratos, se han estudiado inhibidores de la misma para evaluar su posible efecto contra de la obesidad, obteniendo resultados alentadores en este ámbito. Estas enzimas tienen una implicación en muchos procesos muy importantes, principalmente en los que involucran producción de energía. Por lo cual, si se dirige una mayor cantidad de estudios hacia las lipasas bacterianas, sería muy probable que se encontraran resultados novedosos y prometedores, como se ha hecho anteriormente.

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

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

explorado en esta área, que se puede explotar y que muy probablemente arrojaría resultados muy prometedores.

Tsurumura y Tsuge (2014) proponen a una lipasa bacteriana como sitio de ataque promisorio de un antibiótico. Este estudio se basa en la cristalización de la lipasa monoacilglicerol de *Bacillus sp* con el fin de establecer claramente el sitio activo, su selectividad por sustrato y también mostrar características importantes de éste (Figura 3). Esta estructura concuerda con la presentada por Rengachari et al. (2013) donde además, se muestra que la isoleucina 145 (I145) puede restringir el acceso al sitio de unión de esta lipasa. Los autores antes mencionados concluyen con la importancia de elucidar tanto la selectividad como el sitio activo de la enzima, ya que esto permitirá en un futuro desarrollar un fármaco con posible acción de antibiótico.

Además de los trabajos mostrados anteriormente, se han desarrollado otros que se basan en el aspecto industrial en el que se pudieran utilizar las lipasas bacterianas. Entre los microorganismos que más se han estudiado en este ámbito están *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* (Arpigny y Jaeger, 1999). Las lipasas aisladas de *Bacillus aerius* pudieran utilizarse para la síntesis de ésteres con una probable implicación como anticancerígeno (Saun et al., 2014). Incluso, existen más estudios acerca de lipasas relevantes para la industria química y farmacéutica, entre otras, que no se abordaran dentro de este trabajo. Sin embargo, es importante mencionar que estas enzimas tienen funciones muy particulares, así como conservan características tanto estructurales como bioquímicas muy similares dentro de la familia de las lipasas.

La investigación a fondo de estas proteínas tomaría gran relevancia, debido al importante uso que se le puede dar en la industria farmacéutica. Por lo tanto, sería interesante elucidar estructuras específicas de cada una de estas enzimas para analizar sus posibles sitios blancos y con esto, diseñar, sintetizar y estudiar compuestos que sean inhibidores específicos de las mismas. Lo

anterior, con el fin de detener la proliferación de bacterias causantes de grandes mortalidades en el cultivo de camarón, siendo un ejemplo muy importante de la actualidad, *V. parahaemolyticus*.

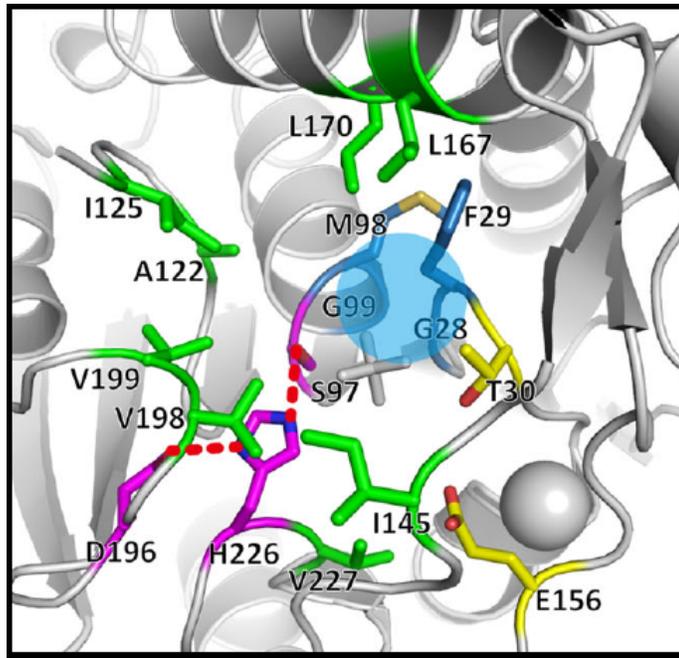


Figura 3. Estructura de sitio activo de lipasa monoacilglicerol de *Bacillus* sp. El color rosa representa el sitio activo, donde actúan los aminoácidos S97, D196 e H226. El círculo azul representa el agujero oxianiónico: G28, F29, M98 y G99. Y por último se destacan los aminoácidos hidrofóbicos: A122, I125, I145, L167, L170, V198, V199 y V227. Adaptado de Tsurumura y Tsuge (2014).

Las pocas investigaciones que se han realizado en conocer las lipasas bacterianas e inhibirlas han presentado resultados muy prometedores. Estos trabajos se han dirigido a inhibidores que contienen fósforo y en específico, con estructuras del ácido fosfónico, modificando solamente el hidrógeno por otros sustituyentes alifáticos. Se ha demostrado que la familia de ciclipostina son inhibidores prometedores de lipasas, ya que se logró detener el crecimiento de micobacterias, con solo agregar este inhibidor al medio donde se encontraban estas bacterias (Seibert et al., 2008). La ciclipostina (Figura 4) tiene una

estructura muy similar a los monoacilgliceroles, lo cual explica su acción inhibitoria, ya que puede entrar en el sitio activo y bloquear su actividad. El descubrimiento de las características bioquímicas y estructurales de las lipasas micobacterianas permitió el desarrollo de este compuesto con acción inhibitoria. Por lo tanto, el descubrir las principales características de las lipasas de *V. parahaemolyticus* podría permitir a largo plazo desarrollar algún fármaco selectivo que detenga su proliferación en el camarón blanco.

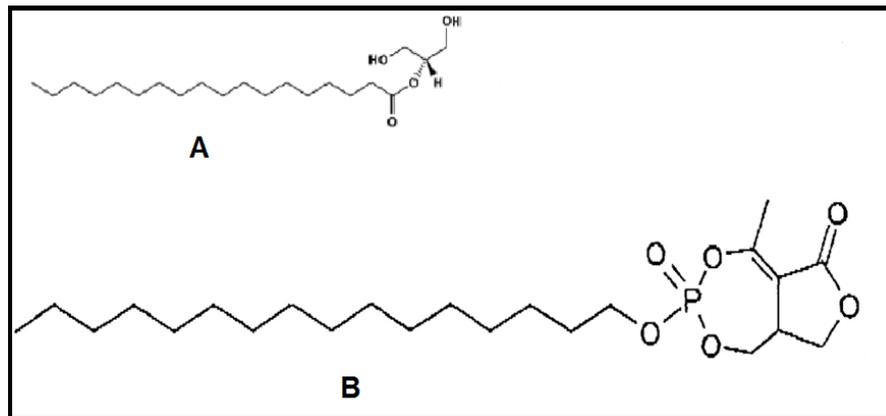


Figura 4. Similitud de ciclipostina con monoacilglicerol. A) Monoacilglicerol. B) Ciclipostina. El resto de los miembros de esta familia difieren en sustituyentes en la cadena carbonada pero conservan su similitud con monoacilglicerol. Adaptado de Seibert et al. (2008).

En la bibliografía actual se encuentran muchos trabajos acerca de inhibidores de lipasas de humanos (Cai et al., 2012; Gao y Mulberg, 2014; Hamzaoui et al., 2015), pero pocos que se enfoquen en lipasas bacterianas. En este contexto, es fundamental la búsqueda de inhibidores específicos para las lipasas bacterianas, los cuales pudieran presentar efectos en contra del patógeno al que se desea atacar y selectividad al no inhibir a las lipasas del huésped. Los inhibidores deben de presentar una estructura que ensamble de manera específica en el sitio catalítico de la lipasa o en su defecto, unirse a otro sitio de la misma provocando un cambio conformacional, que a su vez concluya en un cambio en el sitio activo y por lo tanto, afecte su actividad catalítica. Lo anterior,

se puede realizar conociendo la estructura tridimensional y las principales características bioquímicas de la enzima.

2.5. Genómica y Proteínas Recombinantes

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

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

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

Por lo descrito anteriormente, en este trabajo se propuso la caracterización enzimática de una posible lipasa identificada en el genoma de la cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus*, ya que sus características muestran a estas enzimas como prometedores sitios de ataque de algún fármaco, lo cual se podrá elucidar con estudios futuros. Dicha caracterización se llevó a cabo en una lipasa recombinante sobreexpresada en *E. coli*.

III. HIPÓTESIS

En el genoma de una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* se encuentra un gen que codifica para una secuencia aminoacídica con alta similitud a una lipasa, que contiene la tríada catalítica específica His, Asp, Ser, la cual tiene la capacidad enzimática para hidrolizar lípidos y además su actividad puede ser bloqueada por inhibidores de lipasas.

IV. OBJETIVOS

4.1. General

Identificar y caracterizar estructural y bioquímicamente, una proteína recombinante derivada de una secuencia con similitud a lipasas, obtenida del análisis genómico comparativo de *V. parahaemolyticus* asociado al SMA del camarón.

4.2. Específicos

1. Identificar en el genoma de *V. parahaemolyticus* patógeno para el camarón, una secuencia que corresponda a una proteína lipasa, por comparación con secuencias depositadas en bancos de datos.
2. Obtener un modelo tridimensional teórico de la lipasa.
3. Sobreexpresar la secuencia aminoacídica en bacterias *E. coli* y purificarla mediante cromatografía de afinidad a metales IMAC.
4. Demostrar la actividad lipolítica de la proteína recombinante utilizando sustratos específicos para lipasas.
5. Determinar las constantes cinéticas K_m y V_{max} para la enzima.
6. Demostrar la inhibición de la enzima obtenida por inhibidores específicos de enzimas lipasas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico, bioquímico o biología molecular, según fue requerido.

5.1. Alineamiento de la Secuencia Aminoacídica Identificada en el Análisis Genómico de *V. parahaemolyticus* contra Secuencias de Lipasas.

Primeramente, en los genomas de las cepas de *V. parahaemolyticus*, tanto patógena como inocua para el camarón (Gomez-Jimenez et al., 2014), fueron localizadas las secuencias que tuvieran anotaciones de posibles lipasas, esto mediante el programa MyRast. Se identificaron nueve secuencias en cada una de las cepas.

Después, se utilizó el software Clustal Omega para realizar alineamientos de las secuencias aminoacídicas candidatas a ser lipasas de ambas cepas de *V. parahaemolyticus*. Estas secuencias fueron comparadas con lipasas verdaderas que previamente han sido depositadas en el banco de datos Genbank del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Posterior al alineamiento, se eligió la secuencia aminoacídica con mayor similitud a lipasas y que presentara la tríada catalítica característica de las enzimas lipolíticas.

5.2. Modelación de la Secuencia Aminoacídica Correspondiente a una Posible Lipasa Obtenida del Genoma de *V. parahaemolyticus*.

Se realizó una modelación estructural de la secuencia aminoacídica, utilizando el software PHYRE2 (Kelley et al., 2015). Al tener la secuencia de aminoácidos de interés se depositó en el software en formato FASTA, esta herramienta bioinformática generó un modelo por homología con modelos depositados en la base de datos de estructura de proteínas (PDB). Se utilizó el software Pymol como visualizador del modelo de LipVp. Este modelo se presenta como resultados obtenidos para estudios futuros, y así poder darle validez a dicho modelo mediante datos experimentales a través de herramientas biofísicas como la cristalografía de rayos X.

5.3. Sobreexpresión de la Proteína

Un stock de bacterias *E.coli* BL21 (DE3) (50 µL) de diferentes cepas, tales: BL 21 (DE3), Gold, Star, Shuffle, Arctic, Rosetta 2, SI y Top10, se transformaron mediante choque térmico con el plásmido pJ414 (20 ng) recombinante, conteniendo la secuencia codificante de la proteína de *V. parahaemolyticus* con alta similitud a lipasas, además de una cola de histidinas para facilitar su purificación, y un gen codificante para una betalactamasa, la cual le confiere resistencia a ampicilina (DNA 2.0). La región codificante del plásmido se encuentra optimizada con el uso de codones bacterianos, de tal modo que *E. coli* produzca de forma adecuada la proteína de interés.

Primeramente se mezclaron las bacterias competentes y el plásmido, y posteriormente se sometieron a un choque térmico, incubando 10 min en hielo seguido de 1 min a 42 °C, regresando de inmediato al hielo. Después del choque térmico se adicionaron 250 µL de medio SOC (Super Optimal broth with

Catabolite repression) para su recuperación, continuando con una incubación a 37 °C por 1-3 horas con agitación constante (225 rpm). Posteriormente estas células fueron sembradas en placas con agar Luria-Bertani (LB) adicionado con ampicilina (100 µg/mL). Se incubaron por 24 horas a 37 °C para obtener las colonias aisladas de las bacterias transformadas (Sambrook et al., 1989).

Las bacterias que fueron transformadas correctamente crecieron en placas que contenían ampicilina (100 µg/mL). Una vez transformadas las bacterias, un stock de la cepa BL21 (DE3) fue utilizado para inocular 100 mL de medio LB y se incubó durante 12 h a 37 °C con agitación constante de 225 rpm. Después, éste se utilizó para inocular 1 L de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante de 225 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6, para posteriormente inducir la expresión de la proteína añadiendo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1 mM, y dejando incubarse por toda la noche a 37 °C con agitación constante 225 rpm.

Después de las 24 horas el cultivo fue centrifugado a 7000 rpm a 4°C por 20 min (Sorvall RC 5C Plus, E.U.A.) para recuperar las bacterias, después lavadas con NaCl 0.9% en una proporción de 20 mL por g de pellet, y recolectadas por centrifugación. El pellet bacteriano fue almacenado a -80°C hasta su uso.

5.4. Extracción de LipVp Recombinante de Cuerpos de Inclusión

El pellet bacteriano fue resuspendido en buffer de lisis conteniendo: Na₂PO₄ 20 mM pH 8, ditioneitol (DTT) 1mM, fluoruro de fenil metano sulfonilo (PMSF) 0.5 mM, NaCl 0.5 M y 0.1 mg/mL de lisozima de clara de huevo, a una razón de 5 mL/g de bacterias. La suspensión bacteriana fue lisada por sonicación mediante 6 pulsos de 15 s cada uno en baño de hielo, y centrifugada a 30000 g por 20

min a 4°C. Después de la centrifugación se recuperó el pellet con la biomasa bacteriana, ya que en esa fracción fue encontrada la proteína de interés (LipVp) en forma de cuerpos de inclusión.

Para realizar la extracción de LipVp de los cuerpos de inclusión se llevo a cabo la técnica descrita por Coligan (2003), donde se realizan lavados con diferentes buffers conteniendo:

Buffer 1: Tris 50 mM pH 8.0, DTT 5 mM, Triton X-100 2% y EDTA 5 mM pH 8.0.

Buffer 2: Tris 50 mM pH 8.0, DTT 5 mM y EDTA 5 mM pH 8.0.

Buffer 3: Tris 50 mM pH 8.0, DTT 5 mM, EDTA 5 mM pH 8.0 y Urea 8 M.

Primeramente la fracción insoluble del lisado de las células, conteniendo los cuerpos de inclusión de la proteína de interés, fue lavada con Tritón para lo cual fue resuspendida por sonicación en Buffer 1 a una razón de 4 ml por g de pellet. Posteriormente se centrifugó utilizando una centrifuga en Sorvall RC PLUS con un rotor SS-34 durante 20 minutos a 30,000xg a 4°C. El sobrenadante fue descartado, y el pellet obtenido fue lavado nuevamente utilizando el Buffer 2, el cual no tiene detergente, bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Para finalizar, los cuerpos de inclusión fueron solubilizados en Buffer 3, durante 4 horas para después centrifugar bajo las mismas condiciones anteriores.

Después de extraer y solubilizar la LipVp de los cuerpos de inclusión, se procedió a remover el agente caotrópico (urea). Esta remoción se realizó por etapas, en la primera se llevó a cabo una diálisis de la fracción soluble conteniendo urea 8 M contra buffer de replegamiento (buffer de fosfatos de sodio 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, DTT 10 mM, PMSF 15 µM y urea 4 M) por toda la noche. En la siguiente etapa se realizó la purificación de LipVp para proseguir con el replegamiento de la LipVp.

5.5. Purificación de la LipVp Recombinante.

La purificación de la LipVp Recombinante se realizó mediante cromatografía de afinidad a metales, utilizando un cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare, Suecia). Las muestras clarificadas mediante centrifugación y equilibradas por diálisis con buffer A (Buffer Na_2PO_4 20mM, NaCl 0.5 M, Urea 4 M, pH 8), se cargaron a una columna His-Trap (GE Healthcare) de 5 mL previamente equilibrada en buffer A. La elución de la proteína unida a la matriz se realizó con un gradiente lineal de 0 a 500 mM de imidazol en buffer A, y se colectaron fracciones de 2 mL, a un flujo de 1 ml/min.

Para determinar la pureza de las fracciones obtenidas, estas fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), utilizado como tinción azul de Coomassie (Laemmli, 1970).

5.6. Replegamiento de LipVp Recombinante

La composición del buffer de replegamiento utilizado fue obtenida después de realizar la técnica de Armstrong et al. (1999). Para lo anterior se analizaron 16 buffers de replegamiento del sistema comercial FoldIT Screen (Hampton Research). El buffer con mejor resultados fue: Tris-HCl 55 mM pH 8.0, NaCl 10.56 mM, KCl 0.44 mM, PEG 3350 0.055%, MgCl_2 2.2 mM, CaCl_2 2.2 mM, L-arginina 550 mM, glutatión reducido 0.5 mM y glutatión oxidado 0.05 mM. La enzima LipVp pura se llevó a una concentración de urea 2 M por dilución contra el buffer anterior, para finalmente por diálisis escalonada llevar a trazas el contenido de urea. Una vez replegada la proteína esta fue dializada contra Tris-HCl 55 mM pH 8.0, NaCl 10.56 mM y CaCl_2 2.2 mM.

5.7. Actividad Enzimática.

La actividad enzimática se llevó a cabo utilizando como sustrato *p*-nitrofenil laurato, probando diferentes concentraciones en un rango de 100 μ M a 2 mM, utilizando la técnica de Nawani et al. (1998) modificada, en la cual se incubó la proteína con un buffer de actividad (Tris 2.5 mM pH 8 y NaCl 2.5 mM) por 5 minutos a 37°C, después se agrega el sustrato y se monitorea el incremento de la absorbancia por 3 minutos a una longitud de onda de 410 nm. El sustrato fue disuelto en una mezcla 50:50 de etanol y DMSO

5.8. Caracterización Enzimática.

La caracterización de la actividad enzimática se llevó a cabo utilizando como sustrato *p*-nitrofenil laurato (750 μ M) y se utilizó Orlistat® (tetrahidro lipstatin: (S)-((S)-1-((2S,3S)-3-hexil-4-oxooxetan-2-il) tridecan-2-il) 2-formamido-4-metil pentanoato), como inhibidor específico de lipasas, el cual fue disuelto en DMSO a una concentración de 25 y 0.25 μ M.

El efecto del *p*-nitrofenil laurato e inhibidor en la actividad de la enzima, se determinó de acuerdo a la técnica de Nawani et al. (1998) adaptada a 500 μ L.

5.9. Cinética enzimática

La cinética enzimática se determinó de acuerdo a la técnica de Nawani et al. (1998) adaptada a 500 μ L y modificada, utilizando *p*-nitrofenil laurato como sustrato a diferentes concentraciones (100 - 750 μ M).

Se realizaron mediciones por triplicado en dos lotes diferentes de la LipVp recombinante. Se determinaron los parámetros K_m y V_{max} mediante el software GraFit.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Alineamiento de Secuencias y Modelación de Lipasa de *Vibrio parahaemolyticus*

Dentro del genoma de *V. parahaemolyticus* se encontraron 9 lipasas putativas en ambas cepas, de las cuales se eligió una que presentaba mayor cantidad de características de una lipasa. Con esta secuencia aminoacídica se realizaron alineamientos con otras lipasas verdaderas ya reportadas de camarón, rata y humano (Figura 5). Estas lipasas mostraron poca identidad con respecto a la de *V. parahaemolyticus*, sin embargo se observó que la serina catalítica se encuentra en una región conservada y en el pentapéptido característico para las lipasas (GX SXG) (Arpigny y Jaeger, 1999; Navarro González y Periago Castón, 2012).

Se realizó el análisis de la secuencia elegida comparándola contra una hemolisina de *V. parahaemolyticus* y otras lipasas bacterianas. Después de realizar la elección de la posible lipasa se realizaron alineamientos de ésta contra una hemolisina de *V. parahaemolyticus* la cual es dependiente de lecitina (LDH), con la cual solo tiene 20% de identidad y 31% de similitud, descartando que se trate de esta hemolisina por su baja identidad (Figura 6). En el software de Xtal-Pred se identificó un péptido señal en la secuencia, dicho péptido fue removido y se alineó esta secuencia en contra de otras secuencia de lipasas verdaderas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Cromobacterium viscosum*, teniendo un 58% de identidad con la primera y un 45% de identidad con la segunda (Figura 7). Al analizar el alineamiento de las lipasas bacterianas con la posible

de *V. parahaemolyticus* se identificó la tríada catalítica característica, compuesta por serina, ácido aspártico e histidina, así como el pentapeptido característico de lipasas donde se encuentra la serina catalítica, GX SXG (Figura 7).

Se logró obtener un modelo de la LipVp usando el algoritmo PHYRE2. Dicho modelo se realizó utilizando como templado una lipasa lactonizante de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB: 1EX9). Este modelo tiene características estructurales similares a las de una lipasa, ya que son 5 hojas- β interconectadas por 10 hélices- α , como se muestra en la figura 8. Además se logró identificar la tríada catalítica S86, D233 y H255, los aminoácidos que pudieran conformar el agujero oxianiónico, el cual ya ha sido reportado antes en estas enzimas como posible sitio de unión a calcio, un puente disulfuro teórico entre las cisteínas de la enzima; así como una isoleucina que podría impedir el paso del sustrato al sitio catalítico. Todos estos sitios se encuentran en la literatura ampliamente reportados (Nardini et al., 2000; Rengachari et al., 2013; Tsurumura y Tsuge, 2014).

```

LipVp      1 -----
AAA41250.1 1 MPRG---VSNLFPSVOMILCWI-----VSLLIETVGGKEVQCYG
AHM88206.1 1 MPAIGATKGVLEFLDININLLDILGAPPPDPVASPAVSSNVREVCHIVYG
EKC59306.1 1 -----MRIFLVLCTAALSLSLQG-----FRADG-----GYR

LipVp      1 -----
AAA41250.1 37 HIGCFSNDRPWAGMIGRPIKIEPWSPEIDITRELLYTNENPNNYQKISAT
AHM88206.1 51 QRICFSTMTEPWFSS-SRPVVKAPMSPEELIGISETLETRLNDTFPATILPG
EKC59306.1 27 TQRDIAYRPAWRRLIDSY-----CRILDVYLP-----DA-

LipVp      1 -----
AAA41250.1 87 EPITIKESNEQLDKIRFLVHCFIDKCE--DCWILDMCKKQVEKQNC
AHM88206.1 100 DINTIVNAPSLIICKPKFVVTTCYISVGA--VGVIRTIGELLSADQNV
EKC59306.1 57 -----KCFPTIIWFHC-----GHSISG--RREIPEA-LKCHGAVV

LipVp      42 -----
AAA41250.1 134 ICVDWRRGSRTEYTCASYNTRVQREIAPLVQVLSTEMCYSENVHLIG
AHM88206.1 147 IVVDWGVGARPPYTCAVANIRVVASQIAYLIYLFNKFAVVPVSSVHLIG
EKC59306.1 89 VGVVYRIVPQVK---VADCVADAAAPAVVVEHT-ASYCGIEEIVFVAG

LipVp      85 -----
AAA41250.1 183 HSLGAHVGEAC---ERLEGH-----VGRITGLDPAEPC---ECIPE
AHM88206.1 196 HSLGAHMSCHTC---TYLKKIYGLT---PRLITGLDPAEPC---ENDHE
EKC59306.1 134 HSAGCYLTSMLCLDKRWLAP-----YCIDPDTAEMALII---PY
▲
LipVp      128 -----
AAA41250.1 220 E-----VRLDPSDAMEFVDVIE-----TDSAPITIPY-LGFCMSQ
AHM88206.1 237 V-----TRLDTTDADFVDIIE-----TDDSPILGFFLSVGMTC
EKC59306.1 169 SGOAVTHTFRRSELGLPDTQPLVDDMAPMNHVRADAPEMILIT-SGDRLE

LipVp      169 -----
AAA41250.1 252 KUGHI---DFPNGGKEMPGCKNIIISTIVINGIIEGII-----
AHM88206.1 270 PICHI---DFPNGGGENQPGOMGE-----ENAYEFRRMMRIVGHPDVRLI
EKC59306.1 218 MLCRY-----DFPNGGGENQPGOMGE-----ENAYEFRRMMRIVGHPDVRLI

LipVp      208 -----
AAA41250.1 288 -----QNEVRCNHDRSYKYASSI---L-NPDGFLGYPCSYKFKQND
AHM88206.1 291 -----VNCQHRRAITVETESI---R-SCSPMIGVACPSYGEFIDGD
EKC59306.1 244 EFDGYDHGNMPEACHEVALRYVIREMIRKA-----

LipVp      251 -----
AAA41250.1 328 CFFCPPEE-GCPKMGHYDQFEGKTAIVEQTIVYINTIGSGNFTIRWRYKVSV
AHM88206.1 328 CFCGDDDEHPCSYMGLDAPLPSQP--ELTKIYLHTWERSPECGYRYRVIV
EKC59306.1 273 -----ER

LipVp      282 -----
AAA41250.1 377 TILSGAKKLL-----SCYILVATVGNNGNSKQYEIFKGLKPEER-HVRDI
AHM88206.1 376 EFSNSTEAQEKMGEEFCHIRIRITCNKDKSPPIKLSSEKSKYYEAGSVHRRV
EKC59306.1 -----

LipVp      420 -----
AAA41250.1 420 DVDINVGGIICKYKF--LNNNKY---INTEPPTLGASQITVQSGVIGKEYN
AHM88206.1 426 IILTHDIGDICTGVLTLEYPSSMSWRLEKPTFFLESITVEPLGENTKWK
EKC59306.1 -----

LipVp      465 -----
AAA41250.1 465 FCSSETVREDVLQ---SLYFC
AHM88206.1 476 YCMARVQKSGYEYILSSKQSC
EKC59306.1 -----

```

Figura 5. Alineamiento de lipasa putativa de *V. parahaemolyticus* contra lipasas verdaderas. Los aminoácidos idénticos se muestran sombreados en negros y los aminoácidos de misma naturaleza sombreados en gris. Cepa patógena de *V. parahaemolyticus* (LipVp), Lipasa de Rata (AAA41250.1), Lipasa de Camarón blanco (AHM88206.1), Lipasa Pancreática de Humano (EKC59306.1). El triángulo muestra la Serina catalítica en pentapéptido característico de lipasas.

```

LipVp      1  -----MNTATGYTQTK
BAA25328.1 1  MMKKTITLLTALLPLASAVAEPTLSPERMVSASEVISTQENQTYTYVRCW

LipVp      12  YPI-----VLVHGLFGLFDSLAGVDYF-----
BAA25328.1 51  YRTSYSKDDPATDWEWAKNEDGSYFTLDGYW-WSSVVSFKNMFYTNTSQNV

LipVp      33  -----FGIPHSITKDGATVYVAQVSATNS
BAA25328.1 100 IRORCEATLDLANENADITFFAADNRFSYNHTIWSNDAAMQPDQI----NK

LipVp      57  SEERGEOLLISOVETLAATG----ASKVNLIGHSHGGP-TARYVASVPEP
BAA25328.1 147 VVALGDSLS-DTGNIFNASQWRFFNPNNSWFLGHFSNGFVWTEYAKAKN-

LipVp      102  LVASVTSIGGVNKGSG-----KWADLW-RGTVPEGSGTEQLAVKLA
BAA25328.1 195  LPLYNWAVGGAAGENQYIALTGVGECYSSYLTYAKLAKNYKPANTLFTLE

LipVp      141  QGLTTLINLLSGGSDLDQDPLASDAALTTEGSLAFNQH-YPE-----
BAA25328.1 245  FGLNDFMNYNRGVPEVKADYAEALIRLTDAGAKNFMLMTLPDATKAPQFK

LipVp      182  -----G---IPTSECGDGLLAPNGVYYYSWTGSSSTFSNVFDPDAAAMV
BAA25328.1 295  YSTQEEIDKIRAKVLEMNDFLKAQAMYK-AQYN--ITLFDTHA----LF

LipVp      224  LGLAFDGPNDGLVGCSTHLG--KVIDDYKMNHLDEI-NLLGIH----
BAA25328.1 339  ETLTSAPEEHGFVNASDPOLDINRSSSDYMYTHALRSECAASGAEKVFE

LipVp      267  -----H-----LFEIDPVTLYRCHANRLKLOGL
BAA25328.1 389  WDVTHPTTATHRYVAEKMLESSNNLAERYF-----

```

Figura 6. Alineamiento de lipasa putativa de *V. parahaemolyticus* contra hemolisina dependiente de lecitina (LDH (BAA25328.1)). Los aminoácidos idénticos se muestran sombreados en negros y los aminoácidos de misma naturaleza sombreados en gris. Identidad 20% y similitud 31%.

```

LipCv 1 MVRSMRSRVAARAVAWALAVMPLAGAAGLTMAASPAAMADTYAATRYPM
LipVp 1 -----MNIATCYTOTKYPI
LipPa 1 -----MKKKSLIPLGLAIGLASIAASPLIQASTYTOTKYPI

LipCv 51 ILVHGLIAGTDKEANVDYWYGIQSDIQSHGARVYVANLSGFSDDGPNGR
LipVp 15 VLVHGLIFGFDLAGVDYDFGIPHSLTKDGATVYVAQVSAIN---SSEAR
LipPa 37 VLAHGMLGFDNHLGVDYWFGIPSLRRRDGACVYVTEVSQLD---ISEVR

LipCv 101 GEQLLAYVKQVLAATGATKVNLIHSGGGLTSRYVAAVAPQIVASVTIIG
LipVp 61 GEQLLSQVETLLAATGASKVNLIHSGHGPTERYVASVRPDIIVASVTSIG
LipPa 83 GEQLLQVVEIIVALSGQPKVNLIHSGHGPTIRYVAAVRPDIIVASVTSIG

LipCv 151 TPHRGSEFADFVQDVLKTDPTGLSSTVIAEFWVVEG---ILVSSSHNIDQ
LipVp 111 GWNKGSKVADLVRGTVPEGSGTE--QAVKLAQGLITLINLLSGSDIDQ
LipPa 133 APHKGSDTADFLRQIPP-GSAGE--AVISELVNSLGLLSELSSGSGTGTQ

LipCv 198 DALAAIRTLTTAQTATYNRNEFSAGLGAPGSCQTGAATETVGGSQHLLYS
LipVp 159 DPLASIAAALTTEGSLAFNOHYPEGIP--TSECGDGLLA---PNGVYYYS
LipPa 180 NSLGSLESINSEGAARFNAKYPQIP--TSACGEGAY-K---VNGVSYYS

LipCv 248 WGGTAIQPTSTVLGVTGATDTSTGLDQANVTDPSLALATGAWMINRA
LipVp 204 WTGSSST-----FSNVEDPDAANNVIGLA--ED-
LipPa 224 WSGSSP-----LINFIDPSDAELGASSLT--EKN

LipCv 298 SGQNDGLVSRCSSEFGQVISTSYHNNHLDEINQLLGVGANAEDPVAVIR
LipVp 230 -GPNDGLVGACSTHLGKVIIRDYKNNHLDEINLLGIEHLFETDPVTLVYR
LipPa 251 GTANDGLVGTCSHIGMVIRDNYRMNHLDEVNQVEGLTSLFETSPVSVYR

LipCv 348 THVNRLKLOGV
LipVp 279 QHANRLKLOGI
LipPa 301 QHANRLKNASI

```

Figura 7. Alineamiento de lipasa putativa de *V. parahaemolyticus* (LipVp) contra Lipasas de otros microorganismos. Lipasa de *Cromobacterium viscosum* (LipCv) y Lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* (LipPa). Los aminoácidos idénticos se muestran sombreados en negros y los aminoácidos de misma naturaleza sombreados en gris. Identidad de LipVp con LipCv= 45% y con LipPa= 58%.

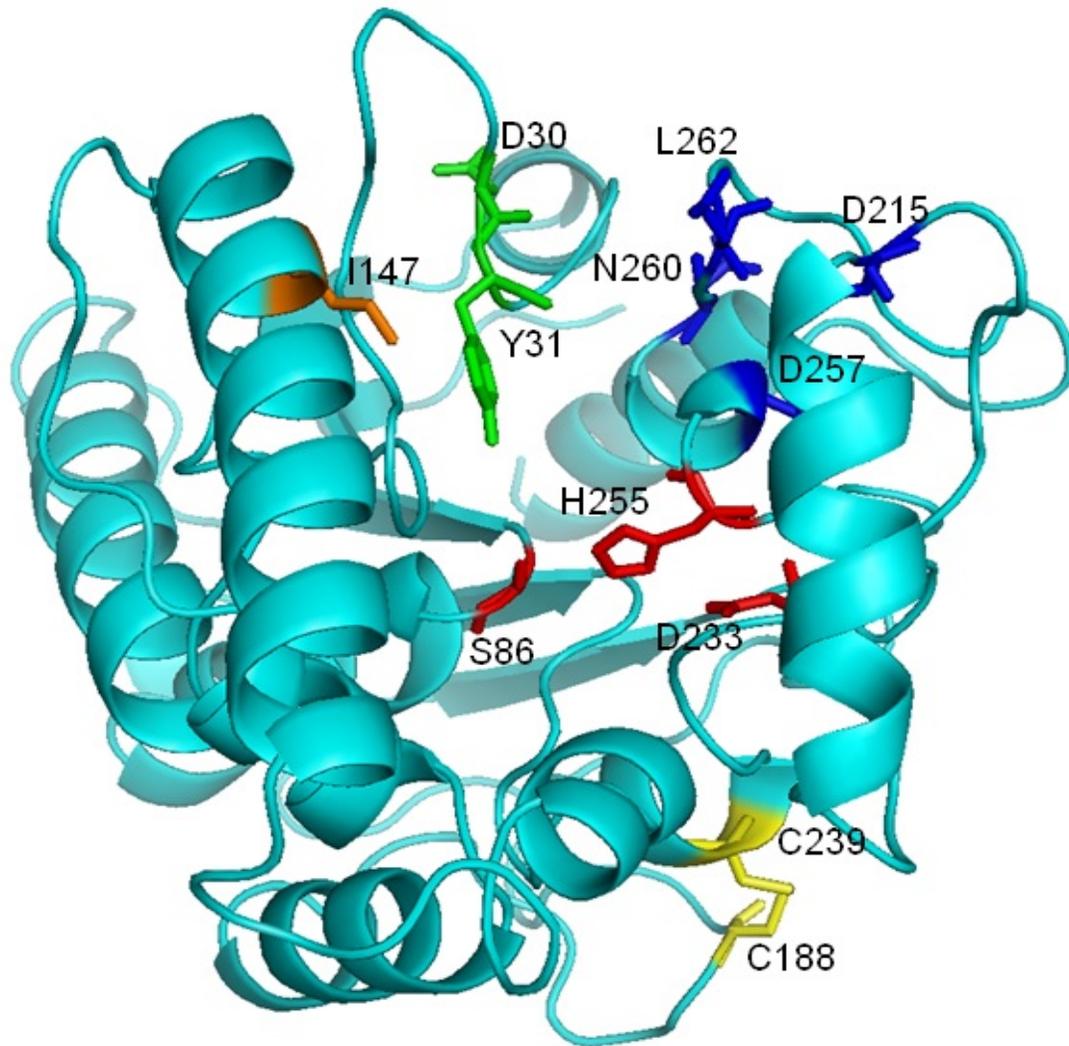


Figura 8. Modelo teórico de LipVp. Hojas- β interconectadas con hélices- α . Triada catalítica: S86, D233 y H255 (Rojo), agujero oxianiónico: D30 y Y31 (Verde), aminoácidos de unión a Calcio: D215, D257, N260 y L262 (Azul), puente disulfuro: C188 y C239 (Amarillo) y por último I147 (Naranja).

6.2. Sobreexpresión, Extracción de Cuerpos de Inclusión, Purificación y Replegamiento de LipVp Recombinante

Se logró transformar de manera eficiente la cepa *E. coli* BL21 (DE3), con el gen sintético conteniendo la secuencia de la lipasa, después de tener esta cepa transformada se procedió a sobreexpresar la LipVp recombinante, observando

que la proteína se encontró de manera insoluble formando cuerpos de inclusión (Figura 9). Lo anterior mencionado no concuerda con otras lipasas reportadas que se habían obtenido en la fracción soluble (Farrokh et al., 2014; Ji et al., 2015; Shangguan et al., 2011).

Sin embargo, este resultado puede deberse a lo descrito por Rosenau et al. (2004) donde explican que el plegamiento correcto de la lipasa ocurre en el periplasma de las bacterias Gram negativas, para posteriormente ser expulsada al medio extracelular; este plegamiento es catalizado por foldasas, chaperonas específicas para lipasas. Éstas son proteínas con un amplio dominio periplásmico, ancladas a la membrana, además de ser específicas para cada lipasa, que pueden actuar directamente en los enlaces disulfuros de las lipasas, cuyo gen viene dentro del mismo operón en el que se encuentra el gen de la lipasa (El Khattabi et al., 1999). Lo anterior se puede representar con la figura 10.

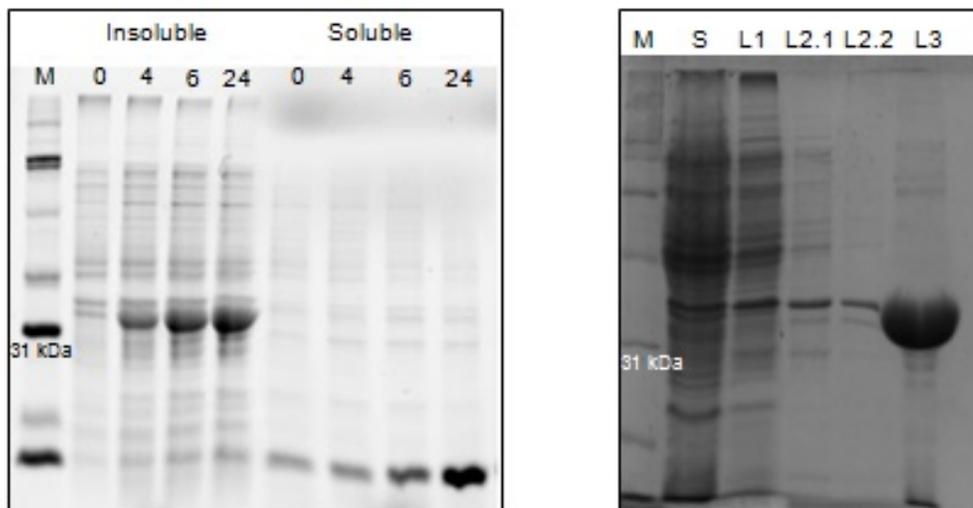


Figura 9. Sobreexpresión y extracción de cuerpos de inclusión de LipVp Recombinante. IZQUIERDA: SDS-PAGE de sobreexpresión de LipVp Recombinante. Carriles: M= Marcador de peso molecular; 0, 4, 6 Y 24= Horas después de inducción. DERECHA: SDS-PAGE de extracción de LipVp recombinante. Carriles: M= Marcador de peso molecular; S= Sobrenadante; L1= Lavado 1 (Con detergente); L2.1= Lavado 2 (Sin detergente); L2.2= Lavado 2 (Sin detergente); L3= Lavado 3 con Urea 8 M, donde se muestra LipVp en la fracción soluble.

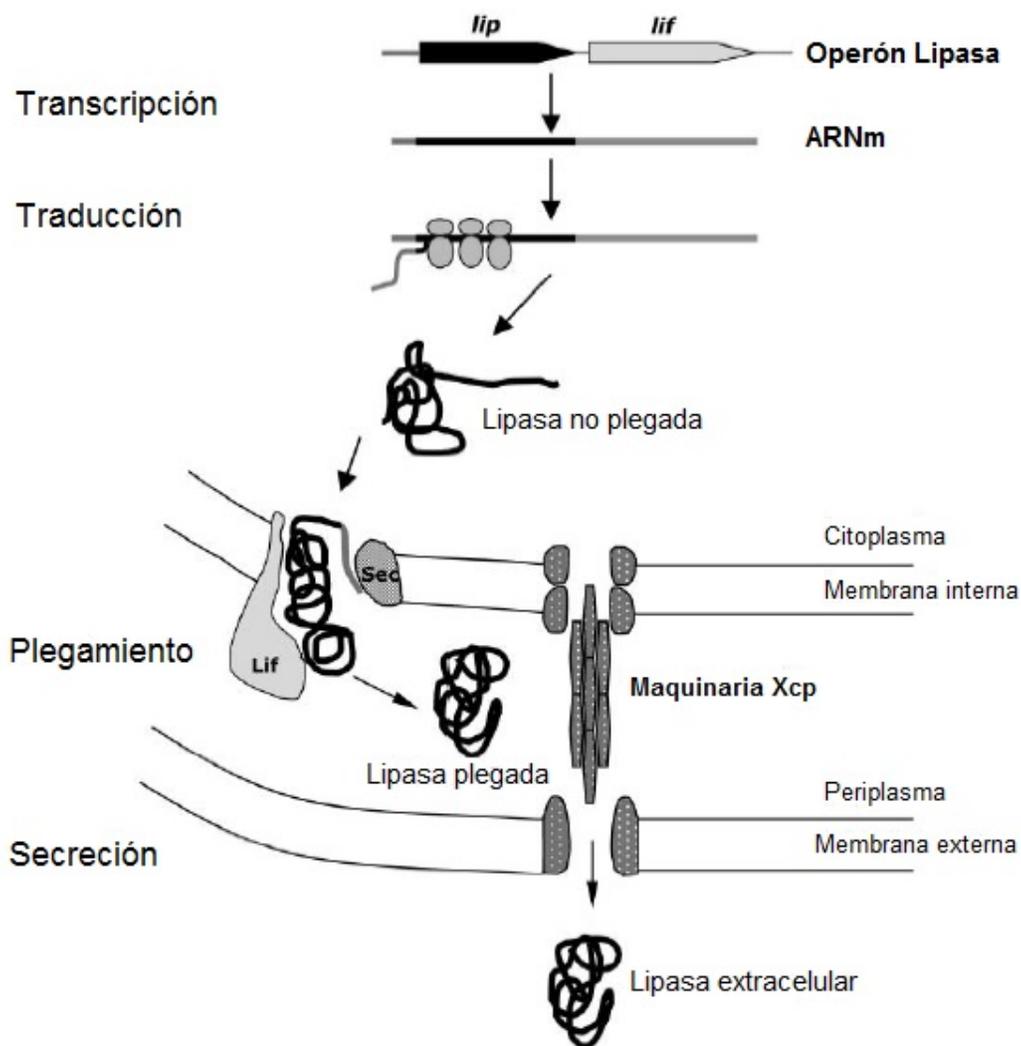


Figura 10. Esquema del plegamiento de una lipasa extracelular catalizado por una foldasa específica de Lipasa (Lif). Se observa que en el mismo operón están los genes de la Lipasa y su respectiva Lif, la cual se ancla a la membrana interna y cataliza el plegamiento correcto de la lipasa. Imagen modificada de Rosenau et al. (2004).

Para la obtención de la LipVp recombinante se realizó la extracción y solubilización de los cuerpos de inclusión, utilizando buffer con y sin detergente y buffer conteniendo urea 8 M (Figura 9) (Coligan, 2003). Para el replegamiento de la LipVp recombinante se removió la urea, primeramente dializando contra buffer con urea 4 M, a esta concentración se realizó la purificación por

cromatografía de afinidad a metales, en la cual se observan los picos característicos de este tipo de cromatografía, los cuales son: proteína no unida a la columna, proteínas con uniones inespecíficas y la proteína de interés, la cual eluyó al 80% del buffer B (imidazol 400 mM), corroborando los resultados con un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Figura 11).

En la mayoría de los estudios donde reportan la purificación de enzimas lipasas, se llevan a cabo varios pasos de purificación (Sharma et al. (2001)). No obstante, es posible que cuando la cola de histidinas está expuesta por el grado de desnaturalización que tiene la LipVp, aumente la eficiencia de la cromatografía de afinidad, logrando obtener la LipVp pura con únicamente un paso de purificación, como ocurrió en este trabajo. Además influye el hecho de que viene de un proceso de extracción de cuerpos de inclusión, el cual también remueve muchas proteínas que pudieran interferir en la purificación.

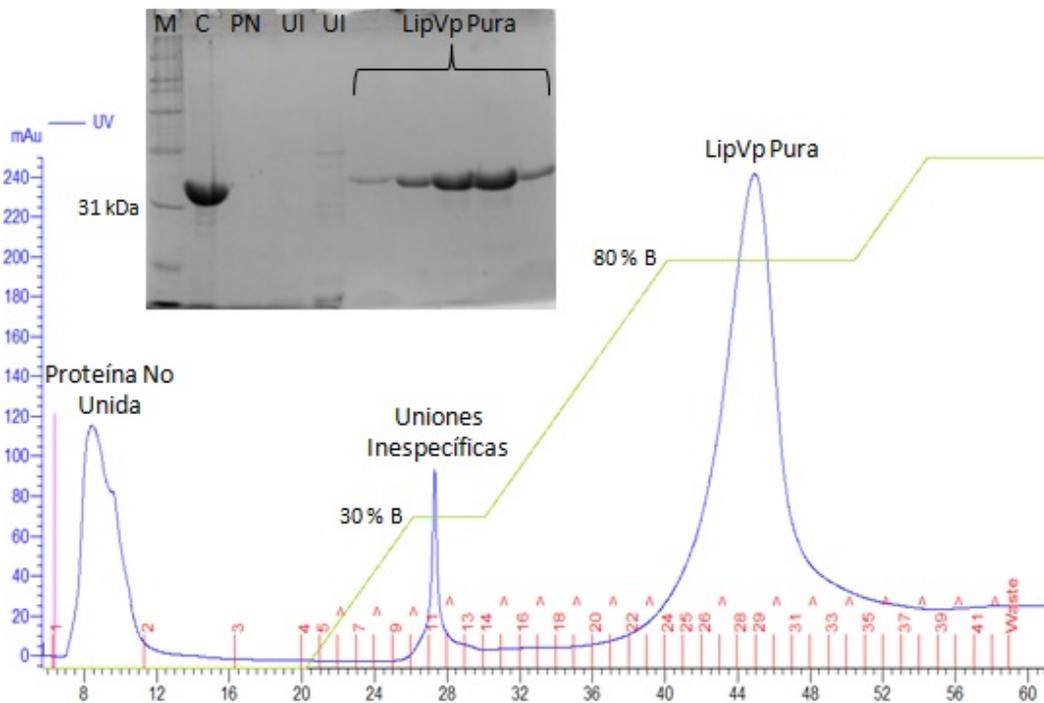


Figura 11. Cromatograma de purificación de LipVp por Cromatografía de afinidad a metales (IMAC) y su respectiva SDS-PAGE. En SDS-PAGE: M=Marcador de Peso Molecular; C=Muestra inyectada; PN=Proteína No unida; UI=Uniones inespecíficas.

La proteína pura obtenida en urea 4 M, se llevó a urea 2 M por medio de dilución y finalmente se dializó contra buffer sin urea. El buffer que se utilizó para el replegamiento y remoción de la urea fue Tris-HCl 55 mM pH 8.0, NaCl 10.56 mM, KCl 0.44 mM, Polietilenglicol 3350 0.055%, MgCl₂ 2.2 mM, CaCl₂ 2.2 mM, L-arginina 550 mM, glutatión reducido 0.5 mM y glutatión oxidado 0.05 mM, el cual se obtuvo a partir del ensayo realizado con el sistema FoldIt Screen (Armstrong et al., 1999). Después de estas diálisis se realizaron dos más contra buffer que solo contenía Tris-HCl 55 mM pH 8.0, NaCl 10.56 mM y CaCl₂ 2.2 mM, para remover los glutationes y la arginina que pudieran interferir en la actividad enzimática.

6.3. Actividad, Cinética e Inhibición Enzimática

La LipVp recombinante pura se utilizó para realizar pruebas de actividad enzimática, presentando actividad con p-nitrofenil laurato como sustrato. En la tabla 1 se muestra que existe una variabilidad entre las actividades enzimáticas de las lipasas, dependiendo de su especificidad por el sustrato así como la fuente y metodología para extraerla.

La actividad total de LipVp recombinante fue de 74 nmol/mL/min, la cual es menor al compararla contra Lipasa 3646 de *Cohnella sp* A01 (Golaki et al., 2015). En cuanto a la actividad específica, la lipasa 3646 reportada mostro 10 veces más actividad que la LipVp recombinante obtenida, caso contrario a la lipasa rRBL de arroz, la cual después de haber sido extraída de cuerpos de inclusión y pasar por el proceso de replegamiento, presentó una actividad específica 70 veces menor a la de LipVp recombinante (Vijayakumar y Gowda, 2013). Una explicación puede ser dada en función al sustrato que se utilizó para la determinación e incluso la especificidad de cada lipasa por un sustrato.

Las constantes cinéticas fueron determinadas, utilizando la ecuación de dobles recíprocos, obteniendo una K_m de 4.34 mM y una V_{max} de 0.018 $\mu\text{M}/\text{min}$ (Figura 12). Estas constantes se encuentran dentro del rango en el que se han reportado otras K_m y V_{max} , ya que la mayoría de K_m reportadas están por debajo de 10 mM (Golaki et al., 2015; Rivera-Pérez et al., 2011; Saun et al., 2014; Shu et al., 2007). En cuanto a V_{max} , la enzima de este trabajo presenta un valor menor, sin embargo es mayor al de *Bacillus aerius* y *Fusarium solani* reportados por Saun et al. (2014) y Maia et al. (2001) respectivamente (Tabla 2). Es importante mencionar que los sustratos para realizar la cinética enzimática difieren, siendo los más utilizados *p*-nitrofenil ésteres, variando la cantidad de carbonos en el ácido graso. El sustrato utilizado para este ensayo fue *p*-nitrofenil laurato, el cual contiene una cadena de 12 carbonos. Lo anterior debido a que existen reportes en los que la cadena de carbonos influye en la actividad de las lipasas, llegándose a probar sustratos con cadenas desde 4 hasta 18 carbonos, en los cuales se observó una mayor actividad cuando hay 12 carbonos en la cadena (Do et al., 2013; Farrokh et al., 2014).

Tabla 1. Actividad enzimática de diferentes lipasas. NR= No reportada. Sustrato= *p*-nitrofenil ésteres.

Proteína	Fuente	Actividad Total (nmol/mL/min)	Actividad específica (nmol/min/mg)
LipVp	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	74	925
Lipasa 3646	<i>Cohnella sp</i> A01	58 000	10 000
rRBL	Arroz	NR	13

Se realizaron ensayos de inhibición de la actividad lipolítica de LipVp recombinante con un inhibidor comercial Orlistat®, el cual se probó a dos concentraciones: 25 μM y 0.25 μM . Alrededor del 70% de la actividad de LipVp recombinante fue inhibida con la concentración más baja y el 100% con la

concentración más alta (Figura 13). Estos resultados dan la certeza que LipVp recombinante obtenida en este estudio es una lipasa verdadera.

Tabla 2. Constantes cinéticas de diferentes lipasas. NR=No Reportada.

Fuente	Km (mM)	Vmax (μM/min)	Publicación
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.34	0.018	Presente trabajo
<i>Pseudomonas cepacia</i>	12	30	Pencreac'h y Baratti (1996)
<i>Bacillus aerius</i>	2.13	0.66	Saun et al. (2014)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.65	NR	Fox y Stepaniak (1983)
<i>Fusarium solani</i>	1.8	1.7	Maia et al. (2001)
<i>Aspergillus niger</i>	7.37	25.91	Shu et al. (2007)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	14	1370	Shangguan et al. (2011)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	3.22	3404	Rivera-Pérez et al. (2011)
<i>Cohnella sp</i>	1.077	61.94	Golaki et al. (2015)

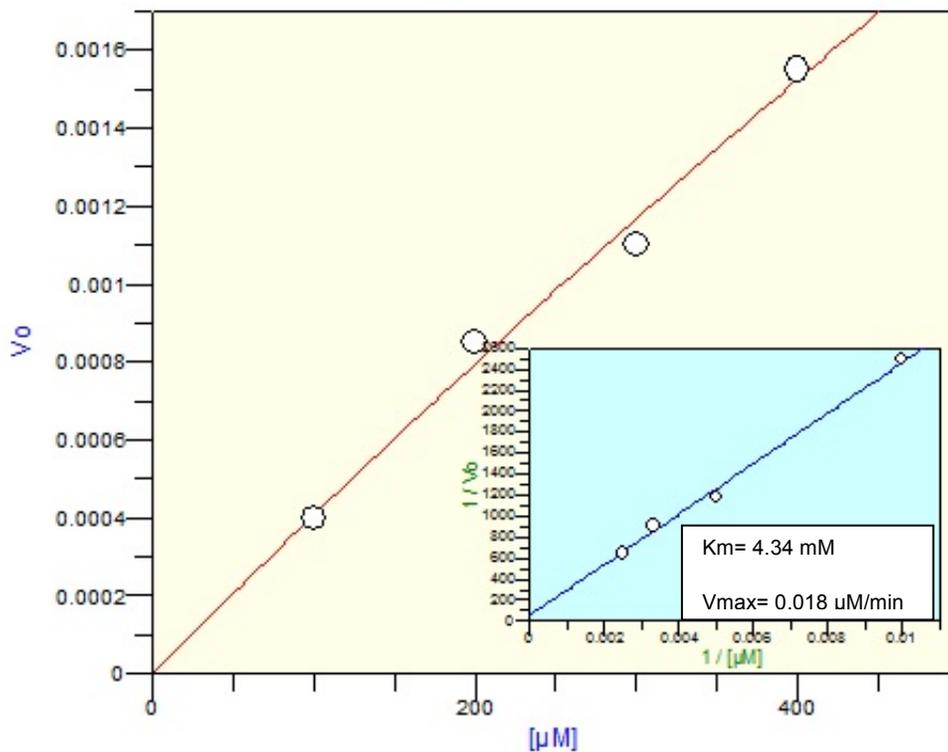


Figura 12. Gráfica de Lineweaver-Burk. Utilizando el software GraFit.

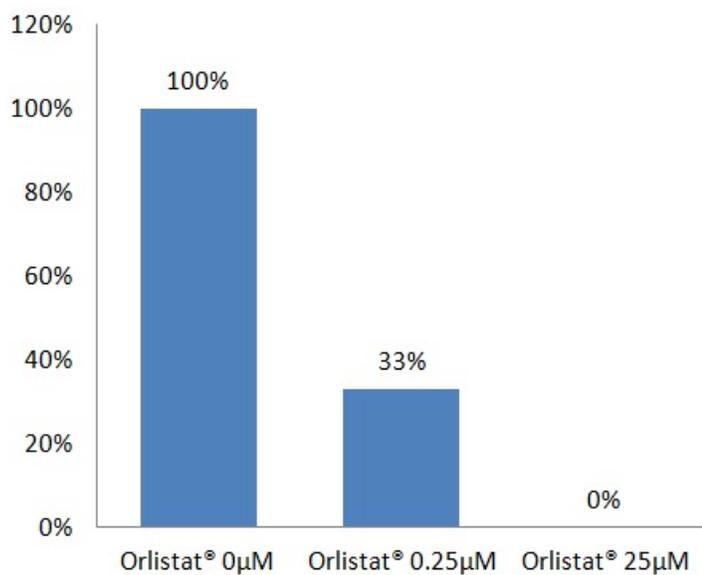


Figura 13. Gráfica de actividad residual agregando Orlistat®

VII. CONCLUSIÓN

En el genoma de una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus* se encontró un gen que codifica para una secuencia aminoacídica con alta similitud a una lipasa, la cual contiene la tríada catalítica específica His, Asp, Ser. Un modelo teórico predice una proteína con plegamiento similar a otras lipasas. Esta proteína VpLip, obtenida de forma recombinante en *E. coli* tiene la capacidad para hidrolizar lípidos, correspondiendo sus constantes cinéticas a los rangos en los que se encuentran las ya reportadas para otras lipasas, además esta actividad lipolítica pudo ser inhibida por un inhibidor de lipasas como lo es el Orlistat®.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar ensayos cristalográficos para la determinación de la estructura de manera experimental, en la manera apoenzima y holoenzima con sustrato e inhibidor.

También se recomiendan pruebas de inhibición de crecimiento a la cepa patógena para el camarón de *Vibrio parahaemolyticus* en presencia de inhibidores de lipasas ya que existen reportes de diferentes cepas dependientes de lípidos.

REFERENCIAS

- Armstrong N., Lencastre A.D., Gouaux E. 1999. A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Sci.* 8: 1475-1483.
- Arpigny J. and Jaeger K. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183.
- Birari R.B. and Bhutani K.K. 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug discovery today.* 12: 879-889.
- Bornscheuer U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 73-81.
- Cai S., Wang O., Wang M., He J., Wang Y., Zhang D., Zhou F., Ji B. 2012. In vitro inhibitory effect on pancreatic lipase activity of subfractions from ethanol extracts of fermented oats (*Avena sativa L.*) and synergistic effect of three phenolic acids. *J. Agric. Food Chem.* 60: 7245-7251.
- Coligan J.E. 2003. Short protocols in protein science: a compendium of methods from Current protocols in protein science (First Edition ed.). New York: John Wiley & Sons Inc. 6.16-6.40.
- CONAPESCA. 2012. Producción de camarón de cultivo supera las 105 mil toneladas en 2011. from CONAPESCA http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/30_de_Enero_de_2012_Mazatlan_Sinaloa
- CONAPESCA. 2013. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013. from CONAPESCA http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca

- Côtes K., N'goma J.B., Dhouib R., Douchet I., Maurin D., Carrière F., Canaan S. 2008. Lipolytic enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 78: 741-749.
- Do H., Lee J.H., Kwon M.H., Song H.E., An J.Y., Eom S.H., Lee S.G., Kim H.J. 2013. Purification, characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a cold-active lipase (CpsLip) from the psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* 34H. Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. and Cryst. Commun. 69: 920-924.
- El Khattabi M., Ockhuijsen C., Bitter W., Jaeger K.-E., Tommassen J. 1999. Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor. Mol. Gen. Genet. 261: 770-776.
- FAO. 2006. Programa de información de especies acuáticas, *Penaeus vannamei*.
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es
- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. from FAO
www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf
- FAO. 2013. Visión general del sector acuícola nacional -México.
http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es#tcN70019
- FAO. 2014. The state of world fisheries and aquaculture. Opportunities and challenges., from FAO www.fao.org/3/a-i3720e.pdf
- Farrokh P., Yakhchali B., Asghar Karkhane A. 2014. Cloning and characterization of newly isolated lipase from *Enterobacter sp. Bn12*. Braz. J. Microbiol. 45: 677-687.
- Fox P.F. and Stepaniak L. 1983. Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT 36. J. Dairy Res. 50: 77-89.
- Gao W.-Y. and Mulberg A.E. 2014. Dependence of PERT Endpoint on Endogenous Lipase Activity. Pancreas. 43: 1232-1238.
- García J., Santana Z., Zumalacárregui L., Quintana M., González D., Furrázola G., Cruz O. 2013. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. VacciMonitor. 22: 30-39.

- Garza-Ramos U., Silva-Sánchez J., Martínez-Romero E. 2009. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Rev. Invest. Salud Publica.* 51: s439-s446.
- Golaki B.P., Aminzadeh S., Karkhane A.A., Yakhchali B., Farrokh P., Khaleghinejad S.H., Tehrani A.A., Mehrpooyan S. 2015. Cloning, expression, purification, and characterization of lipase 3646 from thermophilic indigenous *Cohnella sp. A01*. *Protein expression purif.* 109: 120-126.
- Gomez-Jimenez S., Noriega-Orozco L., Sotelo-Mundo R.R., Cantu-Robles V.A., Cobian-Guemes A.G., Cota-Verdugo R.G., Gamez-Alejo L.A., del Pozo-Yauner L., Guevara-Hernandez E., Garcia-Orozco K.D. 2014. High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome announcements.* 2: e00800-00814.
- González-Bacerio J., Moreno-Medina V.R., del Monte Martínez A. 2010. Las lipasas: Enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 12: 113-140.
- Gonzalez R. 2008. Perspectivas y retos para la exportación de camarón. from INAPESCA
http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/ultima/03Gonzalez_R.pdf
- Hamzaoui S., Ben Salah B., Hamden K., Rekik A., Kossentini M. 2015. Synthesis and evaluation of new Bis-1, 3, 4, 2-triazaphospholinoalkane derivatives as in vitro α -amylase and lipase inhibitors. *Arch. Pharm.* 348: 188-193.
- Hasan F., Shah A.A., Hameed A. 2009. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 27: 782-798.
- Jaeger K.-E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., van Heuvel M., Misset O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 29-63.
- Ji X., Li S., Wang B., Zhang Q., Lin L., Dong Z., Wei Y. 2015. Expression, purification and characterization of a functional, recombinant, cold-active

lipase (LipA) from psychrotrophic *Yersinia enterocolitica*. Protein expression purification. 115: 125-131.

Joshi J., Srisala J., Truong V.H., Chen I.-T., Nuangsaeng B., Suthienkul O., Lo C.F., Flegel T.W., Sritunyalucksana K., Thitamadee S. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*. 428: 297-302.

Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J.E. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protocols*. 10: 845-858.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Lara Á.R. 2011. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 10: 209-223.

Lee C.-T., Chen I.-T., Yang Y.-T., Ko T.-P., Huang Y.-T., Huang J.-Y., Huang M.-F., Lin S.-J., Chen C.-Y., Lin S.-S. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112: 10798-10803.

Letchumanan V., Chan K.-G., Lee L.-H. 2014. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Front. Microbiol.* 5: 10.3389.

Maia M., Heasley A., De Moraes M.C., Melo E., Moraes M., Ledingham W., Lima Filho J. 2001. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresour. Technol.* 76: 23-27.

Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y., Najima M., Nakano M., Yamashita A. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *The Lancet*. 361: 743-749.

Mala J.G.S. and Takeuchi S. 2008. Understanding structural features of microbial lipases—an overview. *Anal. Chem. Insights*. 3: 9.

- Nardini M., Lang D.A., Liebeton K., Jaeger K.-E., Dijkstra B.W. 2000. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I. 1 of bacterial lipases. J. Biol. Chem. 275: 31219-31225.
- Navarro González I. and Periago Castón M.J. 2012. Enzimas lipolíticas bacterianas: propiedades, clasificación, estructura, aplicaciones tecnológicas y aspectos legales. Anales de Veterinaria (Murcia). 28: 45-65.
- Nawani N., Dosanjh N.S., Kaur J. 1998. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. Biotechnol. Lett. 20: 997-1000.
- Nunan L., Lightner D., Pantoja C., Gomez-Jimenez S. 2014. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. Dis. Aquat. Organ.
- Papaneophytou C.P. and Kontopidis G. 2014. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. Protein Expression Purif. 94: 22-32.
- Park Y.-J., Choi S.Y., Lee H.-B. 2006. A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1; purification, characterization, and expression. Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj. 1760: 820-828.
- Pencreac'h G. and Baratti J.C. 1996. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. Enzyme Microb. Technol. 18: 417-422.
- Pride A.C., Guan Z., Trent M.S. 2014. Characterization of the *Vibrio cholerae* VolA surface-exposed lipoprotein lysophospholipase. J. Bacteriol. 196: 1619-1626.
- Rengachari S., Aschauer P., Schittmayer M., Mayer N., Gruber K., Breinbauer R., Birner-Gruenberger R., Dreveny I., Oberer M. 2013. Conformational plasticity and ligand binding of bacterial monoacylglycerol lipase. J. Biol. Chem. 288: 31093-31104.

- Rivera-Pérez C., García-Carreño F.L., Saborowski R. 2011. Purification and biochemical characterization of digestive lipase in whiteleg shrimp. *Mar. Biotechnol.* 13: 284-295.
- Rodríguez-Valencia J.A., Crespo D., López-Camacho M. 2010. La camaronicultura y la sustentabilidad del Golfo de California. http://awsassets.panda.org/downloads/rep_camaronicultura_golfo_california_1030.pdf
- Rosano G.L. and Ceccarelli E.A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Recombinant protein expression in microbial systems*: 7.
- Rosenau F., Tommassen J., Jaeger K.E. 2004. Lipase-specific foldases. *Chembiochem.* 5: 152-161.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning (Vol. 2)*: Cold spring harbor laboratory press New York.
- Saun N.K., Mehta P., Gupta R. 2014. Purification and Physicochemical Properties of Lipase from Thermophilic *Bacillus aerius*. *J. Oleo Sci.* 63: 1261-1268.
- Seibert G., Toti L., Wink J. (2008). Treating mycobacterial infections with cyclipostins: WO/2008/025449.
- Shangguan J.-J., Liu Y.-Q., Wang F.-J., Zhao J., Fan L.-Q., Li S.-X., Xu J.-H. 2011. Expression and characterization of a novel lipase from *Aspergillus fumigatus* with high specific activity. *Appl. biochem. biotechnol.* 165: 949-962.
- Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-662.
- Shu Z.-Y., Yan Y.-J., Yang J.-K., Xu L. 2007. *Aspergillus niger* lipase: gene cloning, over-expression in *Escherichia coli* and in vitro refolding. *Biotechnol. Lett.* 29: 1875-1879.

- Sørensen H.P. and Mortensen K.K. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 4: 1.
- Stryjewska A., Kiepusa K., Librowski T., Lochyński S. 2013. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacol. Rep.* 65: 1075-1085.
- Tran L., Nunan L., Redman R.M., Mohny L.L., Pantoja C.R., Fitzsimmons K., Lightner D.V. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Organ.*: 45-55.
- Tsurumura T. and Tsuge H. 2014. Substrate selectivity of bacterial monoacylglycerol lipase based on crystal structure. *J. Struct. Funct. Genomics.* 15: 83-89.
- Vijayakumar K. and Gowda L.R. 2013. Rice (*Oryza sativa*) lipase: Molecular cloning, functional expression and substrate specificity. *Protein expression purif.* 88: 67-79.
- Zhang C. and Kim S.-K. 2010. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Mar. Drugs.* 8: 1920-1934.