

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Caracterización bioquímica, termodinámica y cinética de catepsina D del hepatopáncreas de la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), almeja reina (*Dosinia ponderosa*) y calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M.C. Francisco Cadena Cadena

Hermosillo, Sonora

enero, 2020

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

APROBACIÓN

Caracterización bioquímica, termodinámica y cinética de catepsina D del hepatopáncreas de la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), almeja reina (*Dosinia ponderosa*) y calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

Francisco Cadena Cadena



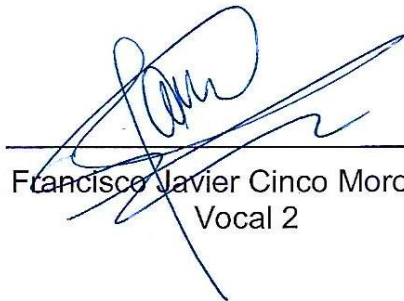
José Luis Cardenas López
Director de tesis



Josafat Marina Ezquerro Brauer
Secretario



Hisila del Carmen Santacruz Ortega
Vocal 1



Francisco Javier Cinco Moroyoqui
Vocal 2



Alonso Alexis López Zavala
Vocal 3

Hermosillo, Sonora a enero de 2020.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada Caracterización bioquímica, termodinámica y cinética de catepsina D del hepatopáncreas de la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), almeja reina (*Dosinia ponderosa*) y calamar gigante (*Dosidicus gigas*), en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Doctor en Ciencias de los Alimentos**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E


LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA


Francisco Cadena Cadena

DEDICATORIA

A:

Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Mi madre María Jesús Cadena (QEPD) y mi padre Porfirio Cadena, por darme la vida, quererme mucho y creer en mí ya que siempre me apoyaron. Mamá y Papa gracias por apoyarme en mi carrera, todo esto se lo debo a ustedes

A mi hija Arya Ximena Cadena y mi esposa Erika Arely Núñez, quiénes me brindaron todo su apoyo y comprensión durante el curso del doctorado, así como en la elaboración del presente trabajo.

.

Mis hermanos, Ana, Jesús y Carlos por estar conmigo y apoyarme siempre.

Todos mis amigos Raquel, Ángel, Santiaguín, Solecito, Claudia, Ivan y Encinas a todos ustedes muchas gracias por haberme ayudado tanto y por compartir los buenos y malos momentos.

Mis suegros José Jesús Núñez y María Ofelia Portillo por el cariño y apoyo incondicional que siempre me han manifestado.

A mis sinodales Dra. Marina, Dr. Cinco, Dr. Alexis y Dra. Hisila que me apoyaron durante todo el curso del Doctorado y durante la realización de este trabajo. Muy especialmente quiero dedicarle este trabajo a mi director de tesis Dr. José Luis Cárdenas López usted ha sido mi mano derecha y quien me ha guiado en el complicado proceso. Es cierto, no ha sido nada fácil, sin embargo, gracias a su ayuda, esto ha parecido un tanto menos complicado. El resultado de mi tesis ha sido espectacular, mejor de lo que esperaba y una gran parte del desarrollo de ese

excelente trabajo se lo debo a usted. Que dios lo bendiga y solo resta decirle muchas gracias Dr. José Luis.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis primeramente me gustaría agradecerle a Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado.

A la UNIVERSIDAD DE SONORA por darme la oportunidad de estudiar y ser un maestro en ciencias.

A mi director de tesis, Dr. José Luis Cárdenas López por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, que me ayudaron a formarme como persona e investigador, por su paciencia conmigo y su motivación ha logrado que yo pueda terminar mis estudios con éxito.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón.

También me gustaría agradecer al DIPA y a CONACYT por la beca brindada durante mi estancia en el Doctorado y por el proyecto “Caracterización fisicoquímica de catepsinas L y D del hepatopáncreas de calamar gigante” Conacyt Ciencia Básica 182348 dirigido por el Dr. José Luis Cárdenas López.

CONTENIDO

APROBACIÓN	II
DERECHOS DE AUTOR	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	VI
CONTENIDO	VII
INTRODUCCIÓN	1
DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	8
Capítulo 1. Efecto de la temperatura y pH en la estructura secundaria y el proceso de desnaturalización de catepsina D del hepatopáncreas de calamar gigante.	
Capítulo 2. Efecto de la temperatura y pH en la estructura secundaria y el proceso de desnaturalización de catepsina D del hepatopáncreas de almeja japonesa (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	
Capítulo 3. Cambios en actividad, estructura secundaria y proceso de desnaturalización de catepsina D del hepatopáncreas de la almeja reina (<i>Dosinia ponderosa</i>) a diferentes condiciones de temperatura y pH	
CONCLUSIONES	85
RECOMENDACIONES	86

INTRODUCCIÓN

Los moluscos son organismos ampliamente distribuidos a nivel mundial, sin embargo debido a fenómenos como la explotación excesiva de los recursos pesqueros en general, así como a los cambios climáticos, las estrategias de producción desde hace varias décadas se han enfocado a su producción a través de sistemas de cultivo. No obstante para poder establecer las mejores condiciones de producción y entender el comportamiento que los organismos marinos presentan en los ambientes marinos se requieren estudios que permitan un mayor conocimiento de las mismas.

Los principales moluscos consumidos en el mundo son las almejas reina (*Doosinia ponderosa*) y la japonesa (*Ruditapes philippinarum*), situándose solo por debajo del ostión (Bagnara Vivanco, 2008) y el calamar gigante. La producción de éste último organismo se ha visto mermada en los últimos 5 años en las costas Mexicanas, atribuido entre otras a problemas climáticos como el fenómeno de la Niña y el Niño (Morales-Bojórquez *et al.*, (2017)). Lo que ha propiciado la migración del mismo hacía otras zonas del continente americano como Costa Rica y Perú. Los fenómenos de migración se dan sobre todo por la búsqueda de alimentación.

Un nutriente importante dentro de la dieta de los organismos marinos son las proteínas. En el caso particular del calamar se ha reportado que en su principal órgano digestivo el hepatopáncreas, las principales actividad enzimática es proteolítica, como la tripsinica, quimotripsinica, aminopéptidica y carboxipéptidica.

Así mismo se ha detectado alta actividad enzimática a pH ácidos en el hepatopáncreas las principales enzimas que se han estudiado son las proteasas alcalinas (Ezquerro-Brauer *et al.* 2002; Osuna-Ruiz *et al.* 2010). Sin embargo, se sabe que existe una alta actividad enzimática a pH ácidos (Cárdenas-Lopez y Haard, 2005). Una de las principales enzimas lisosomales aislada del hepatopáncreas de muchos moluscos es la catepsina D (EC 3.4.23.5) (Tiscar *et al.*, 2004; Venugopal y Kumar, 2014).

La catepsina D se encuentra en todos los organismos actuando en el recambio proteico (Balti *et al.*, 2010; Davies, 1990). Esta enzima desempeña un papel importante en la degradación intracelular de hormonas polipeptídicas, factores de crecimiento, la insulina, el glucagón (Benes *et al.*, 2008) y también participa en la activación *in vitro* de los precursores enzimáticos de catepsinas B y L aisladas del hígado y riñón de rata (Nishimura *et al.*, 1988). Así mismo se ha reportado que su actividad se incrementa ante el desarrollo de varios tipos de carcinomas (Benes *et al.*, 2008; Fusek *et al.*, 2005). Se ha detectado en altas concentraciones en los pacientes con el mal de Parkinson (Crabtree *et al.*, 2014), siendo también un blanco en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Di Domenico *et al.*, 2016), así como involucrada en la regulación de la apoptosis o muerte celular programada (Blanco-Labra *et al.*, 1996).

En organismos marinos la catepsina D ha sido aislada de algunas especies de peces como la carpa (*Cyprinus carpio*) (Goldman-Levkovitz *et al.*, 1995), el arenque (*Clupea harengus*) (Nielsen *et al.*, 2001), del mejillón (*Mytilidae galloprovincialis*) y del hepatopáncreas de calamares (*Sepia*) (Balti *et al.*, 2010;

Gildberg, 1987). En la langosta americana (*Homarus americanus*) se asocia con la digestión encontrándose en el jugo gástrico (Rojo *et al.*, 2010), mientras que en la *Lampetra japonica* está relacionada con el sistema reproductor (Xiao *et al.*, 2015). En otros invertebrados se encuentra presente en la digestión de proteínas del alimento (Padilha *et al.*, 2009; Rojo *et al.*, 2010; Williamson *et al.*, 2002).

Se sabe que la catepsina D juega un papel fundamental tanto en el sistema inmune como digestivo de los organismos vivos (Tiscar *et al.*, 2004; Venugopal y Kumar, 2014). Existen muchas estrategias que pueden tomar los organismos para una adecuada proteólisis. Sin embargo, a nivel enzimático la principal es la síntesis de enzimas con diversas características, ya sea, enzimas que han incrementado su eficiencia catalítica a expensas de la estabilidad térmica o, enzimas que aumentan su estabilidad térmica a expensas de su eficiencia catalítica (Russell, 1998). La catepsina D posee una alta eficiencia catalítica, por lo que se ha detectado que se requieren concentraciones bajas de la enzima para que se lleve a cabo la reacción química, así mismo se ha reportado que pueden inactivarse a temperaturas moderadas, lo que permite detener los procesos enzimáticos sin comprometer la integridad de los productos (Feller, 2013; Siddiqui *et al.*, 2006).

En cuanto a la caracterización estructural de la catepsina D en organismos marinos, a la fecha se tienen reportes principalmente en crustáceos (Martinez-Alarcon *et al.*, 2018). Las cuáles al compararse con la presente en el bazo bovino, la proveniente de los crustáceos estudiados exhibe mayor eficiencia catalítica y ausencia de estructuras tipo lazo en la estructura de la enzima. Estas diferencias constituyen adaptaciones que le permiten a la catepsina D catalizar sus sustratos a

bajas temperaturas (Rojo *et al.*, 2013). Estas características están asociadas a su estructura secundaria principalmente a motivos $\beta\alpha\beta$; es decir, las hélices α y las hojas β se van intercalando en la secuencia peptídica relacionados por un eje de rotación, y es aquí donde los dos motivos $\beta\alpha\beta$ forman una estructura que tipo red (Bhattacharyya, 2016). En algunas proteínas existen residuos acoplados en algunas de las hojas β centrales, principalmente al final de las mismas. Esta presencia de acoplamiento les confiere estabilidad a las hélices α así como también al hecho de que se encuentran muchos residuos importantes en las asas de la proteína y otras regiones accesibles al solvente (Bottoms *et al.* 2002).

A pesar de los estudios antes mencionados, en moluscos la información que se tiene sobre la catepsina D en el tracto digestivo de los organismos es escasa, la mayoría de los trabajos se han centrado en la actividad que la misma posee en la región anatómica que mayormente se consume, su manto (Luna-Raya *et al.*, 2014), y aún no se conoce la biogénesis lisosómica en estos organismos ni cuáles enzimas participan en su digestión. Por lo tanto, debido a la gran diversidad biológica que presenta el grupo de moluscos y al papel fisiológico que la Catepsina D posee, se requieren realizar mayores estudios que permitan profundizar más en el conocimiento de esta enzima. En este trabajo se llevó a cabo la extracción y purificación de la catepsina D de tres moluscos de interés comercial la almeja japonesa, la almeja reina y el calamar gigante. La caracterización de la enzima purificada se realizó mediante el establecimiento de parámetros bioquímicos (masas moleculares), físicos (pH y temperatura), cinéticos y estructurales. El desarrollo de esta investigación coadyuvará al conocimiento de las características bioquímicas y termodinámicas de la catepsina D. y sienta las bases para próximas

investigaciones que permitan explorar cómo las características estructurales responsables de la actividad de la enzima impactan en el desarrollo de los organismos.

REFERENCIAS

Bagnara Vivanco, M. (2008). Descripción del sector mitilicultor en la región de Los Lagos, Chile: evolución y proyecciones. FAO Actas de Pesca y Acuicultura.

Balti, R., Hmidet, N., Jellouli, K., Nedjar-Arroume, N., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Cathepsin D from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(19), 10623-10630.

Benes, P., Vetvicka, V., & Fusek, M. (2008). Cathepsin D—many functions of one aspartic protease. *Critical reviews in oncology/hematology*, 68(1), 12-28.

Bhattacharyya, M., Bhat, C. R., & Vishveshwara, S. (2013). An automated approach to network features of protein structure ensembles. *Protein Science*, 22(10), 1399-1416.

Blanco-Labra, A., Martinez-Gallardo, N. A., Sandoval-Cardoso, L., & Delano-Frier, J. (1996). Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae (Herbst). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(1), 95-100.

Bottoms, C. A., Smith, P. E., & Tanner, J. J. (2002). A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains. *Protein Science*, 11(9), 2125-2137.

Cardenas-Lopez, J. L., & Haard, N. F. (2005). Cysteine proteinase activity in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas extracts. *Journal of food biochemistry*, 29(2), 171-186.

Crabtree, D., Dodson, M., Ouyang, X., Boyer-Guittaut, M., Liang, Q., Ballestas, M. E. Zhang, J. (2014). Over-expression of an inactive mutant cathepsin D increases endogenous alpha-synuclein and cathepsin B activity in SH-SY5Y cells. *Journal of neurochemistry*, 128(6), 950-961.

Davies, D. R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 19(1), 189-215.

Di Domenico, F., Tramutola, A., & Perluigi, M. (2016). Cathepsin D as a therapeutic target in Alzheimer's disease.

Ezquerro-Brauer, J., Haard, N. F., Ramírez-Olivas, R., Olivas-Burrola, H., & Velazquez-Sánchez, C. J. (2002). Influence of harvest season on the proteolytic activity of hepatopancreas and mantle tissues from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Journal of food biochemistry*, 26(5), 459-475.

Feller, G. (2013). *Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology*. Scientifica, 2013.

Fusek, M., & Vetvicka, V. (2005). Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 149(1), 43-50.

Gildberg, A. (1987). Purification and characterisation of cathepsin D from the digestive gland of the pelagic squid *Todarodes sagittatus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 39(1), 85-94.

Goldman-Levkovitz, S., Rimon, A., & Rimon, S. (1995). Purification properties and specificity of cathepsin D from *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(1), 147-151.

Luna-Raya, M. C., García, J. I. U., Zavala, C. A. S., Mata, M. Á. C., & Morales, L. F. B. (2014). Diagnóstico del consumo del calamar gigante en México y en Sonora. *Economía Sociedad y Territorio*.

Martínez-Alarcón, D., Saborowski, R., Rojo-Arreola, L., & García-Carreño, F. (2018). Is digestive cathepsin D the rule in decapod crustaceans? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 215, 31-38. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.09.006>

Morales-Bojórquez, E., y Pacheco-Bedoya, J. L. (2017). A mantle length structured stock assessment model for the jumbo squid, *Dosidicus gigas*, fishery of the Ecuadorian Pacific: a limited data approach. *Marine Biology Research*, 13(4), 417-428.

Nielsen, L. B., & Nielsen, H. H. (2001). Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128(2), 351-363.

Nishimura, Y., Kawabata, T., & Kato, K. (1988). Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Archives of biochemistry and biophysics*, 261(1), 64-71.

Padilha, M. H. P., Pimentel, A. C., Ribeiro, A. F., & Terra, W. R. (2009). Sequence and function of lysosomal and digestive cathepsin D-like proteinases of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(11), 782-791.

Rojo, L., & García-Carreño, F. (2013). Cold-adapted digestive aspartic protease of the clawed lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*: biochemical characterization. *Marine Biotechnology*, 15(1), 87-96.

Rojo, L., Sotelo-Mundo, R., García-Carreño, F., & Gráf, L. (2010). Isolation, biochemical characterization, and molecular modeling of American lobster digestive cathepsin D1. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 157(4), 394-400.

Russell, N. J. (1998). Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications *Biotechnology of Extremophiles* (pp. 1-21): Springer.

Siddiqui, K. S., & Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 403-433.

Tiscar, P. G., & Mosca, F. (2004). Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Veterinary research communications*, 28, 57-62.

Venugopal, A., & Kumar, N. S. (2014). Biochemical characterization of cathepsin D from the mussel *Lamellidens corrianus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 169, 25-30.

Williamson, A. L., Brindley, P. J., Abbenante, G., Prociv, P., Berry, C., Girdwood, K., . . . Dalton, J. P. (2002). Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity. *The FASEB Journal*, 16(11), 1458-1460.

Xiao, R., Zhang, Z., Wang, H., Han, Y., Gou, M., Li, B., . . . Li, Q. (2015). Identification and characterization of a cathepsin D homologue from lampreys (*Lampetra japonica*). *Developmental & Comparative Immunology*, 49(1), 149-156.

DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para probar la hipótesis planteada, el trabajo experimental se dividió en tres etapas, las cuales se describen en los siguientes tres capítulos

Capítulo 1: caracterización de la enzima catepsina D del hepatopancreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

Este capítulo consiste en un manuscrito titulado Effect of Temperature and pH on the Secondary Structure and Denaturation Process of Jumbo Squid Hepatopancreas Cathepsin D. El manuscrito contiene información acerca del efecto que puede tener el pH y la temperatura en la estructura secundaria de la proteína.

Capítulo 2: Caracterización de catepsina D del hepatopancreas de las almejas japonesa (*Ruditapes philippinarum*) y almeja reina (*Dosinia ponderosa*)

Este capítulo consiste en el manuscrito efecto de la temperatura y pH en la estructura secundaria y el proceso de desnaturalización del hepatopancreas de la almeja reina (*Dosinia ponderosa*)

Capítulo 3: Cambios en actividad, estructura secundaria y proceso de desnaturalización de catepsina D del hepatopáncreas de la almeja reina *Dosinia ponderosa* a diferentes condiciones de temperatura y pH.

Este capítulo contiene información sobre la caracterización y purificación de catepsina D del hepatopancreas de la almeja almeja reina (*Dosinia ponderosa*) y como la temperatura y el pH afectan la estructura secundaria de la proteína.

RESEARCH ARTICLE



Effect of Temperature and pH on the Secondary Structure and Denaturation Process of Jumbo Squid Hepatopancreas Cathepsin D.



Cadena-Cadena Francisco¹, Cárdenas-López José Luis^{*1}, Ezquerro-Brauer Josafat Marina¹, Cinco-Moroyoqui Francisco Javier¹, López-Zavala Alonso Alexis², Santacruz-Ortega Hisila del Carmen³ and Rivero-Espejel Ignacio Alfredo⁴

¹Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México; ²Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México; ³Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México; ⁴Centro de Graduados e Investigación en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, Baja California, México

Abstract: Background: Cathepsin D is a lysosomal enzyme that is found in all organisms acting in protein turnover, in humans it is present in some types of carcinomas, and it has a high activity in Parkinson's disease and a low activity in Alzheimer disease. In marine organisms, most of the research has been limited to corroborate the presence of this enzyme. It is known that cathepsin D of some marine organisms has a low thermostability and that it has the ability to have activity at very acidic pH. Cathepsin D of the Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas was purified and partially characterized. The secondary structure of these enzymes is highly conserved so the role of temperature and pH in the secondary structure and in protein denaturation is of great importance in the study of enzymes. The secondary structure of cathepsin D from jumbo squid hepatopancreas was determined by means of circular dichroism spectroscopy.

Objective: In this article, our purpose was to determine the secondary structure of the enzyme and how it is affected by subjecting it to different temperature and pH conditions.

Methods: Circular dichroism technique was used to measure the modifications of the secondary structure of cathepsin D when subjected to different treatments. The methodology consisted in dissecting the hepatopancreas of squid and freeze drying it. Then a crude extract was prepared by mixing 1: 1 hepatopancreas with assay buffer, the purification was in two steps; the first step consisted of using an ultrafiltration membrane with a molecular cut of 50 kDa, and the second step, a pepstatin agarose resin was used to purification the enzyme. Once the enzyme was purified, the purity was corroborated with SDS PAGE electrophoresis, isoelectric point and zymogram. Circular dichroism is carried out by placing the sample with a concentration of 0.125 mg / mL in a 3 mL quartz cell. The results were obtained in mdeg (millidegrees) and transformed to mean ellipticity per residue, using 111 g/mol molecular weight/residue as average. Secondary-structure estimation from the far-UV CD spectra was calculated using K2D Dichroweb software.

Results: It was found that α helix decreases at temperatures above 50 °C and above pH 4. Heating the enzyme above 70°C maintains a low percentage of α helix and increases β sheet. Far-UV CD measurements of cathepsin D showed irreversible thermal denaturation. The process was strongly dependent on the heating rate, accompanied by a process of oligomerization of the protein that appears when the sample is heated, and maintained a certain time at this temperature. An amount typically between 3 and 4% α helix of their secondary structure remains unchanged. It is consistent with an unfolding process kinetically controlled due to the presence of an irreversible reaction. The secondary structure depends on pH, and a pH above 4 causes α helix structures to be modified.

Conclusion: In conclusion, cathepsin D from jumbo squid hepatopancreas showed retaining up to 4% α helix at 80°C. The thermal denaturation of cathepsin D at pH 3.5 is under kinetic control and follows an irreversible model.

Keywords: Jumbo squid, cathepsin D denaturation, circular dichroism, oligomerization, Far-UV CD, hepatopancreas.

*Address correspondence to this author at the Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México; Tel: 526621517311; Fax: 526622592207; E-mail: joseluis.cardenas@unison.mx

ARTICLE HISTORY

Received: December 20, 2018
Revised: March 22, 2019
Accepted: March 23, 2019

DOI:
10.2174/0929866526666190405124353



CAPÍTULO 2

Effect of temperature and pH in secondary structure and denaturation process of

Japanese clam (*Ruditapes philippinarum*) hepatopancreas cathepsin D

Francisco Cadena-Cadena^a, Josafat Marina Ezquerro-Brauer^a, Francisco Javier Cinco-Moroyoqui^a, Alonso Alexis López-Zavala^b, Hisila del Carmen Santacruz-Ortega^c, Ignacio Alfredo Rivero-Espejel^d, Ofelia Rouzand-Sández^a and José Luis Cárdenas-López^{*a}

^aDepartamento de Investigación y Posgrado de Alimentos, Universidad de Sonora, Hermosillo Sonora México

^bDepartamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo Sonora México

^cDepartamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Hermosillo Sonora México

^dCentro de Graduados e Investigación en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, Baja California, México

*Corresponding author:

Dr. Jose Luis Cardenas Lopez

e-mail: joseluis.cardenas@unison.mx

Tel: +52(662) 2-59-22-07

Abstract

Cathepsin D from the Japanese clam (*Ruditapes philippinarum*) hepatopancreas was purified and partially characterized by affinity chromatography on pepstatin agarose. The purification fold and yield were 37 X and 19% respectively, with a molecular weight of 36.5 kDa estimated by SDS-PAGE. The isoelectric point was 6.6 determined by isoelectric focusing. The optimal activity of the enzyme was found from pH 3.0 to 3.5 and an optimum temperature at 45°C for hemoglobin substrate. The stability remained constant at a pH of 3 to 7, retaining more than 50% of its activity at 60 min and rapidly losing the activity at pH 2, 8 and 9. As for temperature, the activity it remained above 50% at 1 hour and 30 °C. However, it decreases rapidly from and above 40 °C. The protein structure is highly conserved, but

CAPÍTULO 3

Cambios en actividad, estructura secundaria y proceso de desnaturalización de catepsina D del hepatopáncreas de la almeja reina *Dosinia ponderosa* a diferentes condiciones de temperatura y pH.

Cadena-Cadena Francisco^a, Cárdenas-López José Luis^{*a}, Ezquerro-Brauer Josafat Marina^a, Cinco-Moroyoqui Francisco Javier^a, López-Zavala, Alonso Alexis^b, Santacruz-Ortega Hisila del Carmen, Rivero-Espejel Ignacio Alfredo^e and Ofelia Rouzand Sandez^a

^a*Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos, Universidad de Sonora, Hermosillo Sonora México*

^b*Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo Sonora México*

^c*Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Hermosillo Sonora México*

^e*Centro de Graduados e Investigación en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, Baja California, México*

**Corresponding autor, joseluis.cardenas@unison.mx*

Introducción

Los factores que afectan las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas, son poco conocidos (White, 2013; White *et al.*, 1998). La catepsina D es una enzima lisosómica que se encuentra en todos los organismos actuando en el recambio proteico y recientemente se ha descubierto su participación en la degradación de proteínas del alimento (Jamdar *et al.*, 2016; Martínez-Alarcón *et al.*, 2018; Rojo *et al.*, 2013; Rojo *et al.*, 2010), en humanos, esta enzima está bien caracterizada debido a su presencia en varios tipos de carcinomas (Fusek *et al.*, 2005), es un blanco en el tratamiento de mal de Parkinson (Pal *et al.*, 2019) y actúa en la regulación de la activación de las células inflamatorias durante la pancreatitis (Aghdassi *et al.*, 2018), en organismos marinos se sabe que la catepsina D tiene una intensa actividad durante el desove (Balti *et al.*, 2010; Sales *et al.*, 2019).

Se han realizado varios esfuerzos analíticos para dilucidar la relación que existe entre la estructura de la proteína y la actividad. Los estudios de caracterización fisicoquímica y

CONCLUSIONES

- Se logró establecer la presencia de catepsina D en el hepatopáncreas de la almeja japonesa, almeja reina y calamar gigante.
- La estabilidad al pH y a la temperatura están aumentados posiblemente por la poca presencia de α hélices.
- Su temperatura de transición (T_m) es inusualmente alta comparada con la que se reporta para organismos marinos, en el caso del calamar gigante su temperatura de desnaturalización es muy similar a la reportada para otros calamares.
- Su estabilidad térmica y estabilidad al pH coincide con los cambios en su estructura secundaria.
- Se sugiere que la catepsina D es la única enzima que actúa a un pH muy ácido en la almeja japonesa, almeja reina y calamar gigante.

RECOMENDACIONES

- Modelar la estructura proteica de las catepsinas D de calamar gigante, almeja reina y almeja japonesa.
- Identificar la secuencia N-terminal de aminoácidos de la catepsina D de calamar gigante, almeja reina y almeja japonesa.
- Conocer los parámetros termodinámicos de la unión entre el inhibidor y la catepsina D de calamar gigante, almeja reina y almeja japonesa mediante la calorimetría de titulación isotérmica (ITC).
- Conocer la especificidad de la catepsina D hacia diferentes sustratos.