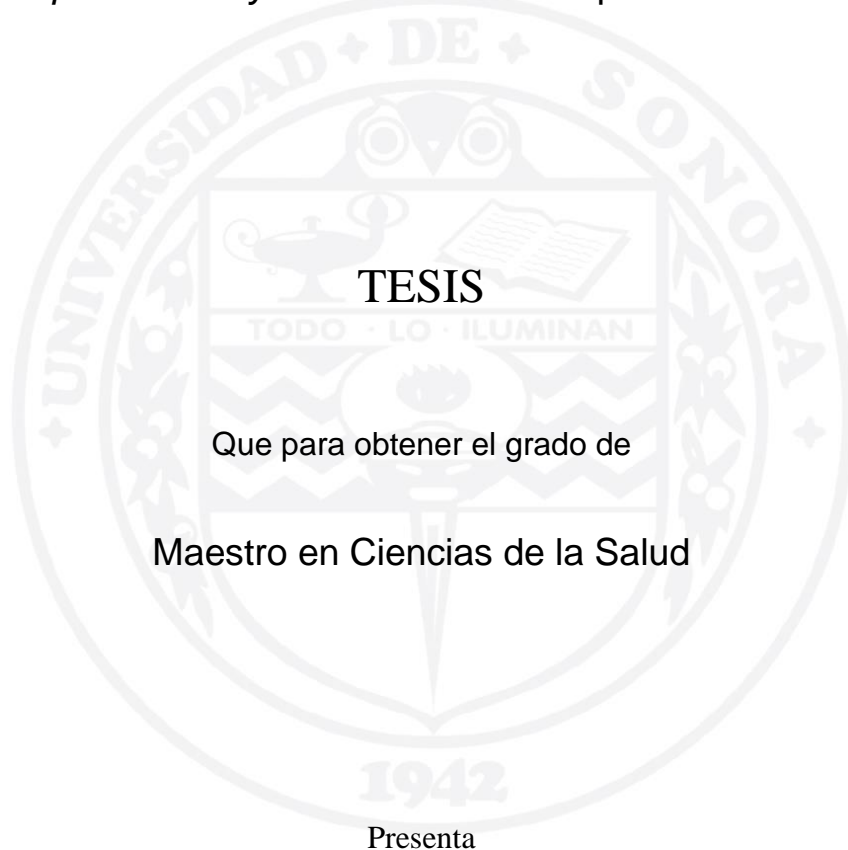


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Inhibición de la Hemolisina Termolábil Dependiente de Lecitina de  
*Vibrio parahaemolyticus* Mediante Compuestos Fenólicos



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

**Luis Enrique Vazquez Morado**

Hermosillo, Sonora

Octubre de 2019

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



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

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo a mi padres, hermanos y en especial a mis abuelos. A pesar de no demostrarlo claramente, son lo más importante que tengo, y por ello quiero que todo el trabajo que he realizado sea para honrarlos a ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de maestría con el cual fue posible cumplir con el proyecto realizado en el programa.

Agradezco al proyecto “inhibición de la hemolisina termolábil dependiente de lecitina de *Vibrio parahaemolyticus* por compuestos fenólicos” con la clave USO313004740 financiado por la división de ciencias biológicas y de la salud de la Universidad de Sonora.

Agradezco al proyecto “Identificación y caracterización de proteínas alergénicas de la jaiba café” del Programa de Movilidad Académica Nacional 2019 entre la Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Biotecnología y la Universidad de Sonora por el apoyo para la elaboración del constructo de la hemolisina termolábil dependiente de lecitina de *Vibrio parahaemolyticus*.

Quiero agradecer a la Universidad de Sonora la cual fue mi si segundo hogar todos estos años y en especial quiero agradecer al posgrado en ciencias de la salud por la oportunidad que me brindaron para participar en el programa de maestría, además de los apoyos brindados, así como la facilidad de las instalaciones para realizar mis estudios.

Agradezco especialmente a mi comité de tesis conformado por el Dr. Zepeda, la Dra. Garibay y al Dr. Aldo Arvizu por los conocimientos, consejos y el apoyo que me brindaron durante mi proceso de estudios de maestría, ya que fueron parte fundamental para mi formación.

A su vez quiero agradecer al Laboratorio de Investigación en Alimentos ya que fue un hogar para mí durante la maestría, pues en este se realizó casi en su totalidad el proyecto, y también agradezco al maestro Cesar el cual como encargado de laboratorio siempre me brindo apoyo y facilidad para el uso de los equipos del laboratorio. A su vez, quiero agradecer a la pequeña Elenita, a la pequeña Machuy y Sr. Carretas que además de haber sido mis compañeros de laboratorio estos dos años, fueron de gran apoyo para mí en lo

académico y emocional. Por último, quiero agradecer a Brisa, que además de ser una gran amiga, fue la persona que me permitió adentrarme en un área de la ciencia a la cual le tome tanto afecto. En pocas palabras gracias a todos por su apoyo, amistad y enseñanzas.

Con gran afecto agradezco a mis compañeras y amigas Jeanette, Astrid y a Gaby con quienes compartí estos dos años de maestría y fueron un pilar emocional para mí en este trayecto.

A su vez, agradezco al grupo de trabajo del laboratorio conformado por Pancho, Meli, Haydeé, Michelle, Uriel y Joshua, por el apoyo y amistad brindados durante estos años de trabajo.

Quiero agradecer con gran cariño a toda mi familia, ya que, sin su amor y apoyo incondicional, no hubiera sido posible llevar a cabo esta etapa de mi vida.

Quiero agradecer a mis amigos de toda la vida: Sami, Marcos, Jona, Marianna y Essaul los cuales han estado conmigo en cada trayecto de mi vida, en buenos y malos momentos, gracias por siempre estar ahí para mí. Además, quiero agradecer a mis buenos amigos de la carrera y posgrado: Andrey Gova, Nacxit (con quien tuve el placer de trabajar) y a Estrella por su gran apoyo, amistad, cariño y sus buenos deseos, gracias por su amistad. A sí mismo, agradezco a la comunidad de Pogo/Ingress de Hermosillo, en especial a Soanitha y a Luis Nájera por la amistad y el apoyo que siempre me dieron estos años, además de estar conmigo en esa comunidad para los momentos de desestrese.

Por último, quiero agradecerle a usted Dr. Alonso por todo. Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar en este proyecto e inculcarme y ayudarme en mejorar como persona en mi formación como investigador. Gracias por los conocimientos, por la disposición, por los consejos, por los regaños, por las risas, por la confianza, por ser un gran mentor para mí durante mi proceso de formación, espero nunca defraudarlo y poder trabajar en algún proyecto en el futuro con usted.

## ÍNDICE

FORMA DE APROBACIÓN	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XI
OBJETIVO GENERAL	XII
Objetivos Específicos	XII
RESUMEN	XIII
INTRODUCCIÓN	14
ANTECEDENTES	16
Acuicultura de Camarón	16
Enfermedades Asociadas a Camarón	16
Vibriosis	17
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> : Factores de Virulencia	21
La Hemolisina Termolábil Dependiente de Lecitina	24
Función Biológica de la Hemolisina Termolábil Dependiente de Lecitina	26
Compuestos Fenólicos como Inhibidores de Enzimas	28
Compuestos Fenólicos	30
MATERIALES Y MÉTODOS	34
Reactivos	34
Sobreexpresión y Purificación	34
Transformación Bacteriana	34
Preparación del Inóculo Bacteriano	35
Sobreexpresión de la LDH Recombinante	35
Extracción de la LDH a Partir de Cuerpos de Inclusión	36

Purificación de la LDH por Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados (IMAC)	37
Replegamiento <i>in vitro</i> de la LDH	37
Caracterización Bioquímica	38
Preparación de los Sustratos Para la Determinación de la Actividad Enzimática	38
Medición de la Actividad Enzimática	38
pH Óptimo y Estabilidad al pH	39
Temperatura Óptima y Termoestabilidad	40
Actividad Hemolítica	41
Determinación de los Parámetros Cinéticos	42
Inhibición de la Actividad Enzimática y Hemolítica	44
Estructura por Homología de la LDH de <i>Vp</i> y Anclaje Molecular	45
Comparación de la Secuencia de la LDH de <i>Vp</i> con las LDH de las Especies del Género <i>Vibrio</i> y Modelado de la LDH de <i>Vp</i> por Homología	45
Acoplamiento Molecular de la LDH de <i>Vp</i> con Sustratos e Inhibidores	46
Análisis Estadístico	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
Sobreexpresión y Purificación de la LDH de <i>Vp</i>	47
Caracterización Bioquímica Mediante la Actividad Enzimática	51
Ensayo de Actividad de la LDH de <i>Vp</i>	51
Actividad Hemolítica de la LDH de <i>Vp</i>	53
pH Óptimo y Estabilidad al pH de la LDH de <i>Vp</i>	55
Temperatura Óptima de la LDH de <i>Vp</i>	59
Termoestabilidad de la LDH de <i>Vp</i>	61
Determinación de los Parámetros Cinéticos de la LDH de <i>Vp</i>	63
Ensayo de Inhibición de la Actividad Enzimática de la LDH de <i>Vp</i>	67
Estructura por Homología de la LDH de <i>Vp</i> y Anclaje Molecular	76
Comparación de la Secuencia de la LDH de <i>Vp</i> con las LDH de las Especies del género <i>Vibrio</i>	76
Modelado por Homología de la LDH de <i>Vp</i>	78

Acoplamiento Molecular de la LDH con Sustratos e Inhibidores	81
CONCLUSIONES	89
Recomendaciones	90
BIBLIOGRAFÍA	91
APÉNDICE I	98
APÉNDICE II	100



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Producción de camarón blanco por acuicultura en Sonora.....	18
2	Prevalencia de Mortalidad por la Necrosis Hepatopancreática Aguda en Camarón en Sonora.....	20
3	Estructura y factores de virulencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ....	23
4	Secuencia de aminoácidos de la hemolisina termolábil dependiente de lecitina de <i>Vp</i> .....	25
5	Mecanismo catalítico mediado por la triada Ser-His-Asp.....	27
6	Actividad enzimática de la LDH de <i>Vp</i> .....	29
7	Compuestos fenólicos.....	31
8	Estructura de la sPLA <sub>2</sub> del veneno de <i>Naja naja naja</i> .....	33
9	Purificación IMAC en condiciones desnaturalizantes (8 M de urea) de la LDH de <i>Vp</i> .....	48
10	SDS-PAGE del proceso de purificación de la LDH de <i>Vp</i> .....	50
11	Estandarización del ensayo de actividad de la LDH de <i>Vp</i> .....	52
12	Efecto de la lecitina de yema de huevo en la actividad enzimática de la LDH.....	52
13	Actividad hemolítica de LDH de <i>Vp</i> .....	54
14	Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la LDH de <i>Vp</i> .....	56
15	Estabilidad al pH de la LDH de <i>Vp</i> .....	58

16	Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la LDH.....	60
17	Diagrama de Arrhenius del ensayo de temperatura óptima.....	60
18	Termoestabilidad de la LDH de <i>Vp</i> .....	62
19	Cinética enzimática de la LDH de <i>Vp</i> .....	64
20	Efecto de los ácidos fenólicos sobre la LDH de <i>Vp</i> .....	68
21	Estructura de los flavonoides utilizados en el proyecto.....	69
22	Gráficas de inhibición de la LDH de <i>Vp</i> por efecto de los flavonoides.....	73
23	Inhibición de la actividad hemolítica de la LDH de <i>Vp</i> .....	75
24	Comparación de la secuencia de la LDH de <i>Vp</i> con la producida por otras especies del género <i>Vibrio</i> .....	77
25	Estructura por Homología de la LDH de <i>Vp</i> .....	80
26	Aminoácidos catalíticos y la cavidad del sitio activo de la LDH de <i>Vp</i> .....	82
27	Acoplamiento molecular y mapa de interacciones de los sustratos con la LDH de <i>Vp</i> .....	84
28	Acoplamiento molecular y mapa de interacciones de los inhibidores con la LDH de <i>Vp</i> .....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
I	Resultados Cinéticos de la LDH de $V_p$ .....	65
II	Porcentaje de inhibición de los compuestos fenolicos sobre la actividad enzimática de la LDH de $V_p$ .....	70

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar bioquímicamente a la hemolisina termolábil dependiente de lecitina de *Vibrio parahaemolyticus* y determinar el efecto de los compuestos fenólicos sobre su función.

### **Objetivos Específicos**

1. Caracterizar bioquímicamente (temperatura óptima, pH óptimo, estabilidad a la temperatura y pH, cinética enzimática y actividad hemolítica) a la hemolisina termolábil dependiente de lecitina de *Vibrio parahaemolyticus*.
2. Evaluar *in vitro* la inhibición de la actividad enzimática y hemolítica de la hemolisina termolábil dependiente de lecitina de *Vibrio parahaemolyticus* mediante compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos.
3. Determinar el IC<sub>50</sub> para los compuestos que presenten mayor grado de inhibición de la hemolisina termolábil dependiente de lecitina de *Vibrio parahaemolyticus*.
4. Elaborar un modelo estructural por homología de la hemolisina termolábil dependiente de lecitina de *Vibrio parahaemolyticus* y determinar por medio de acoplamiento molecular la interacción de la enzima con los sustratos e inhibidores.

## RESUMEN

La hemolisina termolábil dependiente de lecitina (LDH) es un factor de virulencia excretado por *Vibrio parahaemolyticus* (Vp). Esta enzima tiene actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>/lisofosfolipasa. La LDH cataliza la hidrólisis de la fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina, el cual es una molécula con capacidad detergente y hemolítica. Por otro lado, los compuestos fenólicos son moléculas con un amplio espectro de actividades biológicas por lo que han sido utilizadas en la inhibición de PLA<sub>2</sub> de diferentes especies. El estudio de la LDH proveniente de *Vibrio parahaemolyticus* se enfocó en obtención recombinante de la LDH, la inhibición de su actividad y la construcción de un modelo estructural por homología. La LDH se obtuvo como proteína recombinante en *E. coli* rosetta II y se purificó por IMAC en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente, se replegó *in vitro* mediante diálisis en búfer Tris a pH 7.5. La actividad de la enzima a diferentes condiciones de pH, temperatura e inhibidores se determinó mediante la hidrólisis del PNFL en presencia de lecitina como activador. Adicionalmente se construyó un modelo estructural por homología con el programa MOE. Como resultados, se logró sobreexpresar y purificar a partir de cuerpos de inclusión la LDH en su forma activa. La LDH mostró una actividad de 0.47 U·mg<sup>-1</sup>(s), siendo la concentración del 0.001% (p/v) de lecitina en la que se observó una mayor actividad. La enzima presentó un pH óptimo de 8.0 y una temperatura óptima de 50 °C. Adicionalmente la LDH fue estable en un rango de pH de 6.5-11 y a la temperatura de 10-40 °C. Los valores cinéticos de  $V_{max}$  y  $K_m$  fueron de 0.80 U·mg<sup>-1</sup>(s) y 161.3 μM respectivamente. Los compuestos fenólicos fueron capaces de inhibir la actividad enzimática de la LDH, siendo la quercetina el mejor inhibidor con un IC<sub>50</sub> =4.514μM. El modelo molecular por homología mostró una conformación del sitio activo adecuada para la catálisis, así como otros elementos estructurales característicos de la enzima. Estos resultados indican que los flavonoides son capaces de inhibir la actividad enzimática y hemolítica de la LDH de Vp.

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una de las principales técnicas de obtención de alimentos a nivel mundial. Esta actividad es una gran fuente de ingresos, así como de empleos para los países productores pues representa hasta 46.8 % del producto marino obtenido anualmente (Bortolini, 2014). Las especies de camarón cuentan con la mayor extensión de hectáreas dedicadas a su cultivo, siendo *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco) la más utilizada a nivel internacional (FAO, 2006). México es uno de los mayores productores de camarón de cultivo en Latinoamérica con aproximadamente 86,438 hectáreas, siendo los estados Nayarit, Sonora y Sinaloa los principales productores (Bortolini, 2014; COSAES, 2014).

Las enfermedades asociadas a camarón son uno de los mayores problemas para los productores de camarón a nivel mundial (Sánchez, 2003). Entre 1990 y 2005 se obtuvo una pérdida en los cultivos de camarón con costo de 15 mil millones de dólares, donde las enfermedades relacionadas a bacterias representaron un 22% de las pérdidas. La vibriosis es una de las principales enfermedades de origen bacteriano, la cual es capaz de causar mortalidades totales en estanques de cultivo. Esta enfermedad se puede presentar en distintas etapas del desarrollo del camarón, comprendiendo desde el cultivo de las larvas hasta la fase de engorda. La vibriosis provoca diversos trastornos como: el síndrome de mortalidad temprana, la necrosis séptica del hepatopáncreas, la necrosis de la cola, entre otras (Ibarra, 2015), siendo *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*) la especie más reportada causante de estos trastornos (COSAES, 2014).

Esta bacteria expresa diferentes factores de virulencia para su patogénesis, entre ellas tres toxinas: la hemolisina directa termoestable (TDH), la hemolisina relacionada a la TDH (TRH) y la hemolisina termolábil dependiente de lecitina (LDH) (Wang y col., 2015). La TDH y la TRH han sido reportadas como proteínas causantes de gastroenteritis por intoxicación alimentaria en humanos. Por otro lado, la LDH se ha descrito como un factor de virulencia infeccioso para camarón expresado por cepas del género *Vibrio* (Senevirathne y col., 2009).

La LDH presenta actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>/lisofosfolipasa. Esta es mediada por una triada catalítica conformada por S153-D390-H393, pertenecientes a los cuatro bloques del dominio SGNH, el cual es característico de la familia de lipasas/esterasas de GDSL. La LDH cataliza la hidrólisis de fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina, donde esta molécula es capaz de participar en la señalización celular e inducir la apoptosis, además, cuenta con actividad detergente, con la que puede inducir hemólisis (Ye y col., 2019; Shinoda y col., 1991). La actividad hemolítica de la LDH de *Vp* ha sido observada en ensayos espectrofotométricos con eritrocitos de oveja y en pruebas realizadas en placas con agar y hemocitos de camarón. Este efecto hemolítico también fue observado por las LDH producidas por *V. harveyi* y *V. alginolyticus* (Shinoda y col., 1991; Robles, 2017; Jia y col., 2010; Zhong y col., 2006).

Por otro lado, los compuestos fenólicos son moléculas biosintetizadas por plantas como productos secundarios de diferentes vías metabólicas en respuesta a estímulos del medio ambiente. Estos compuestos se caracterizan por presentar un amplio espectro de actividades biológicas, entre ellas: efecto antioxidante, antitumoral, antimutagénico, antibacterial y la capacidad de interactuar con proteínas (Goleniowski y col., 2013; Cheynier, 2012). Con base a estas características, los compuestos fenólicos se han utilizado para inhibir diversas enzimas, entre ellas, fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Este efecto se observó en PLA<sub>2</sub> provenientes del veneno de serpientes del género *Crotalus* donde se probó el efecto de flavonoides como quercetina y morin; además se describió el efecto inhibitorio de rutina sobre la PLA<sub>2</sub> del veneno de *Naja naja* y la del páncreas porcino (Cotrim y col., 2011; Iglesias y col., 2005; Lindahl y col., 1997). A pesar de que la LDH no cuenta con grandes similitudes a nivel de secuencia y estructura con estas PLA<sub>2</sub>, estos comparten aminoácidos catalíticos como la histidina y el ácido aspártico, por lo que estos compuestos podrían inhibir la actividad enzimática de la LDH (Burke y col., 2009). Por lo tanto, es importante caracterizar bioquímicamente a la LDH de *Vp* y determinar el efecto de los compuestos fenólicos sobre su función con el fin de proponer alternativas al control de la vibriosis en camarón.

## **ANTECEDENTES**

### **Acuicultura de Camarón**

La acuicultura se describe como el grupo de actividades, técnicas y conocimientos de crianza de especies acuáticas vegetales y animales (CONAPESCA, 2013). Esta es una de las mayores técnicas de aprovechamiento de los recursos acuáticos, con una producción mundial aproximada de 80 millones de toneladas anuales, con ganancias de más de 232 millones de dólares y una generación de 19 millones de empleos, siendo así, una de las actividades económicas más importantes. Esta actividad se desarrolló con el fin de sumarse a la pesca y complementarla, con el fin de cumplir con la demanda de productos marinos a nivel mundial, que desde la década de los 80, la pesca no pudo sostener, y actualmente la acuicultura representa el 46.8 % del producto marino mundial producido (FAO, 2018). México es uno de los mayores acuicultores en Latinoamérica, con una producción de 240-270 mil toneladas anuales y registrando un valor aproximado de 7,568 millones de pesos (FAO, 2006, COSAES,2014). Los principales estados productores son Sonora, Sinaloa, Veracruz y Jalisco, donde las principales especies obtenidas son la mojarra, ostión, carpa y camarón. Este último es una de las principales crustáceos cultivados en el mundo con un 57% de la producción total, siendo *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco), la especie de camarón más cultivada con el 98.4% (FAO, 2018). México cuenta con 86,438 hectáreas dedicadas para el cultivo de camarón, representando un 74.5% del área de engorda de todas las especies cultivadas a nivel nacional. Estas áreas de cultivo dedicadas a camarón generaron en 2016 una ganancia de 157.8 millones de dólares (FAO, 2018).

### **Enfermedades Asociadas a Camarón**

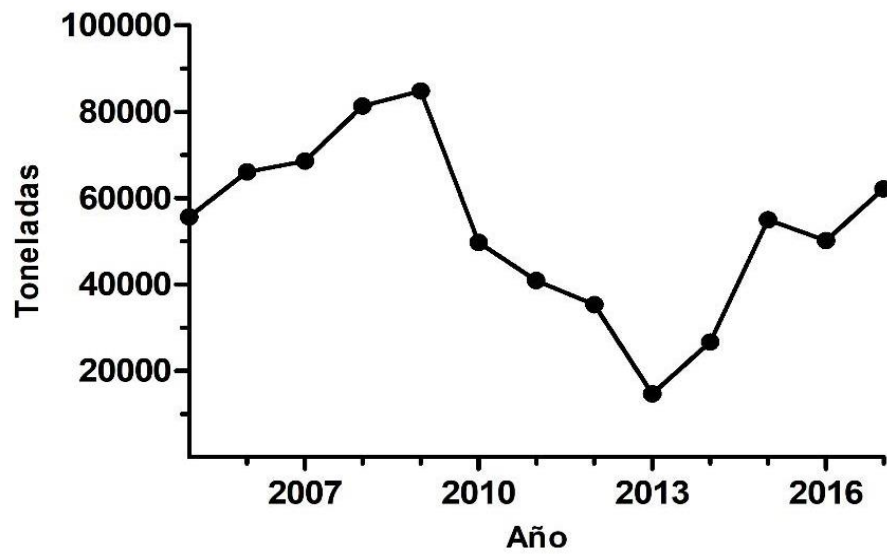
El cultivo de camarón representa una gran fuente de ingresos y empleos para los países productores. Sin embargo, el creciente desarrollo de la industria del cultivo de camarón ha sido frenado, principalmente por la presencia de diversas enfermedades del tipo viral o bacteriano que ocasionaron pérdidas de alrededor de 3 mil millones de dólares en el periodo de 1990-2005 (Sánchez y col., 2003). Entre las principales enfermedades virales se encuentra la Mancha



Blanca (WSD), el Síndrome del Taura (TSV), la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV), la Necrosis Baculoviral de la Glándula Intestinal (BMN) (FAO, 2006). Por otro lado, la vibriosis es la enfermedad de origen bacteriano más importante, la cual representa un 20% de la pérdida total en los cultivos de camarón (Ibarra, 2014). Sonora es uno de los mayores productores de camarón en México (Figura 1); este estado registró un aumento en su producción durante los años 2005-2009 con un máximo de más de 80,000 toneladas (2009). Sin embargo, esta disminuyó considerablemente en el año 2010, principalmente por la presencia de la enfermedad de la mancha blanca. Posteriormente se registró una disminución en la producción entre 2011-2013 hasta un mínimo de aproximadamente 15,000 toneladas, esto debido a la presencia de la vibriosis en los estanques de cultivo (Sánchez y col., 2003; COSAES, 2014).

### **Vibriosis**

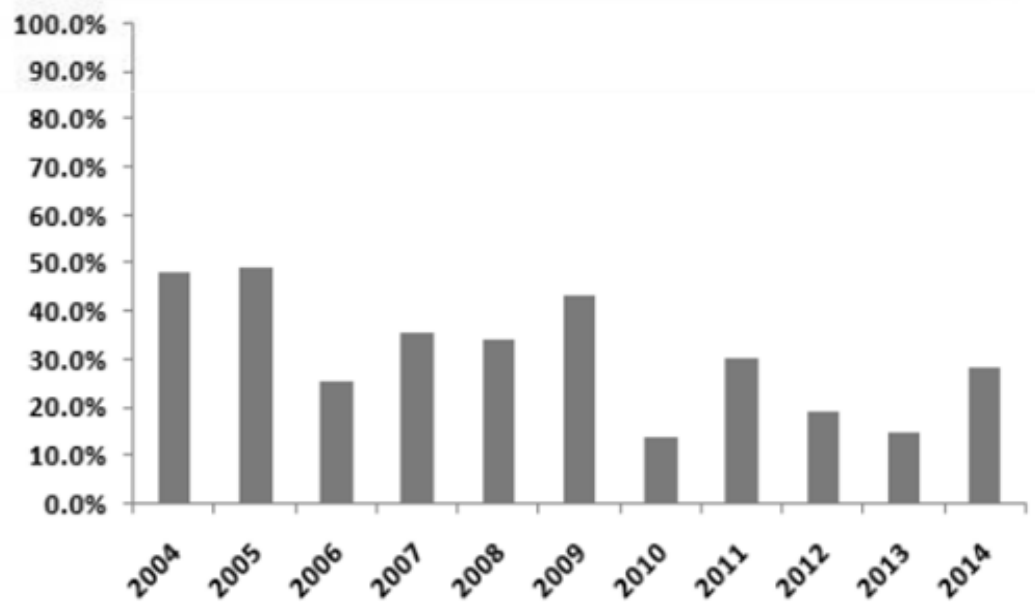
La Vibriosis es una enfermedad causada por cepas patógenas pertenecientes al género *Vibrio*. Esta infección puede afectar diferentes fases del desarrollo de los camarones; como el cultivo de la larvas y la fase de engorda, donde es causante de mortalidades totales en estanques de cultivo a nivel mundial (Cuéllar, 2015; Sánchez y col., 2003). *Vibrio* se encuentra de manera natural en aguas y sedimentos de zonas costeras, y es hospedero de diferentes especies marinas como en camarón. La vibriosis suele desencadenarse cuando ocurre un cambio súbito en las condiciones medioambientales como lo son los cambios de pH, temperatura y salinidad del agua; esto conduce a un aumento en la velocidad de reproducción *Vibrio*, superando así las cargas bacterianas toleradas por el camarón (Cuéllar, 2015). El ingreso de *Vibrio* al camarón se da cuando se supera la primera barrera de defensa, que es el exoesqueleto; esto puede suceder a través de heridas, poros o por perforaciones producidas por bacterias quitinolíticas. También pueden penetrar el camarón a través de las branquias ya que están cubiertas por una cutícula delgada que, en situaciones de estrés, puede permitir el ingreso de la bacteria, sin embargo, se considera que el intestino es la vía de mayor ingreso de patógenos, pues *Vibrio* puede ingresar a camarón por medio del sedimento presente en el agua y por los alimentos consumidos por los camarones (Ye y col. 2019; Cüellar y col., 2015; Braun y col., 2009). La vibriosis en camarón



**Figura 1.** Producción de camarón blanco por acuacultura en Sonora. Datos reportados por SAGARPA (2018).

puede presentarse como la vibriosis oral, vibriosis entérica, vibriosis localizadas en las heridas, necrosis séptica del hepatopáncreas, vibriosis cuticular y de los apéndices, necrosis de la cola, síndrome de la concha suelta, enfermedad del intestino blanco, enfermedad roja y vibriosis sistémica.

Entre las especies del género *Vibrio* que han sido reportadas como patógenas para camarón se encuentran: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. damsella*, *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. mediterranii*, *V. nigripulchritudo*, *V. ordalii*, *V. orientalis*, *V. pelagicus*, *V. penaeicida*, *V. splendidus*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum* y *V. parahaemolyticus* (*Vp*). Este último se ha descrito como el principal agente causal de la enfermedad. A principios de 2009 en China, esta especie causó mortalidades masivas del 60-80% de los camarones juveniles en estanques de cultivo. Así mismo, se registraron pérdidas de cultivos en los años 2010 y 2011 en Vietnam y Malasia (Sánchez y col., 2003). El Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (México) en 2014 reportó la prevalencia de la necrosis hepatopancreática aguda en estanques de cultivo, donde se observó una presencia constante de la enfermedad con un rango del 15-50% entre los años 2004-2014, donde el principal agente causal fue *Vibrio parahaemolyticus* (Figura 2) (COSAES, 2014). Actualmente *Vp* ha sido reportado como el responsable de mortalidades atípicas de camarón, iniciando como un brote en Nayarit, y distribuyéndose posteriormente al noroeste (Sinaloa y Sonora). Esta bacteria provocó atrofia y una coloración blanquecina en la zona hepatopancreática de los camarones, los cuales son síntomas característicos de la EMS (síndrome de mortalidad temprana). Estos trastornos causaron mortalidades de hasta el 70% en los cultivos de la región durante el primer mes del año 2014 (Ibarra, 2015). El control de la vibriosis en camarón se da por el seguimiento de dos estrategias principales: la primera se basa en la prevención con la limpieza y desinfección de las instalaciones, de los estanques, equipos, y de los trabajadores, además de utilizar alimentos certificados libres de bacterias. En casos de infección, se recubren los estanques con mantas plásticas para evitar el contagio entre estanques (FAO, 2006). Adicionalmente se controla el florecimiento de algas y se utilizan filtros para el agua utilizada en los estanques. Por último, se controlan las densidades de la siembra para mantener las condiciones óptimas a lo largo del



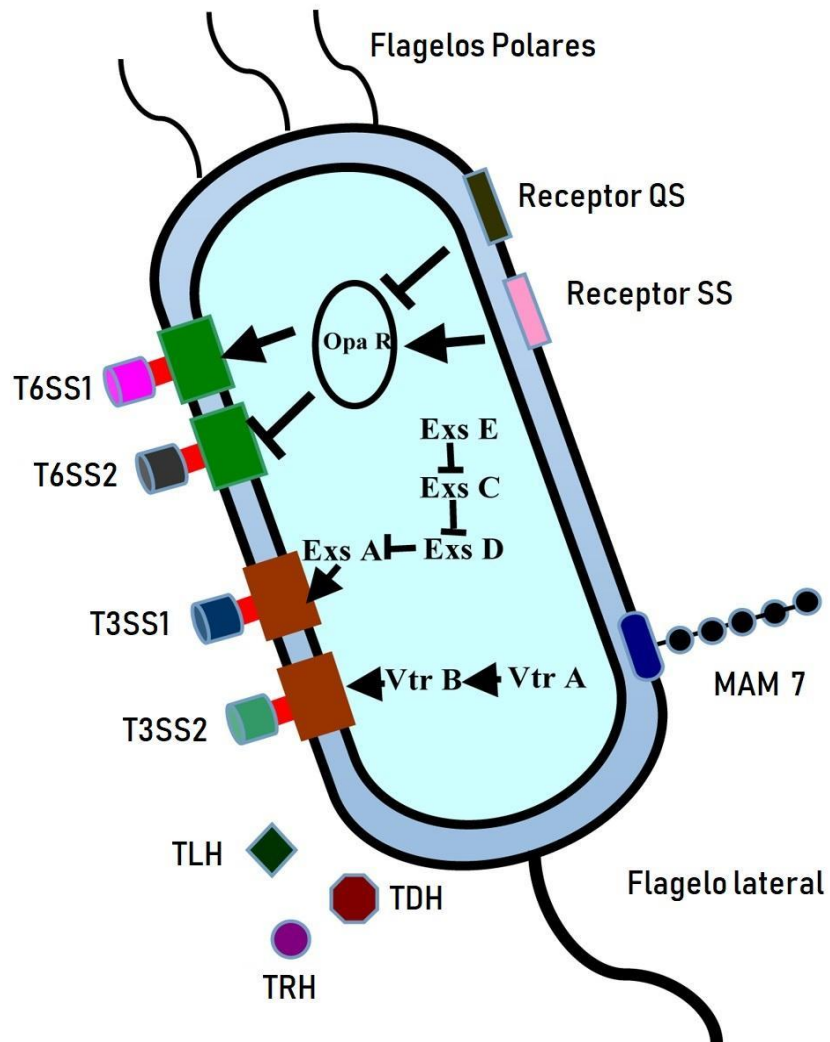
**Figura 2.** Prevalencia de Mortalidad por la Necrosis Hepatopancreática Aguda en Camarón en Sonora. Es una patología causada por el género *Vibrio* donde observa una mortalidad entre el 15-50% de mortalidad de camarón, (Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora A.C. 2014).

ciclo de cultivo. La segunda estrategia se basa en el tratamiento de los camarones con antibióticos como el florfenicol y la oxitetraciclina, que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, y la enrofloxacin que inhiben la síntesis de ADN (Plumb, 2005). Sin embargo, el uso de antibióticos no es recomendado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2018), pues la aparición de cepas de bacterias resistentes a antibióticos se han vuelto un problema biológico, médico, social, económico y ético a escala global, pues estas bacterias tienen una mayor morbilidad y mortalidad (Cabello y col., 2004). Por ello, es importante la búsqueda de compuestos naturales con capacidad bioactiva que tengan la capacidad de controlar a la infección de *Vibrio parahaemolyticus* en los cultivos de camarón (Ibarra y col., 2015).

### ***Vibrio parahaemolyticus*: Factores de Virulencia**

*Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*) es un bacilo gram negativo levemente curvo, halófilo, aerobio facultativo y fermentador de glucosa, pero no de sacarosa. Requiere medios selectivos para su desarrollo, con una concentración de NaCl de 1%. El esquema de serotipificación de *Vibrio parahaemolyticus* incluye 13 antígenos O y 71 tipo K, que ayudan a describir los tipos de cepas, sin embargo, no existe una asociación de un serotipo en particular con el desarrollo de la enfermedad (ACHIPIA, 2017). *Vp* presenta diferentes factores de virulencia que ayudan durante el proceso de invasión e infección al hospedero (Figura 3): La proteína MAM7 (Multivalent Adhesion Molecule 7) participa en la adhesión a células hospederas, ya que tiene la capacidad de anclarse a fibronectina y a moléculas de ácido fosfatídico presentes en la matriz extracelular y en las membranas celulares respectivamente. *Vp* cuenta con dos tipos de flagelos que lo ayudan en su movilidad y en la producción de su cápsula. Esta bacteria también expresa dos sistemas de secreción, el T3SS y T6SS, los cuales participan en la citotoxicidad celular, y participa en el bloqueo del sitio de unión a ATP de enzimas MAPK, que son fosfolipasas que participan en la cascada de señalización para la transcripción de diversas proteínas, lo cual facilita el proceso de infección en la celular hospederas (Letchumanan y col., 2014).

Por otro lado, *Vp* expresa tres toxinas: la hemolisina directa termoestable (TDH), la hemolisina relacionada a la TDH (TRH), y la hemolisina termolábil dependiente de lecitina (LDH). La TDH y la TRH se encuentran relacionadas a la gastroenteritis en humanos por intoxicación con alimentos de origen marino. Estas proteínas tienen la capacidad de formar poros en las células, lo cual causa un desequilibrio osmótico que conduce a la apoptosis. Este efecto fue observado en medios agar Wagatsuma con eritrocitos (Honda y col., 1988; Letchumanan y col., 2014; Wang y col., 2015, Robles, 2017). Adicionalmente, la TDH ha sido reportada como termoestable debido a que es una proteína que mantiene su función a temperaturas mayores de los 60 °C. Mientras que, la hemolisina termolábil dependiente de lecitina es una proteína con actividad enzimática relacionada con la citotoxicidad en organismos marinos. Se ha demostrado que la LDH presenta actividad hemolítica en sangre de oveja, humanos y hemocitos de camarón, así como la capacidad de causar la apoptosis de líneas celulares HeLa, Chang liver y RAW 264.7 ( Rongzhi y col., 2012; Letchumanan y col., 2014; Sun y col., 2007; Wang y col., 2015; Robles, 2017). Además, la LDH se ha descrito como un factor patogénico para camarón gracias a métodos de biología molecular y por la técnica de separación inmunomagnética (IMS), donde se describió que las cepas con el gen *tlh* (+) que codifica para la LDH, son infectivas para camarón (Makino y col., 2003; Senevirathne y col., 2009).



**Figura 3.** Estructura y factores de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*. *Vp* contiene 2 sistemas T3SS, 2 sistemas T6SS, y expresa distintas toxinas, las cuales incluyen a la LDH, TRH y la TDH. MAM7 participa en la primera interacción con las células blanco. Los flagelos polares permiten el movimiento de la bacteria, y el flagelo lateral participa en la formación de biofilms. Imagen adaptada de Wang y col., 2015.

## La Hemolisina Termolábil Dependiente de Lecitina

La hemolisina termolábil dependiente de lecitina es una enzima codificada por el gen *tlh* presente en el cromosoma II de *Vp* (Taniguchi y col., 1986). El gen *tlh* presenta una secuencia de 1,257 pb (con el codón de término) el cual es traducido a una pre-LDH de 418 aminoácidos que tiene un peso molecular deducido de 47.3 kDa (Figura 4) (NCBI, AB012596.1). Esta enzima cuenta con un péptido señal de 20 aminoácidos (aa) en el extremo amino terminal. El péptido señal es eliminado por una modificación postraduccional para obtener a la LDH madura con una secuencia de 399 aa y un peso molecular deducido de 45.3 kDa. Esta enzima pertenece a la familia de esterasas-lipasas GDSL, donde este dominio se localiza en la región que corresponde a los aminoácidos 151-406 de la secuencia total. Este dominio se encuentra presente en un gran grupo de enzimas hidrolíticas con propiedades multifuncionales: como una amplia especificidad de sustratos y flexibilidad estructural. Adicionalmente, se ha observado que las enzimas de esta familia presentan un sitio activo flexible, el cual es capaz de cambiar la conformación en presencia y unión de diferentes sustratos, muy semejante al ajuste inducido propuesto por Koshland (Akoh y col., 2004). Este mecanismo propone que la estructura original del sitio activo de la enzima no se ajusta exactamente al sustrato, sino que la presencia del sustrato induce cambios estructurales en el sitio activo para adaptarse a la unión al sustrato (Koshland, 1958).

La LDH cuenta con una triada catalítica conformada por serina (Ser), ácido aspártico (Asp) e histidina (His) en las posiciones 153, 390 y 393 respectivamente. Estos aminoácidos pertenecen al dominio conocido como SGNH (Ser-Gly-Asn-His), que es descrito como un dominio característico de enzimas lipolíticas. El dominio se divide en cuatro bloques de secuencia conservada identificados como bloques I, II, III, y V. Estos fueron propuestos por primera vez por Upton y Buckley para definir a la familia de enzimas hidrolíticas GDSL (Upton y col., 1995). En el bloque I se presenta el segmento GDSL en el que se encuentra la Ser-153 catalítica dentro del motivo GDSX, donde la serina actúa como un residuo nucleofílico y es equivalente al motivo clásico GX SXG de lipasas/esterasas. Mientras que el aminoácido glicina



*Vibrio parahaemolyticus* serotipo O3:K6 (Cepa RIMD 2210633); gen VPA0226; clave de acceso UNIPROT Q99289

10	20	30	40	50	
MMKKTITLLT	ALLPLASAVA	EEPTLSPEMV	SASEVISTQE	NQTYTYVRCW	
60	70	80	90	100	
YRTSYSKDDP	ATDWEWAKNE	DGSYFTIDGY	WWSSVSFKNM	FYTNTSQNVI	
110	120	130	140	150	
RQRCEATLDL	ANENADITFF	AADNRFSYNH	TIWSNDAAMQ	PDQINKVVAL	
160	170	180	190	200	
<u>GDSLSDTGNI</u>	FNASQWRFPN	PNSWFLGHFS	NGFVWTEYIA	KAKNLPLYNW	
210	220	230	240	250	
AVGGAAGENQ	YIALTGVGEQ	VSSYLTYAKL	AKNYKPANTL	FTLEFGLNDF	
260	270	280	290	300	
MNYNRGVPEV	KADYAEALIR	LTDAAGAKNFM	LMTLPD	ATKA	PQFKYSTQEE
310	320	330	340	350	
IDKIRAKVLE	MNEFIKAQAM	YYKAQGYNIT	LFDTHALFET	LTSAPEEHGF	
360	370	380	390	400	
VNASDPCLDI	NRSSVDYMY	THALRSECAA	SGAEKVFVWD	VTHPTT	ATHR
410					
YVAEKMLESS	NNLAEYRF				

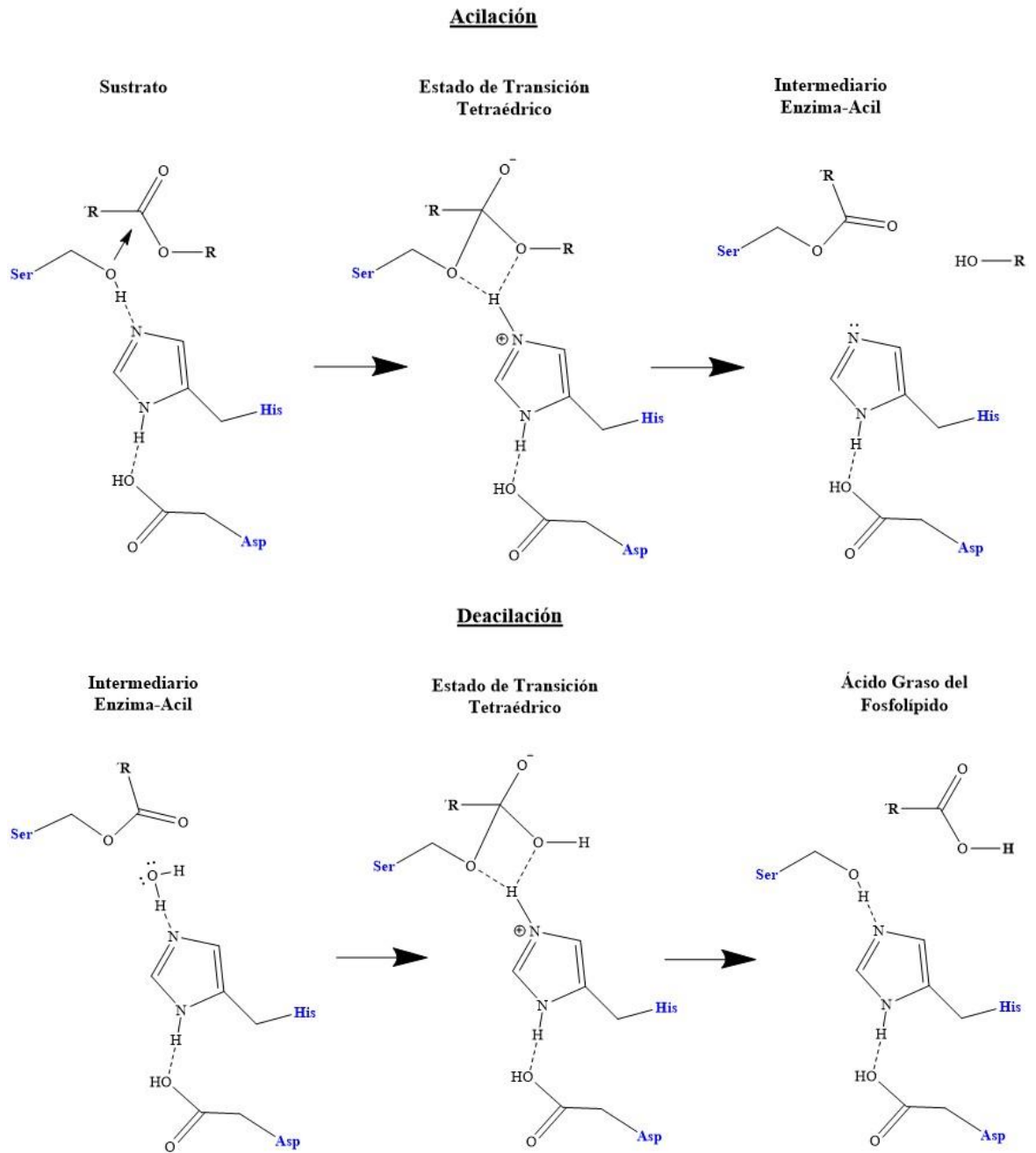
**Figura 4.** Secuencia de aminoácidos de la hemolisina termolábil dependiente de lecitina. Se puede observar la péptido señal del aminoácido 1-20 (verde); el dominio GDSL desde el aminoácido 151-154 (subrayado); la triada catalítica: S-153, D-390 e H-393 (azul claro); el dominio SGNH (Rojo) y los aminoácidos glicina y asparagina que estabilizan el centro catalítico (amarillo)

204 y la asparagina 248 se encuentran en los bloques II y III, participan como donadores de protones en la cavidad oxianión. Por otro lado, la histidina 393 es parte del bloque V en el que actúa como una base y activa al aminoácido catalítico (Ser-153), esto en apoyo del ácido aspártico 390 el cual se ha descrito que interactúa con la histidina estabilizándola durante la formación del intermediario tetraédrico, o bien, asegurando la orientación correcta de este aminoácido (Ye y col., 2019; Upton y col., 1995; Akoh y col., 2004). Este mecanismo es de tipo covalente (Figura 5) y fue descrito a partir de los diversos estudios realizados sobre triada catalítica compuesta por Ser-His-Asp, la cual es utilizada por 23 superfamilias de esterasas/transferasas, entre ellas lipasas y proteasas, siendo este último uno de los más estudiados (Hedstrom, 2002; Carter y col., 1988; Pfeffer, Weadge y col., 2013).

### **Función Biológica de la Hemolisina Termolábil Dependiente de Lecitina**

Las hemolisinas se describen como sustancias del tipo lipídico o proteico, capaces de inducir la lisis de los eritrocitos por medio de la formación de poros en la membrana plasmática. Estas son producidas por diversas bacterias como *Streptococcus pyogenes* (estreptolisina S y O) y *Staphylococcus aureus* (hemolisina-  $\Delta$ ) durante la invasión o patogénesis (Lemichez y col., 2013; Randis y col., 2013). Estas proteínas producen la desestabilización de las membranas celulares por medio de la formación de canales o actuando como surfactantes, sin embargo, existen proteínas con actividad enzimática capaces de causar este efecto hemolítico, entre ellas la LDH (Shinoda y col., 1991).

La LDH fue descrita por primera vez como un factor hemolítico activado mediante la adición de lecitina. El término lecitina se designó al grupo de compuestos saponificables con actividad emulgente que son comúnmente encontrados en membranas celulares, como lo son: fosfolípidos, ácido fosfatídico, glicerol, entre otros; siendo el fosfolípido fosfatidilcolina, su principal componente (Yanagase y col., 1970). Posteriormente, la LDH fue estudiada desde el punto de vista de su actividad hemolítica y enzimática (espectrofotométricamente y en placas con lecitina, respectivamente). En base a estos resultados se clasificó como una fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) / lisofosfolipasa, esto al comparar su actividad hemolítica con una fosfolipasa B de *Vp*

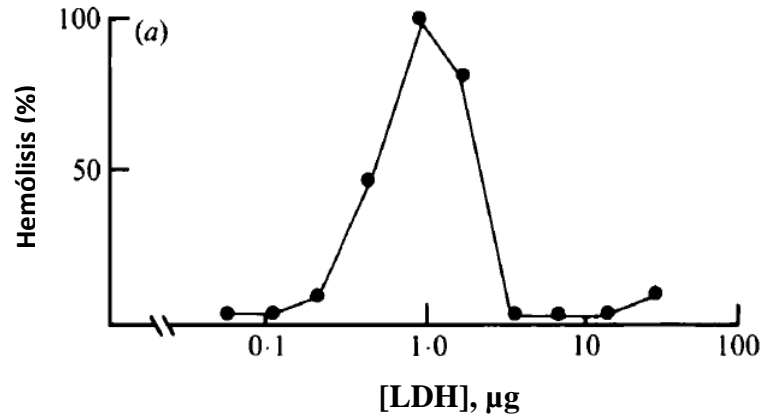


**Figura 5.** Mecanismo catalítico mediado por la triada Ser-Asp-His. El mecanismo de tipo covalente se da en dos pasos principales: en la Acilación es liberado el grupo R, quedando la serina-acilo como intermediario; en la deacilación, el grupo R unido covalentemente a la serina es eliminado con el uso de una molécula de agua, dejando en el estado inicial a la serina catalítica.

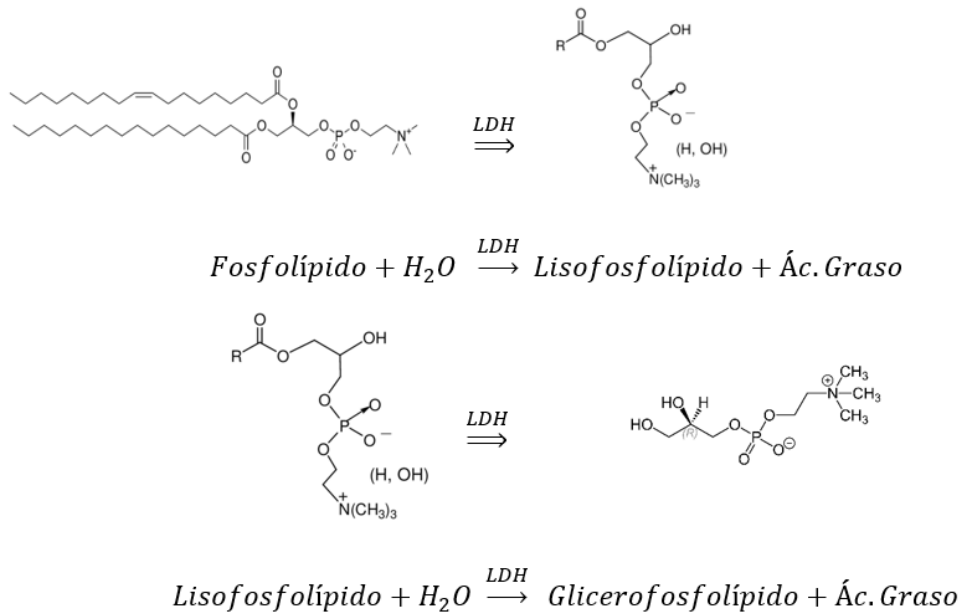
y una sPLA<sub>2</sub> proveniente del veneno de la serpiente *Naja naja* (Shinoda y col., 1991). En este estudio se observó que la hemólisis era directamente proporcional a la concentración de enzima, sin embargo, en concentraciones altas de la enzima disminuye su capacidad hemolítica. Esto difiere de una sPLA<sub>2</sub> típica donde no se observa una pérdida de la actividad hemolítica (Figura 6, panel A). Mientras que las fosfolipasas tipo B no presentan este tipo de actividad. Por lo anterior se clasificó a la LDH como una fosfolipasa atípica, pues la enzima demostró tener una mayor afinidad al ácido graso en la segunda posición de los fosfolípidos (actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>) (Shinoda y col., 1991; Robles, 2017). La LDH hidroliza el enlace éster del segundo ácido graso presente en los fosfolípidos (Figura 6, panel B), principalmente la fosfatidilcolina, obteniendo como producto a una molécula de lisofosfolípido (actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>). Se ha descrito que estos compuestos son capaces de inducir apoptosis e inflamación, y presentan actividad detergente (Tanaka y col., 1983; Shinoda y col., 1991; Letchumanan y col., 2014). Esta última es la responsable de la actividad hemolítica de la LDH, por lo que se ha asociado con la patogenicidad de *Vp* durante el proceso de infección en el camarón. Como se mencionó la LDH también tiene actividad de lisofosfolipasa. Esto le permite hidrolizar el enlace éster del ácido graso restante de los lisofosfolípidos, produciendo glicerofosfolípidos, los cuales no presentan actividad hemolítica (Ye y col., 2019; Shinoda y col., 1991; Sun y col., 2007; Zhong y col., 2006).

### **Compuestos Fenólicos como Inhibidores de Enzimas**

Un inhibidor enzimático es una molécula capaz de interactuar con la estructura de las enzimas, y por consiguiente disminuyen su actividad. Estos inhibidores son utilizados para el control de patógenos (antibióticos), como reguladores metabólicos, y como herbicidas y pesticidas (Lehninger y col., 2000). El efecto puede ser del tipo reversible o irreversible; el tipo reversible se da por la interacciones del inhibidor con la enzima por medio de enlaces intermoleculares como lo son los puentes de hidrógeno y por fuerzas de Van Der Waals, y



A)



B)

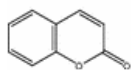
**Figura 6.** Actividad enzimática de la LDH. A) diagrama del comportamiento de la actividad hemolítica de la LDH (Shinoda y col., 1991). B) Actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>/lisofosfolipasa de la LDH. La molécula de fosfatidilcolina fue utilizada en el diagrama, el cual es el fosfolípido de mayor proporción en la lecitina y en la cara externa de las membranas celulares.

estos inhibidores se clasifican como: competitivo (interacciona con el sitio activo) y no competitivo (interacciona con un sitio alostérico de la enzima). Por último, la inhibición irreversible se describe para compuestos que pueden formar enlaces del tipo covalente con la enzima objetivo, por lo que la funcionalidad de la enzima se pierde por completo (Segel, 1993), por ejemplo, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) es un inhibidor irreversible para una gran variedad de proteasas de serina, y es comúnmente utilizado en la preparación de lisados celulares para mantener la integridad de las proteínas de interés (James 1978). Actualmente no existen inhibidores reportados para la actividad enzimática y hemolítica de las LDH del género *Vibrio*, por lo tanto, parte de los objetivos del presente estudio es inhibir a la LDH de *Vp*, para ello se propone el uso de los compuestos fenólicos.

### **Compuestos Fenólicos**

Los compuestos fenólicos son moléculas que son biosintetizadas principalmente por plantas como metabolitos secundarios. Estos compuestos son producidos en respuesta a estímulos del medio ambiente como lo son: el aumento de la radiación UV, por heridas, la disminución de la temperatura y por un déficit de nitrógeno, fósforo o hierro. Estos metabolitos muestran una gran diversidad de estructuras, que incluyen moléculas simples como los ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido gálico, entre otros) y polifenoles como los flavonoides (quercetina, morin entre otros), estilbenos, lignanos y polímeros derivados de estos diversos grupos (Figura 7) (Goleniowski y col., 2013; Panche y col., 2016; Cheynier, 2012). Estos compuestos son sintetizados principalmente por dos vías metabólicas: (1) la ruta del ácido shikímico, en la cual se da la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), donde la molécula de ácido shikímico es precursor de diferentes metabolitos secundarios como los flavonoides y ácidos fenólicos (Guy y col., 2013); (2) La vía del ácido malónico consiste en la polimerización de subunidades de acetilo y propionilo obtenidas por la descarboxilación de malonil coenzima A o metilmalonil coenzima A en un proceso similar a la biosíntesis de ácidos grasos, donde se producen flavonoides, lignanos y entre otros (Cryle, 2018). estudios por su capacidad antioxidante o bien para inhibición de la actividad de diversas enzimas.

### Fenoles simples

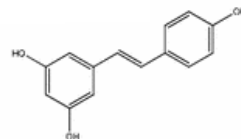


Cumarina



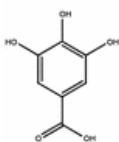
Catecol

### Estilbeno

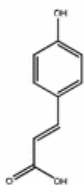


Resveratrol

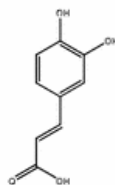
### Ácidos fenólicos



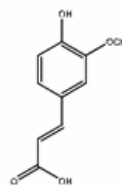
Ácido gálico



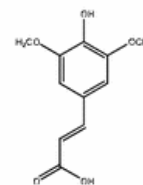
Ácido p-cumárico



Ácido cafeico

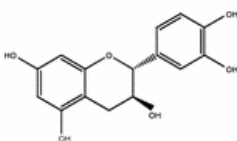


Ácido ferúlico

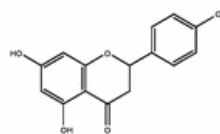


Ácido sinápico

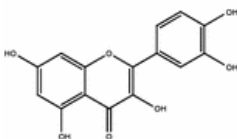
### Flavonoides



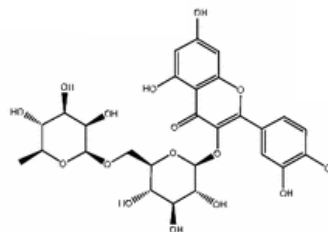
Catequina



Naringenina



Quercetina



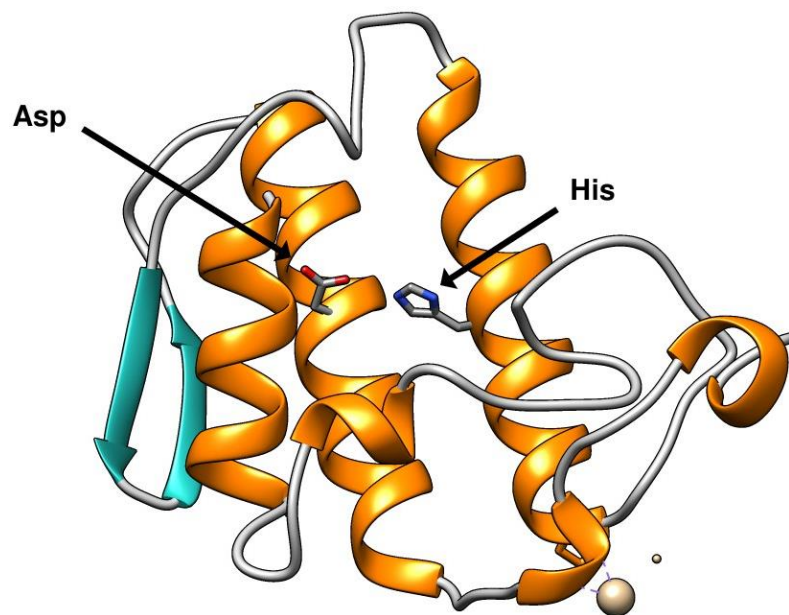
Rutina

**Figura 7.** Compuestos fenólicos. Se observan compuestos fenólicos simples como la cumarina, el estilbeno resveratrol, además algunos ácidos fenólicos como el ácido gálico y algunos flavonoides como la quercetina y la rutina. Estos compuestos han sido utilizados en diversos

Los compuestos fenólicos han generado un gran interés gracias a sus importantes propiedades biológicas y farmacológicas, entre ellas su capacidad antiinflamatoria, antioxidantes, antimutagénica y anticarcinogénica (Goleniowski y col., 2013; Panche y col., 2016; Cheynier, 2012). Debido a estas características los compuestos fenólicos se han utilizado para inhibir la actividad enzimática de fosfolipasas A<sub>2</sub> presentes en varias especies animales. Se ha reportado que los flavonoides son capaces de inhibir selectivamente a fosfolipasas A<sub>2</sub> del veneno de diferentes especies de serpientes. Cotrim y col. (2011) describieron una disminución en la actividad de sPLA<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus*, utilizando la quercetina como inhibidor, adicionalmente se observó una disminución en el efecto antibacterial y en la miotoxicidad de la enzima. Por otro lado, Veras y col. (2005) reportaron una disminución en la actividad enzimática y antibacteriana de la sPLA<sub>2</sub> de *Crotalus durissus cascavella*, utilizando morin como inhibidor. Otros autores han se observado una disminución en la actividad enzimática de la PLA<sub>2</sub> del veneno de *Crotalus adamanteus* y del páncreas porcino utilizando diversos ácidos fenólicos simples y flavonoides (Lindahl y col., 1997; Cotrim y col., 2011; Iglesias y col., 2005; Marangoni y col., 2009). Si bien las fosfolipasas A<sub>2</sub> del veneno de serpientes no pertenecen a la misma familia GDSL, estos al igual que diversas PLA<sub>2</sub> cuentan con aminoácidos del sitio catalítico similares; como la serina, histidina y cido aspártico o ácido glutámico; Por ejemplo, la PLA<sub>2</sub> de *Naja naja naja* utiliza los residuos His y Asp para realizar su actividad (Figura 8). Además, como su nombre lo indica, estas enzimas también tienen actividad enzimática similar a la observada por la LDH de *Vp* (Burke y col., 2009; Shinoda y col., 1991; Akoh y col., 2004).

A pesar de esta información, las características bioquímicas y funcionales de la hemolisina termolábil dependiente de lecitina aún no están descritas. Además, el efecto de los compuestos fenólicos sobre su actividad enzimática es aún desconocido. Esta información podría proporcionar nuevas alternativas para el control de la vibriosis en camarones. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es caracterizar la hemolisina termolábil de *Vibrio parahaemolyticus* bioquímicamente y evaluar el efecto de los compuestos fenólicos en su función.





**Figura 8.** Estructura de la sPLA<sub>2</sub> del veneno de *Naja naja naja*.. Se aprecian los aminoácidos catalíticos para esta clasificación de enzimas de venenos de serpiente. Entre los aminoácidos del sitio catalítico de PLA<sub>2</sub> se encuentran S, D/E, H. Estos pueden encontrarse como diadas o triadas catalíticas y pueden o no, depender de un ion de calcio para su catálisis. Clave de acceso en PDB 1A3D.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

La secuencia de la LDH-*Vp* se obtuvo del banco de datos de genes (número de acceso: AB012596.1). El constructo de la LDH-*Vp* fue elaborado por el Dr. Adrián Ochoa (Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos México). Este fue clonado en el plásmido pET-28b (+), el cual brinda resistencia al antibiótico kanamicina y cuenta con un operón lac inducible para la sobreexpresión de la proteína de interés. Al gen de la LDH le fue agregado un segmento His-Tag (GAHHHHHH) en el extremo carboxilo terminal (C-terminal) para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC).

El isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), el p-nitrofenil laurato (PNFL), la lecitina (de yema de huevo), quercetina, morin, rutina, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), ácido gálico (GA), ácido vanílico (VA), ácido protocatéuico (PR) y el ácido clorogénico (CL) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EUA). El equipo para la obtención de agua ultrapura Milli-Q utilizada en la preparación de los búfers y la cepa rosetta II de *E. coli* fueron obtenidos de Merk Millipore, Billerica, MA, EUA. En el apéndice I se muestra la tabla con los equipos utilizados en el proyecto.

### Sobreexpresión y Purificación

#### **Transformación Bacteriana**

El constructo de la LDH-*Vp* se insertó en la bacteria *E. coli*, cepa Rosetta II por el método de choque térmico (Rahimzadeh y col., 2016). El proceso de transformación se realizó un microtubo Eppendorf que contenía células químicamente competentes de Rosetta II. La suspensión bacteriana se homogenizó suavemente para posteriormente añadir un 1  $\mu$ L de del constructo de la LDH*Vp* a una concentración de 20  $\mu$ g/mL. La solución se mezcló cuidadosamente con la micropipeta y se mantuvo por 10 minutos en hielo. Posteriormente, se incubó durante un minuto a una temperatura de 42 °C, inmediatamente después se colocó en

hielo y se dejó reposar durante 2 minutos. Después se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de medio SOB (“Super Optimal Broth”, 20 g/L Tryptona, 5 g/L extracto de levadura, 4.8 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 3.603 g/L glucosa, 0.5g/L NaCl y 0.186 g/L KCl), se mezcló con una micropipeta y se incubó durante 3 horas a 37 °C en un agitador orbital a 220 rpm. Se sembraron 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  y 150  $\mu\text{L}$  de cultivo bacteriano en tres placas de agar Luria Bertani (LB, 15 g/L Agar, 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 0.5 g/L NaCl) adicionado con kanamicina (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como antibiótico de selección. Se realizó el método de extensión en superficie en las placas y se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 37 °C. Las placas con presencia de colonias aisladas fueron utilizadas para la preparación del inóculo bacteriano, el cual se describe en la siguiente sección.

### **Preparación del Inóculo Bacteriano**

A partir de una colonia aislada de las placas de cultivo con las células transformadas se sembró en una nueva placa con agar LB por el método de estriado. Esta se incubó a una temperatura de 37 °C por 12 horas. Se seleccionó una colonia aislada y se inoculó en un matraz con 25 mL de caldo LB suplementado kanamicina (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), el medio de cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante (200 rpm). Se registró la densidad óptica del cultivo hasta una absorbancia de 0.4 unidades a una longitud de onda de 600 nm. A partir de este cultivo bacteriano se prepararon los inóculos en microtubos eppendorf con una relación de 600  $\mu\text{L}$  de cultivo y 400  $\mu\text{L}$  de glicerol (50%). Estos se almacenaron a -80 °C para su preservación para futuros cultivos para sobreexpresión (Cabrera y col., 2017; Zhong y col., 2006).

### **Sobreexpresión de la LDH Recombinante**

Para la sobreexpresión de la enzima se siguió el protocolo descrito por Robles (2017), el cual fue modificado. Se utilizó un microtubo con las bacterias transformadas para inocular un matraz Erlenmeyer con 100 mL de caldo Luria Bertani (LB) adicionado con kanamicina (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Este se incubó durante 3 horas a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se adicionaron 10 mL del cultivo a un matraz tipo Fernbach con 1 L de medio LB adicionado con kanamicina (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó en agitación constante de 220 rpm a 25 °C. El crecimiento del cultivo fue monitorizado a una  $\lambda=600$  nm hasta alcanzar una O.D.= 0.6, en este punto se indujo la

sobreexpresión de la LDH mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo se mantuvo a 25 °C con agitación constante de 220 rpm por 16 horas. Transcurrido este tiempo, las células fueron recolectadas por centrifugación a 7, 000 × g durante 20 minutos a 4 °C. El botón de células bacterianas obtenido fue pesado y almacenado en un ultra congelador a – 80 °C hasta su uso. Durante la sobreexpresión se tomaron alícuotas de 1 mL del cultivo antes de inducir y después de la inducción, las cuales fueron centrifugadas a 8000 × g por 3 minutos a 4 °C, las bacterias fueron almacenadas a –20 °C para su análisis posterior. El botón de células bacterianas fue resuspendido en búfer Lisis (Tris-HCl 50 mM, 100 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, benzamidina 5mM, 1 mM DTT pH 7.0), y fueron sonicadas en una cama de hielo (6 pulsos de 10 segundos cada uno al 40 % de amplitud). El producto obtenido fue clarificado por centrifugación (8, 000 × g por 20 minutos a 4 °C) obteniendo dos fases: una soluble (sobrenadante) y otra insoluble (precipitado). Ambas fases fueron sometidas a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones reductoras y desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

### **Extracción de la LDH a Partir de Cuerpos de Inclusión**

La LDH se sobreexpresó en forma de cuerpo de inclusión, por lo que se implementó un protocolo para la extracción de la enzima. Este procedimiento se realizó de acuerdo con lo reportado previamente por Robles (tesis de licenciatura, 2017). La obtención de la LDH se realizó a partir de un gramo de células bacterianas obtenidas de la sobreexpresión. Las células bacterianas fueron sometidas a una serie de 5 ciclos para obtener la LDH del precipitado celular. En cada ciclo se utilizó un búfer para resuspender las células y/o el precipitado el cual fue utilizado a una razón de 4 mL por cada gramo inicial de bacteria. En cada ciclo la suspensión fue solubilizada por sonicación en cama de hielo a una razón de 6 pulsos de 10 segundos al 40 % de amplitud. Posteriormente, en cada ciclo se centrifugó a 25, 000 × g por 20 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se recuperó el precipitado. En el último ciclo se utilizó el búfer de extracción con urea 8M para solubilizar a la LDH. La suspensión que contiene a la enzima fue incubada a 4 °C con agitación moderada por 12 horas. Esta se clarificó por centrifugación (condiciones de la centrifuga), se recuperó el sobrenadante (fracción soluble) y se cuantificó la

concentración de proteína por el método de Bradford. Esta solución se almacenó a 4 °C y se utilizó para la purificación de la LDH en condiciones desnaturalizantes (Robles, 2017). El contenido de los búfers utilizados en la extracción de los cuerpos de inclusión se describe en el apéndice I.

### **Purificación de la LDH por Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados (IMAC)**

El procedimiento para realizar la purificación de la proteína se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante (GE Healthcare, 2019) en condiciones desnaturalizantes. Este consistió en utilizar una columna His Trap FF crude (1 ml) con el equipo Akta Prime Plus (GE life Sciences), donde la columna fue equilibrada con 5 mL de búfer A (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, urea 8 M a pH 7.4). Posteriormente, la columna fue cargada con 4 mL de la solución de proteína a 15 mg/mL (Solubilizado de cuerpos de inclusión) a un flujo de 1 mL/min. La proteína unida a la columna fue eluida mediante gradiente lineal (1-100%) de búfer B (búfer A adicionado con imidazol 500 mM) a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones (1 mL cada una) en donde se detectó la presencia de proteína (absorbancia a  $\lambda=280$  nm) se analizaron mediante electroforesis en condiciones reductoras y desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso.

### **Replegamiento *in vitro* de la LDH**

El plegamiento de la LDH a su forma activa se realizó por medio de una disminución gradual de la concentración de urea de acuerdo con lo reportado por Robles (2017). Este procedimiento se realizó mediante diálisis utilizando una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 12-14 KDa (Millipore). El recambio del búfer de diálisis se llevó a cabo cada 3 horas a 4 °C con agitación constante, con una disminución gradual de la concentración de urea de 8 M hasta 0 M en el último recambio. Posteriormente, la solución se clarificó por centrifugación a 25, 000  $\times$  g durante 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y la concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976; Robles, 2017). El contenido de los búfers utilizados en el replegamiento se describe en el apéndice I.

## Caracterización Bioquímica

### Preparación de los Sustratos Para la Determinación de la Actividad Enzimática

El *p*-nitrofenil laurato y la lecitina fueron disueltos en etanol absoluto anhidro a una concentración de 5-200  $\mu\text{M}$  y del 0.0001-1.0 % (p/v), respectivamente.

### Medición de la Actividad Enzimática

La actividad de la LDH se midió por el método espectrofotométrico, utilizando el ensayo para lipasas descrito por Nawani y col. (1998), en el cual se añadió lecitina de yema de huevo como activador de la enzima con base a lo descrito para la enzima (Shinoda y col., 1991). Se registró la formación de *p*-nitrofenol ( $\epsilon_{410 \text{ nm}} = 11.8 \text{ cm}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ) como producto de la hidrólisis del sustrato (PNFL). Los ensayos se realizaron con 3  $\mu\text{g}$  de la LDH, 200  $\mu\text{M}$  de PNFL y 0.0001% (p/v) de lecitina. El búfer de actividad fue Tris 50 mM pH 7.5 y el volumen final de reacción fue de 1 mL. La actividad de la LDH se midió durante 5 minutos a una temperatura de 37 °C. En cada ensayo se midió una reacción blanco (control negativo) sin la enzima para evaluar la auto-hidrólisis del sustrato. Las reacciones se realizaron en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud de paso de luz con un espectrofotómetro de UV Cary-60 equipado con un sistema Peltier para el control de la temperatura. La actividad total de la LDH se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\mu\text{mol}$  de PNFL por minuto bajo las condiciones de ensayo. Cada medición se realizó por triplicado, y las pendientes obtenidas fueron utilizadas para el cálculo de la actividad específica y fue expresada en forma de promedios con su valor de desviación estándar. El cálculo de la actividad específica se realizó utilizando la ecuación 1.

**Ecuación 1:** ecuación de la actividad específica

$$\text{Actividad específica} = \frac{m V}{\epsilon p l}$$

Donde:

La actividad específica está dada en  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol  $\text{min}^{-1}\text{mL}^{-1}$ .

m es la pendiente del segmento lineal de la absorbancia contra tiempo de la reacción.

V es el volumen total en la reacción, que es de 1 mL.

E es el coeficiente de extinción molar de *p*-nitrofenol  $11.8 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a pH de 7.5.

p es la concentración de proteína (0.003 mg).

l es la longitud del paso de luz en la celda que es de 1 cm.

### **pH Óptimo y Estabilidad al pH**

Para el ensayo de pH óptimo se utilizaron las condiciones estándares descritas para el ensayo de actividad. Se evaluó la actividad enzimática en diferentes valores de pH: 6, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 10 y 11. Para el cálculo de la actividad específica se utilizó el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del PNFL para cada uno de los valores pH: 1.97, 6.52, 11.8, 12.75, 13.9, 14.3, 14.6 y 14.6 ( $\text{cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1} \text{ml}$ ), respectivamente. Los búfers de actividad utilizados fueron citratos sódicos a pH=6, Tris-HCl para pH de 7 a 9 y carbonatos de sodio para los valores de pH 10 y 11. En todos los casos se mantuvo una concentración constante de 100 mM. El pH óptimo se definió como el pH en el que la enzima presentó la mayor actividad bajo las condiciones del ensayo descrito (Hriscu y col., 2013).

Para el ensayo de estabilidad al pH, 40  $\mu\text{L}$  de la LDH se colocaron en microtubos de 0.5 mL con cada uno de los búfer de intervalo de pH evaluado (5-10.5) en una relación 1:5. Las soluciones de los búfers (20 mM) a los diferentes pH fueron las siguientes: citratos sódicos (pH= 5.5 y 6.0), fosfatos de potasio (pH= 6.5 y 7.0), Tris-HCl (pH= 7.0- 9.0), carbonatos (pH= 9.0 y 10.5). La actividad enzimática se evaluó en condiciones estándar con un búfer Tris-HCl 100 mM a pH 8.0. El valor de pH en el cual la enzima presentó la mayor actividad enzimática se tomó como 100% de la actividad. Además, se describió a la LDH como estable cuando la enzima mantiene por lo menos un 80% de su actividad en base al punto de mayor actividad enzimática (100%).

## **Temperatura Óptima y Termoestabilidad**

Ambos ensayos fueron realizados a las condiciones del ensayo de actividad descrito anteriormente. La temperatura óptima se determinó midiendo la actividad enzimática en un rango de 10-80 °C con intervalos de 10 °C. Donde la temperatura óptima aparente se describió como la temperatura en la cual hubo una mayor hidrólisis de PNFL a 5 minutos de reacción bajo las condiciones del ensayo. Para el ensayo de termoestabilidad, la LDH se incubó 15 minutos a temperaturas de 10-80 °C con intervalos de 10 °C y después se midió la actividad enzimática en las condiciones estándar. Se consideró a la LDH como termoestable cuando la actividad específica fue al menos del 80% con respecto a la temperatura donde la LDH mantuvo su mayor actividad enzimática (100 %). Los datos obtenidos para la temperatura óptima fueron ajustados a la ecuación de Arrhenius (ecuación 2) para determinar la energía de activación para la enzima. Mientras que los datos de termoestabilidad fueron ajustados al modelo sigmoideo de Boltzman, esto utilizando el software Prism 5 (GraphPad®).

**Ecuación 2:** ecuación de Arrhenius y su forma linealizada para la elaboración del gráfico de Arrhenius.

$$k(T) = Ae^{-\frac{Ea}{RT}}$$

Linealizada:

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{Ea}{R} \left( \frac{1}{T} \right)$$

Donde:

k(T) es una constante cinética dependiente de la temperatura.

A es el factor de frecuencia, el cual indica la frecuencia de las colisiones.



$E_a$  es la energía de activación en J/mol.

R es la constante universal de los gases la cual es igual a  $8.3143 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

T es la temperatura absoluta [K].

### **Actividad Hemolítica**

Para determinar la actividad hemolítica de la LDH se utilizaron eritrocitos de humano (O +) como sustrato. A continuación, se describe el procedimiento utilizado: se extrajo sangre de humano por venopunción en tubos con EDTA. El paquete eritrocitario fue aislado por centrifugación a  $1,100 \times g$  por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se descartó el plasma y después los eritrocitos se lavaron 3 veces con solución salina estéril al 0.9% (p/v) seguidos por centrifugación a  $1,100 \times g$  por 3 minutos. Por último, el paquete eritrocitario fue resuspendido en búfer de fosfatos salinos (PBS) en una relación 1/200 para los ensayos. Esta suspensión fue utilizada para los ensayos de actividad hemolítica. Para el ensayo se utilizaron  $300 \mu\text{L}$  de la suspensión eritrocitaria, a la que se le adicionó lecitina de yema de huevo al 0.0001% (p/v), LDH a una concentración final de 2, 4 y  $10 \mu\text{g}$  y se ajustó el volumen del ensayo a 1 mL con PBS. Como control positivo se utilizó Tween 20 al 0.2% (v/v) y un control negativo sin enzima o detergente celular. Las muestras se homogenizaron ligeramente y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por una hora en agitación ligera. Las muestras fueron centrifugadas a  $1,100 \times g$  por 2 minutos y se recolectó el sobrenadante, al cual se midió la absorbancia a 540 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de hemólisis, teniendo como hemólisis total a la producida por el Tween 20 y una hemólisis nula al control sin detergente y LDH (Malagoli, 2007). Los resultados expresados en función de la ecuación 3.

**Ecuación 3:** ecuación para el cálculo del porcentaje de actividad hemolítica.

$$\%AH = \left( \frac{AbsM - AbsCN}{AbsCH - AbsCN} \right) * 100$$

%AH es el porcentaje de actividad de la enzima.

AbsM es la absorbancia registrada por la actividad hemolítica de la LDH.

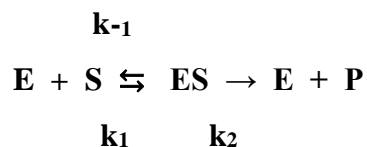
AbsCN es la absorbancia del control negativo (ensayo sin enzima o detergentes).

AbsCH es la absorbancia del control positivo de la hemólisis (Tween 20).

### **Determinación de los Parámetros Cinéticos**

Los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $k_{cat}$  de la LDH se determinaron a partir de la medición de las velocidades iniciales de la enzima a las condiciones óptimas del ensayo de actividad. Para lo cual se varió la concentración de PNFL en un rango de 20-400  $\mu\text{M}$  y a una concentración constante de lecitina de 0.0001% ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). La actividad enzimática se registró durante 2 minutos y los datos obtenidos de actividad específica se ajustaron al modelo de regresión no lineal de Michaelis-Menten (ecuación 4) utilizando programa Prism 5 (GraphPad®). Además, con estos datos se calculó la  $k_{cat}$  y la constante de especificidad ( $k_e$ ) de la enzima con las ecuaciones 5 y 6, respectivamente (Johnson y col., 2012).

**Ecuación 4:** Mecanismo de unión de un único sustrato para una reacción enzimática y la ecuación de Michaelis-Menten.



Donde:

E es igual a enzima

S es el sustrato

ES es el complejo enzima sustrato

P es el producto

$k_1$  es la constante de formación del complejo ES

$k_{-1}$  es la constante de disociación del complejo ES

$k_2$  es la constante de catálisis ( $k_{cat}$ )

$$v = \frac{V_{max}[S]}{k_m + [S]}$$

Donde:

v es igual a la velocidad inicial de la reacción, la cual es calculada con la ecuación 1.

$V_{max}$  es la velocidad máxima de la reacción enzimática.

$K_m$  es la constante de Michaelis-Menten ( $(k_{-1} + k_2 / k_1)$ ).

S es la concentración de sustrato en la reacción.

**Ecuación 5:** constante catalítica

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[Et]}$$

**Ecuación 6:** constante de especificidad

$$K_e = \frac{K_{cat}}{V_{max}}$$

Donde:

$k_e$  es la constante de especificidad.

$k_{cat}$  es la constante catalítica ( $k_2$ ) expresada en  $s^{-1}$ .

[Et] es la concentración de enzima (M).

### **Inhibición de la Actividad Enzimática y Hemolítica**

Se evaluó el efecto de compuesto fenólicos y flavonoides sobre la actividad enzimática y hemolítica de la LDH. Para lo cual, todas las mediciones se realizaron con los ensayos estándar anteriormente descritos. Se utilizaron los siguientes compuestos, ácidos fenólicos: GA, VA, PR y CL; flavonoides: Quercetina, morin, rutina y EGCG El rango de concentración fue de 1-20  $\mu$ M para todos los flavonoides, mientras que para los ácidos fenólicos se usó una concentración de 30  $\mu$ M y 100  $\mu$ M. Se describió un efecto inhibitorio cuando la actividad basal de la LDH disminuyó significativamente en presencia de los compuestos fenólicos con un valor estadístico de  $p < 0.05$ . posteriormente se determinó la  $IC_{50}$  de los compuestos que ejercieron un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de la LDH, utilizando un rango de concentraciones de 0.1-50  $\mu$ M. Para la actividad hemolítica, se usó la quercetina, la morin y el EGCG en un rango de concentración de 1-20  $\mu$ M. Los datos fueron analizados con el modelo de dosis-respuesta del programa Prism 5 (GraphPad®). Se describió como inhibición de la actividad hemolítica cuando la actividad fue menor en comparación al control con LDH sin ningún compuesto fenólico.

## Estructura por Homología de la LDH de *Vp* y Anclaje Molecular

### Comparación de la Secuencia de la LDH de *Vp* con las LDH de las Especies del Género *Vibrio* y Modelado de la LDH de *Vp* por Homología

La secuencia de aminoácidos de la LDH de *Vp*, con clave de acceso Q99289 en la base de datos UniProt, fue comparada con la de otras especies de *Vibrio*, entre ellas: *Vibrio cholerae* (*Vch*) (Q9KMV0), *Vibrio alginolyticus* (*Va*) (C7EWQ8), *Vibrio harveyi* (*Vh*) (Q2XPT2), *Vibrio campbelli* (*Vc*) (Q1W564), *Vibrio diabolicus* (*Vd*) (A0A2LKBG5), *Vibrio anguillarum* (*Van*) (A0A191WA34) y *Vibrio vulnificus* (*Vv*) (A0A1V8MSL8). Estas fueron comparadas utilizando el algoritmo *BLAST* y *ClustalW* del programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5.3. Con base al alineamiento obtenido, se identificaron las regiones conservadas de las secuencias, así como la presencia del dominio GDSL y los bloques del dominio SGNH que son dominios característicos de este tipo de enzimas.

Posteriormente, se elaboró un modelo estructural por homología utilizando el servidor de PHYRE en el modo intensivo (Kelley y col., 2015). Brevemente, la secuencia de la LDH fue comparada con otras proteínas homólogas tanto a nivel de secuencia de aminoácidos como por plegamientos de estructura secundaria que se encuentran depositadas en la base total de datos de Protein Data Bank (PDB). Después, el modelo con mayor porcentaje de confianza e identidad fue seleccionado y analizado en el programa UCFS Chimera 1.13.1. Adicionalmente, se utilizó el programa *MOE* (Molecular Operating Environment) para obtener otro modelo de la LDH. Para este caso se utilizó como templatado la estructura obtenida experimentalmente de la LDH G389D *Vibrio vulnificus* (PDB # 6JL1), ya que ambas enzimas presentan una identidad >74 %. Se tomó un máximo de 30 modelos de la cadena principal y estos se refinaron para obtener un modelo final. El modelo realizado fue visualizado y analizado con el programa *UCFS Chimera 1.13.1*.

## **Acoplamiento Molecular de la LDH de *Vp* con Sustratos e Inhibidores**

El acoplamiento molecular de los ligandos y la LDH de *Vp* se realizó utilizando el obtenido en el programa MOE. Los archivos de las estructuras en 3D de los compuestos PNFL, quercetina, morin y EGCG fueron obtenidos de la base de datos de PubChem con las claves de acceso 74778, 5280343, 5281670 y 65064, respectivamente. El archivo con los datos estructurales de la fosfatidilcolina fue obtenido de la base de datos de MOE. Los modelos de acoplamiento fueron realizados en el programa *UCFS Chimera 1.13.1*. Las estructuras de la LDH y los compuestos fueron tratados con la opción de “Minimize Structure” y los modelos de interacción se realizaron con el método “autodock vina” del programa. Los modelos con mayor puntaje de interacción fueron cargados al programa *Discovery Studio 2019* para visualizar las interacciones que presenta la LDH con los compuestos utilizados.

### **Análisis Estadístico**

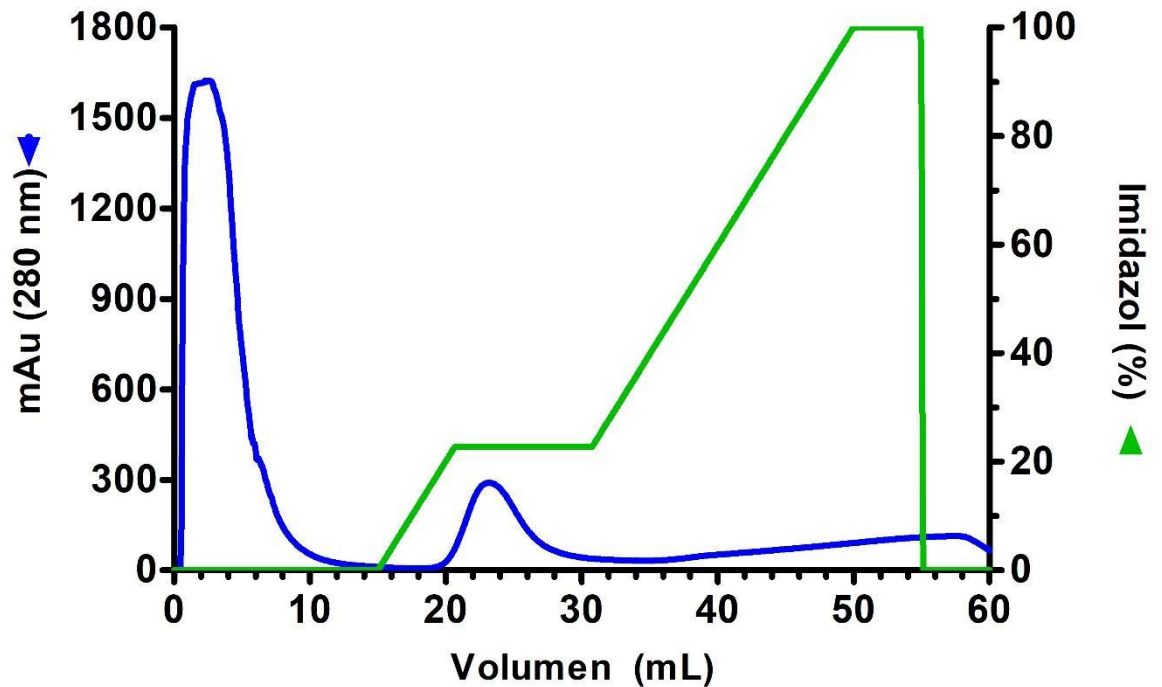
El diseño fue completo al azar para los experimentos de actividad enzimática y de inhibición. Se analizó la actividad residual de la enzima y su inhibición frente a la concentración de los compuestos fenólicos utilizados. Se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) en donde se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). La comparación múltiple de medias se hizo por el método de Kruskal-Wallis a un 95% de confianza con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 23™.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Sobreexpresión y Purificación de la LDH de *Vp*

Las proteínas recombinantes (heterólogas o quiméricas) son aquellas que se obtienen al expresar un gen clonado en una especie o línea celular diferente a la de origen. Las técnicas que permiten la producción de estas proteínas se desarrollaron a partir de la biología molecular con el fin de facilitar el estudio de diversas proteínas. Las ventajas de utilizar esta estrategia para el estudio de enzimas es que en muchos casos se obtienen en concentraciones altas (en comparación a su origen natural), no requieren equipos costosos, son de fácil manipulación y pueden utilizarse etiquetas en la secuencia que faciliten su posterior purificación (García y col., 2013). En base a lo mencionado la LDH se obtuvo de forma heteróloga en la cepa Rosetta II de *E. coli* y fue purificada a partir de cuerpos de inclusión por medio de la cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) en condiciones desnaturalizantes (urea 8M). En la figura 9 se puede observar el cromatograma característico para el proceso de purificación de la LDH por medio de IMAC, con la absorbancia de proteína en azul y el porcentaje de búfer B en verde. En el volumen de elusión de 0-13 se observa el pico de la proteína no unida a la columna. Posteriormente se realizó un gradiente lineal de 0 a 100% de búfer B en el volumen de elusión de 15-55. El búfer B contiene imidazol; esta molécula tiene la capacidad de desplazar por competencia a las etiquetas de histidina de las proteínas unidas al níquel de la columna. Este efecto es observado entre el volumen de elusión de 20-32, con un pico único a un 20-25 % de búfer B (115 mM de imidazol). Las fracciones donde se encontró el pico único fueron resguardadas a 4 °C para su posterior replegamiento *in vitro*.

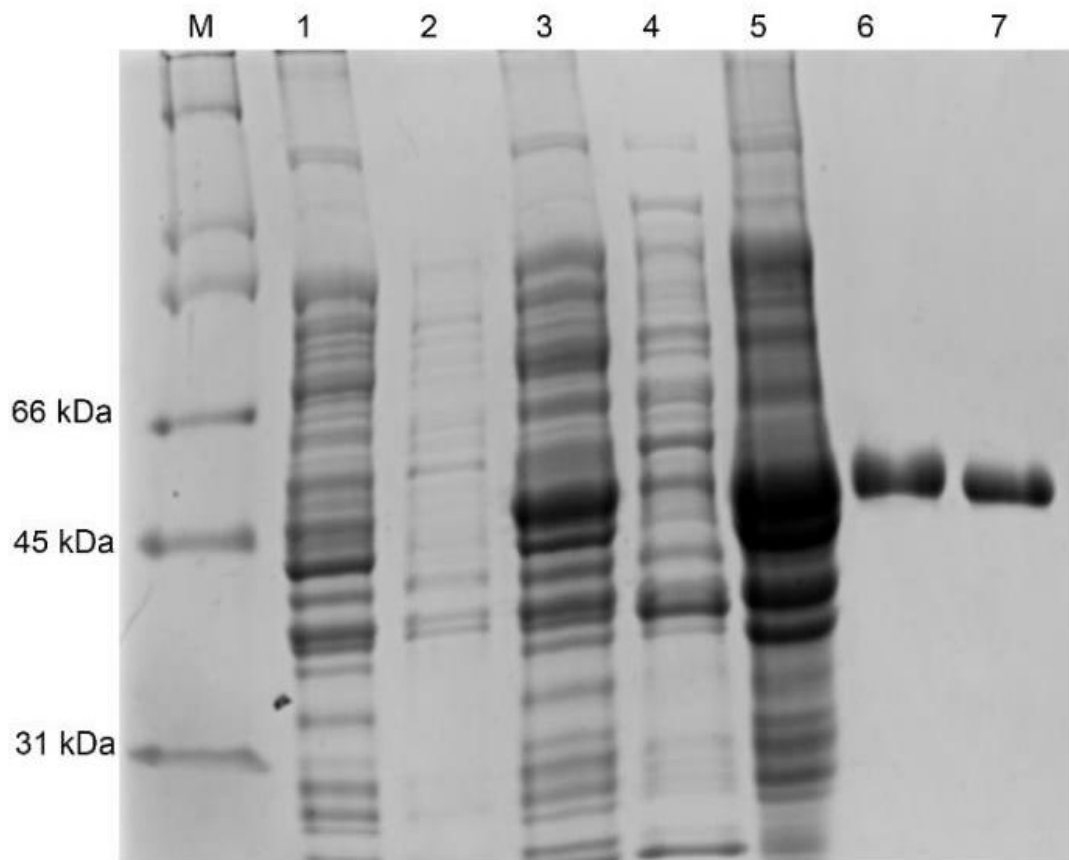
La fracciones dializadas fueron evaluadas por el método de Bradford (Bradford, 1976), donde se determinó una concentración de 0.5 mg·ml<sup>-1</sup> de proteína en su forma activa. Una conformación activa se describe como la estructura tridimensional en la cual una enzima puede ejercer su función.



**Figura 9.** Purificación IMAC en condiciones desnaturizantes (8 M de urea) de la LDH de *Vp*. Absorbancia de la proteína en la muestra (azul). Porcentaje de búfer B para la elusión la proteína unida al níquel presente en la matriz (verde). El pico de elusión presente en el volumen de 0-10 mL corresponde a proteínas que no interaccionan con el níquel de la matriz. La LDH eluye como un pico único en el volumen de 20-30 mL con el 23% de búfer B (115 mM de imidazol).



El proceso de purificación se puede observar en el gel de electroforesis SDS-PAGE de la figura 10. En el carril M se observa el marcador de peso molecular. Los carriles 1 y 2 se puede ver el precipitado y la fracción soluble respectivamente de la cepa transformada antes de la inducción con IPTG; los carriles 3 y 4 muestran el precipitado y la fracción soluble de la cepa posterior a la inducción, donde se observa claramente en el carril 4 una banda abundante correspondiente a la LDH (48.3 kDa). El carril 5 es correspondiente al lavado de cuerpos de inclusión; el carril 6 es del pico obtenido durante la elusión en la cromatografía IMAC, donde se observa a la LDH como una banda única. El carril 7 permite observar que la LDH se mantiene en la solución durante el proceso de diálisis de forma pura. Los resultados obtenidos del proceso de purificación difieren de lo reportado por Shinoda y col., (1991) donde fue obtenida de forma soluble. Adicionalmente Ye (2019), Zhong (2006) y Sun (2007) describieron una purificación de la LDH de las especies de *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi* y de *Vibrio alginolyticus* respectivamente de forma soluble (Ye y col., 2019; Zhong y col., 2006; Sun y col., 2007). Sin embargo, resultados similares fueron reportados por Zhao (2011), donde obtuvo la LDH de *Vp* de cuerpos de inclusión con el constructo pET-28a-tlh, y posteriormente fue capaz de replegarla *in vitro* por medio de diálisis; resultados similares fueron observados por Robles (2017), donde la LDH fue purificada a partir de cuerpos de inclusión con un constructo que contenía la etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal (Zhao y col., 2011; Robles, 2017). A pesar de las diferencias de solubilidad de la LDH, se puede observar una gran homogeneidad electroforética (Figura 10), donde se observa con un peso molecular similar a lo descrito por los anteriores autores mencionados, que indican un peso de 45-48 kDa para la enzima. Este resultado fue corroborado con la herramienta digital ProtParam del servidor de uso libre ExPASy (Gasteiger y col., 2005). En este a partir de la secuencia de aminoácidos de la enzima con la etiqueta de histidinas (UNIPROT, Q99289) se calculó un peso molecular teórico de 48.3 kDa, que es muy similar al observado en el gel de electroforesis (Figura 10, carriles 3,5,6 y 7).



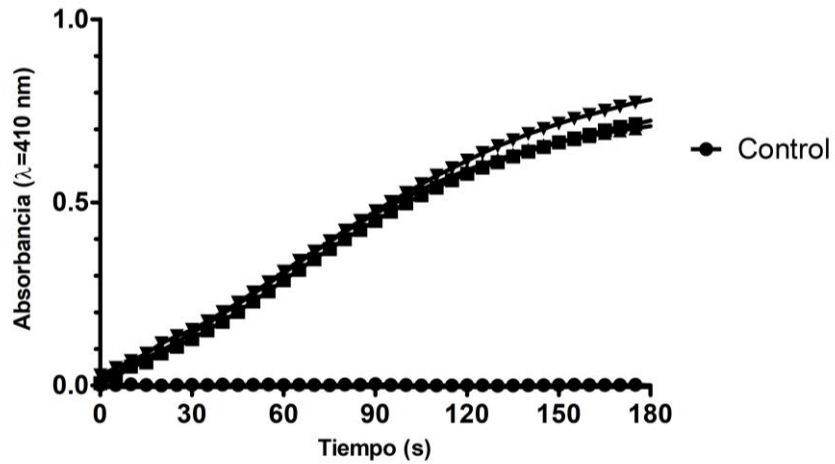
**Figura 10.** SDS-PAGE del proceso de purificación de la LDH de *Vp*. M – marcador de peso molecular, 1-fracción insoluble 0 HPI, 2- *E. coli* fracción soluble 0 HPI, 3 – fracción insoluble 16 HPI, 4 – Soluble fracción 16 HPI, 5-solubilizado Cuerpos de inclusión (urea 8M), 6-LDH purificada desnaturalizada (urea 8M), 7-LDH replegada (posterior a la diálisis). Donde LDH se observa como una banda única de 48,3 kDa (peso molecular teórico) en los carriles 6 y 7. HPI: horas posteriores a la inducción.

## Caracterización Bioquímica Mediante la Actividad Enzimática

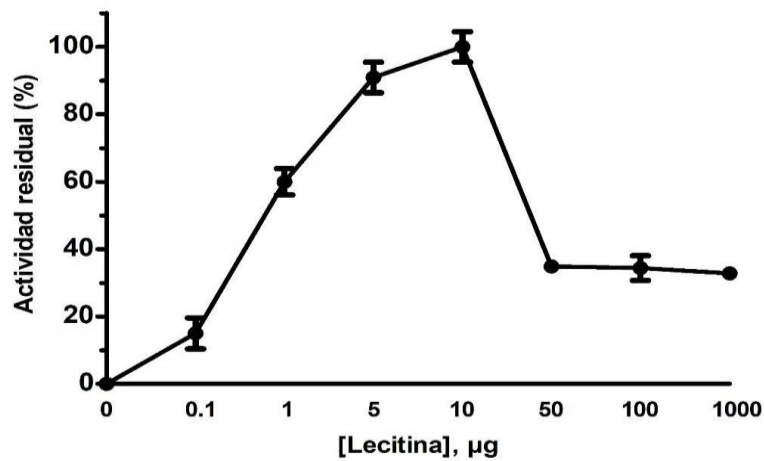
### Ensayo de Actividad de la LDH de *Vp*

El ensayo de actividad es fundamental para el estudio de las enzimas, debido a que ayuda a establecer las condiciones óptimas de su funcionamiento. La actividad de la LDH se ha reportado desde el punto de vista hemolítico en ensayos en placa y espectrofotométricos con sangre de oveja, Sin embargo, la actividad enzimática de la LDH de *Vp*, así como de otras especies de *Vibrio* son de reciente estudio. En la figura 11 se muestra una gráfica típica de la actividad enzimática de la LDH en el cual se observa un aumento en la absorbancia producto de la hidrólisis del PNFL. Los ensayos mostraron ser reproducibles en cada medición con una actividad específica de  $0.47 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{s})$ , además se puede observar un ensayo control sin enzima o lecitina, en el cual no se registró un aumento en la absorbancia. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Shinoda y col. (1991) en el cual la enzima es dependiente de lecitina para ejercer su función.

En función de lo anterior, se evaluó el efecto de lecitina sobre la actividad enzimática de la LDH. Esto con finalidad de determinar la concentración de lecitina en la que la actividad enzimática fuera la más alta. En la figura 12 se observa que la actividad enzimática aumenta conforme incrementa la concentración de lecitina en la celda reacción (0.1-10  $\mu\text{g}$ ), pero a concentraciones mayores (50, 100 y 1000  $\mu\text{g}$ ) disminuyó drásticamente la actividad de la LDH. Estos resultados nos indican que, bajo las condiciones de este ensayo, la LDH muestra la mayor actividad en presencia de 10  $\mu\text{g}$  de lecitina (0.0001% p/v). Esta concentración es similar a la reportada en el ensayo de actividad hemolítica de Shinoda y col. (1991) donde se realizaron los ensayos de actividad hemolítica con 20  $\mu\text{g}$  de lecitina (0.0002% p/v). En base al análisis se corroboró que la enzima no es capaz de hidrolizar al PNFL en ausencia de lecitina. Esto puede deberse a que lecitina favorece un cambio estructural en la región del sitio catalítico de la enzima, lo que permite la hidrólisis del PNFL, el cual se describe como una característica de las lipasas de la Familia GDSL.



**Figura 11.** Estandarización del ensayo de actividad de la LDH de *Vp*. La absorbancia del *p*-nitrofenol liberado por la actividad enzimática de la LDH se midió a longitud de onda de 410 nm, donde se puede observar la reproducibilidad del ensayo, donde la reacción control, es el ensayo sin la presencia de enzima o lecitina.

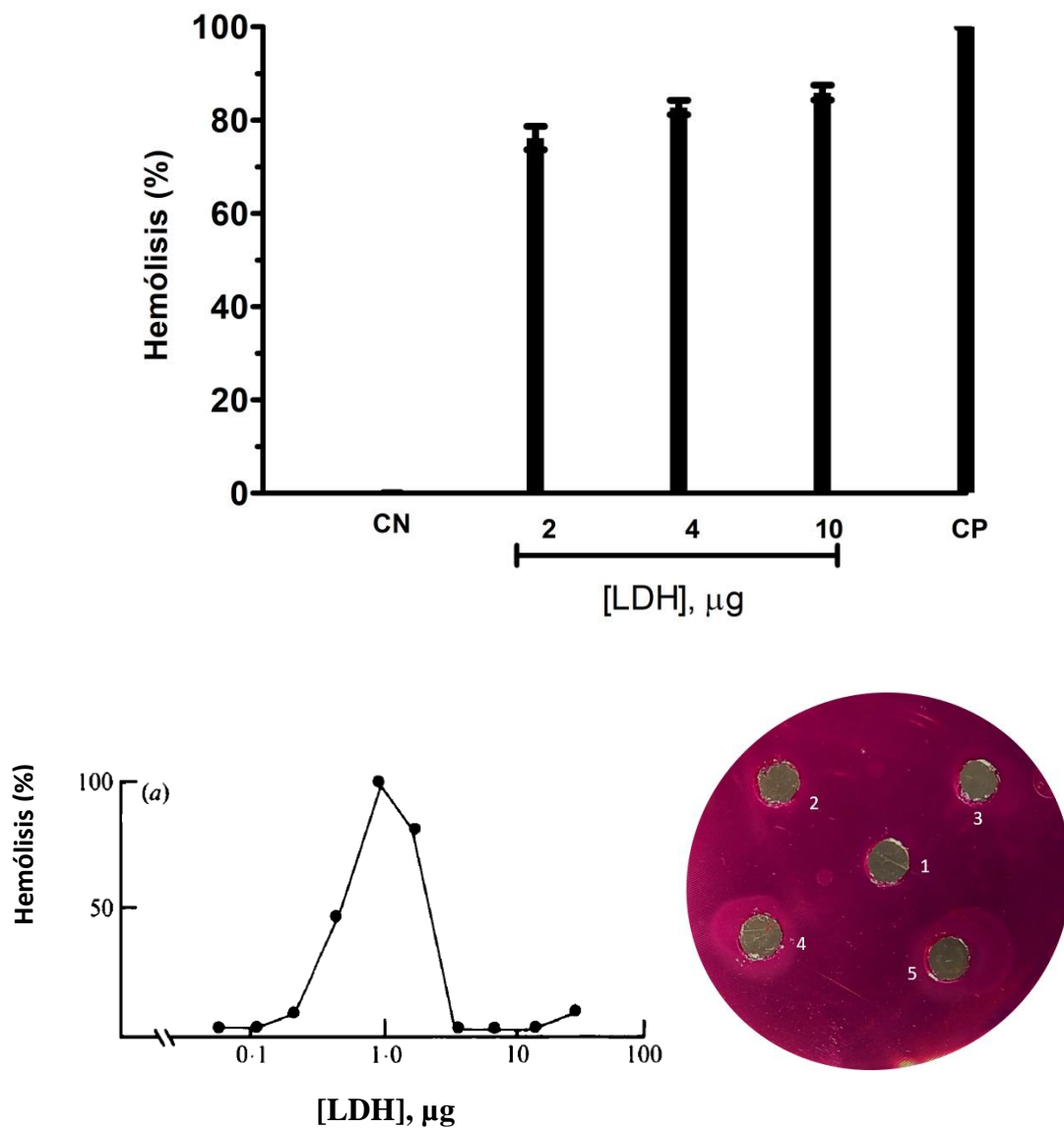


**Figura 12.** Efecto de la lecitina de yema de huevo en la actividad enzimática de la LDH de *Vp*. La dependencia de la LDH por lecitina puede ser observada, obteniendo a 10 μg de lecitina la mayor actividad enzimática.

En este tipo de enzimas el sitio catalítico es flexible lo cual favorece una amplia afinidad a diferentes sustratos (Akoh y col., 2004). Con respecto a la disminución de la actividad de la LDH por efecto de la elevada concentración de lecitina, podría deberse a que la lecitina se encuentra en una concentración saturante durante la reacción. Esto ocasionaría una competencia de los sustratos por el sitio catalítico de la enzima, y como consecuencia, una menor capacidad catalítica de la enzima, como los descritos en los mecanismos de regulación por sustrato en diversas enzimas (Segel, 1993).

### **Actividad Hemolítica de la LDH de *Vp***

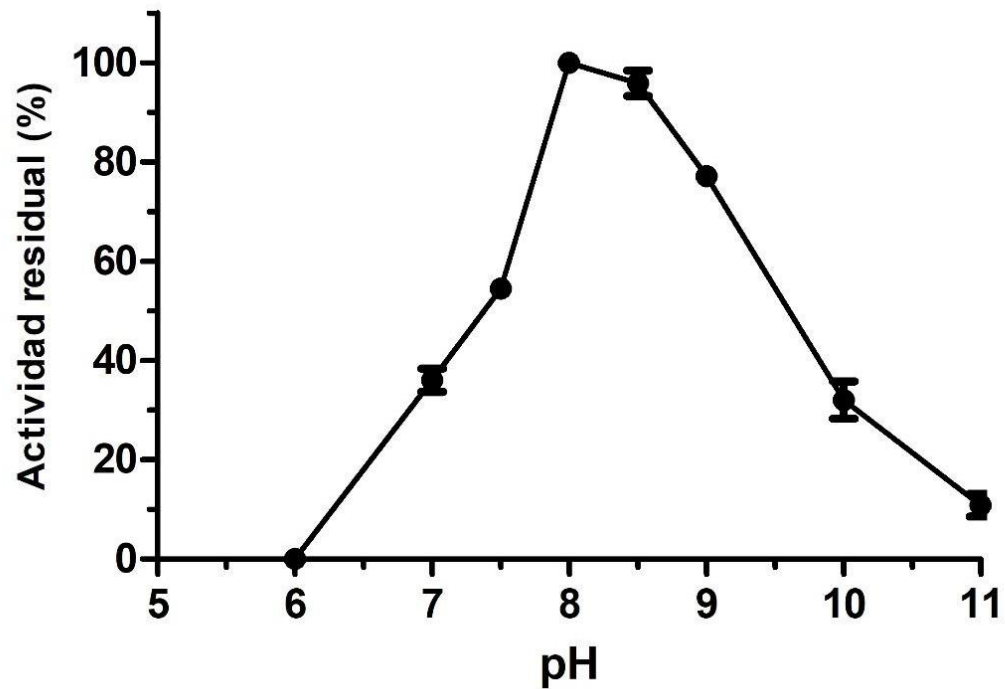
Como se mencionó anteriormente, la actividad hemolítica es una de las principales características de la LDH. Por lo tanto, se evaluó la liberación de hemoglobina espectrofotométricamente ( $\lambda=540$  nm) como producto de la lisis de los eritrocitos. Los resultados se muestran en la figura 13 (panel A), donde se obtuvo una hemólisis del 76.2-85.8% en presencia de 2-10  $\mu\text{g}$  de LDH. Se observa que el tween 20 es capaz de lisar los eritrocitos mientras que el control negativo no registró un aumento en absorbancia. Este ensayo fue evaluado a una concentración de lecitina del 0.001% (p/v) debido que al utilizar concentraciones similares al ensayo de actividad (0.0001% p/v), no se detectó la actividad hemolítica de la LDH. Este efecto hemolítico fue también observado por Shinoda y col. (1991) con la LDH de *Vp*, sin embargo, el rango de actividad fue menor, mostrando el mayor efecto con un 1  $\mu\text{g}$  de LDH y lecitina al 0.0003% (p/v) (grafica 11, panel B). Por otro lado, Robles (2017) reportó un efecto hemolítico en placas de agar con hemolinfa de camarón (hemocitos), donde se observa un aumento gradual en el diámetro del halo de hemólisis conforme aumenta la cantidad de enzima (Figura 13, panel C). Estos resultados comprueban el efecto hemolítico de la enzima y nos indica la importancia de los lisofosfolípidos para inducir la hemólisis.



**Figura 13.** Actividad hemolítica de LDH de *Vp*. A) Resultados de la actividad hemolítica, Control positivo (CP): Tween 0,2% v/v. control negativo (CN): búfer Tris-HCl 50mm pH 7,5. B) Actividad hemolítica de la LDH de *Vp* reportada por Shinoda y col. (1991). C) Actividad hemolítica en placa de agar con hemolinfa y teñido con rosa de bengala. 1.- control negativo, búfer Tris-HCl 50 mM, EDTA 1mM pH 7,5, del 2-5 contienen 90, 180, 270 y 450 μg de LDH de *Vp*. Imagen tomada de Robles (2017).

### **pH Óptimo y Estabilidad al pH de la LDH de *Vp***

Las enzimas poseen grupos químicos ionizables en las cadenas laterales de los aminoácidos, por lo que un cambio en el pH puede cambiar sus cargas y afectar la estructura de la proteína. En base a esto, un pH óptimo se describe como el pH en el cual la conformación, ya sea del sitio activo o de toda la molécula, es la más adecuada para efectuar la actividad de la enzima. En la figura 14 se observan los resultados del comportamiento de la actividad enzimática de la LDH frente a cambios de pH. La enzima mostró actividad enzimática en un rango de pH de 7.0-10.0, con una actividad casi nula (<10%) a pH 11.0 y además se observó una pérdida del 100% de la actividad a pH 6.0. El pH óptimo se observó en el valor de 8.0, donde la LDH mostró una mayor actividad específica. Esto es similar a lo reportado para enzimas de la familia de lipasas GDSL, donde el pH óptimo es cercano 8.0 (Okamura y col., 2010; Deng y col., 2016; Akoh y col., 2004; Jia, Woo y col., 2010). Adicionalmente un pH similar ha sido reportado para sPLA2 del veneno de serpiente del género *Crotalus* como el de *C. durissus terrificus* con un pH óptimo de 7.9, además muchos autores reportan el uso de búfer *s* de actividad a pH de 8.0 (Oliveira y col., 2002; Marangoni y col., 2009; Cotrim y col., 2011; Iglesias y col., 2005). Cabe señalar, que no se han encontrado estudios de este tipo para las hemolisinas termolábiles del mismo género de *Vibrio*. En algunos reportes se menciona que para los ensayos de actividad hemolítica o bien para almacenar la enzima y en ensayos de actividad han utilizado un pH de 7.5, donde aún se puede apreciar un 54.5 % de actividad para LDH de *Vp* en comparación al pH óptimo obtenido (Jia y col., 2010; Sun y col., 2007; Ye y col., 2019). Retomando lo descrito para la LDH, esta cuenta con una tríada catalítica conformada por serina, ácido aspártico e histidina, y por la glicina y la asparagina para estabilizar la cavidad catalítica. A pH de 8, las cadenas laterales de estos aminoácidos se encuentran en mayor proporción sin carga, exceptuando al ácido aspártico que se encuentra cargado negativamente (COO<sup>-</sup>). Por lo que un cambio en el pH puede cambiar la proporción de las cargas laterales de estos aminoácidos, lo cual disminuiría la actividad enzimática. Por otro lado, la pérdida de la actividad al pH a 6.0 puede ser debido a que el punto isoelectrico (PI) teórico de la enzima es de 5.18 (con la etiqueta de histidinas). Esto es importante

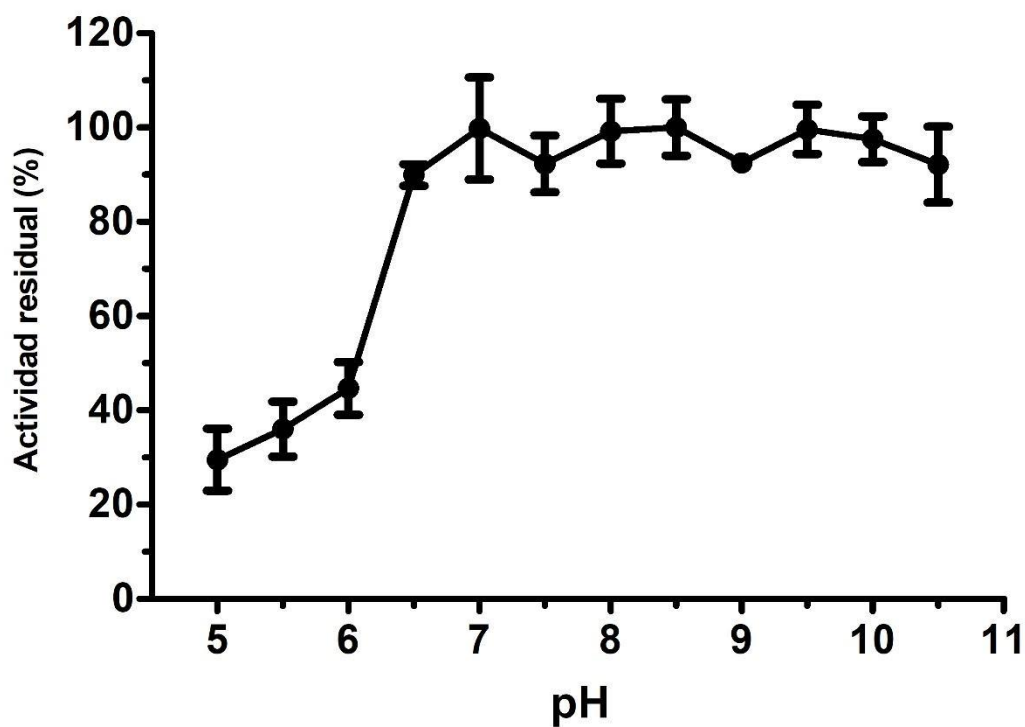


**Figura 14.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la LDH de *Vp*. Se puede observar un pH óptimo para la LDH de 8.0. Adicionalmente esta disminuye notablemente su actividad a un pH superior a 10.0, por otro lado, a un pH de 6 o menor no mostró actividad enzimática.



ya que es conocido que a un pH cercano al punto isoelectrico las enzimas pueden desestabilizarse y precipitar, lo que conlleva a una pérdida su actividad (Segel, 1993).

Continuando con el efecto del pH sobre la actividad enzimática, se evaluó la estabilidad de la enzima al pH. En el ensayo la LDH fue incubada por una hora en diferentes búfer con un pH entre 5.0-10.5. El comportamiento de la actividad se puede observar en la figura 15, donde se aprecia una estabilidad de la actividad enzimática en un rango de pH de 6.5-10.5 ya que se presenta una actividad residual superior al 80%, esto en comparación al punto donde se registró la mayor actividad catalítica (Figura 15). Adicionalmente, la actividad disminuyó en el rango de pH de 5 a 6, en donde puede denotarse un mayor efecto a pH de 5.0. Estos datos concuerdan con los datos observados en las mediciones el pH óptimo. Durante los ensayos de estabilidad se observó que la enzima a pH superior al óptimo mantenía un breve tiempo de latencia antes de presentar actividad enzimática y posteriormente aumentaba considerablemente con el tiempo. Esto posiblemente debido a que la enzima sufre un cambio en su estructura (pérdida de estabilidad/desnaturalización parcial) durante el período de incubación y este efecto pudo revertirse, al cambiar de búfer durante la medición de la actividad enzimática, pues los ensayos fueron realizados al pH óptimo (8.0). Actualmente no se ha descrito la estabilidad al pH de las LDH del género *Vibrio*, pero estos datos concuerdan con lo reportado para enzimas de la familia GDSL. Yang y col. (2013) evaluaron la estabilidad al pH la esterasa (enzima GDSL) de *Geobacillus thermodenitrificans* la cual mostró ser estable en un rango de 7.0-11.0 de pH, y disminuyó su actividad al ser incubada en valores inferiores de pH 6.0. Estos datos permiten establecer el valor de pH para realizar las mediciones de actividad, y a su vez el pH a la cual la enzima puede conservarse.



**Figura 15.** Estabilidad al pH de la LDH de *Vp*. La LDH fue incubada 1 hora a diferentes pH y se evaluó su actividad a pH de 8.0. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se describió a la enzima como estable al mantener su actividad superior al 80% con respecto a la actividad nativa. Se puede observar una estabilidad en la actividad enzimática entre el pH de 6.5 a 11.0, además se puede apreciar una pérdida en la actividad al ser incubada a un pH de 6.0 o inferior.

### **Temperatura Óptima de la LDH de *Vp***

La temperatura se define como una magnitud escalar relacionada con la energía interna de un sistema termodinámico. Esta energía está relacionada directamente con la energía cinética, que es la energía asociada al movimiento de las partículas presentes en el sistema, por lo tanto, a medida que aumenta la energía cinética en el sistema, la temperatura es mayor. En el estudio de las enzimas, este concepto es importante, pues el aumento de la temperatura acelera las velocidades de reacción. Sin embargo, las enzimas al alcanzar ciertas temperaturas pueden desestabilizarse ya que las interacciones moleculares que mantienen sus estructuras pueden romperse, lo que conlleva a una desnaturalización por el calor (Segel, 1993; Lehninger, 2000). En base a lo mencionado, la temperatura en la cual la actividad catalítica es la más alta se conoce como temperatura óptima. En la figura 16 se observa el comportamiento de la actividad en función de la temperatura, donde se aprecia un aumento en la velocidad de reacción en el intervalo de 10 a 50 °C. A partir de los 50 °C la actividad de LDH disminuyó gradualmente hasta perder completamente la actividad a los 80 °C. En base a lo observado se determinó que la temperatura óptima de la enzima es a los 50 °C. Este comportamiento en la actividad enzimática es comparable al de varias lipasas de la familia GDSL (Akoh y col., 2004), adicionalmente no se ha descrito una temperatura óptima para las hemolisinas termolábiles de género *Vibrio*. A pesar de que la temperatura óptima es mayor a las temperaturas en las cuales se desarrollan los sistemas vivos, esto concuerda con lo mencionado anteriormente, pues a mayor temperatura, se favorece el número de colisiones entre la LDH y su sustrato, que se ve representado con un aumento en la velocidad de catálisis (Figura 16). Por otro lado, la disminución de la actividad a temperaturas altas es indicativo de que la LDH se está desestabilizando durante el tiempo de la reacción. Debido a este comportamiento los datos de temperatura óptima se analizaron mediante la ecuación de Arrhenius para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática (Figura 17). En base al diagrama realizado fue posible calcular la energía de activación de la LDH utilizando la ecuación de Arrhenius, donde se obtuvo un valor igual a 26.688 kJ·mol<sup>-1</sup> el cual es la energía necesaria durante el ensayo de actividad. La Energía de activación (Ea) de la LDH fue igual a 26.688 kJ·mol<sup>-1</sup>, la cual es la energía necesaria para que

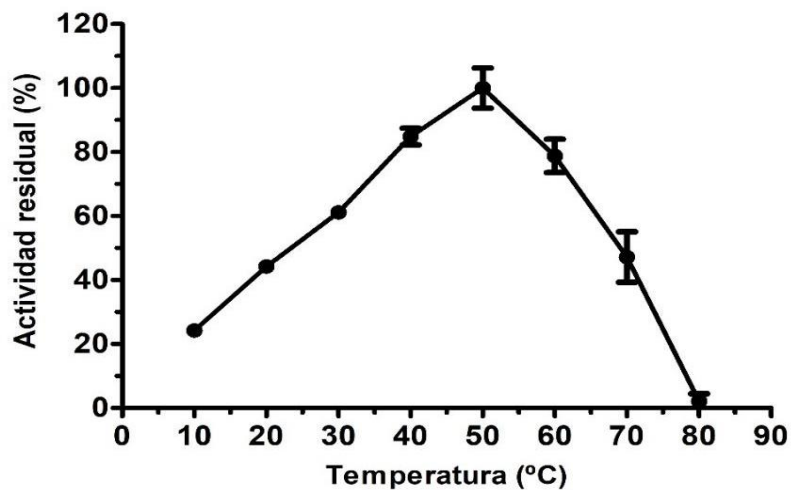
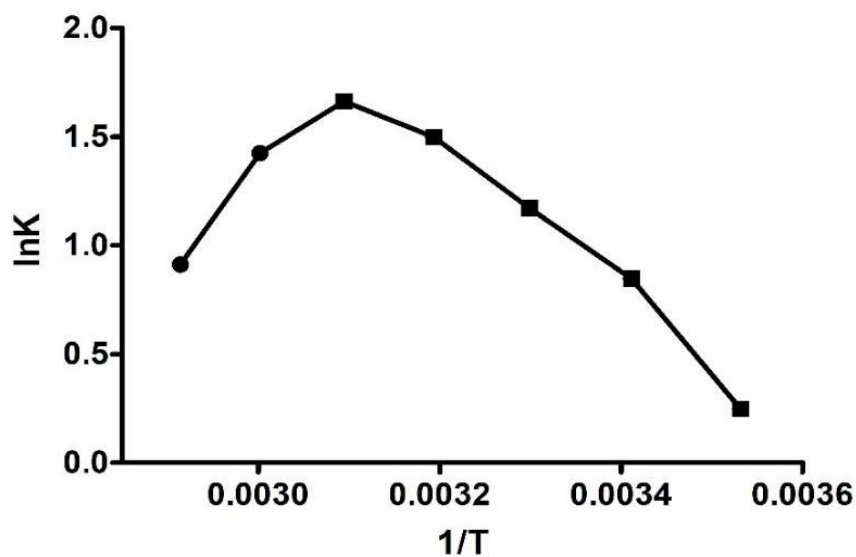


Figura 16. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la LDH de *Vp*. Se puede apreciar como la temperatura óptima aparente es a 50 °C.

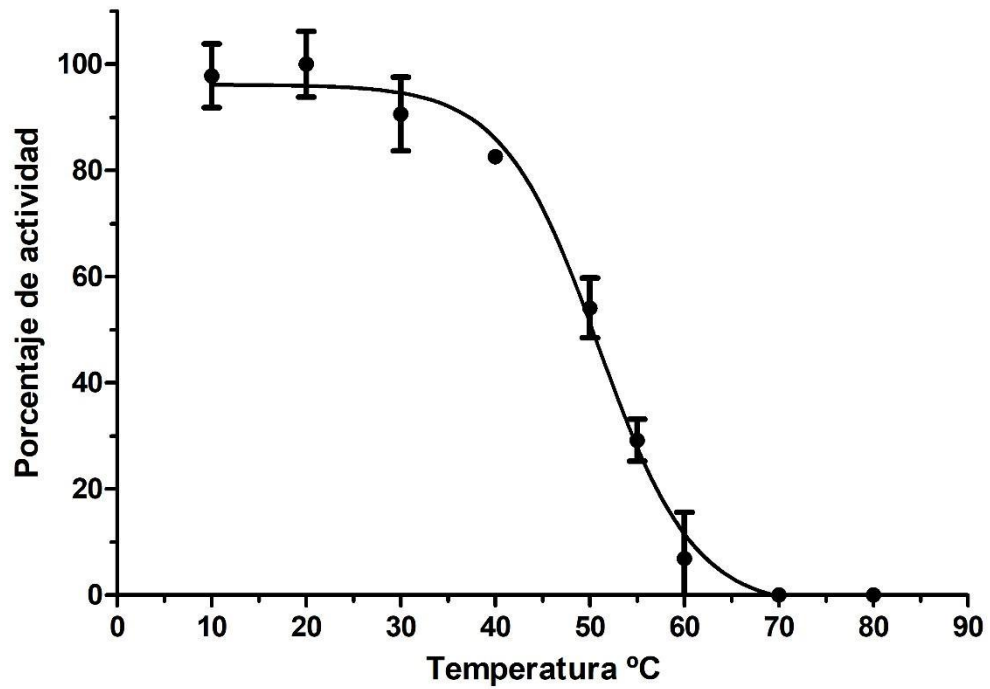


**Figura 17.** Diagrama de Arrhenius del ensayo de temperatura óptima. El comportamiento de “caída” en la recta es un indicativo de que la LDH pasa por un proceso de desnaturalización

la LDH pueda catalizar la hidrólisis del PNFL a *p*-nitrofenol bajo las condiciones del ensayo (Segel, 1993). Además, el comportamiento “en caída” del diagrama 17 indica que la LDH entra en un proceso de desnaturalización drástico de una sola etapa, es decir, sin la presencia aparente de estados de transición inestables de la enzima. Esto es similar a lo descrito para enzimas psicrófilas, las cuales tienden a perder su actividad enzimática alrededor de los 50 °C, esto porque a nivel estructural estas enzimas son flexibles para poder mantener su actividad a bajas temperaturas, lo cual las lleva a desnaturalizarse en este rango de temperaturas (Gerday y col., 1997; Feller y col., 1997). Otra característica para las enzimas psicrófilas son sus bajos valores de energía de activación en comparación a enzimas mesófilas/termófilas, lo cual es importante para que este tipo de enzimas pueda realizar su actividad a bajas temperaturas. Para las LDH de *Vibrio* no se han reportado valores de energía de activación, pero la calculada para *Vp* en este experimental es similar a las reportadas para tripsinas psicrófilas (28 kJ·mol<sup>-1</sup>) con quienes comparte la triada catalítica (S-D-H), las cuales son menores en comparación a las de tripsinas mesófilas como la de origen bovino (50 kJ·mol<sup>-1</sup>) (Hedstrom, 2002; Simpson y col., 1984; Feller y col., 1997).

### **Termoestabilidad de la LDH de *Vp***

Con propósito de determinar la estabilidad de la enzima a la temperatura, ésta se evaluó en función de su actividad enzimática. Para ello, la enzima fue incubada 15 minutos en un rango de temperatura de 10-80 °C. Los resultados de la actividad fueron graficados utilizando el ajuste sigmoideal de Boltzmann y estos se ven plasmados en la figura 18 con una  $R^2=0.9985$ . Se puede observar que LDH mantiene su actividad (>80%) cuando se incuba a temperaturas entre 10 y 40 °C. A partir esta última temperatura (>40°C) la actividad disminuye a aproximadamente al 7% a los 60 °C. La actividad no fue detectada a valores de temperatura >70 °C. A partir de este ajuste se calculó una  $T_m = 50.94^\circ\text{C}$  para la LDH. Este valor nos indica que a esta temperatura el 50 % de la enzima se encuentra en un estado inactivo. Este resultado similar con lo observado en el diagrama de Arrhenius de la temperatura óptima, lo que nos indica que la LDH a temperaturas superiores a 50 °C sufre un proceso de inactivación (Segel, 1993).

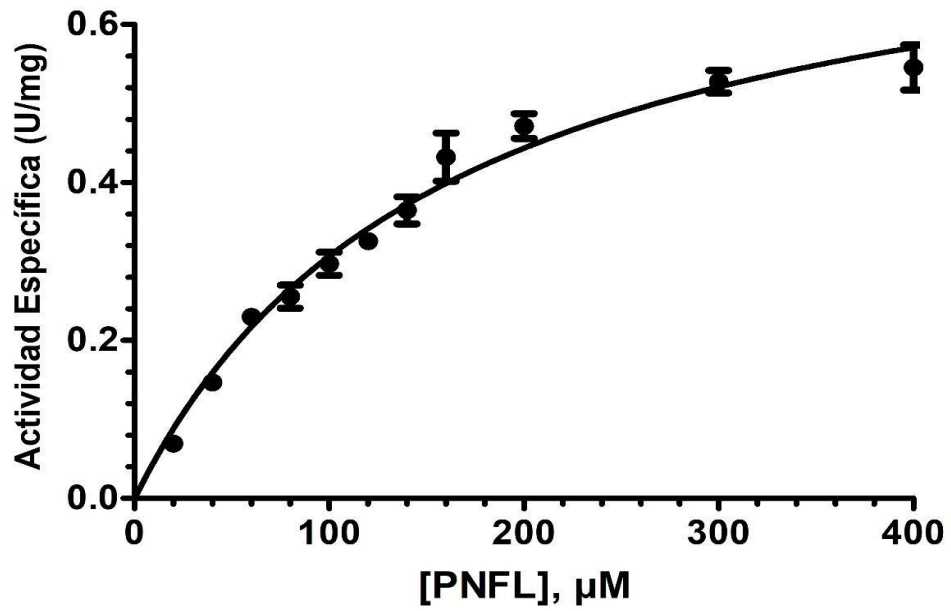


**Figura 18.** Termoestabilidad de la LDH de *Vp*. Los resultados se presentan ajustados al modelo sigmoideo de Boltzmann ( $R^2 = 0.9985$ ), donde se calculó una  $T_m = 50.94$  ° C.

Por otro lado, este comportamiento en la estabilidad de la LDH es consistente con lo reportado anteriormente para la enzima por parte de nuestro grupo de trabajo (Robles, 2017). En este trabajo se evaluó semi-cuantitativamente la estabilidad térmica mediante ensayos en placas de agar con lecitina al 3%, y se determinó que a 70 °C la LDH no tenía actividad enzimática. Así mismo, los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito por Taniguchi y col. (1995), donde se describió por primera vez a la LDH de *Vp* como una enzima termolábil en comparación a la TDH de *Vp*. En el experimento se incubó a la LDH durante 10 minutos a temperaturas de 60 y 90 °C, y se evaluó su actividad hemolítica con sangre de humano y caballo. Ellos reportaron una hemólisis negativa a causa de que la enzima fue desnaturalizada durante el tratamiento, por otro lado, la TDH de *Vp* mantuvo su actividad después de ser incubada a 90 °C (Taniguchi y col., 1985). Adicionalmente, la LDH de *Vp* sigue el patrón de estabilidad térmica descrita para enzimas psicrófilas, donde se ha reportado que la inactivación total de estas enzimas se da en un rango de 15-20 °C después de la  $T_m$  (Feller y col., 1997).

### **Determinación de los Parámetros Cinéticos de la LDH de *Vp***

La cinética enzimática estudia las velocidades iniciales de las reacciones químicas catalizadas por las enzimas. Estos son reportados como  $V_{max}$  y  $K_m$  los cuales nos indican la velocidad máxima de reacción y la afinidad de la enzima por el sustrato respectivamente. Para determinar estos valores, se evaluaron diferentes concentraciones de PNFL en un rango de 20-400  $\mu\text{M}$  sobre la actividad de la LDH. Durante estos experimentos se mantuvo constante la concentración de enzima y de lecitina. La grafica de las velocidades iniciales se puede apreciar en la figura 19, donde se observa un comportamiento característico de Michaelis-Menten. A partir de las velocidades iniciales se calcularon los parámetros cinéticos de la LDH: la  $V_{max}$  de 0.8011  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{s})$  y la  $K_m$  de 161.3  $\mu\text{M}$  (Tabla I). Actualmente entre las especies de *Vibrio* solo se han reportado los parámetros cinéticos de la LDH de *Vibrio vulnificus* (*Vv*) (Ye y col., 2019). En este estudio se determinaron los parámetros cinéticos para la LDH nativa y para la LDH mutante G389D de *Vv*. El experimento fue realizado a 25 °C con el sustrato Red/Green BODIPY PC-A<sub>2</sub> y un búfer de actividad a pH 7.4. Los valores cinéticos obtenidos fueron: una  $V_{max}$  = 0.0216  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  y una  $K_m$  = 20.99  $\mu\text{M}$  para la enzima nativa; una  $V_{max}$  = 0.0118  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  y una



**Figura 19.** Cinética enzimática de la LDH de *Vp*. La gráfica se obtuvo analizando los datos con el ajuste Michaelis-Menten ( $R^2=0.9591$ ) del programa GraphPad Prism 5.



**Tabla I.** Resultados Cinéticos de la LDH de *Vp*. Resultados cinéticos de la LDH y su comparación con los valores reportados para otras especies de fosfolipasas A<sub>2</sub>/lipasas.

<b>Enzima</b>	<b><math>K_m</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>V_{max}</math> (<math>\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b><math>k_{cat}</math> (<math>\text{s}^{-1}</math>)</b>	<b><math>k_{cat}/K_m</math> (<math>\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}</math>)</b>	<b>Referencia</b>
<b>LDH <i>Vp</i></b>	<b>161.30</b>	<b>0.8011</b>	<b>12909.4</b>	<b><math>8.0033\cdot 10^7</math></b>	<b>Este trabajo</b>
<b>LDH WT <i>Vv</i></b>	20.99	0.0216	0.051	$2.43\cdot 10^3$	Ye y col., 2019
<b>LDH G389D <i>Vv</i></b>	20.98	0.0118	0.028	$1.34\cdot 10^3$	Ye y col., 2019
<b>sPLA<sub>2</sub> <i>Cdc</i></b>	6000 (6 mM)	0.0034	NR	NR	Marangoni y col., 2009
<b>sPLA<sub>2</sub> <i>Cdt</i></b>	31200 (31.2 mM)	0.0082	NR	NR	Oliveira y col., 2002
<b>EstS9N <i>Psp.</i></b>	161.7	NR	3.31	$2.048\cdot 10^4$	Wicka y col., 2016

**NR:** no reportado por el autor (no hay datos para su estimación).

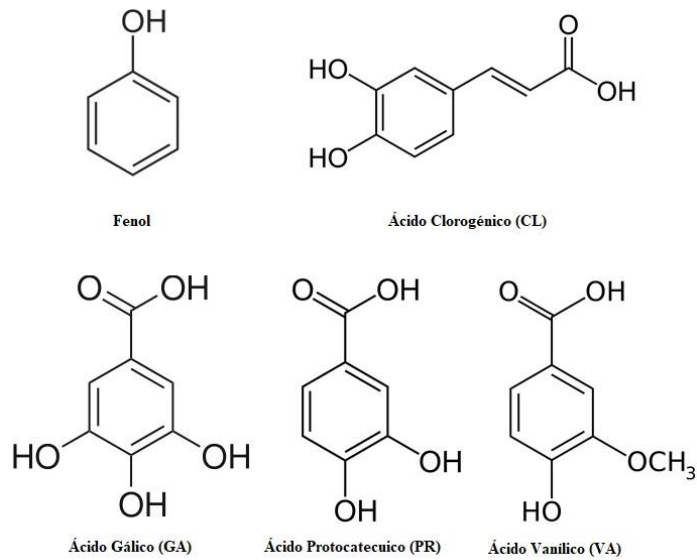
$K_m = 20.98 \mu\text{M}$  para la mutante (G389D). Estos resultados muestran que la LDH necesita una mayor concentración de sustrato para llegar la mitad de su velocidad máxima ( $K_m$ ) en comparación a las obtenidas para  $V_v$ . Sin embargo, la LDH de  $V_p$  muestra un valor aproximado de  $V_{max}$  37 veces mayor que sus contrapartes. Esto posiblemente dado por la naturaleza química de los sustratos y a las condiciones utilizadas en el experimento, pues los ensayos se realizaron a las condiciones óptimas descritas anteriormente. Por otro lado, Marangoni y col. (2009) reportaron una  $K_m = 6.0 \text{ mM}$  para la PLA<sub>2</sub> del veneno de *C. durissus cumanensis* (*Cdc*) de y Oliveira y col. (2009) obtuvo una  $K_m = 31.2 \text{ mM}$  para la PLA<sub>2</sub> del veneno de *C. durissus terrificus* (*Cdt*). Estos valores de  $K_m$  son mucho mayores a lo observado para la LDH, con una diferencia de 1 o 2 órdenes de magnitud de concentración de sustrato. Cabe mencionar que en ambos casos se utilizó como sustrato el ácido 4-nitro-3- (octanoiloxi) benzoico (4N3OBA, Pub Chem # 20112083). Este sustrato es ampliamente utilizado para evaluar la actividad de PLA<sub>2</sub>, el cual tiene una composición química similar a la PNFL. Por otro lado, Wicka y col. (2016) reportaron que la lipasa GDSL EstS9N de *Pseudomonas sp* tiene un valor de  $K_m = 161.7 \mu\text{M}$  con el sustrato *p*-nitrofenil butirato (PNFB, Pub Chem # 75834). Este valor de  $K_m$  es muy cercano al determinado en el presente trabajo, además, el compuesto utilizado es de naturaleza similar al PNFL, cuya única diferencia solo radica en la longitud del ácido graso presente en la molécula.

Además, se obtuvo un valor de  $k_{cat} = 12909.4 \text{ s}^{-1}$  y una eficiencia catalítica de  $8.0033 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Estos valores son mayores a los reportados por los autores citados y esto nos indica que la catálisis que realiza la LDH es más rápida lo cual se refleja en el alto valor de la eficiencia catalítica, que nos indica que la enzima tiene una alta afinidad por el sustrato utilizado. Estos valores se asemejan a lo observado en tripsinas psicrófilas con quienes comparte la triada catalítica, en las que se han reportado valores de eficiencia catalítica en un rango de  $10^6$ - $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Feller y col., 1997; Gerday y col., 1997). Estos datos obtenidos se correlacionan con la energía de activación de la enzima ( $26.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), pues diversos estudios han observado una relación entre una baja energía de activación con la alta eficiencia catalítica de las enzima (Gerday y col., 1997; Segel, 1993).

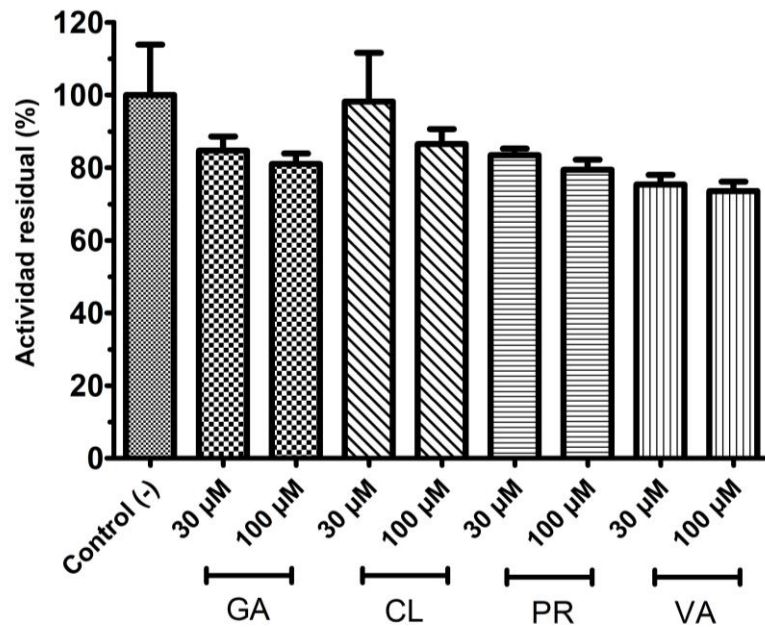
### **Ensayo de Inhibición de la Actividad Enzimática de la LDH de *Vp***

Como se describió anteriormente, un inhibidor es una molécula que disminuye la actividad de las enzimas. En base a esto, se determinó el efecto de los compuestos fenólicos sobre la actividad enzimática de la LDH. Para ello se utilizaron los ácidos fenólicos: GA, VA, PR y CL; y los flavonoides: quercetina, rutina, morin y EGCG. En la figura 20 se muestra que los ácidos fenólicos utilizados inhibieron la actividad enzimática de la LDH entre un 15-20% a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ), excepto el ácido clorogénico, el cual no mostró una diferencia estadísticamente significativa. Además, al incrementar la concentración de todos los ácidos fenólicos a 100  $\mu\text{M}$ , se observó un ligero aumento en la inhibición ( $\approx 80\%$ ). Estas dosis muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control sin inhibidores. Sin embargo, todos los compuestos no mostraron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas. Estos resultados contrastan con lo reportado por Dileep y col. (2015); estos autores evaluaron el efecto inhibitor de ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico sobre la actividad enzimática la  $\text{PLA}_2$  de cerdo, los cuales fueron similares a los utilizados en el proyecto. Reportaron que estos compuestos eran capaces de inhibir la actividad de esta enzima con concentraciones en el orden micromolar ( $\mu\text{M}$ ) y le atribuyeron este efecto a la capacidad de estos compuestos de interactuar con el sitio catalítico de la  $\text{PLA}_2$ . Por lo tanto, el sustituyente carboxilo en el anillo aromático de los compuestos podría estar implicado en la inhibición para estas enzimas.

Continuando, la estructura de los flavonoides proviene de la molécula 2-fenil-1,4-benzopirona, que está compuesta por tres anillos principales designados como A, B y C. Esta estructura y la de los flavonoides se puede observar en la figura 21, así mismo, los resultados de inhibición obtenidos para estos compuestos se resumen en la tabla I. La quercetina, la morin y la EGCG a una concentración 20  $\mu\text{M}$  lograron disminuir la actividad enzimática de la LDH entre un 65-70% ( $p < 0.05$ ), caso contrario a la rutina que no fue capaz de causar este efecto en cada una de las concentraciones utilizadas (1-20  $\mu\text{M}$ ) ( $p > 0.05$ ). Estos resultados han sido observados en la inhibición  $\text{PLA}_2$  de otras especies. Cotrim y col. (2011) obtuvieron un 40 % de inhibición sobre

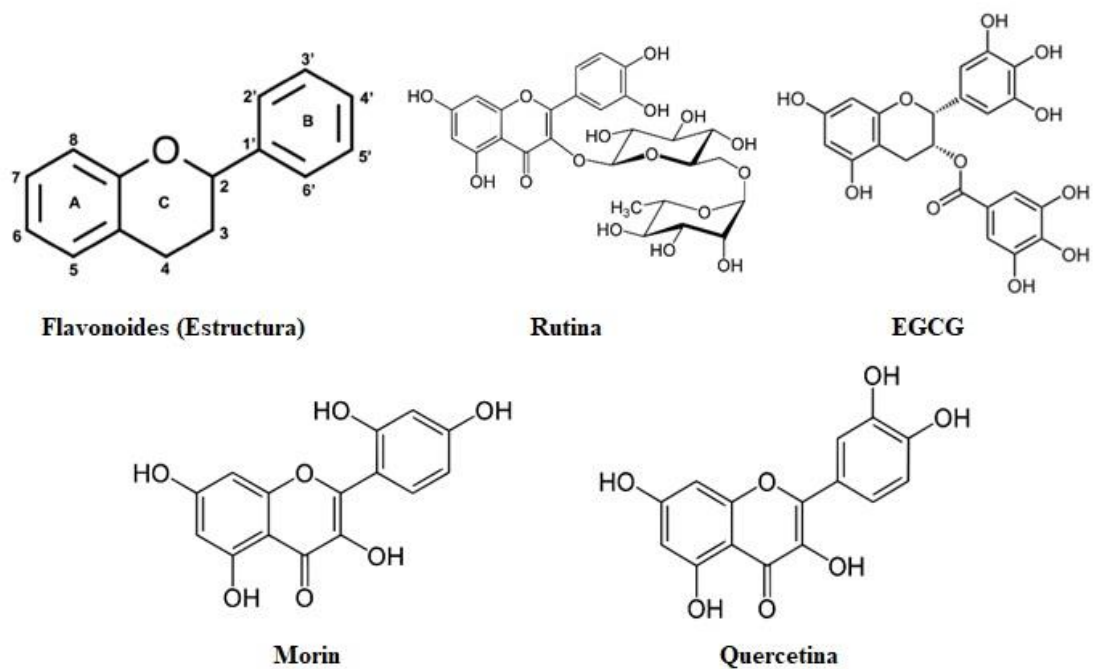


A)



B)

**Figura 20.** Efecto de los ácidos fenólicos sobre la LDH de *Vp*. A) Estructura de los ácidos fenólicos utilizados en el proyecto. B) Efecto de los ácidos fenólicos sobre la actividad enzimática de la LDH. Ácido gálico (GA), ácido protocatecuico (PR), ácido clorogénico (CL).



**Figura 21.** Estructura de los flavonoides utilizados en el proyecto. En la imagen se aprecia la 2-fenil-1,4-benzopirona con su nomenclatura, la cual es la base estructural de los flavonoides. A si mismo se observan los compuestos fenolicos utilizados en los ensayos de inhibición.

**Tabla II.** Porcentaje de inhibición de los compuestos fenolicos sobre la actividad enzimática de la LDH de *Vp*.

<b>Compuesto\ Dosis (<math>\mu</math>M)</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>Valor de p</b>
Quercetina	14.9 $\pm$ 4.2	34.5 $\pm$ 4.0	62.2 $\pm$ 7.4	70.3 $\pm$ 8.5	0.011 *
Morin	30.3 $\pm$ 2.1	38.7 $\pm$ 8.3	45.4 $\pm$ 6.2	65.5 $\pm$ 5.4	0.018 *
EGCG	16.8 $\pm$ 7.2	44.7 $\pm$ 6.8	60.3 $\pm$ 13.0	67.8 $\pm$ 7.2	0.020*
Rutina	NI	NI	6.5 $\pm$	NI	0.242
<b>Compuesto\ Dosis (mM)</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>Valor de p</b>
Tetrahidrolipstatina	NI	NI	NI	NI	NC
PMSF	NI	2.0 $\pm$ 0.1	55.3 $\pm$ 3.0	64.4 $\pm$ 7.2	0.084

NI: no inhibió. Los valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) son representados con un \*. NC: no calculado.

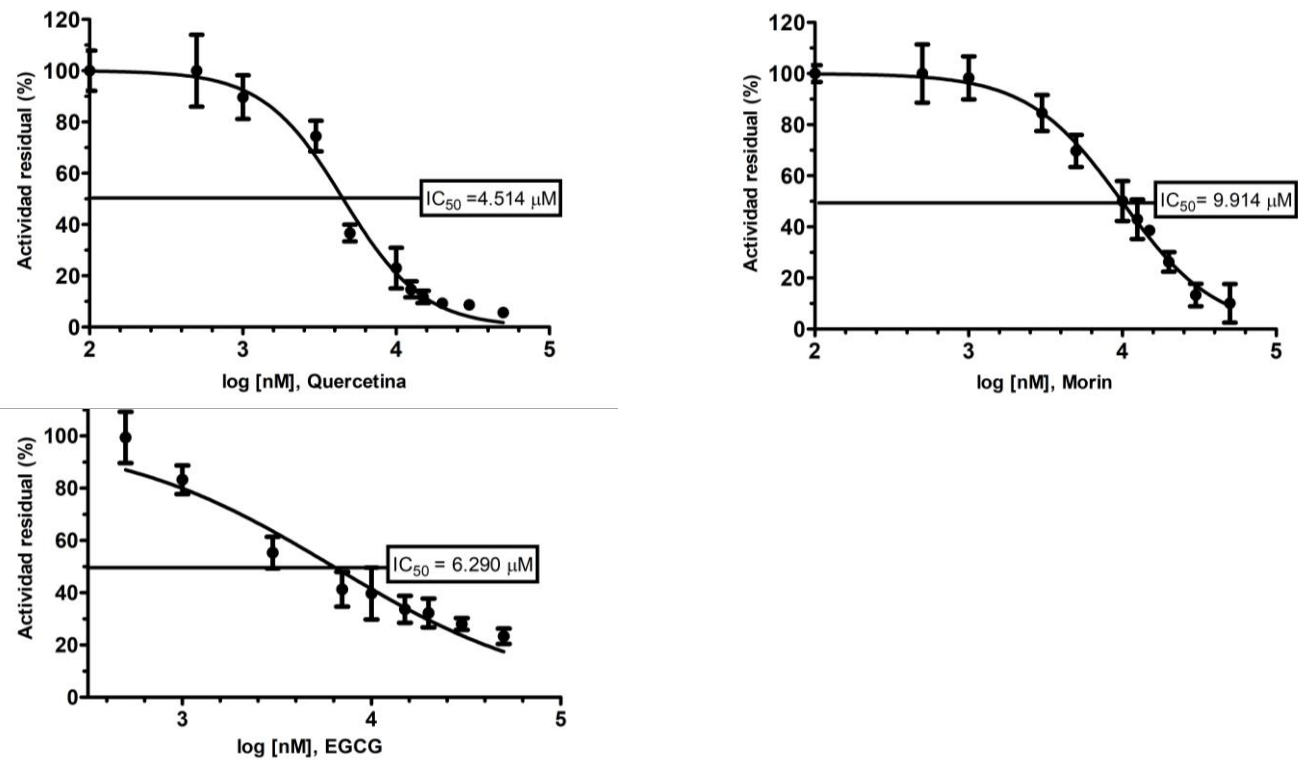
la actividad de la PLA<sub>2</sub> proveniente del veneno de *C. durissus terrificus*. Cuando la enzima se incubó 90 minutos con quercetina a una concentración de 50 µM. Así mismo, Iglesias y col. (2005) determinaron que morin a una concentración de 20 µM era capaz de inhibir un 70 % la actividad de la sPLA<sub>2</sub> del veneno de *C. durissus cascavella*.

En la actualidad no se han reportado inhibidores selectivos para la actividad enzimática de las LDH de *Vibrio spp.* Por lo tanto, se evaluó el efecto de dos compuestos que se han reportado como inhibidores de enzimas con actividad similar a la LDH, como la tetrahidrolipstatina y el PMSF. La tetrahidrolipstatina es un potente inhibidor de serina-hidrolasas al cual pertenecen algunas lipasas, este compuesto se une covalentemente con al residuo de serina catalítico, por lo que impide la catálisis de los sustratos de estas enzimas (Kridel y col., 2004); el PMSF actúa como un inhibidor irreversible para proteasas de serina, y estas enzimas comparten con la LDH los residuos que conforman sus respectivas triadas catalíticas (Ser, His y Asp) (James, 1978; Hedstrom, 2002). En la tabla II se muestran los resultados de actividad enzimática de la LDH en presencia de estos compuestos. La tetrahidrolipstatina no fue capaz de inhibir la actividad de la LDH en el rango de concentraciones de 0.5-5.0 mM, mientras que el PMSF fue capaz de inhibir la actividad de la LDH a concentraciones elevadas de 3-5 mM, donde se observó una disminución máxima de  $64.4 \pm 7.2$  %. Sin embargo este efecto se obtuvo con concentraciones 150-250 veces superiores a las obtenidas para los flavonoides y de 3-5 veces mayores a las utilizadas para serina-proteasas (James, 1978). Por otro lado, este inhibidor no fue considerado para determinar su IC<sub>50</sub> debido a que en las concentraciones más elevadas de PMSF se observó la formación de precipitados en la celda de reacción.

En base a los resultados obtenidos se prosiguió a determinar la Concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de los flavonoides quercetina, morin y EGCG. Este valor nos indica la concentración del inhibidor necesaria para disminuir la actividad de la enzima en un 50 %. Los datos de inhibición se analizaron mediante el modelo de dosis-respuesta, donde la concentración se en nanomoles se expresó en escala logarítmica y los datos de actividad se normalizaron como porcentaje de

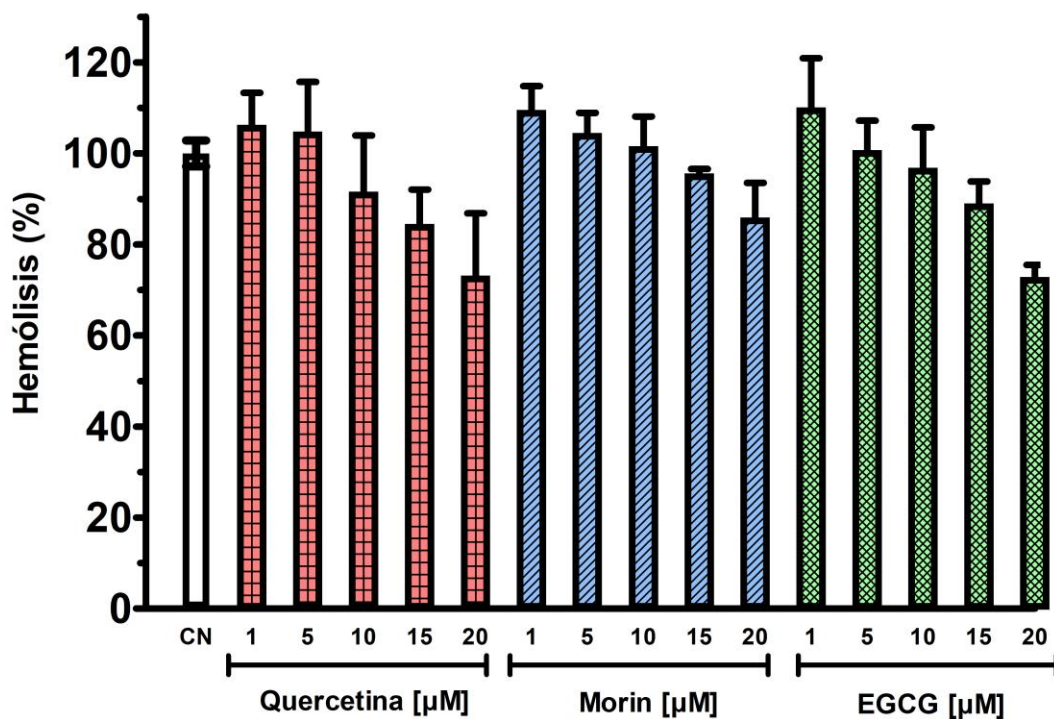
actividad (GraphPad Prism 5). Las gráficas de este análisis para todos los compuestos evaluados se muestran en la figura 22 ( $R^2 > 0.95$ ). A partir de estos resultados se calculó una  $IC_{50}$  para la quercetina, la morin y la EGCG de: 4.514  $\mu\text{M}$ , 9.914  $\mu\text{M}$  y 6.290  $\mu\text{M}$  respectivamente. Si bien los valores se encuentran en el mismo orden de magnitud, se observa que la quercetina tiene un mayor efecto inhibitorio. Estas pequeñas diferencias en los valores de  $IC_{50}$  podrían deberse a que estos compuestos a nivel estructural son similares. Por ejemplo, la quercetina y la morin solo difieren en la posición de un grupo hidroxilo en la posición 2 y 3 del anillo B respectivamente (Figura 21, panel A). Esto nos indica que un grupo hidroxilo en la posición 2 del anillo B de la quercetina, podría estar relacionado con el resultado obtenido de  $IC_{50}$ . Por otro lado, la quercetina y la EGCG presentan los sustituyentes hidroxilos en posiciones iguales, pero este último no cuenta con el grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C y tiene una molécula de ácido gálico unido covalentemente en la posición 3 del mismo anillo. Estas sustituciones en la molécula del EGCG podrían ser las causantes de las diferencias observadas en su efecto inhibitorio, pero al contar con grupos hidroxilos similares a quercetina en el anillo B, es capaz de inhibir en mayor medida que la morin. Por lo tanto, un cambio en la posición de los sustituyentes del anillo B con respecto a quercetina, podría disminuir el efecto inhibitorio de estos compuestos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Lindahl y col. (1997), ellos describieron que los flavonoides son inhibidores selectivos para fosfolipasas  $A_2$ , donde reportaron que, compuestos como la quercetina, la rutina, la catequina entre otros, tienen valores de  $IC_{50}$  en un rango de 0.1-4.0 mM, y le atribuyeron este efecto inhibitorio a la posición de los grupos hidroxilo del anillo A y B, con respecto a quercetina. En base a los resultados obtenidos se puede indicar que los flavonoides la quercetina, la morin y la EGCG son capaces de inhibir la actividad enzimática de la LDH. Anteriormente se describió que la LDH de *Vp* tiene actividad hemolítica, la cual es causada por la lisofosfatidilcolina producto de hidrólisis de la fosfatidilcolina. En base a esto, con el fin de comprobar si la inhibición de la actividad enzimática con los flavonoides es también observable desde el punto de vista hemolítico.





**Figura 22.** Gráficas de inhibición de la LDH de *Vp* por efecto de los flavonoides. Los resultados fueron expresados en un modelo de dosis-respuesta con un valor de  $R^2 < 0.95$ . Se utilizó un rango de concentración de 0.1-50 μM de los compuestos, y fueron expresados de forma logarítmica en concentración nanomolar. En cada gráfico se expresa el valor de IC<sub>50</sub> obtenido para cada compuesto.

En la figura 23 se observa que la quercetina y la EGCG en una concentración de 20  $\mu$ M fueron capaces de disminuir la hemólisis de la LDH un 30% en comparación al control (sin compuestos). Por el contrario, la morin a la misma concentración solo disminuyó la hemólisis entre 10-15%. Estos resultados de inhibición son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) (Figura 23) y concuerdan con lo observado en la inhibición de la actividad enzimática, donde la quercetina y la EGCG mostraron el mayor efecto inhibitorio. Un resultado similar fue descrito para la actividad hemolítica de fosfolipasas  $A_2$  provenientes del veneno de serpientes pertenecientes género *Crotalus* y *Naja*. En estos se utilizaron compuestos como quercetina, morin y ácidos fenólicos simples (GA, PR entre otros), donde ellos reportaron una disminución del 30-50 % de la hemólisis de estas enzimas (Cotrim y col., 2011; Iglesias y col., 2005a; Pereañez y col., 2011; Lindahl y col., 1997; Fernandes, Cardoso y col., 2015). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la quercetina, la EGCG y la morin son inhibidores de la actividad enzimática y hemolítica de la LDH de *Vp*.



**Figura 23.** Inhibición de la actividad hemolítica de la LDH de *Vp*. Efecto de los flavonoides sobre la actividad hemolítica de la LDH. CN: actividad nativa de la enzima (sin inhibidor). Los tratamientos muestran diferencias significativas con una  $p=0.00248$ . Las dosis mostraron diferencias entre si con respecto al control negativo con una  $p<0.05$ . Quercetina  $p=0.037$ , morin  $p=0.021$ , EGCG  $p=0.033$ .

## Estructura por Homología de la LDH de *Vp* y Anclaje Molecular

### Comparación de la Secuencia de la LDH de *Vp* con las LDH de las Especies del género *Vibrio*

Una proteína es un biopolímero compuesto por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y el número de aminoácidos presentes y la secuencia de estos en la cadena proteica determinan su estructura primaria. Este último es importante, pues la secuencia de aminoácidos determina la estructura y función de una proteína. En base a lo anterior y a la escasa información estructural para las LDH, se determinaron las regiones conservadas de la secuencia de aminoácidos de esta enzima. Para ello se comparó la secuencia de aminoácidos de las LDH de diferentes especies patógenas de *Vibrio*, entre ellas: *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*), *Vibrio alginolyticus* (*Va*), *Vibrio harveyi* (*Vh*), *Vibrio campbelli* (*Vc*), *Vibrio cholerae* (*Vch*), *Vibrio diabolicus* (*Vd*) y *Vibrio anguillarum* (*Van*) (Figura 24). La LDH de *Vp* muestra un porcentaje de identidad del 94.5 % con *Vd*, 94.0 % con *Va*, 86.3 % con *Vh*, 80.3 % con *Vc*, 73.3 % con *Vv*, 65.0 % con *Van* y 64.1 % con *Vch*. El alineamiento de secuencias muestra que los aminoácidos correspondientes al dominio GDSL y a los bloques SGNH que son característicos para la actividad enzimática de las LDH, están altamente conservados en estas especies (Akoh y col., 2004; Upton y col., 1995). Estas enzimas comparten los aminoácidos correspondientes al dominio SGNH. Sin embargo, solo las especies de *Vp*, *Va*, *Vh*, *Vc*, *Vch* presentan un aminoácido cargado negativamente (Asp-Glu), conocido por ser parte de la triada catalítica de estas enzimas (S-D o E-H). Por otro lado, las LDH de *Vibrio vulnificus* y *Vibrio anguillarum* no presentan este aminoácido (Ye y col., 2019). Para la especie de *Vv* se descubrió que la función del ácido aspártico es realizado por un átomo de cloro, sin embargo esto no ha sido estudiado para la LDH de *Van* (Ye y col., 2019). Retomando lo mencionado anteriormente, los aminoácidos partícipes en la catálisis de la enzima se encuentran distribuidos en 4 regiones conservadas de la enzima que corresponden a los 4 bloques del dominio SGNH: en el bloque I (139-158 de *Vp*) se encuentran los aminoácidos del dominio GDSL, y en este dominio está la serina catalítica; los bloques II (197-208 de *Vp*) y III (238-258 de *Vp*) cuentan con la glicina y la asparagina que actúan como donadores de protones en la cavidad oxianión durante la catálisis; y el bloque V (384-397 de *Vp*) contiene al ácido aspártico y la histidina catalíticos. Estas características colocan evolutivamente a la LDH de *Vp*

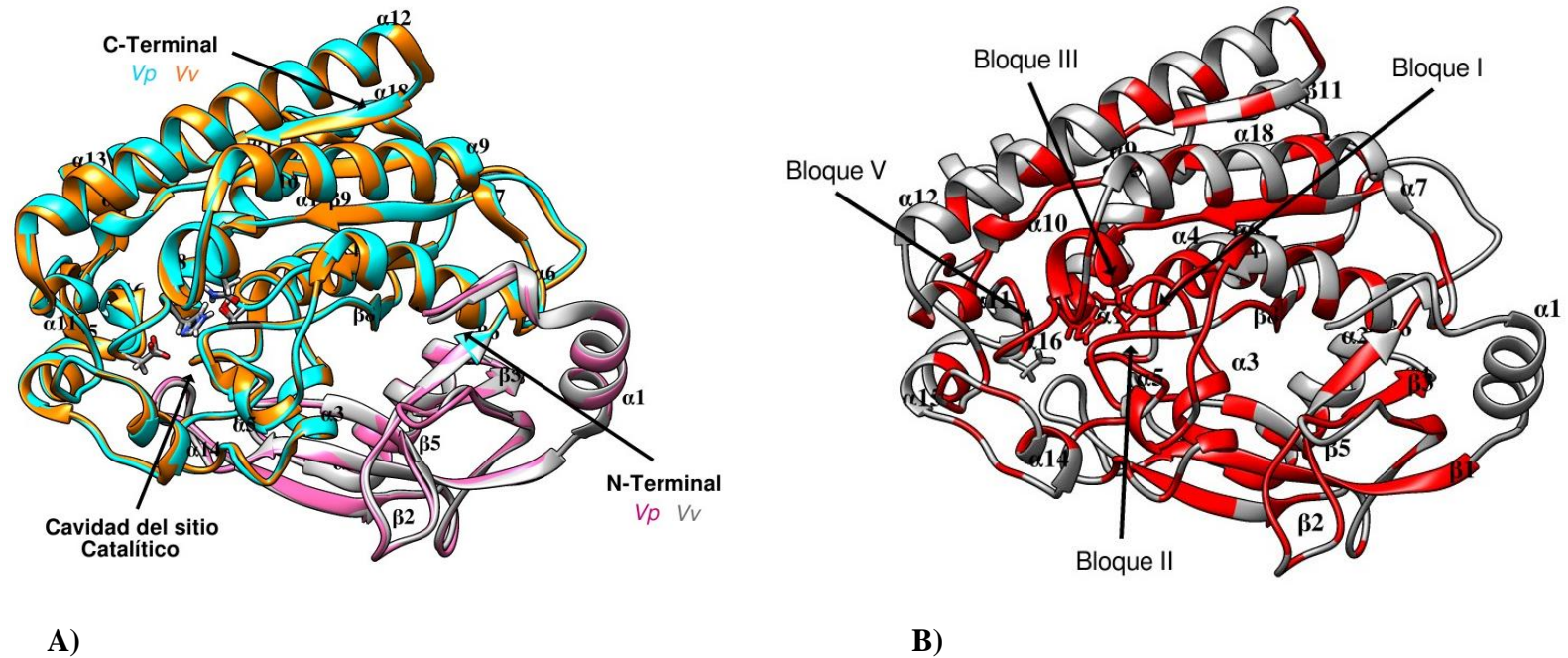


con las producidas por *V. diabolicus* y *V. alginolyticus*, por contar con un alto porcentaje de identidad (94 %) con estas especies y por presentar un residuo de ácido aspártico en el bloque V participe en la catálisis.

### **Modelado por Homología de la LDH de *Vp***

Parte del estudio de las proteínas comprende la determinación de su estructura tridimensional. Estas nos ayudan a descubrir la función de las proteínas a nivel molecular, su evolución y su interacción con diferentes ligandos. Las estructuras de proteínas se pueden determinar experimentalmente por medio de técnicas como la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear. En la actualidad no existe una estructura experimental para la LDH de *Vp*. En estos casos una metodología que se suele elegir es la construcción de un modelo por homología. Los modelos por homología son estructuras tridimensionales de proteínas construidas a partir de otras ya conocidas con características similares (Singh y col., 2010). Para el modelado de la LDH de *Vp*, el templado fue seleccionado a partir de los resultados obtenidos en el servidor PHYRE 2. Este programa se utilizó como un primer acercamiento para establecer cuales estructuras serian candidatas para la construcción del modelo final de la LDH de *Vp*. En base a esto, se utilizó como templado la estructura reportada recientemente (2019) para la LDH de *Vibrio vulnificus* (clave 6JL1 en Protein Data Bank), ya que tiene un 74 % de identidad con respecto a la LDH de *Vp* y porque el modelo por homología obtenido presentó un 100 % de confianza. Este último dato nos indica “la probabilidad (de 0-100%) de que la secuencia problema y la plantilla utilizada sean una verdadera homología” (Kelley y col., 2015). Posteriormente se construyó un modelo de la LDH de *Vp* por homología con el templado 6JL1 en el programa MOE. La secuencia del modelo estructural obtenido es de 395 aa, que comprenden los aa 24-418 de la secuencia total de la LDH de *Vp*. La estructura se puede dividir en 2 dominios principales en base a las características descritas por Ye y col. (2019) para la LDH de *Vv* (Figura 25, panel A). El dominio N-terminal comprende los residuos 24-133, donde la función de este dominio aún no se ha determinado. Este dominio cuenta con una larga lámina  $\beta 1$  la cual forma una hoja antiparalela con las láminas  $\beta 2$  y  $\beta 5$ , a su vez, la lámina  $\beta 1$  forma una hoja antiparalela con 3 láminas  $\beta$  en el orden  $\beta 1$ -  $\beta 3$ -  $\beta 4$ -  $\beta 6$ , y este último se encuentra cerca

del inicio de la secuencia del extremo N-terminal. Adicionalmente este segmento cuenta con dos hélices  $\alpha$ . La hélice  $\alpha_1$  se encuentra cercana al inicio del N-terminal y la hélice  $\alpha_2$  se observa en la parte lateral de la hoja antiparalela  $\beta_2$ -  $\beta_1$ -  $\beta_5$  (Figura 25, panel A). Por otro lado, El dominio C-terminal comprende los aminoácidos 134-418, y este cuenta con los aminoácidos del sitio catalítico distribuidos en los cuatro bloques característicos del dominio SGNH (Figura 25, panel B). En este dominio se encuentra la mayor proporción de hélices  $\alpha$  de la estructura, 16 en total. Una serie de 3 hélices  $\alpha$  en el orden  $\alpha_6$ -  $\alpha_9$ -  $\alpha_{12}$ , se encuentra visible de manera prominente en la parte superior del sitio catalítico. Además, por debajo de estas hélices  $\alpha$  se encuentran las únicas cinco láminas  $\beta$  del extremo C-terminal, formando una hoja paralela con el orden  $\beta_8$ -  $\beta_7$ -  $\beta_9$ -  $\beta_{10}$ -  $\beta_{11}$ . Los aminoácidos del sitio catalítico se encuentran rodeados por una región rica en hélices alfa de secuencia corta, conformada por  $\alpha_3$ - $\alpha_5$ - $\alpha_8$ - $\alpha_{10}$ - $\alpha_{11}$ - $\alpha_{12}$ - $\alpha_{14}$ , donde la asparagina 248 (dominio SGNH) forma parte de la hélice  $\alpha_8$ . Se puede observar que los bloques I, II, III, y V del dominio SGNH que convergen en la cavidad del sitio catalítico y las láminas  $\beta$  presentes en el extremo N-terminal se encuentran altamente conservados. Sin embargo, este último podría tener su importancia a nivel estructural, ya que este extremo se pliega sobre sí mismo por debajo del extremo C-terminal. Esto deja una abertura entre los dominios que atraviesa toda la estructura de la enzima cuya función se desconoce. Con lo observado se determinó el índice alifático de ambos dominios (N y T), pues este valor nos indica el espacio relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas (Ala, Val, Ile, leu) y puede considerarse como un factor positivo para la termoestabilidad de las proteínas globulares (IKAI, 1980). El resultado nos indica que el extremo C-terminal es más termoestable que el extremo N-terminal, con valores de 71.08 y 49.27 respectivamente. Se han reportado valores para proteínas mesofílicas y termofílicas en un rango de 63-105 (IKAI, 1980), lo que podría indicar que el extremo N-terminal podría estar implicado en la termolabilidad de la LDH de *Vp*, que fue observada en los experimentos de temperatura óptima y termoestabilidad, pero para ello sería necesario realizar estudios a nivel estructural a partir de mutaciones en la enzima (mutagénesis dirigida) para corroborar esta hipótesis (Daniel, 1996).

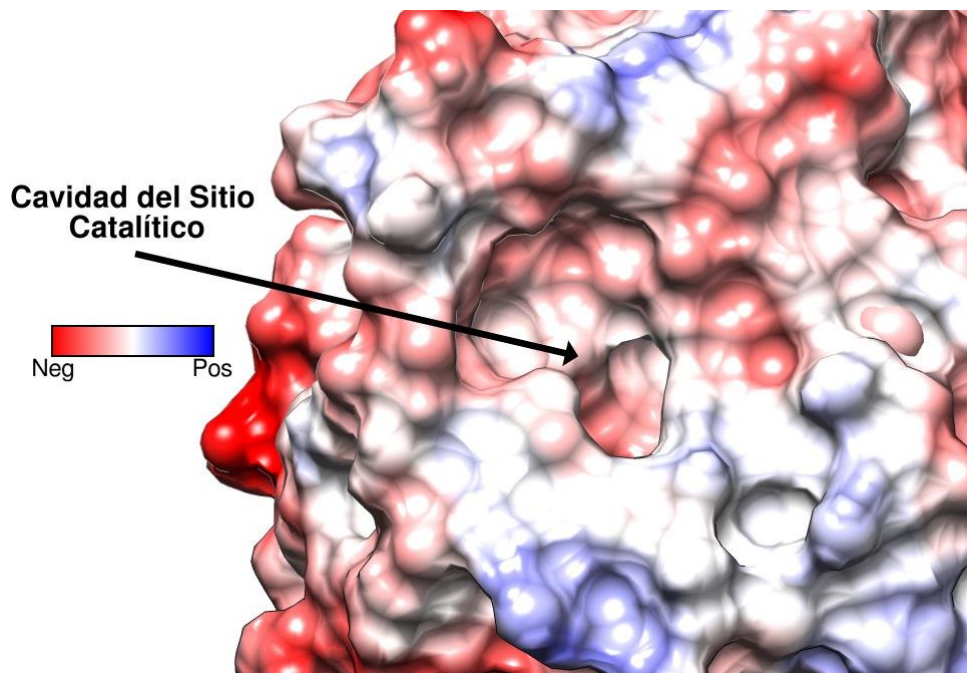
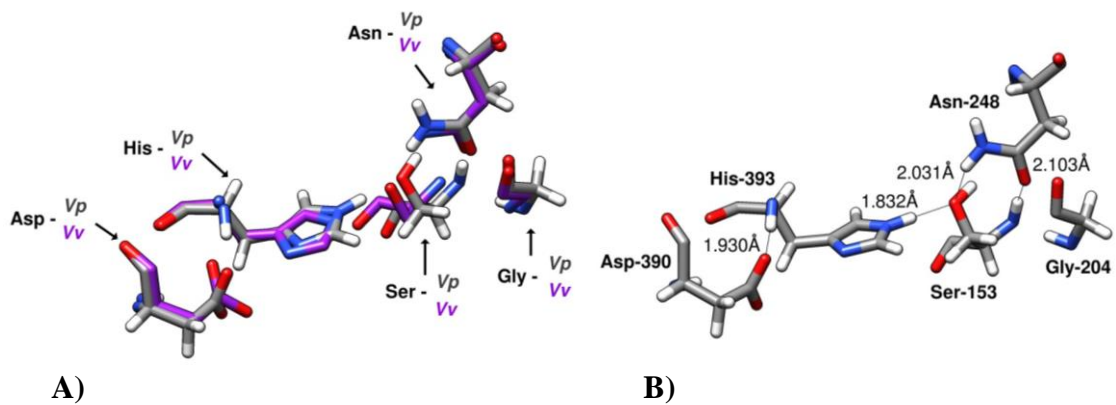


**Figura 25.** Estructura por Homología de la LDH de *Vp*. A) Estructura de la LDH de *Vp* (Rosa-Azul claro) sobrepuesta a la LDH G389D de *Vv* (gris-naranja). Se puede apreciar los dominios amino y carboxilo terminal (N y T) y la cavidad del sitio activo. B) Aminoácidos conservados de la LDH *Vp* (rojo). Es apreciable el alto grado de conservación de la cavidad del sitio catalítico, representado por los Bloques I, II, III y V del dominio SGNH de *Vp*.



### **Acoplamiento Molecular de la LDH con Sustratos e Inhibidores**

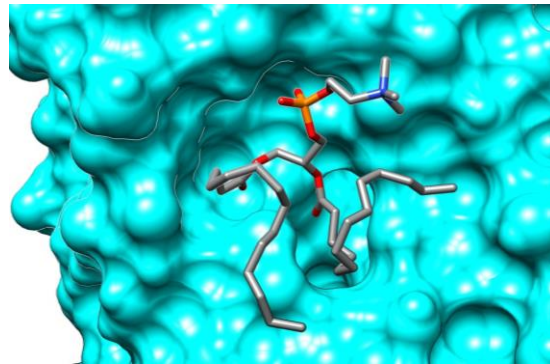
Con el fin de comprender como interactúan los sustratos e inhibidores con el sitio activo de la LDH de *Vp*, se realizó un acoplamiento molecular en el software UCSF-Chimera. Para ello, se determinó homología, las interacciones, y las coordenadas espaciales con respecto a la estructura de la LDH de *Vv* para realizar el acoplamiento. En el panel A de la figura 26 se muestra la sobreposición de los aminoácidos del sitio catalítico de ambas especies, en el cual se observa un acomodo espacial muy similar entre los residuos de las dos especies. Por otro lado, en el panel B de la figura 26 se aprecian los puentes de hidrógeno presentes entre los residuos catalíticos de la LDH de *Vp*. Estas interacciones se establecieron en base a la estructura experimental de la LDH de *Vv*. La asparagina forma dos puentes de hidrógeno con serina, el primero lo realiza con un hidrógeno del grupo amino de su cadena lateral con el átomo de oxígeno de serina (2.031 Å), y el segundo se da entre su grupo carbonilo con el grupo amino de serina que participa en el enlace peptídico (2.103 Å). Este último podría participar en el acomodo espacial de la serina durante la catálisis. A su vez, el hidrógeno de la amina secundaria en la cadena lateral de la histidina forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo de serina (1.832 Å). Esta interacción es importante para desprotonar el grupo funcional de la serina para que inicie el ataque nucleofílico sobre el sustrato. Además, el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido aspártico forma un puente de hidrógeno con el grupo amino que participa en el enlace peptídico de la histidina (1.930 Å). Esto concuerda con la teoría descrita para este aminoácido, el cual podría participar ordenando espacialmente a la histidina para que este pueda cumplir su función (Upton y col., 1995; Ye y col., 2019). Estas interacciones son similares a las observadas en el modelo experimental de la LDH G389 de *Vv*, pero en el modelo obtenido en este trabajo no se observa un puente de hidrógeno entre la glicina y la asparagina. Para la construcción de los modelos de interacción proteína-ligando se designó la cavidad del sitio activo con las coordenadas espaciales siguientes: centro 24.4143, -2.51601, -35.3974 y tamaño 28.3667, -32.6566, -31.0921. Este cubo cubre gran parte del dominio C-Terminal, dejando en el centro a la cavidad del sitio activo (Figura 26, panel C). Al tener delimitada la cavidad del sitio catalítico se realizó el acoplamiento molecular, en el cual se obtuvieron 20 modelos para cada compuesto



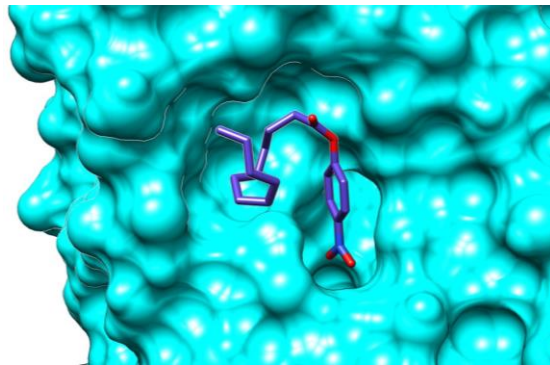
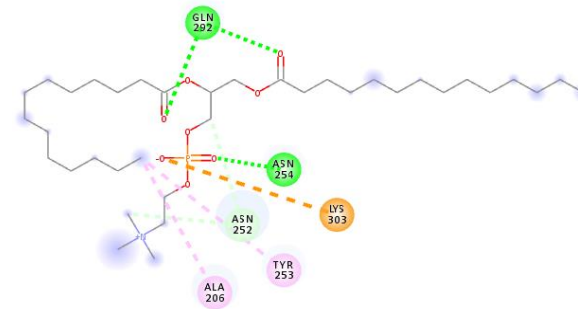
**Figura 26.** Aminoácidos catalíticos y la cavidad del sitio activo de la LDH de *Vp*. A) superposición de los aminoácidos catalíticos de la LDH de *Vp* (C-gris) y *Vv* (C-morado). B) puentes de hidrógeno presentes por los aminoácidos catalíticos de la LDH de *Vp*. C) Cavidad del sitio catalítico de la LDH de *Vp* (señalado con la flecha). Se utilizó una escala de color que indica las cargas presentes en la superficie de la estructura (rojo-negativo, azul-positivo).

del cual se seleccionó la posición más favorable en función de los tipos y distancias de los enlaces.

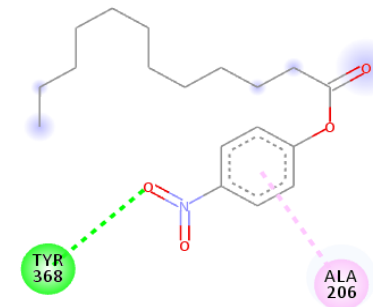
Los puntajes para los acoplamientos más favorables de interacción de los sustratos fueron: fosfatidilcolina=-3.9 kcal·mol<sup>-1</sup> y PNFL=-4.5 kcal·mol<sup>-1</sup>. La fosfatidilcolina interactúa principalmente con la parte externa de la cavidad del sitio activo, donde el primer ácido graso se pliega hacia la lateral izquierda de la cavidad (vista frontal), el sustituyente colina queda expuesto en la parte superior a la cavidad y el segundo ácido graso de la cadena se acomoda espacialmente cerca de la cavidad del sitio activo (Figura 27, panel A). Esta posición es apoyada por múltiples interacciones intermoleculares, donde se puede apreciar que la glutamina 292 realiza puentes de hidrógeno con los grupos carboxilo de las dos cadenas de ácidos grasos. Así mismo, la asparagina 254 y la lisina 303 interactúan con la lecitina por puentes de hidrógeno y enlaces pi-anión, respectivamente. La tirosina 253 y la alanina 206, mantienen la posición de la cadena del segundo ácido graso por medio en interacciones pi-alquilo, lo que posiblemente ayuda a que la disposición de este ácido graso se mantenga cercana a la cavidad del sitio catalítico (Figura 27, derecha panel A). Por otro lado, se observa la interacción del PNFL en el panel B de la figura 27. Esta posición a pesar de ser más favorable que la obtenida con fosfatidilcolina, solo muestra dos interacciones intermoleculares: un enlace pi entre el anillo de *p*-nitrofenol con la alanina 206 y un puente de hidrógeno con la tirosina 368. Sin embargo, estas dos interacciones ayudan a disponer al sustrato de manera que la parte hidrolizable de la molécula queda cercana a la cavidad del sitio activo. Asociado a esta observación, es apreciable que todos los aminoácidos interactúan con los sustratos son altamente conservados en las LDH de diferentes especies de *Vibrio* (Figura 24 y 25). Otro punto es que la hidrólisis del PNFL solo se lleva a cabo cuando en la reacción se encuentra presente la lecitina, por lo que la interacción con estos aminoácidos conservados podría producir un ajuste inducido en la enzima, el cual es una característica de la familia de enzimas GDSL. Este efecto fue observado experimentalmente en la Tioesterasa/ Proteasa I de *E. coli* (enzima GDSL), donde por medio de resonancia magnética nuclear describieron que las largas hélices alfa, y las hojas beta internas se mantienen rígidas, pero la cavidad del sitio activo se denota flexible (Huang y col., 2001). Por ende, la interacción de los sustratos con la cavidad formada por la zona rica en hélices alfa de la LDH



A)



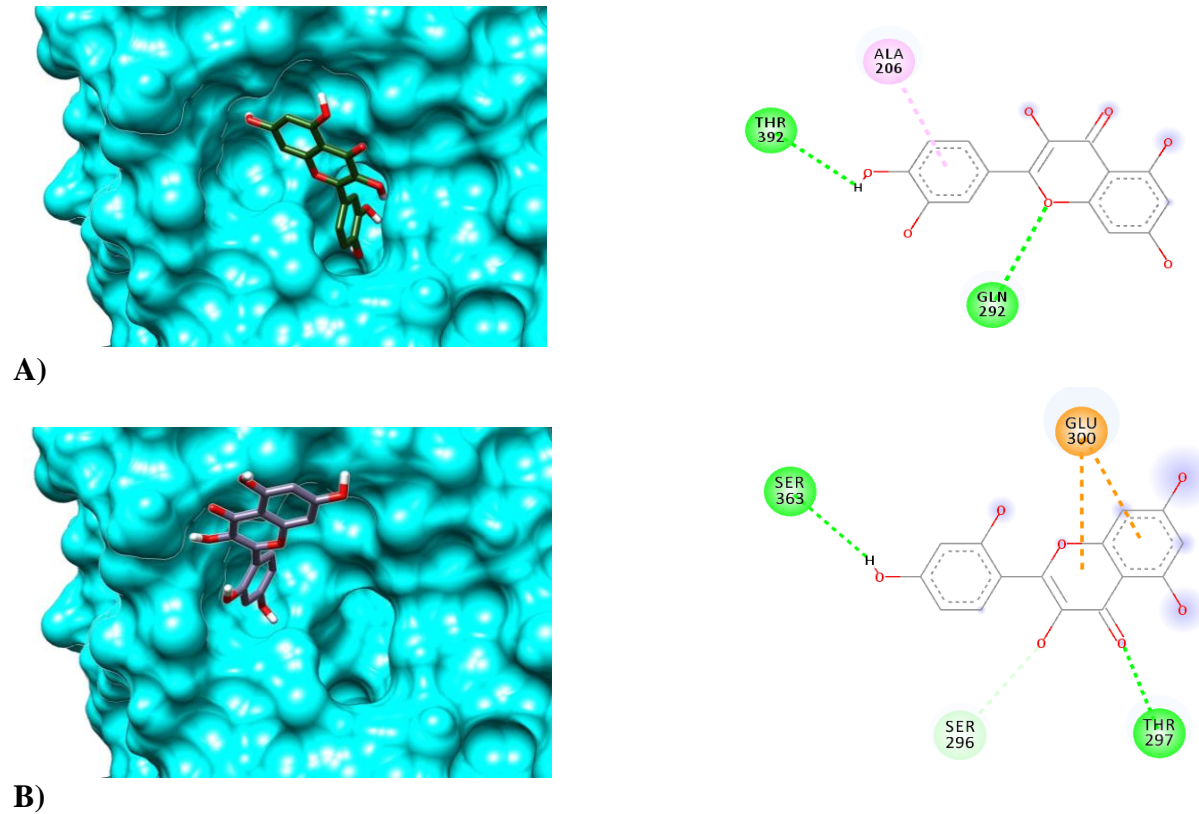
B)



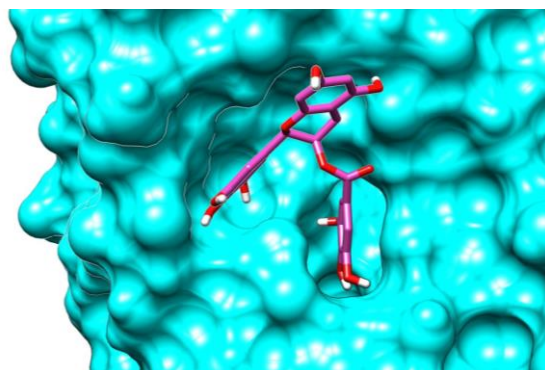
**Figura 27.** Acoplamiento molecular y mapa de interacciones de los sustratos con la LDH de *Vp*. A) Fosfatidilcolina, B) PNFL. Las posiciones fueron seleccionadas por ser las más favorables. Los mapas de interacciones fueron determinados con el programa Discovery Studio 2019. Se pueden apreciar puentes de hidrógeno (verde intenso), interacciones pi con grupos alquilo (rosa claro), interacción de Van Der Waals (azul claro) y enlaces pi con aniones. (naranja).

podría ser importante para inducir la catálisis, y su vez una interacción de otros compuestos con esta zona podría inhibir la actividad de la enzima.

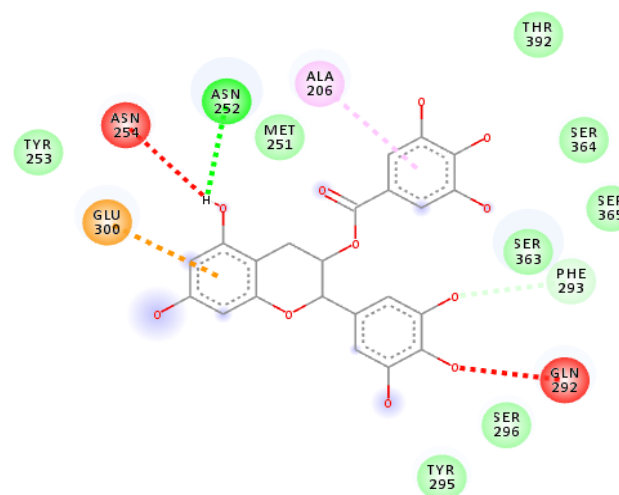
En base a lo observado, se determinó el acoplamiento molecular de los flavonoides que inhibieron la actividad enzimática de la LDH. La energía de interacción que obtuvieron los flavonoides fueron las siguientes: quercetina=-6.4 kcal·mol<sup>-1</sup>, morin=-7.2 kcal·mol<sup>-1</sup> y para EGCG=-7.9 kcal·mol<sup>-1</sup>. Estos valores fueron mayores que los obtenidos para los sustratos, pero estos no mostraron una relación de puntaje versus el grado de inhibición, es decir, la quercetina que fue el mejor inhibidor obtuvo la energía de interacción más baja. Los flavonoides al igual que los sustratos, interaccionaron con la parte externa de la cavidad (Figura 28). El anillo B de la Quercetina realiza un enlace pi-alquilo con la alanina 206 y un puente de hidrógeno con la treonina 392 (ver la Figura 21 para la estructura de los flavonoides). Además, los anillos A y C mantienen su posición mediante un puente de hidrógeno con la glutamina 292 (Figura 28, panel A). La morin a pesar de diferir solo en la posición de un sustituyente hidroxilo en el anillo B, este fue suficiente para que no se posicionara en el interior de la cavidad del sitio activo en comparación a los otros sustratos e inhibidores. La morin forma dos puentes de hidrógeno con la treonina 297 y la serina 363, además de una interacción pi-anión con el ácido glutámico 300 (Figura 28, panel B). Sin embargo, estos no son aminoácidos conservados en las especies de *Vibrio*. Por último, en el panel C de la figura 28 se muestra el modelo de interacción de este compuesto con la LDH. La EGCG realiza interacciones hidrofóbicas, iónicas y polares que puede formar con el exterior de la cavidad del sitio catalítico, donde destaca el enlace pi-alquilo con la alanina 206. Interesantemente esta última interacción se observó en todos los compuestos que interaccionaron con el sitio activo, sean inhibidores o sustratos. En el caso de los inhibidores, este enlace con el anillo C de quercetina y con la molécula de ácido gálico de EGCG podría favorecer una inhibición del tipo competitiva. Estos resultados deberán ser confirmados por estudios de cinética de inhibición en presencia de estos flavonoides. También se observó que la glutamina 292 es importante en la fijación del grupo colina de fosfatidilcolina y del acomodo de quercetina y EGCG en la cavidad catalítica. Esto podría indicar que la alanina 206 y la glutamina 292 son importantes en la unión de los sustratos e inhibidores en el sitio activo.



**Figura 28.** Acoplamiento molecular y mapa de interacciones de los inhibidores con la LDH de *Vp*. Los ligandos utilizados fueron los flavonoides quercetina (A), morin (B) y EGCG (C). Las imágenes muestran cómo los ligandos se unen a la cavidad del sitio activo en su forma más favorable, a su vez se pueden observar los aminoácidos con los que mantienen enlaces intermoleculares: puentes de hidrógeno (verde), Van Der Waals (verde claro), enlace pi con anión (naranja), enlace pi con grupos alquilo (rosa claro), enlace carbono-hidrógeno (azul claro) y enlaces donador-donador o aceptor-aceptor desfavorables (rojo).



C)



**Figura 28 (Continuación).** Acoplamiento molecular y mapa de interacciones de los inhibidores con la LDH de *Vp*. Los ligandos utilizados fueron los flavonoides quercetina (A), morin (B) y EGCG (C). Las imágenes muestran cómo los ligandos se unen a la cavidad del sitio activo en su forma más favorable, a su vez se pueden observar los aminoácidos con los que mantienen enlaces intermoleculares: puentes de hidrógeno (verde), Van Der Waals (verde claro), enlace pi con anión (naranja), enlace pi con grupos alquilo (rosa claro), enlace carbono-hidrógeno (azul claro) y enlaces donador-donador o aceptor-aceptor desfavorables (rojo).

Otros autores le atribuyen el efecto inhibitorio a la capacidad de los flavonoides y ácidos fenólicos de interactuar con los aminoácidos catalíticos del sitio activos de las fosfolipasas (Dileep y col., 2015; Lindahl y col., 1997). Sin embargo, se ha descrito que parte importante de la inhibición de un compuesto también está dada por la capacidad de interactuar con los aminoácidos que participan en la disposición del sustrato en el sitio catalítico (Segel, 1993). Por lo tanto, estos resultados indican que los flavonoides quercetina, EGCG y morin son inhibidores para la actividad enzimática y hemolítica de la LDH de Vp.



## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró purificar de forma recombinante a la LDH de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de cuerpos de inclusión en su forma enzimáticamente activa.

Como parte de la caracterización se determinó que su pH óptimo es similar a lo reportado para enzimas de la familia GDSL y al de fosfolipasas A<sub>2</sub> del veneno de serpientes. Además, se demostró que esta enzima es termolábil en comparación a la TDH de *Vp*.

En base a sus propiedades cinéticas, esta enzima mostró un comportamiento clásico de Michaelis-Menten, donde se calcularon valores cinéticos como la  $V_{max}$  y  $k_{cat}$  mayores a lo reportado para hemolisinas de *Vibrio* y para enzimas GDSL.

Adicionalmente fue posible construir un modelo estructural por homología para la LDH de *Vp*, se identificó la cavidad del sitio activo y se lograron obtener los posibles modelos de interacción de la enzima con los sustratos y flavonoides.

Por último, se demostró que los flavonoides quercetina, morin y EGCG son inhibidores de la actividad enzimática y hemolítica de la LDH de *Vp*. Estos resultados podrían brindar nuevas pautas para el control de la vibriosis en los cultivos de camarón.

## Recomendaciones

1. Realizar estudios de afinidad a sustratos con derivados de los utilizados en el proyecto.
2. Realizar cinéticas de inhibición con los flavonoides con el fin de determinar sus mecanismos de inhibición sobre la LDH de *Vp*.
3. Determinar los parámetros termodinámicos de la enzima por calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría diferencial de barrido y ensayos de fluorescencia para comparar la estabilidad térmica estructural de la enzima con los datos obtenidos en función de su actividad enzimática.
4. Obtener la estructura experimental de esta enzima con el fin relacionar los datos obtenidos a partir de la caracterización bioquímica con su estructura. Además, esta podría ayudar a determinar el mecanismo de actividad de la enzima.
5. Evaluar el efecto de los compuestos fenólicos *in vitro* sobre la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*.
6. Evaluar la actividad de la enzima *in vivo* en camarón blanco, y en base a estos, realizar experimentos de inhibición *in vivo* con camarón.

## BIBLIOGRAFÍA

- ACHIPIA. 2017. *Vibrio parahaemolyticus*. *Área Soporte al Análisis de Riesgo*. 08/2017 1:8.
- Akoh, C., Chiun-Lee, G., Chywan-Liaw, Y., Huang-Huang, T., Fu-Shaw, J. 2004. GDSL Family of Serine Esterases/Lipases. *Progress in Lipid Research* 43 (6): 534–52. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.09.002>.
- Bortolini, J. L. 2004. La camaronicultura en México. Research Gate, Revista de ciencias UNAM, actualizado-2014. <https://www.revistaciencias.unam.mx/pt/77-revistas/revista-ciencias-76/612-la-camaronicultura-en-mexico.html>
- Bradford, M. M. 2000. A Raíd Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing thr Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 254: 481. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Burke, J., Edward A. 2009. Phospholipase A<sub>2</sub> Structure/Function, Mechanism, and Signaling. *Journal of Lipid Research*. 50 (SUPPL.): 237–42. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200>.
- Cabrera, M. Á., Blamey, J. M. 2017. Cloning, overexpression, and characterization of a thermostable nitrilase from an Antarctic Pyrococcus sp. *Extremophiles*. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0948-9>
- Carter, P., James, A. 1988. Dissecting the Catalytic Triad of a Serine Protease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/332564a0>.
- Cheyrier, V. 2012. Phenolic Compounds: From Plants to Foods. *Phytochem Rev*. 000: 153–77. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>.
- CONAPESCA. 2013. Camarón Blanco del Pacífico. Diario Oficial. 0913, segunda sección 16-20. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308082/02camaron\\_blanco\\_pacifico.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308082/02camaron_blanco_pacifico.pdf)
- COSAES. 2014. Informe Final Ciclo 2014, Seguimiento de los cultivos de camarón en el estado de Sonora. SAGARPA.
- Cotrim, C. A., Simone, C. B., Eduardo, B.S. Diz, F., Fonseca, F., Baldissera, L., Antunes, E. Ximenes, R. 2011. Quercetin as an Inhibitor of Snake Venom Secretory Phospholipase A<sub>2</sub>. *Chemico-Biological Interactions*. 189 (1–2): 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.10.016>.
- Cryle, M. J. 2018. Pathway to Malonic Acid-Containing Metabolites. *Nature Catalysis*. 1 (December): 907–8. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0191-5>.
- Cuéllar, J. 2015. Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS). *The Center for Food Security and Public*. 2015-1306 1–7.
- Dabanch, J., Herrero, D., Pavéz, C., Veas, V., Braun, S., Porte, L. 2009. Bacteriemia por *Vibrio*

- parahaemolyticus*: Reporte de caso y revisión de la literatura. *Sociedad Chilena de Infectología*. 26 (4): 360–62.
- Daniel, R. M. 1996. The Upper Limits of Enzyme Thermal Stability. *Enzyme and Microbial Technology*. 19 (1): 74–79. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00174-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00174-3).
- Deng, D., Yun Z., Aijun S. 2016. Functional Characterization of a Novel Marine Microbial GDSL Lipase and Its Utilization in the Resolution. *Biochemistry and Biotechnology*. 75–93. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-1980-4>.
- Dileep, K. V., Remya, C., Cerezo, J., Fassihi, A., Pérez-Sánchez, H., Sadasivan, C. 2015. Comparative Studies on the Inhibitory Activities of Selected Benzoic Acid Derivatives against Secretory Phospholipase A<sub>2</sub>, a Key Enzyme Involved in the Inflammatory Pathway. *Molecular BioSystems*. 11 (7): 1973–79. <https://doi.org/10.1039/c5mb00073d>.
- FAO. 2006. Programa de información de especies acuáticas *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Obtenido de [fao.org](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es): [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es)
- FAO. 2018. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Feller, G., Gerday, C. 1997. Psychrophilic Enzymes: Molecular Basis of Cold Adaptation. Cellular and Molecular. *Life Sciences*. 53 (10): 830–41. <https://doi.org/10.1007/s000180050103>.
- Ferdinand, C. O., Randis, T. M., Aroian, R. V., Ratner, A. J. 2013. Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77 (2): 173–207. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00052-12>.
- Fernandes, C., Florença-Cardoso, F., Cavalcante, W. 2015. Structural Basis for the Inhibition of a Phospholipase A<sub>2</sub>-Like Toxin by Caffeic and Aristolochic Acids. *PLoS ONE*. 10(7): e0133370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133370>.
- García, J., Zeila S., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G. 2013. Estrategias de Obtención de Proteínas Recombinantes En *Escherichia coli*. *Finlay ediciones*. 22 (2): 30–39.
- GE Healthcare. 2019. HisTrap FF Crure. Obtenido de [GElifesciences.com](http://GElifesciences.com): <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=13691>
- Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J. L., Etienne Baise, Pierre-Chess, J., Garsoux, J., Petrescu, I., Feller, G. 1997. Psychrophilic Enzymes: A Thermodynamic Challenge. *Biochimica et Biophysica Acta. Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1342 (2): 119–31. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(97\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(97)00093-9).
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., Palazon, J. 2013. Phenolic Acids. *Elsevier*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>.

- Guthrie, W. W. 1976. *Vibrio Parahaemolyticus*. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 236 (7): 822. <https://doi.org/10.1001/jama.1976.03270080014016>.
- Guy B. K., Verpoorte, R. 2013. Shikimic Acid. *Science Direct*. 2-32
- Hedstrom, L. 2002. “Serine Protease Mechanism and Specificity.” <https://doi.org/10.1021/cr000033x>.
- Honda, T., Miwatani, T. 1988. Purification and Characterization of a Hemolysin Produced by a Clinical Isolate of Kanagawa Phenomenon-Negative *Vibrio parahaemolyticus* and Related to the Thermostable Direct Hemolysin. *Infection and Immunity*. 56 (4): 961–65. [https://doi.org/0019-9567/88/040961-05\\$02.00/0](https://doi.org/0019-9567/88/040961-05$02.00/0).
- Hriscu, M., Chis, L., Tos, M., Dan-Irimie, F. 2013. pH-Profiling of thermoactive lipases and esterases: Caveats and further notes. *Metrika*. 12 (1): 97–105. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200305>.
- Huang, Y., Chywan-Liaw, Y., Ya-Gorbatyuk, V., Huang-Huang, T. 2001. Backbone Dynamics of Escherichia Coli Thioesterase/ Protease i: Evidence of a Flexible Active-Site Environment for a Serine Protease. *Journal of Molecular Biology*. 307 (4): 1075–90. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4539>.
- Ibarra-Gómez, J. C. 2015. Historia de las Enfermedades en el Cultivo de Camarón en el Noroeste de México. México: SAGARPA.
- IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Iglesias, C. V., Aparicio, R., Rodrigues-Simioni, L., Camargo, E. A., Antunes, E., Marangoni, S., Oliveira, D., Toyama O.S. 2005. “Effects of Morin on Snake Venom Phospholipase A2 (PLA2).” *Toxicon* 46 (7): 751–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.07.017>.
- Ikai, A. 1980. Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins A Statistical Analysis Shows That the Aliphatic Index, Which Is Defined as the Relative Volume of a Protein Occupied by Aliphatic Side Chains ( Alanine , Valine , Isoleucine , and Leucine ), of Pro. *Biochem, Communication J*. 88 (6): 1895–98.
- James, G. T. 1978. Inactivation of the Protease Inhibitor Phenylmethylsulfonyl Fluoride in Buffers. *Analytical Biochemistry*. 86 (2): 574–79. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90784-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90784-4).
- Jia, A. N., Woo, Y. S., Hua-Zhang, X. 2010. Expression, Purification, and Characterization of Thermolabile Hemolysin (TLH) from *Vibrio alginolyticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 90 (2): 121–27. <https://doi.org/10.3354/dao02225>.
- Kelley L. A. 2015. PHYRE 2, *Nature Protocols* 10, 845-858
- Kenneth, J., Goody, R. 2012. The Original Michaelis Constant. *Biochemistry* 50 (39): 8264–69. <https://doi.org/10.1021/bi201284u>.The.

- Koshland, D. E. 1958. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Symposium*. 98–104.
- Kridel, S. J., Fumiko A., Rozenkrantz, N., Smith, J. 2004. Orlistat Is a Novel Inhibitor of Fatty Acid Synthase with Antitumor Activity. *Cancer Research* 64 (6): 2070–75. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3645>.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. 2000. Lehninger principles of biochemistry. *New York: Worth Publishers*.
- Lemichez, E., Barbieri, J. 2013. General Aspects and Recent Advances on Bacterial Protein Toxins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 3 (2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013573>.
- Letchumanan, Vengadesh, Kok Gan Chan, and Learn Han Lee. 2014. “Vibrio Parahaemolyticus: A Review on the Pathogenesis, Prevalence, and Advance Molecular Identification Techniques.” *Frontiers in Microbiology*. 5 (DEC): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00705>.
- Lindahl, M., Tagesson, C. 1997. Flavonoids as Phospholipase A2inhibitors: Importance of Their Structure for Selective Inhibition of Group II Phospholipase A2. *Inflammation-* 21 (3): 347–56. <https://doi.org/10.1023/A:1027306118026>.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y. 2003. Mechanisms of Disease Genome Sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: A Pathogenic Mechanism Distinct from That of V Cholerae. *Mechanisms of Disease*. 361: 743–49.
- Marangoni, S., Ponce-soto, L. A. 2009. Toxicon Biochemical and Biological Characterization of a PLA2 from Crotoxin Complex of *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon*. 53: 534–42. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.021>.
- Malagoli, D. 2007. A Full-Length Protocol to Test Hemolytic Activity of Palytoxin on Human Erythrocytes D Malagoli Abstract The Hemolytic Assay Protocols Currently Utilized to Test the Presence of the Marine Biotoxin Palytoxin (PTX) Are Deeply Analyzed . *Invertebrate Survival Journal*. [S.l.], v. 4, n. 2, p. 92-94, sep. 2007. ISSN 1824-307X.
- MOE . 2014. Molecular Operating Environment Version 2014.0901. *Chemical ComputingGroup*, (CCG).<[http://www.chemcomp.com/MOEMolecular\\_Operating\\_Environment.html](http://www.chemcomp.com/MOEMolecular_Operating_Environment.html)
- Nawani, N., Dosanjh, N. S., Kaur, J. 1998. A novel thermostable lipase from a *thermophilic Bacillus sp.*: Characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*, 20(10), 997–1000. <https://doi.org/10.1023/A:1005430215849>
- NCBI. 1998. *Vibrio parahaemolyticus* gene for LDH, complete cds. Obtenido de NCBI-nucleotide: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AB012596.1>

- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- Okamura, Y., Kimura, T., Yokouchi, H. 2010. Isolation and Characterization of a GDSE Esterase from the Metagenome of a Marine Sponge-Associated Bacteria. *Mar Biotechnol*. 12:395–402. <https://doi.org/10.1007/s10126-009-9226-x>.
- Oliveira, D. G., Toyama, M. H., Novello, J. C., Beriam, L. O. S., Marangoni, S. 2002. Structural and Functional Characterization of Basic PLA2 Isolated from *Crotalus durissus terrificus* Venom. *Journal of Protein Chemistry*. Vol. 21 No. (3).
- Pereañez, J. A., Núñez, V., Patiño, A. C., Londoño M., Quintana, J. C. 2011. Inhibitory Effects of Plant Phenolic Compounds on Enzymatic and Cytotoxic Activities Induced by a Snake Venom Phospholipase A<sub>2</sub>. *Vitae*. 18 (3): 295–304.
- Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605-12.
- Pfeffer, J. M., Weadge, J. T., Clarke, A. J. 2013. Mechanism of Action of *Neisseria gonorrhoeae* O-Acetylpeptidoglycan Esterase, an SGNH Serine Esterase. *Journal of Biological Chemistry* 288 (4): 2605–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436352>.
- PubChem. 2019. Estructuras de los Sustratos y Flavonoides. U.S. National Library of Medicine. Obtenido de PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., Arab, S., & Mobasheri, H. 2016. Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Molecular Biology Research Communications*, 5(4), 257–261. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28261629%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5326489>
- Robles-Ruiz, A. G. 2017. Actividad Hemolítica y Termoestabilidad de la Hemolisina Dependiente de Lecitina de *Vibrio parahaemolyticus*. Universidad de Sonora, Tesis de licenciatura.
- Sánchez-paz, A., Mendoza-cano, F., Enríquez-espinoza, T., Encinas-garcía, T., Portillo-Clark, G., Grijalva-chon, M. 2003. Síndrome de Mortalidad Temprana Del Camarón, ¿presente En México?. *Ciencia y Desarrollo*. February: 66–69.
- Segel, I. H. 1993. Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. *WILEY*.
- Senevirathne, R. N., Janes, M. E., Simonson, J. G. 2009. Detection and Enumeration of *Vibrio vulnificus* by Direct Colony Immunoblot. *Journal of Food Science* 74 (1): 41–45. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01012.x>.
- Shinoda, S., Matsuoka, H., Tsuchie, T., Shin-ichi M., Yamamoto, S., Taniguchi, H., Mizuguchi,

- Y. 1991. Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *Journal of General Microbiology*. 137, 2705-2711.
- Simpson, B. K., Haard, N. F. 1984. Purification and Characterization of Trypsin from the Greenland Cod (*Gadus Ogac*). 1. Kinetic and Thermodynamic Characteristics. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* 62 (9): 894–900. <https://doi.org/10.1139/o84-114>.
- Singh, M. K., Dominy, B. N. 2010. Thermodynamic Resolution: How Do Errors in Modeled Protein Structures Affect Binding Affinity Predictions?. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 78 (7): 1613–17. <https://doi.org/10.1002/prot.22691>.
- Sun, B., Zhang, X. H., Tang, X., Wang, S., Zhong, Y., Chen, J., Austin, B. 2007. A Single Residue Change in *Vibrio Harveyi* Hemolysin Results in the Loss of Phospholipase and Hemolytic Activities and Pathogenicity for Turbot (*Scophthalmus Maximus*). *Journal of Bacteriology*. 189 (6): 2575–79. <https://doi.org/10.1128/JB.01650-06>.
- Tanaka, Y., Kazuko-Mashino S., Inoue, K., Chemistry-Hongo, N, Pharmaceutical Bunkyo-ku. 1983. Mechanism of Human Erythrocyte Hemolysis Induced by Phosphatidylcholines and Lysophosphatidylcholine Chemistry for Publication Though Reports of Studies on Hemolysis Mediated by Lysophospholipids or Short-Chain Phospholipids Have Accumulated over the Past. *Journal Biochem*. 94 (3): 833–40.
- Taniguchi, H., H. Ohta, M. Ogawa, and Y. Mizuguchi. 1985. “Cloning and Expression in *Escherichia Coli* of *Vibrio Parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin and Thermolabile Hemolysin Genes.” *Journal of Bacteriology* 162 (2): 510–15.
- UNIPROT. 1995. Q99289 (HLT\_VIBPA). Obtenido de uniprot.org: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q99289#>
- Upton, C., Buckley, J. 1995. PROTEIN SEQUENCE A New Family of Lipolytic. *Elsevier Science Ltd*. 178–79. 0968-0004/95/\$09.50
- Wang, R., Fang, S., Wu, D., Lian, J., Fan, J., Zhang, Y., Wang, S., Wenxiong, L. 2012. Screening for a Single-Chain Variable-Fragment Antibody That Can Effectively Neutralize the Cytotoxicity of the *Vibrio parahaemolyticus*. 78 (14): 4967–75. <https://doi.org/10.1128/AEM.00435-12>.
- Wang, R., Zhong, Y., Gu, X., Yuan, J., Saeed, A. F., Wang, S. 2015. The Pathogenesis, Detection, and Prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*. 6 (MAR): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00144>.
- Wicka, M., Wanarska, M., Krajewska, E., Pawlak-szukalska, A., Kur, J., Cieśliński, H. 2016. Cloning, Expression, and Biochemical Characterization of a Cold- Active GDSL-Esterase of a *Pseudomonas Sp* . S9 Isolated from Spitsbergen Island Soil. *Akta ABP Biochimica Polonica*. Vol. 63 (1): 117–25.



- Yang, Z., Zhang, Y., Shen, T., Xie, Y., Mao, Y., Ji, C. 2013. Cloning, Expression and Biochemical Characterization of a Novel, Moderately Thermostable GDSL Family Esterase from *Geobacillus Thermodenitrificans* T2. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 115 (2): 133–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.08.016>.
- Ye, W., Changshui L., Qingjun, M. 2019. Structural analysis of a vibrio phospholipase reveals an unusual Ser–His–chloride catalytic triad. *Journal Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008280>.
- Zamora-Pantoja, D. R. 2005. Un enemigo marino silencioso *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Digital Universitaria*, 6(44), 9. <https://doi.org/http://doi.acm.org/10.1145/1101908.1101941>
- Zhao, Y., Tang, X., Zhan, W. 2011. Cloning, Expressing, and Hemolysis of Tdh, Trh and Tlh Genes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Ocean University of China*. 10 (3): 275–79. <https://doi.org/10.1007/s11802-011-1801-x>.
- Zhong, Y., Hua-Zhang, X., Chen, J., Chi, Z., Sun, B., Li, Y., Austin, B. 2006. Overexpression, Purification, Characterization, and Pathogenicity of *Vibrio harveyi* Hemolysin VHH. *Infection and Immunity*. 74 (10): 6001–5. <https://doi.org/10.1128/IAI.00512-06>.

## APÉNDICE I

Equipos utilizados para la realización del proyecto.

<b>Nombre</b>	<b>Uso</b>	<b>Nombre</b>	<b>Uso</b>
<b>Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies</b>	Medición de absorbancia UV-Vis	<b>Rotor: F14-14x50y Rotor: F10-4x1000 LEX</b>	Rotores para la centrifuga Sorvall para tubos de 50 mL y envases de 1000 mL
<b>Cary Single Cell Peltier Accesory</b>	Para el control de la temperatura en el espectrofotómetro	<b>Aktaprime plus GE</b>	Equipo para cromatografías de baja presión
<b>Rio+ 180</b>	Bomba de agua para el espectrofotómetro	<b>HERA incubator Scientific</b>	<b>Therm Thermo</b> Incubadora para microbiología
<b>Branson Digital Sonifier – 102C (CE)</b>	Equipo para el control de la Sonicación	<b>AccuSpin Fisher Scientific</b>	<b>Micro</b> Centrifuga para microtubos eppendorf
<b>Gabinete Digital Sonfier SSE-1</b>	Gabinete para las muestras del sonicador	<b>Starter 3100 OHAUS</b>	Potenciómetro
<b>Valor 1000 OHAUS</b>	Bascula digital granataria	<b>DryBlockHEATER OHAUS</b>	Termo-bloque
<b>Sorvall Lynx 4000 Thermo Scientific</b>	Centrifuga	<b>CIMAREC</b>	Placa térmica y de agitación magnética

Búfers Utilizados en la Extracción de los Cuerpos de Inclusión

<b>Búfer</b>	<b>Contenido</b>	<b>Ciclo</b>
<b>Lisis</b>	Tris HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, Benzamidina 5 mM, pH 7.0	1
<b>Lavado 1</b>	Tris HCl 50 mM, Triton x-100 al 2%, EDTA 5 mM, Benzamidina 5 mM, pH 7.0	2
<b>Lavado 2</b>	Tris HCl 50 mM, EDTA 5 mM, Benzamidina 5 mM, pH 7.0	3 y 4
<b>Extracción (solubilización)</b>	Tris HCl 50 mM, Urea 8M, EDTA 5 mM, Benzamidina 5 mM, pH 7.0	5

Búfers Utilizados Para el Replegamiento *in vitro*.

<b>Cambio</b>	<b>búfer</b>
<b>1</b>	Tris 50 mM, urea 4 M, pH 7.5
<b>2</b>	Tris 50 mM, urea 1 M, pH 7.5
<b>3-4</b>	Tris 50 mM, pH 7.5

## APÉNDICE II

### Abreviaturas

4N3OBA	4-Nitro-3-(octanoiloxi) benzoico
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BMN	Necrosis Baculoviral de la Glándula Intestinal
°C	Grados centígrados
<i>Cdc</i>	<i>Crotalus durissus cumanesis</i>
<i>Cdt</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
CL	Ácido clorogénico
CONAPESCA	Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca
COSAES	Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora
DDT	Ditiotreitol
Ea	Energía de activación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
EMS	Síndrome de Mortalidad Temprana
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GA	Ácido gálico
HPI	Horas posteriores a la inducción
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50
IHHNV	Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética
IMAC	Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados
K	Temperatura absoluta (Kelvin)
$k_{cat}$	Constante catalítica (cinética)
kDa	Kilodaltons
$k_e$	Constante de especificidad (cinética)
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten (cinética)
LB	Luria Bertani (medio de cultivo)
LDH	Hemolisina termolábil dependiente de lecitina
M	Molaridad
MAM7	Multivalent Adhesion Molecule 7
MAPK	MAP cinasas
min	Minuto
MOE	Molecular Operating Environment
NC	No calculado
NI	No inhibió
PBS	Búfer de fosfatos salinos
PDB	Protein Data Bank
PI	Punto Isoeléctrico

PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNFB	<i>P</i> -nitrofenil butirato
PNFL	<i>P</i> -nitrofenil laurato
PR	Ácido protocatéuico
<i>Psp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
s	Segundo
S	Sustrato
SAGARPA	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
T	Temperatura
TDH	<i>Hemolisina directa termoestable</i>
T <sub>m</sub>	Temperatura media de inactivación
TRH	Hemolisina relacionada a la TDH
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TSV	Virus del síndrome del Taura
U	Unidades de actividad enzimática
<i>Va</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
VA	Ácido vanílico
<i>Van</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Vch</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Vd</i>	<i>Vibrio diabolicus</i>
<i>Vh</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>V<sub>max</sub></i>	Velocidad máxima (cinética)
<i>Vp</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Vv</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
WSD	Enfermedad de la mancha blanca
ε	Coefficiente de extinción molar
λ	Longitud de onda