

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Actividad hemolítica y termoestabilidad de hemolisina dependiente de lecitina de *Vibrio parahaemolyticus*.

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

TODO LO ILUMINAN

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Ana Gabriela Robles Ruiz

Hermosillo, Sonora

Mayo de 2017

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

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Ana Gabriela Robles Ruíz la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo clínico.

Dr. Alonso Alexis López Zavala
Presidente

Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Secretario

M.C. Griselda Macrina Moreno Ibarra
Vocal

Dra. Maritza Lizeth Álvarez Ainza
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, por abrir sus puertas del conocimiento y brindarme las herramientas para mi formación profesional.

Al Proyecto de retención/2015/CONACYT.

A mi director de tesis Dr. Alonso Alexis López Zavala un agradecimiento especial por su infinita paciencia, por su presencia incondicional, enseñanza, comprensión y estar al pendiente de mi durante la realización de este proyecto porque sé que no pude ver tenido mejor director de tesis que usted.

A cada miembro del comité de tesis Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores, Mc. Gricelda Macrina Moreno Ibarra y Dra. Maritza Lizeth Álvarez Ainza por su conocimiento y apoyo brindado en esta investigación.

A los integrantes de Laboratorio de Investigación en Alimentos de la Universidad de Sonora. Dr. Eduardo Guevara, cDr. Manuel Carretas Valdez y en especial al maestro César Otero por su apoyo, por corretear cada cosas que necesitaba en laboratorio y sobre todo por poner esa chispa y entusiasmo que hacía que los días fueran más llevaderos.

A mis compañeros de laboratorio. Carolina, Adán, Nallely, Emma, Paola y en especial a Machuy por su disposición de ayudarme en lo que necesitaba.

DEDICATORIA

A Dios, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera y haberme dado la sabiduría y la fortaleza para poder llegar a concluir esta etapa, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi madre, Gaby Ruiz A. por su apoyo ilimitado e incondicional que me brinda. Gracias por tus consejos, valores inculcados, educación y sobre todo por tu amor. No me cansaré de darte gracias por todo lo que me das de una manera incondicional, porque sin ti no soy nada, te amo infinitamente, tu mi motor de vida por siempre.

A mi abuela (mami ana) y mi hermana Annie por acompañarme en los momentos importantes de mi vida y sobre todo por darme el mejor regalo, la dicha de ser tía de unos hermosos niños (Diego y Luisana) que amo con todo mi corazón.

A mi amiga Claudia Soto, gracias por acompañarme en este proceso, por tus consejos, por tu amistad, paciencia y sobre todo por ser una excelente persona y amiga.

Gracias a ti Carlos Torres por tu compañía, por soportarme día a día, y por pasar esas largas horas en el laboratorio, y sobre todo por preocuparte y estar al pendiente de mí.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
Objetivo General	14
Objetivos Específicos	14
ANTECEDENTES	15
Camarón Blanco	15
Importancia Económica del Camarón	16
Enfermedades del Camarón	18
Vibriosis <i>Vibrio</i> SP1	21
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	23
Enfermedades del Camarón Causadas por Vibrios SP y Especie <i>V. parahaemolyticus</i>	25

Hemolisinas Asociadas a <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	29
Hemolisina Termolábil Dependiente de Lecitina	30
Fosfolipasas	32
Sistemas para la Sobreexpresión de Proteínas Recombinantes	33
<i>Escherichia coli</i> y el Operon LAC como Reguladoras de la Expresión	35
METODOLOGIA	39
Producción Recombinante de la HDL en <i>E. coli</i>	39
Transformación Bacteriana	39
Preparación del Inóculo Bacteriano	40
Sobreexpresión Recombinante de la HDL	40
Lavado de Cuerpos de Inclusión	41
Replegamiento de Proteínas	42
Ensayo de Actividad de Fosfolipasa y Temperatura Óptima	43
Estabilidad Térmica de Almacenamiento	43
Actividad Lítica de La HDL Utilizando Hemocitos de Camarón	44
RESULTADOS Y DISCUSIONES	45

Transformación de cepas de <i>Escherichia coli</i> con Gen de la HDL	45
Sobreexpresión y Replegamiento in vitro de la HDL	45
Temperatura Óptima y Estabilidad Térmica	48
Actividad Enzimática	48
Temperatura Óptima	49
Estabilidad Térmica	52
Estabilidad Térmica de Almacenamiento	54
Actividad Lítica de la HDL Utilizando Hemocitos de Camarón	56
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Enfermedades más frecuentes reportadas para camarón de cultivo	19
Tabla 2	Patogenicidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> diferenciados entre humano y camarón en función de las hemolisinas	31
Tabla 3	Sistema de expresión más utilizado en <i>E. coli</i>	35
Tabla 4	Composición del buffer de lavado 2	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico del camarón	15
Figura 2	Fisiología del camarón	16
Figura 3	Camarón blanco con Vibriosis sistémica. Se aprecian manchas oscuras En el tejido muscular del organismo	22
Figura 4	Microscopía electrónica de barrido de la bacteria <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	24
Figura 5	Tinción gram de <i>Vibrio sp.</i>	24
Figura 6	Juvenil de camarón con manchas negras en su esqueleto	26
Figura 7	Juveniles de <i>Penaeus vannamei</i> con EMS (Síndrome de Mortalidad Tem- prana)	27
Figura 8	Juveniles de <i>Penaeus vannamei</i> ambos con HP afectado, indicativo de EMS	28
Figura 9	Secuencia de aminoácidos de la HDL de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
Figura 10	Diversos tipos de fosfolipasas dependiendo del sitio hidrolizado en el glicerolfosfolípido	33
Figura 11	Diagrama de los componentes del <i>operón lac</i> y su función	37
Figura 12	Gel de electroforesis SDS-PAGE del proceso de replegamiento de la HDL mediante diálisis, disminuyendo la concentración del agente desnaturalizante (urea)	47

Figura 13	Actividad de fosfolipasa de la HDL en una placa Petri con medio agarosa al 1.5 % más fosfatidilcolina al 0.1 %. A una concentración inicial de la proteína de 5. 025 mg/mL	48
Figura 14	Temperatura óptima de la actividad catalítica de la HDL incubada a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 45, 50 y 60 °C) medido en porcentaje de actividad tomando como 100 % 40 °C	50
Figura 15	Temperatura óptima de la HDL en placa agarosa-fosfatidilcolina	51
Figura 16	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad enzimática de la HDL bajo diversas temperaturas (10 -70 °C con intervalos de 10 °C) los resultados obtenidos se muestran en porcentaje de actividad relativa, tomando como 100 % la temperatura registrada a la temperatura de mayor estabilidad de la HDL (10 °C)	53
Figura 17	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad enzimática de la HDL en placa	54
Figura 18	Temperatura óptima de almacenamiento de la enzima HDL durante cinco semanas a bajas temperaturas (-80, -20 y 4 °C)	55
Figura 19	Temperatura óptima de almacenamiento de la HDL durante cinco semanas en placa realizado por cuadruplicado	56
Figura 20	Actividad lítica de la HDL utilizando hemocitos de camarón teñidos con Rosa de Bengala al 3 % incubada a temperatura ambiente	57

RESUMEN

La camaronicultura es una de las actividades de mayor importancia en términos de volumen y empleos generados. Mas, sin embargo, en los últimos años la producción ha decaído debido principalmente a las epidemias causadas por diversos patógenos, principalmente y más reciente *Vibrio parahaemolyticus*. Por tanto, es pertinente estudiar su mecanismo de patogenicidad, el cual se ha reportado puede estar mediado por proteínas del tipo hemolisinas que pueden ser factores de virulencia., Por lo anterior, el objetivo de esta investigación es determinar la actividad hemolítica y termoestabilidad de la hemolisina dependiente de lecitina (HDL) de *V. parahaemolyticus*. Para cumplir el objetivo se realizó la sobreexpresión de la HDL recombinante de *V. parahaemolyticus* en *E. coli*. La proteína fue replegada por medio de diálisis utilizando el agente desnaturalizante (urea). Además, mostro tener actividad fosfolipasa mediante un ensayo semi-cuantitativo en placa utilizando fosfatidilcolina como sustrato. Asimismo, presentó actividad hemolítica utilizando hemocitos de camarón teñidos con rosa de bengala al 3 %. Con lo que respecta a su termoestabilidad, la HDL mostró mayor actividad enzimática a una temperatura de 40 °C y demostró ser una hemolisina sensible a temperaturas superiores a 60 °C durante 15 minutos, considerándose una hemolisina termolábil. La HDL manifestó ser estable en un rango de temperatura de 10 °C a 40 °C. De igual manera demostró ser estable al ser almacenada por cinco semanas a 4 °C y -20 °C siendo esta última su temperatura óptima de almacenamiento. De acuerdo con los resultados presentados, la LDH de *V. parahaemolyticus* es una enzima termolábil y es capaz de lisar hemocitos de camarón por lo que podrías estar implicada en el mecanismo de infección de esta bacteria en camarón.

INTRODUCCIÓN

La pesca en México constituye una fuente importante de alimentos y riquezas para el país. Además, la camaronicultura es una de las actividades de mayor importancia en términos de volumen y empleos generados. Más sin embargo, en los últimos años esta actividad se ha visto severamente afectada por organismos patógenos, siendo las bacterias los agentes causales más persistentes de enfermedades como la vibriosis, provocado por bacterias de género *Vibrio*. Son varias las especies a las que se les ha asociado esta enfermedad, de las cuales las asociadas a infecciones del camarón son: *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. fluvialis*, *V.harveyi*, *V. penaeicida*, *V. vulnificus*, *V. Damsela* y recientemente *V. parahaemolyticus*. Todas estas especies tienen la capacidad de afectar al camarón en cualquiera de sus diferentes estadios de desarrollo provocando rangos de mortalidad de hasta el 100 % a las 24 horas después de aparecer la infección (Lightner DV., 1996, Ibarra Gámez *et al*, 2007). Por lo tanto, es concerniente estudiar su mecanismo de patogenicidad, siendo las Hemolisinas los principales factores de virulencia más ampliamente distribuida entre las especies de *Vibrios* patógenos.

Las Hemolisinas son un tipo de exotoxinas que produce la lisis de los eritrocitos mediante la realización de poros en la membrana citoplasmática y que ejerce diversas funciones en el proceso de infección (Shinoda S. *et al.*, 1991). Además de causar lisis en los eritrocitos (en el caso de vertebrados y hemocitos para invertebrados), está tiene la capacidad de atacar otras células como las células blancas (Miyamoto Y. *et al.*, 1969) provocando así, daños fisiológicos. Por lo antes mencionado, en la presente investigación se evaluó la actividad hemolítica de la hemolisina dependiente de lecitina (HDL) en hemocitos de camarón con la finalidad de poder elucidar el rol durante la infección de *V. parahaemolyticus*. Además, se caracterizó en términos de termoestabilidad para posteriores estudios que implican entender y conocer su estructura molecular, estructura tridimensional y el sitio activo de la proteína (HDL) con el fin de poder ser utilizada en medicina en diseño de fármacos y en biotecnología (diseño de nuevas enzimas).

HIPÓTESIS

La hemolisina dependiente de lecitina (HDL) de *V. parahaemolyticus* es una enzima termolábil y puede lisar hemocitos de camarón.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la estabilidad térmica de la hemolisina dependiente de lecitina (HDL) de *Vibrio parahaemolyticus* y su actividad hemolítica utilizando hemocitos de camarón.

Objetivos Específicos

- Obtener la HDL de forma recombinante (sobreexpresada en *E. coli*) y .en su forma enzimáticamente activa mediante replegamiento *in vitro*
- Determinar la temperatura óptima de la actividad catalítica de la HDL utilizando como sustrato fosfatidilcolina.
- Evaluar la estabilidad de la HDL a diversas temperaturas utilizando fosfatidilcolina como sustrato.
- Establecer las condiciones de almacenamiento de la HDL.
- Evaluar la actividad hemolítica de la HDL utilizando hemocitos de camarón.

ANTECEDENTES

Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*)

Es una especie de crustáceo decápodo de la familia *penaeidae*, que en su estado adulto vive y reproduce en mar abierto, donde alcanza una talla entre 15 y 20 cm de largo (gbcbiotech, 2011), mientras que los camarones jóvenes migran a los esteros, lagunas costeras y a los manglares litorales al iniciarse la primavera o en los primeros meses de estío para pasar la etapa adolescente y pre-adulta (Figura 1) (gbcbiotech, 2011; FAO, 2006).

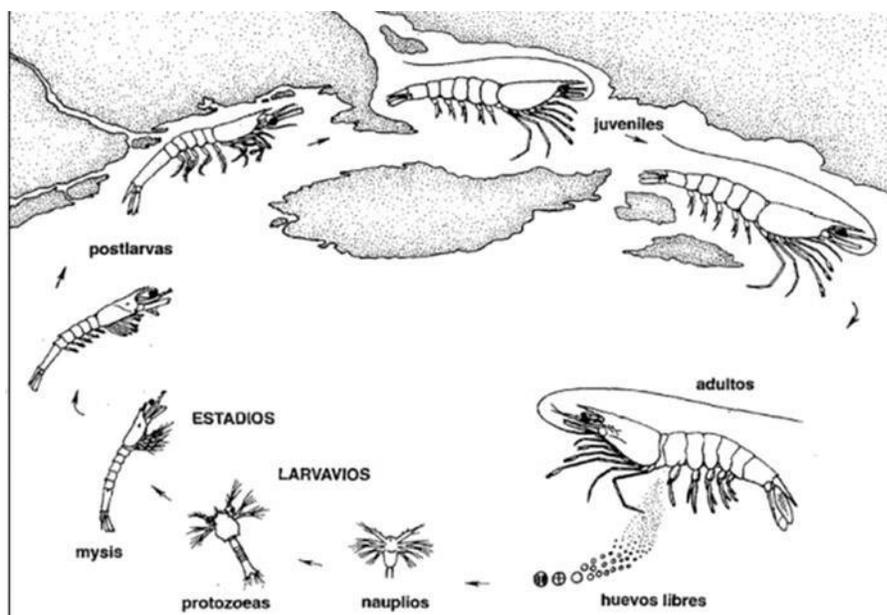


Figura 1. Ciclo biológico del camarón (FAO, 2006)

En esta etapa su cuerpo es transparente (cristalino) y son altamente voraces por lo que gracias a su alimentación crecen muy rápido, alrededor de 2 cm por mes (gbcbiotech, 2011). Los machos maduran a partir de los 20 g y las hembras a partir de los 28 g en una edad de

entre 6 y 7 meses. En la Figura 2 se muestra las principales áreas fisionómicas de una camarón blanco en su estadio adulto. Cuando *P. vannamei* pesa entre 30 y 45 g libera entre 100, 000 y 250, 000 huevos de los cuales nacen pequeñas larvas llamadas nauplios. En este estadio no requieren alimentación, sino que se nutren de su reserva embrionaria. Las siguientes etapas larvianas (protozoa, mysis y postlarva temprana) continúan siendo planctónicas por algún tiempo, se alimentan del fitoplancton y del zooplancton, y son transportados a la costa por las corrientes mareales. Las postlarvas (PL) cambian sus hábitos planctónicos unos 5 días después de su metamorfosis a PL, se trasladan a la costa y empiezan a alimentarse de detritos bénticos, gusanos, bivalvos y otros crustáceos (FAO, 2006).

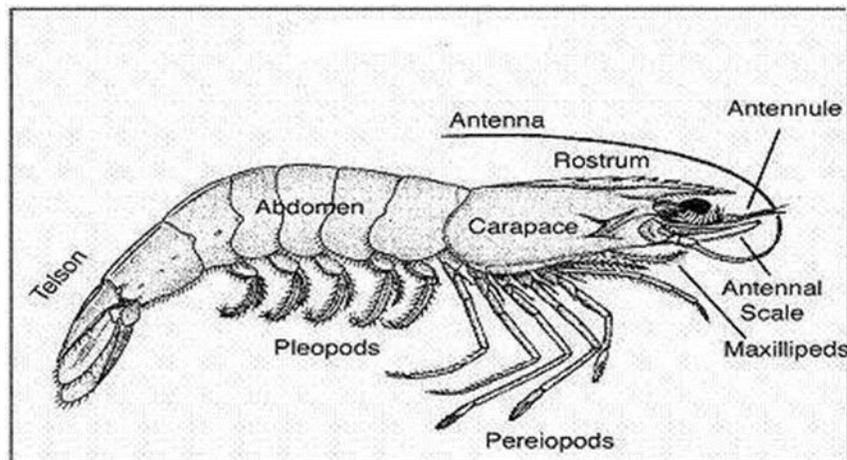


Figura 2. Fisiología del camarón (tomado de: www.ecured.cu)

Importancia Económica del Camarón

La pesca en México constituye una fuente importante de alimentos y riquezas para el país en virtud de la extensión de su litoral, 11 mil 122 kilómetros (SIAP, 2013). Además, la captura de camarón es una de las actividades de mayor importancia en términos de volumen y empleos

generados. Se produce tanto por captura en las zonas costeras como por acuicultura, la tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años ha sido de 6.24 %, lo cual se debe al crecimiento de la actividad de dicha especie (gbcbiotech, 2011). Las principales especies de cultivo y captura de camarón son: camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), azul (*Litopenaeus stylirostris*), café (*Farfantepenaeus californiensis*), blanco del sur (*Litopenaeus occidentalis*), cristal o rojo (*Farfantepenaeus brevisrostris*) (SAGARPA, 2012). El camarón tuvo una producción record en el 2008 y 2009 de 196, 299 ton y 196, 456 ton, respectivamente. Para el 2013 la producción de camarón cayó en un 37 % respecto al 2012 en volumen de captura. Sin embargo, su valor económico (7, 550 millones de pesos) solo represento una disminución del 1 % (SAGARPA, 2013).

Sonora es la entidad del país que ocupa el primer lugar en producción pesquera de México, con una aportación del 36.7 % del volumen y del 17.4 % del valor de la producción. La entidad cuenta con mil 207.81 kilómetros de litoral, equivalentes al 10.9 % de la extensión nacional de las costas. De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), de la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el 2014 Sonora produjo 507 mil 736 de toneladas de especies pesqueras. Refirió que el valor de la producción marina al cierre del año pasado fue de 3 mil 879 millones de pesos ocupando el camarón el segundo lugar en volumen con 38 mil 937 toneladas. Lo cual representa la primera posición en cuanto al valor comercial con dos mil 394 millones de pesos (SIAP, 2012). Sin embargo, esta actividad se ha visto severamente afectada por diversos tipos de enfermedades que han mermado su producción. Siendo una de las principales problemáticas la devastación que experimentó el cultivo del crustáceo en las entidades de Sonora y Sinaloa por el síndrome de la muerte temprana, que apareció en 2012 y provocó una caída de entre 30 y 40 por ciento de rendimiento ocasionando así, que en 2012 y 2013 se perdiera un millón de toneladas en Sonora, Sinaloa y Nayarit, lo cual repercutió en la disminución del empleo, pues en 2012 las granjas camaroneras daban trabajo a siete mil personas, y un año después, a sólo dos mil 500, según reportes de productores. En estimaciones realizadas por la SAGARPA se cree que la producción de camarón en granjas acuícolas de los Estados de Sinaloa y de Sonora volverá a alcanzar 87 mil toneladas anuales para el año 2017. Esta pronta recuperación se pronostica debido a que las granjas de camarón son las que ocupan mayor espacio, con 86 mil 438 hectáreas en las cuales existe un registro de 9 mil 230 unidades de producción acuícola. Además, la Comisión Nacional de Acuicultura y

Pesca (Conapesca), sostuvo que la situación ha mejorado en el año 2015, ya que la sobrevivencia en las granjas de camarón en el Estado de Sinaloa es superior a 70 % generando una producción de 86 mil toneladas. De la producción total de camarón en Sonora, el 85 % de obtiene del sector acuícola a través de granjas de cultivo, mientras que el 15 por ciento restantes se extrae de bahías y altamar de las costas de la entidad (SIAP, 2015)

Enfermedades del Camarón

La camaronicultura surgió debido a la creciente demanda del consumo del camarón y de forma inherente, al agotamiento de sus reservas naturales ocasionado por la sobrepesca. La industria del cultivo de camarón en América Latina ha surgido como una de las fuentes de mayor generación de divisas de la región. Sin embargo en los últimos años la producción del camarón ha decaído (PROAQUA, 2007), debido principalmente a las epidemias de varias enfermedades que se han presentado (Tabla 1). El 94 % de las granjas de camarón están situadas en el golfo de California en las costas de los estados de Sonora, Nayarit y Sinaloa. En estas entidades se han presentado enfermedades con altas mortalidades como la causada por el virus de la mancha blanca (WSSV). En tanto que en Nayarit se reportaron grandes pérdidas de la producción a causa de la necrosis infecciosa viral del tejido hipodérmico y hematopoyético (IHHNV) causada por el virus que lleva el mismo nombre (gbcbiotech, 2011). Actualmente para el diagnóstico de estas enfermedades existen métodos comerciales que permiten una detección precisa y oportuna de dichas enfermedades, los cuales se basan en técnicas moleculares (como la reacción en cadena de la polimerasa), Estas herramientas son de gran utilidad en México para la industria camaronícola ya que permiten un diagnóstico y, en su caso, las estrategias preventivas o resolutivas correspondientes (gbcbiotech, 2011)

Tabla 1. Enfermedades más frecuentes reportadas para camarón de cultivo (FAO 1995, imágenes tomadas de la revista PROAQUA,2007).

Enfermedad	Agente	Tipo	Síndrome	Medidas	Imagen
Mancha blanca (WSD); también conocida como WSBV o WSSV	Virus del síndrome de manchas blancas, complejo (recientemente reclasificado en una nueva familia como nimavirus)	Virus	El camarón severamente infectado manifiesta reducción en el consumo de alimentos, letargo; alta mortalidad, hasta del 100 por ciento entre 3 y 10 días a partir de la manifestación de signos clínicos; cutículas sueltas con manchas blancas de 0,5–2,0 mm de diámetro, más evidentes dentro del caparazón; el camarón moribundo muestra coloración entre rosada y rojiza-café debido a la expansión de cromatóforos cuticulares y escasas manchas blancas	Uso de cepas libres de patógenos específicos (SPF); lavar y desinfectar los huevos/nauplios con yodo, formalina; tamizar y separar los reproductores, los nauplios, las postlarvas y los juveniles; evitar cambios bruscos de calidad del agua; mantener temperatura del agua >30 °C; evitar el estrés; evitar uso de alimentos frescos; minimizar recambio de agua para evitar entrada de portadores de virus; tratamiento a estanques e incubadoras infectados con cloro a 30 ppm para matar el camarón infectado y a los portadores; desinfección de equipo.	 <p>Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California A.C. (2010)</p>
Síndrome del Taura (TS); también conocido como Virus del Síndrome de Taura (TSV) o Enfermedad de Cola Roja	Virus de ARN de una sola banda (Picornaviridae)	Virus	Ocurre durante la única muda en los juveniles a los 5 a 20 días tras la siembra, o tiene un curso crónico de varios meses; debilidad, caparazón blando, tracto digestivo vacío y expansión difusa de cromatóforos rojos en los apéndices; la mortalidad varía de 5 a 95 por ciento; los sobrevivientes pueden presentar lesiones negras y ser portadores de por vida.	Uso de cepas libres de patógenos específicos o resistentes a patógenos específicos; lavar y desinfectar huevos y nauplios; limpiar y desinfectar vehículos y equipo contaminado; ahuyentar aves (vectores); destruir el stock y desinfectar totalmente las instalaciones.	
Necrosis infecciosa hypodermal y hematopoiética (IHHNV), causando	Parvovirus sistémico	Virus	Baja mortalidad de <i>P. vannamei</i> ; resistente; pero hay una reducción en la alimentación y baja	Uso de cepas libres de patógenos específicos SPF y resistentes a patógenos específicos (SPR); lavar y desinfectar huevos y nauplios;	

Síndrome de Deformidad Runt (RDS)			eficiencia en alimentación y crecimiento; deformaciones cuticulares (rostrum encorvado – RDS) ocurren en <30 por ciento de la población infectada, mayor variación en el peso a la cosecha final y menor precio de mercado.	desinfección total de las instalaciones de cultivo para evitar la reintroducción.	
Necrosis de la Glándula Intestinal (BMN); también conocida como enfermedad de la glándula intestinal turbia, enfermedad del hígado blanco turbio o enfermedad turbia blanca	Baculovirus entérico no ocluido	Virus	Infecta los estadios larvales y postlarvales, causando una gran mortandad; turbiedad blanca del hepatopancreas causado por necrosis del epitelio tubular; la larva flota inactiva en la superficie; en etapas posteriores muestra resistencia; los reproductores portadores también son una fuente de infección.	Separar los huevos de las heces, lavar huevos y nauplios con agua de mar limpia y desinfectarlos con iodo y/o formalina; desinfectar instalaciones infectadas para evitar nuevos brotes.	
Vibriosis sistémica, síndrome de mortalidad temprana (EMS) y necrosis hepatopancreática (NHP)	Vibrio spp. particularment e <i>V. harveyi</i> & <i>V. parahaemolyticus</i>	Bacteria	Puede causar varios síndromes importantes. En estanques, los altos niveles de vibrios se asocian con la decoloración roja del camarón (especialmente en las colas) y necrosis interna y externa; una segunda infección resultado de un pobre manejo ambiental debilita al camarón, el cual es susceptible de infecciones virales.	Manejo cuidadoso del sistema. En incubadoras, desinfectar las instalaciones, equipo, agua y trabajadores; utilizar alimentos vivos libres de bacterias; cubrir tanques de cultivo con cubiertas de plástico para evitar la transferencia a los estanques. En estanque, prevenir con preparación apropiada; control de florecimientos algales; agua limpia y manejo de alimento; controlar la densidad de siembra y la aireación para mantener condiciones ambientales óptimas a lo largo del ciclo de cultivo.	 

Vibriosis (*Vibrio* sp1.)

Se han identificado más de 35 especies del género *Vibrio*, de las cuales 12 son “vibriones marinos”, gérmenes ambientales que no se han asociado a una patología humana. El resto de las especies de *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. hollisae*, *V. mimicus*, entre otros), producen gastroenteritis, infección de heridas y tejidos blandos además de sepsis/bacteriemia (Seas C. y Gotuzzo E., 2005).

En Japón y los países de Asia Oriental se ha reconocido a *Vibrio parahaemolyticus* como la principal causa de gastroenteritis transmitida por alimentos, como lo son mariscos o pescados de mar crudos o cocidos de manera inadecuada (Twedt RM., 1989). Otra especie de *Vibrio* que causa problemas en humanos es *V. vulnificus* causando septicemia primaria en individuos con enfermedades crónicas, después del consumo de bivalvos, esta enfermedad se ha asociado casi exclusivamente al consumo de ostras (Oliver JD., 1989). De la misma manera, la especie *V. cholerae*, es la más destacable asignándosele el serogrupo O1 (denominadas así porque se aglutinan con el antisuero O1) son causantes de los casos clásicos de cólera pandémico. Las cepas no-O1 del *V. cholerae* y el resto de las especies no causan síndromes diarreicos tan graves y producen más frecuentemente infecciones extraintestinales (Seas C., y Gotuzzo E. 2005.; World Health Organization, 2000). Estas cepas de *Vibrio* son muy importantes clínicamente en humanos, más sin embargo, las enfermedades mencionadas son ocasionadas por vectores de los cuales algunos están relacionado con la industria acuícola. Por lo tanto, las enfermedades bacterianas representan una de las mayores problemática asociadas a esta industria que producen una significativa baja producción de cultivo y por consiguiente causan pérdidas económicas importantes y aumento del desempleo en las comunidades asociadas a esta actividad productiva.

Por otro lado, *Vibrio* sp. Es una bacteria gram negativa (-) de la familia *Vibrionaceae*, que forma parte de la microflora natural de las aguas marinas al igual que de los camarones silvestres y de cultivo (Sinderman CJ., 1990), siendo estos últimos los más susceptibles. Estas bacterias se convierten en patógenos oportunistas cuando los mecanismos de defensa están suprimidos (Brock JA. y Lightner DV., 1990). El género *Vibrio* está formado por un grupo de

diversos organismos marinos que contienen 35 especies, de las cuales, las asociadas a infecciones del camarón son: *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. fluvialis*, *V.harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. penaeicida*, *V. vulnificus* y *V. Damsela*. Todas estas especies tienen la capacidad de afectar al camarón en cualquiera de sus diferentes estadios de desarrollo provocando rangos de mortalidad de hasta el 100 % a las 24 horas después de aparecer la infección (Ibarra Gámez *et al*, 2007). Los camarones que sufren de vibriosis pueden presentar diferentes síndromes como vibriosis cuticular y de apéndice, infecciones localizadas en heridas, vibriosis sistémica (Figura 3) y hepatopancreatitis, además de vibriosis oral y entérica (Lightner DV., 1996).

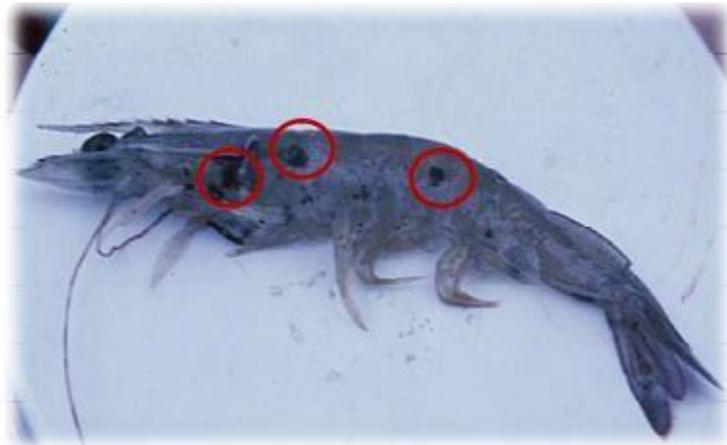


Figura 3. Camarón blanco con vibriosis sistémica. Se aprecian manchas oscuras en el tejido muscular del organismo (Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California A.C.).

Vibrio parahaemolyticus

V. parahaemolyticus es una bacteria de forma bacilar, gram negativa, de hábitat marino, por tanto es una bacteria halófila, crece en condiciones de salinidad entre el 3 al 8 %, es móvil, crece a temperatura entre 10 – 44°C con n óptimo crecimiento de 35 – 37 °C y su tiempo de replicación estimado es de 10 a 12 minutos (Figura 4 y 5). Este microorganismo es anaerobio facultativo con un metabolismo oxidativo y fermentativo, produce catalasa, fermenta glucosa sin producción de gas, fermenta manitol, arabinosa y manosa pero no fermenta sacarosa, lactosa inositol y ramnosa, la producción de ureasa es variable (Zamora-Pantoja DR. y Quiroz-Santiago C., 2005). Además de todas estas características *V. parahaemolyticus* cuenta con una gran diversidad y sus miembros pueden diferir hasta un 60 % en la secuencia del ADN de sus genomas (Makino *et. al.*, 2003) siendo bastante clara esta diversidad en *V. parahaemolyticus* ambientales aislados de agua de mar. Sin embargo, en las epidemias recientes, esta diversidad es indetectable en aquellos Vibrios aislados de las deposiciones de pacientes con infecciones producidas por esta bacteria (Daniels NA., 2000 ; Oliver JD. y Kaper JB., 1997).

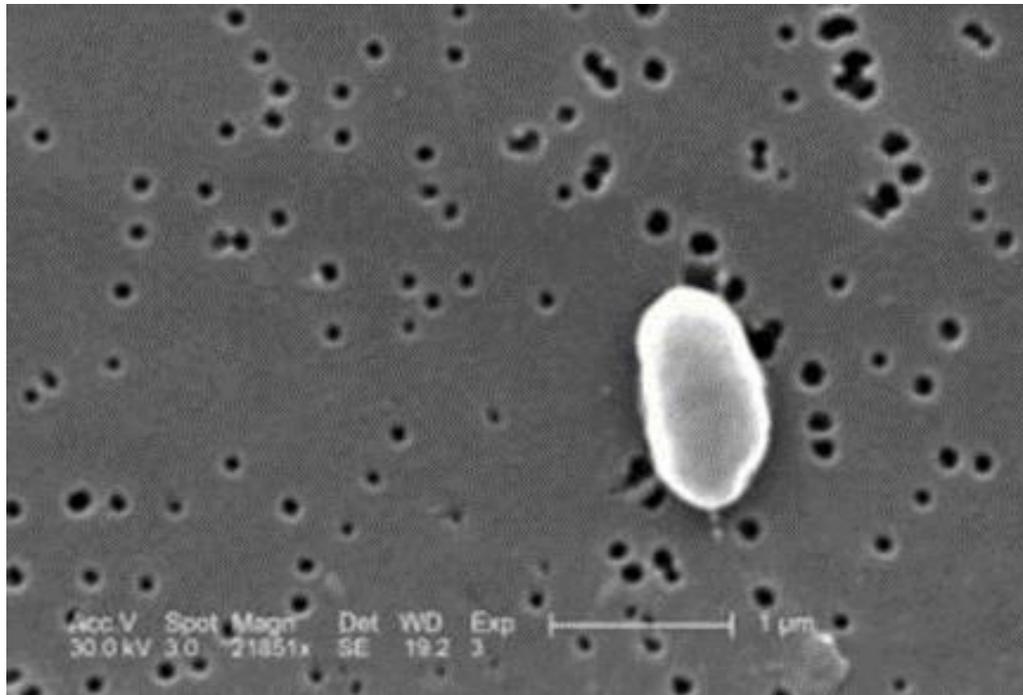


Figura 4. Microscopia electrónica de barrido de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* (Tomado de: Pontificia Universidad Católica de Chile)

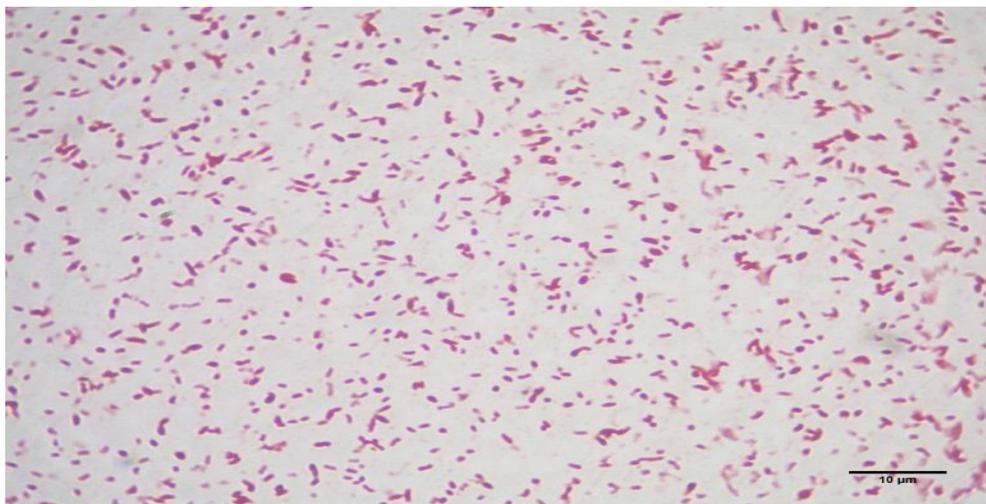


Figura 5. Tinción gram de *Vibrio* sp. (Tomado de: <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xvp/xvp01.html>).

Enfermedades del Camarón Causadas por *Vibrios sp.* y Especie *V. parahaemolyticus.*

El género de *Vibrio* tiene la capacidad de afectar los distintos estadios del desarrollo del camarón, provocando rangos de mortalidad variables dependiendo del sitio u órgano infectado (Morales V. y Cuéllar AJ. 2008). Este género coexiste normalmente en los animales de cultivo, colonizando principalmente el tracto digestivo, los branquias y la cutícula (Morales Covarrubias MS., 2008). El proceso infeccioso se presenta cuando la bacteria ingresa al interior del organismo, a través del intestino medio y se extiende a los demás órganos vía hemolinfa, causando primeramente lesiones como hepatopáncreas endémico y alto grado de vacuolización de células epiteliales en este órgano (Morales Covarrubias MS., 2013). El proceso infeccioso progresa generando infecciones generalizadas involucrando cutícula, hepatopáncreas, órganos linfoides, corazón, glándula antenal, hemolinfa y músculo (Morales Covarrubias MS., 2008). Las enfermedades de origen bacteriano que actualmente se encuentran presentes en la camaronicultura que se practica en el continente americano son: la enfermedad de la Astilla negra, enfermedad del camarón manchado, Vibriosis sistémica, Síndrome de la gaviota, Vibriosis luminiscente y camarones rojos, causadas principalmente por *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. harveyi*, cuyos porcentajes de prevalencia son del 10 al 60 % (PROAQUA, 2007).

Los camarones adultos que sufren de vibriosis pueden parecer hipóxicos, mostrando un enrojecimiento del cuerpo con branquias rojas o marrones, reducir su alimentación y puede ser observado nadando letárgicamente en el borde y la superficie de los estanques (Anderson IG. *et al.*, 1988; Nash G. *et al.*, 1992). Así mismo, *Vibrio sp.* causa la enfermedad de las patas rojas, caracterizada por una coloración roja de los, periópodos y branquias. En camarones juveniles y adultos puede causar una mortalidad de hasta el 95 % durante la estación cálida (Chen D., 1992). Por otro lado, la enfermedad de la necrosis ocular es causado por la bacteria *V. cholerae*, los globos oculares de los camarones infectados se vuelven marrón y se caen, la mortalidad se presenta en pocos días después de detectada la enfermedad (Chen D., 1992).

Específicamente, 6 especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* y *V. splendidus*) están asociados con las enfermedades del camarón y son consideradas de importancia sanitaria, de las cuales las especies *V. harveyi* y *V.*

splendidus causan luminiscencia, el cual es visible durante la noche, y se ha reportado que pueden infectar tanto las postlarvas, juveniles y adultos de camarón (Ruby EG. *et al.*, 1980; Lightner DV., *et al.*, 1992). Las postlarvas infectadas pueden exhibir una mortalidad reducida, disminución de fototaxismo e intestinos vacíos (Chen, 1992). Una de las enfermedades más comunes en los laboratorios productores de larvas, de *P. vannamei* y de *P. stylirostris* es el llamado síndrome de bolitas, cuyo agente etiológico es *V. harveyi*, el cual puede presentar grandes mortalidades de larvas de los crustáceos mencionados (Álvarez JD. *et al.*, 1999), alcanzado pérdidas de la población de hasta el 100 % a las 24 horas de aparecer la infección (Ibarra-Gómez JC., 2007). Por otro lado, también se ha reportado que algunos lotes de juveniles mantenidos en acuarios, luego de su llegada al laboratorio desarrollaron manchas marrones oscuras, sobre todo en el exoesqueleto (Figura 6); de estas lesiones se obtuvieron cultivos casi puros de *V. harveyi*. Otro grupo de juveniles, esta vez mantenidos en una laguna de engorda, presentaron mortalidades a causa de una septicemia bacteriana, aislándose nuevamente cepas de *V. harveyi* en forma casi pura (Álvarez JD. *et al.*, 1999).



Figura 6. Juvenil de camarón con manchas negras en su esqueleto (CENIAP-FONAIP 1999).

Las epidemias masivas en Tailandia (Nash *et al.*, 1992) y Filipinas (Lavilla- Pitogo *et al.*, 1990) han sido ocasionadas por las cepas patogénicas de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. harveyi*, siendo esta última una bacteria luminiscente que parece liberar exotoxinas (Liu PC.

et al., 1996) y puede causar una mortalidad del 80-100 % en los estanques de engorda de *P. monodon* (Harris, 1995). Recientemente, se ha reportado que la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* es el agente causal de la enfermedad, conocida como síndrome de mortalidad temprana del camarón (EMS, por sus siglas en inglés) o síndrome de necrosis hepatopancreática aguda (AHPNS, siglas en inglés (FAO, 2006) (Figura 7 y 8). Desde su aparición en China en el año 2009, esta enfermedad ha producido pérdidas económicas significativas entre los productores de camarón. En el año 2011, las explotaciones acuícolas en Hainan, Guangdong, Fujian y Guangxi sufrieron casi un 80 % de pérdidas. Esta enfermedad se ha ido diseminando a Vietnam (2010), Malasia (2011) y Tailandia en el 2012. Para el año 2013 se reportó un 30 % de pérdidas anuales debido a la presencia de esta enfermedad. La producción en algunas explotaciones en las regiones orientales de Tailandia se ha reducido en un 60 %, en estos países es donde se ha reportado oficialmente la enfermedad, más sin embargo desde marzo de 2013 se está presentando un cuadro de enfermedad y mortalidad temprana de camarones muy similar al asiático en varios estados de México (Center for Food Security and Public health, 2013).



Figura 7. Juveniles de *Penaeus vannamei* (Vietnam). EMS (lado izquierdo); normal (lado derecho) (Cuéllar-Anjel J. , 2013).



Figura 8. Juveniles de *Penaeus vannamei* ambos con HP afectado, indicativo de EMS. HP: Hepatopancreas; EMS: síndrome de mortalidad temprana. (Lightner DV., 2014).

La enfermedad AHPNS afecta a *Penaeus monodon* y *Litopenaeus vannamei* y se caracteriza por mortalidades masivas, alcanzando en algunos casos hasta un 100 % en los estanques afectados, durante los primeros 10-30 días de cultivo (etapas de engorde) y pocos días después de los primeros signos de la enfermedad (Center for Food Security and Public health, 2013). Estos investigadores encontraron que este agente es transmitido vía oral por los detritos que se encuentran en la columna de agua y el fondo del estanque, colonizando el tracto digestivo, produciendo toxinas y causando en la fase aguda una disfunción de las células del hepatopáncreas (HP), en donde se destruyen las células E, R, F y B, y además producen el desprendimiento de las células epiteliales tubulares, inflamación hemocítica y necrosis muy marcada del HP. En la fase terminal, adicional al desprendimiento de las células epiteliales, se presenta una infección secundaria bacteriana masiva. Los signos clínicos durante la aparición de la enfermedad, se presenta disminución de la ingesta de alimento que progresa hasta anorexia, aumenta la tasa de conversión de alimento, letargia, intestino vacío, cromatóforos expandidos, flacidez, caparazón blando, palidez generalizada, branquias amarillas o café, hepatopáncreas atrófico y blanquecino con melanización, colas delgadas, superficies con mal olor por presencia de epicomensales, lesiones bacterianas en la superficie, o apéndices melanizados, bordes oscuros en urópodos y pleópodos (Center for Food Security and Public health, 2013). Cabe señalar que esta toxina no afecta al humano debido a que la cepa aislada “no parece tener los genes que confieren virulencia en las infecciones en humanos”, según lo comentado por el Dr. Donald Lightner en 2014.

Hemolisinas Asociadas a *Vibrio parahaemolyticus*

Las Hemolisinas son un tipo de exotoxina que produce la lisis de los eritrocitos mediante la realización de poros en la membrana citoplasmática y es una de las toxina más ampliamente distribuida entre las especies de *Vibrios* patógenos y que ejerce diversas funciones en el proceso de infección (Shinoda S. *et al.*, 1991). Además de causar lisis en los eritrocitos (en el caso de vertebrados y hemocitos para invertebrados), ésta tiene la capacidad de atacar otras células como las células blancas (Miyamoto Y. *et al.*, 1969) siendo considerado un factor de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* y otro gran número de bacterias.

Los factores de virulencia principales de *Vibrio parahaemolyticus* son la hemolisina directa termoestable (por sus siglas en inglés "TDH") y la hemolisina relacionada a la TDH (por sus siglas en inglés TRH) y factores de adherencia que interactúan con los receptores superficiales de la célula huésped (Akaeda Y. *et al.*, 1997). Estas dos hemolisinas son codificada por dos tipos de genes distintos *tdh* (*tdha* y *tdhs*) y *rth*, respectivamente. Este último gen presenta una secuencia de nucleótidos 68 % homóloga al gen *tdh* y desempeña un papel significativo durante el desarrollo de la enfermedad (Bej AK. *et al.*, 1999; Zhang XH. y Austin B., 2005). Además, a diferencia de *Vp-tdh*, *Vp-trh* es inactivado por calor a 60 °C durante 10 minutos (Honda, 1993). Gran parte de las cepas clínicas de *Vibrio parahaemolyticus* son beta-hemolíticos y se cultivan en agar Wagatsuma (contiene eritrocitos de humano); debido a este suceso se le conoce como fenómeno de Kanagawa y es considerado como un factor de virulencia determinante para la producción de enfermedad en humanos (Okuda *et al.*, 1997). Mientras que ambos genes mencionados anteriormente son marcadores patogénicos, algunas cepas de *V. parahaemolyticus* presentan el gen *tth* que codifica para otra toxina, la hemolisina termolábil, la cual es un marcador específico para ciertas cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (Nordstrom JL. *et al.*, 2007). Los genes *tdh* están presentes en el 90 - 99.8 % de los aislamientos de cepas clínicas, mientras que solamente el 0.2 al 10 % de los aislamientos ambientales son potencialmente patogénicos y son positivos para el gen *tth* (Martínez-Urtaza J *et al.*, 2008).

Hemolisina Termolábil Dependiente de Lecitina

Yanagase Y. *et al.* (1970) reportaron un factor hemolítico asociado a *Vibrio parahaemolyticus* que se activó por la adición de lecitina (fosfatidilcolina) al medio de cultivo, este factor fue nombrado como hemolisina dependiente de lecitina o hemolisina termolábil (por sus siglas en inglés "LDH), lo cual se ha reportado que también puede tener actividad de fosfolipasa. La Hemolisina termolábil (HDL) se encuentra en todas las cepas de *V. parahaemolyticus*, pero no en otras especies. Pruebas genéticas basadas en PCR y algunos otros procedimientos como separación inmunomagnética (IMS) han sido desarrollados para detectar el gen de *tlh* en *V. parahaemolyticus* (Takeda Y. *et al.*, 1983; Honda T. *et al.*, 1998) estas técnicas al igual que el método de siembra inmunológica directa (SID) y el método estándar de hibridación de ADN han permitido distinguir entre *V. parahaemolyticus* patogénico (*tdh+*) y no patogénico (*tdh -*) (Senevirathne RN. *et al.*, 2008) (Tabla 2).

La LDH no solo hidroliza fosfatidilcolina (PC) a alisifosfatidilcolina (LPC) si no también LPC a glicerofosforilcolina (GPC). Las fosfolipasas tipo A se define como una enzima que hidroliza uno de los dos ésteres de ácidos grasos de fosfolípido y la fosfolipasa B como una enzima que hidroliza ambos ésteres, de acuerdo con esta definición, la LDH debe clasificarse como fosfolipasa B. Sin embargo, la actividad contra LPC (monoglicerido) de la típica fosfolipasa B obtenida a partir de diversas fuentes es mucho mayor que contra PC (diglicerido). La fosfolipasa B no tiene actividad hemolítica debido a que el producto final GPC ya no es un detergente. Por otro lado, LPC formado por acción de la fosfolipasa A es un detergente que perturba a las membranas de los eritrocitos conduciendo a la hemólisis (Shinoda S. *et al.*, 1991).

Tabla 2. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* diferenciados entre humano y camarón en función de las hemolisinas.

Especie/organismo	Marcadores patogénicos
Camarón	<i>Tlh</i> (+), <i>Tdh</i> (-), <i>Trh</i> (-)
	<i>Tlh</i> (+), <i>Tdh</i> (-), <i>Trh</i> (+)
	<i>Tlh</i> (+), <i>Tdh</i> (+), <i>Trh</i> (+)
Humanos	<i>Tlh</i> (-), <i>Tdh</i> (+), <i>Trh</i> (+)
	<i>Tdh</i> (+), <i>Trh</i> (-)
	<i>Tdh</i> (+), <i>Trh</i> (+)
	<i>Tdh</i> (-), <i>Trh</i> (+)

Aunque la HDL hidroliza a LPC, la velocidad de reacción es mucho menor que la fosfolipasa B. Por lo tanto, el intermedio, LPC, es relativamente estable y presenta una cantidad suficiente para causar hemólisis. Por lo contrario, con la adición de demasiada HDL disminuye la actividad hemolítica frente a eritrocitos de cordero debido a la rápida hemólisis de LPC. Por lo tanto, la HDL de *Vibrio parahaemolyticus* está clasificada como una fosfolipasa atípica, una fosfolipasa B excepcional, o un nuevo tipo de enzima que debe ser designada como fosfolipasa tipo A con actividad de lisofosfolipasa (Gassama-Diagne J. *et al.*, 1989).

El gen hemolisina *tlh* consiste de un marco de lectura abierto de 1254 pb (Shinoda *et al.*, 1991), a partir de la secuencia de la HDL (Figura 9) se dedujo que el la proteína sufre una modificación pos-traducciona lo que genera una pre-LDH y la proteína madura consistía de 418 y 398 aminoácidos con un peso molecular correspondiente 47.5 y 45.3 kDa, respectivamente (Shinoda S. *et al.*, 1991).

MMKKTITLLTALLPLASAVAEPTLSPEMVSASEVISTQENQTYTYVRCWYRTSYSKDDPATDW
EWAKNEDGSYFTIDGYWWSSVSFKNMFYTNNTSQNVIRQRCEATLDLANENADITFFAADNRFS
YNHTIWSNDAAMQPDQINKVVALGDSLSDTGNIFNASQWRFPNPNSWFLGHFSNGFVWTEYIA
KAKNLPLYNWAVGGAAGENQYIALTGVDQVSSYLTYAKLAKNYKPANTLFTLEFGLNDFMNY
NRGVPEVKADYAEALIRLTDAGAKNFMLMTLPDATKAPQFKYSTQEEIDKIRAKVLEMNEFIKAQ
AMYYKAQGYNITLFDTHALFETLTSAPEEHGFVNASDPCLDINRSSSVDYMYTHALRSECAASG
AEKFVFWNVTHPTTATHRYVAEKMLESSNNLAEYRF

Figura 9. Secuencia de aminoácidos de la hemolisina dependiente de lecitina (HDL) de *Vibrio parahaemolyticus*.

Fosfolipasas

Como se mencionó anteriormente, la hemolisina dependiente de lecitina o “HDL” tiene actividad de fosfolipasa (Yanagase Y. *et al.*, 1970). Esta actividad enzimática está directamente relacionado con su capacidad hemolítica. Así mismo, esta actividad de fosfolipasa ha resultado de mucha utilidad para la caracterización de esta proteína aislada de otros organismos. Por lo a continuación se hace una breve descripción sobre los diferentes tipo de fosfolipasas. Estas enzimas son moléculas capaces de romper los fosfolípidos de membrana y se nombran dependiendo del punto en que cortan a ese fosfolípido (Figura 10).

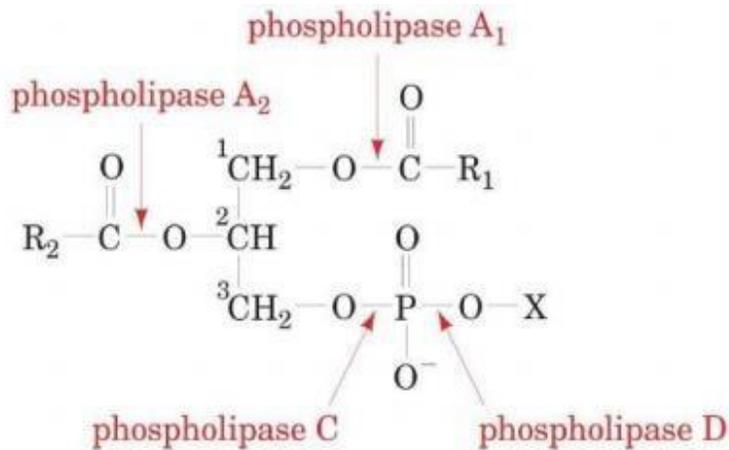


Figura 10. Diversos tipos de fosfolipasas dependiendo del sitio hidrolizado en el glicerolfosfolípido (Voet D. y Voet JD., 2007).

Las fosfolipasas hidrolizan los glicerolfosfolípidos. Las estructuras químicas incluidas las cadenas de acilo graso y los grupos cabeza de los glicerolfosfolípidos pueden determinarse a partir de los productos de las reacciones hidrolíticas catalizadas por las enzimas conocidas como fosfolipasas (Voet D. y Voet JD., 2007). Por ejemplo la hemolisina de *V. parahaemolyticus* está clasificada como una fosfolipasa A₂ por lo que pertenece a la familia de enzimas que hidrolizan el enlace éster del C-2 de los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos, principalmente el ácido araquidónico y lisofosfolípidos (Valdés-Rodríguez YC. *et al.*, 2002). Siendo este último como denota su nombre, un detergente poderoso que desorganiza las membranas celulares y provocando de esta manera la lisis de las células (Voet D. y Voet JD., 2007).

Sistemas para la Sobreexpresión de Proteínas Recombinantes

El sistema de expresión consiste en un conjunto de elementos genéticos configurados de manera óptima para el control de la transcripción y traducción de las secuencias a expresar (Makrides SC., 1996; Sørensen H.P y Mortensen KK., 2005). El sistema de expresión en

Escherichia coli está constituido por dos componentes: una bacteria huésped y un vector de expresión que posee los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicha bacteria. Con el objetivo de obtener altos niveles de expresión de la proteína de interés es necesario estudiar la influencia de diferentes factores en el proceso de producción, los cuales pueden agruparse en genéticos y fisiológicos (García J. *et al.*, 2013). Entre los genéticos se encuentran: el número de copias del vector de expresión (el número de copias del plásmido en *E. coli* puede variar desde 1 hasta 2 000 por célula, en dependencia de su origen de replicación en la bacteria (Nordström K. y Uhlin BE., 1992), características del gen, estabilidad del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), promotor empleado y cepa utilizada (García J. *et al.*, 2013).

La segregación plasmídica es de gran importancia en el mecanismo de retención del vector en la célula. El mecanismo clásico para evitar el inconveniente de la segregación es la coexpresión en el vector de un gen codificante para la resistencia a un marcador de selección, generalmente un antibiótico, de manera que únicamente las células que posean en su interior el vector, serán capaces de propagarse en un medio de cultivo que contenga el marcador de selección. Otro mecanismo que previene la pérdida del vector y evita el uso de antibióticos es la inclusión en el vector de regiones cromosómicas que complementen la auxotrofia de una determinada cepa bacteriana (Vidal L. *et al.*, 2008), es decir, únicamente las células que contengan el vector serán capaces de crecer en un medio de cultivo que carezca del elemento para el que la cepa es auxótrofa.

La cepa de *Escherichia coli* más utilizada en los sistemas de expresión es la *BL21*, debido a que es defectiva en las proteasas *OmpT* y *Lon*, involucradas en la degradación de proteínas. En función del sistema de expresión empleado, la cepa puede contener el módulo regulador de la expresión integrado en el cromosoma. En el caso concreto de los sistemas de expresión pET (Novagen®) y pRSET (Invitrogen®) la cepa de expresión contiene el ADN del bacteriófago *DE3* integrado en el cromosoma. Este bacteriófago contiene a su vez el gen codificante de la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor *lacUV5* cuya actividad se induce por medio de la adición del inductor IPTG (Isopropyl-D-thiogalactopyranosido). En este sistema, el vector de expresión pET utilizado para la expresión de la secuencia codificante de la proteína de interés, incorpora una región promotora reconocida por la T7 RNA polimerasa, de manera que tras la adición del IPTG, la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano

induce la expresión de la proteína a partir del vector. En el caso de los sistemas *pGEX* (GE Healthcare®), *pQE* (QIAGEN®), *pTrc* (Invitrogen®), *pBAD* (Invitrogen®) la expresión de las proteínas recombinantes no está supeditada a la presencia de un módulo regulador integrado en el cromosoma de la bacteria. En estos casos, los elementos reguladores del promotor para la expresión de proteínas recombinantes están incluidos en el vector, por lo que el mismo vector puede emplearse en combinación con diferentes cepas (BIOTECH, Co.). En la Tabla 3 se resumen los sistemas de expresión comerciales comúnmente utilizados para la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* (BIOTECH, Co.).

Tabla 3. Sistema de expresión más común utilizada en *E. coli*

Vector de expresión	Promotor de transcripción	Origen de replicación	Cepa (<i>E. coli</i>)
pET	T7	pBR322	BL21 (DE3)
pRSET	T7	ColE1	BL21 (DE3)
pGEX	tac	pBR322	BL21
pBAD	araBAD	pUC	TOP10
pTrc	trc/lac	pUC	BL21
pQE	T5/lac	ColE1	M15[pREP4]

***Escherichia coli* y el Operon *lac* como Reguladores de la Expresión.**

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) ha sido la más empleada para la producción de proteínas recombinantes (PR) que surgió debido a la necesidad de proveer proteínas de uso terapéutico o vacunales, además de ser utilizadas con fines diagnósticos por procedimientos relativamente baratos, ya que esta bacteria ha sido muy bien caracterizada desde el punto de vista genético y

fisiológico (Ferrer N., *et al.*, 2009). *E. coli* es un bacilo corto gram-negativo y es la especie que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de otros animales. A pesar, de ser necesarios para el funcionamiento correcto del proceso digestivo y ser responsable de producir vitaminas B y K, esta también puede ocasionar enfermedades como cistitis, septicemia y gastroenteritis entre otras (Perry-Chou C, 2007).

Muchas de las proteínas recombinantes requieren modificaciones post-traduccionales que no pueden ser llevados a cabo por cepas bacterianas silvestres, por lo que esto implica desventajas del uso de cepas procariontas como lo es *E. coli*, además, es conocido que las proteasas producidas en el microorganismo pueden destruir las PR obtenidas, no es un eficiente secretor de proteínas al medio de cultivo es una fuente potencial de pirógenos y su habilidad para promover formación de correcta de numerosos puentes disulfuro es limitada (Santana H., *et al.*, 1999); independientemente de estos inconvenientes esta bacteria ha sido la más utilizada para la producción de PR, debido a la serie de ventajas que presenta este microorganismo como hospedero: fácil manipulación genética ya que su genoma es ampliamente conocido, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo, puede crecer rápido en medios simples con una alto índice de producción de PR, existe una gran cantidad de conocimientos acumulados sobre su fisiología y metabolismo, además se tiene varios vectores bien establecidos para la producción de PR (Ferrer N *et al.*,2009).

A causa de las desventajas ya mencionadas, en los últimas décadas se han desarrollado cepas de *E. coli* modificadas genéticamente para solucionar algunos de estos inconvenientes, entre ellas se encuentran varias cepas mutantes de los genes *ion A* y *omp T* para disminuir la degradación proteolítica de los productos recombinantes, también se han obtenido cepas deficientes, o bien de la tiorredoxina (*trxB*) o de la glutatión reductasa (*gor*) o de ambas a la vez por lo cual en ellas se favorece la correcta formación de puentes disulfuro en el citoplasma. En otras cepas desarrolladas pueden obtenerse proteínas complejas, con modificaciones postraduccionales propias de células eucariotas, como es el caso de las que portan el gen de la tirosina cinasa para producir proteínas fosforiladas por la tirosina (Lehmann K. *et al.*, 2003; Bessette PH. *et al.*, 1999).

El *operón lac* es un operón requerido para la expresión genética en procariontas. Un Operón es grupo de genes estructurales cuya expresión está regulada por los mismos elementos de control (promotor y operador) y los genes reguladores, incluyendo la

disponibilidad de glucosa y de lactosa (Jacob F. y Monod J., 1961). En *E. coli*, casi la mitad de los genes están agrupados en *operones*, cada uno de los cuales codifica enzimas involucradas en una vía metabólica en particular o proteínas que interactúan para formar una proteína de subunidad múltiple (Harvey L. *et al.*, 2005). En este caso, el *operón lac* codifica tres enzimas requeridas para el metabolismo de la lactosa, el gen *z+* que codifica para la β -galactosidasa cuya función es catalizar la hidrólisis de la lactosa en glucosa más galactosa (Figura 11). Por otro lado, se encuentra el *gen y+* que codifica para la galactósido permeasa que transporta β -galactosidos, al interior de la célula bacteriana. Por último, se encuentra al *gen a+* que codifica para la tiogalactósido transacetilasa que cataliza la transferencia del grupo acetil del acetil Coenzima A al 6-OH de un aceptor tiogalactósido. Este gen no está relacionado con el metabolismo de la lactosa (Jacob F. y Monod J., 1961).

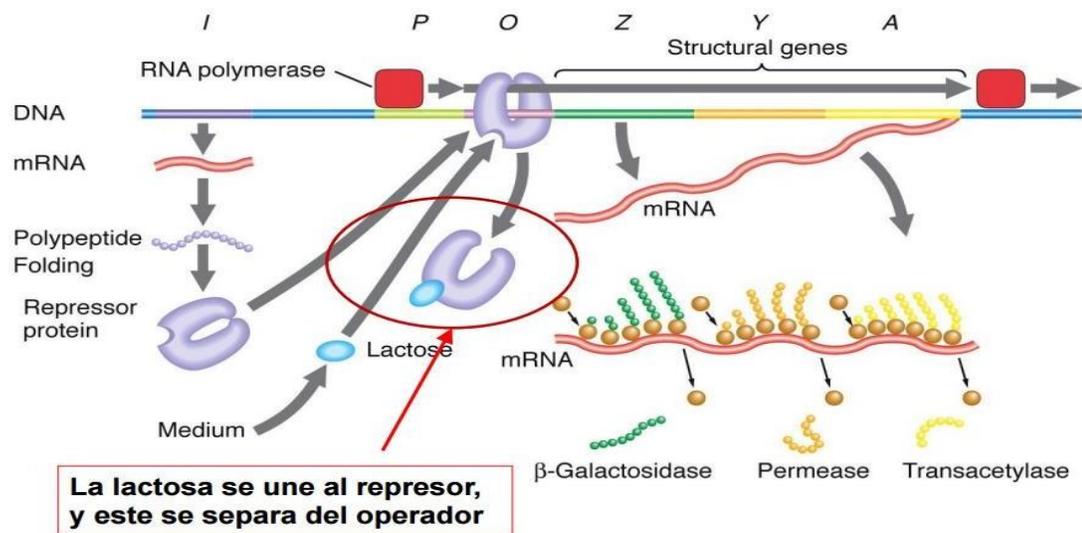


Figura 11. Diagrama de los componentes del *operón lac* y su función. Tomado de: (www.Depafquim.unam).

El *operón lac* es un sistema inducible que está bajo control negativo, es decir, que en condiciones normales no se expresa debido a la actividad de una proteína de carácter represor

que impide la transcripción. Sin embargo, también está bajo control positivo, lo que significa que en presencia de un inductor (lactosa) que actúa como activador estimula la transcripción de los genes estructurales (Jacob F. y Monod J., 1961). En realidad, el verdadero inductor del sistema es la Alolactosa y no la lactosa, de manera que la β -galactosidasa transforma la lactosa en Alolactosa. En los estudios del *operón lac* se utiliza como inductor un análogo sintético no hidrolizable de la lactosa que es el Isopropil tiogalactósido (IPTG). El IPTG no necesita ser transportado por la galactósido permeasa para entrar en la bacteria (Jacob F. y Monod J., 1961).

METODOLOGÍA

Producción Recombinante de la HDL en *E. Coli*

Transformación Bacteriana

La transformación de la bacteria *E. coli*, cepa Rossetta 2 se realizó por el método de choque térmico. Para iniciar el proceso de transformación se utilizó un microtubo *Eppendorf* que contenía células químicamente competentes de *E. coli* el cual se colocó en una cama de hielo para su descongelamiento. La suspensión bacteriana se homogeneizó suavemente con golpes suaves con el dedo, posteriormente se añadió un 1 μL de plásmido que contenía el gen sintético que codifica para la HDL a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La solución se mezcló cuidadosamente y se incubó en hielo por 10 minutos. Posteriormente, se incubó durante un minuto a una temperatura de 42 °C, una vez transcurrido este tiempo se regresó rápidamente al hielo y se dejó reposar durante 2 minutos. Después se le añadieron 250 μL de medio Super Optimal Broth, (SOC por sus siglas en inglés, (20 g/L Tryptona, 5 g/L extracto de levadura, 4.8 g/L MgSO_4 , 3.603 g/L glucosa, 0.5 g/L NaCl y 0.186 g/L KCl) mezclándose por agitación con una micropipeta y se incubó durante 3 horas a 37 °C en un agitador orbital a 220 revoluciones por minuto.

Posteriormente se inocularon tres placas de agar Luria (15 g/L Agar, 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 0.5 g/L NaCl) al que se le adicionó ampicilina (a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como marcador de selección con 50 μL y 150 μL respectivamente de cultivo bacteriano. Se utilizó el método de extensión en superficie en placas Petri, los cuales se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 37 °C en una incubadora de convección.

Preparación del Inóculo Bacteriano

Las placas Petri inoculadas se utilizaron como base para la sobreexpresión de proteínas, debido que a partir de ellas se seleccionaron colonias aisladas para sembrar una nueva placa por el método de estriado, incubándose a una temperatura de 37 °C por 24 h. Además se utilizó una colonia aislada como inóculo para un tubo de ensayo contenido 5 mL de caldo Luria (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 0.5 g/L NaCl) al que se le adicionó una concentración de 100 µg/mL de ampicilina, manteniéndolo a una temperatura de 37 °C durante toda la noche en un agitador orbital a 225 rpm.

Sobreexpresión Recombinante de la HDL

La colonia bacteriana recombinante se cultivo en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 mL de caldo Luria con una concentración de 100 µg/mL de ampicilina, se incubó durante 3 horas. Posteriormente se adicionó el volumen total del matraz a otro que contenía 1000 mL del mismo medio de cultivo con el antibiótico ya seleccionado. Una vez inoculado el cultivo bacteriano de 1 L se monitoreó la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 unidades. Este valor indica que el crecimiento bacteriano se encuentra en su fase exponencial de su ciclo de crecimiento (Moreno et al, 2013). En esta etapa se llevó a cabo la inducción de la expresión del gen de interés productor de la HDL, la inducción se realizó con isopropil- β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM, la sobreexpresión se llevó a cabo a una temperatura de 25 °C y con una agitación de 225 rpm por 24 h. Posteriormente, las células se cosecharon tomando el volumen total del matraz (1000 mL), se centrifugó a 13000 X g durante 15 minutos a 4 °C de temperatura. El botón de células bacterianas obtenido se almacenó en un ultra congelador a – 80 °C hasta su uso.

Para el control de la cinética de sobreexpresión se tomaron alícuotas de 1 mL del medio de cultivo cada 0, 2, y 15 horas después de la inducción. Las células se recuperaron por medio de centrifugación a 6000 x g por 15 minutos a una temperatura de 4 °C. El botón de células

bacterianas se resuspendió en buffer Lisis (Tris HCl 20 Mm, NaCl 500 mM), lisaron por sonicación en una cama de hielo a 10 % de amplitud 10 pulsos por 10 segundos cada uno. El producto obtenido se clarificó por centrifugación (16, 000 × g por 20 minutos a 4 °C) obteniéndose dos fases: una soluble (sobrenadante) y otra insoluble (precipitado). Ambas fases se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones reductoras y desnaturizantes. La electroforesis se corrió en una cámara Biorad mini protean 3 a una corriente de 20 mA por una hora.

Lavado de Cuerpos de inclusión.

Debido a que la proteína no se presenta en su forma nativa, no muestra sus características funcionales, es decir se sobre-expresó en cuerpos de inclusión. Por lo que fue necesario realizar un lavado o purificación de los mismos. Este lavado se inició a partir de la biomasa obtenida al final durante la sobreexpresión. Para esto se pesaron 2.33 g. del botón de células bacterianas y se resuspendió totalmente en buffer lisis (Tris HCl 20 mM, NaCl 500 mM,) a una razón de 8 mL por cada gramo de biomasa bacteriana y se sónico en hielo durante 10 segundos por 8 ocasiones. Una vez que el botón de células bacteriana se resuspendió en buffer Lisis se centrifugó a 16,000 × g por 30 minutos a 4 °C, se recuperó el precipitado y se descartó el sobrenadante.

Al precipitado obtenido se le adicionó buffer de lavado 1 (Tris HCl 50 mM, pH 7.0, DTT 5 mM, Triton X-100 (2 %) y EDTA 1 mM) a una razón de 4 mL por cada gramo de biomasa inicial. Posteriormente, se sonicó hasta que fue resuspendido totalmente y se centrifugó bajo las condiciones anteriormente mencionadas, se recuperó el pellet y se descartó el sobrenadante y se repitió nuevamente el lavado. El pellet o precipitado se resuspendió en buffer de lavado 2 a una razón de 4 mL por cada gramo de pellet/biomasa inicial (lavado 2, tabla 4) una vez resuspendido se centrifugó de nuevo, se desechó el sobrenadante y se recuperó el pellet. Se realizó nuevamente el lavado con buffer 2.

Tabla 4. Composición del buffer de lavado 2 (base a 100 mL)

Tris HCl 50 mM, pH 7.0	5 mL (partiendo de un stock 1 M)
EDTA 1 mM	1 mL (partiendo de un stock 0.5 mM)
DTT 5 mM	80 mg

El precipitado obtenido se resuspendió totalmente mediante sonicación (5 pulsos durante 10 segundos) en un buffer de extracción a una razón de 4 mL por gramo de precipitado (buffer de lavado 2 adicionado con 8 M de Urea). Posteriormente se almacenó en refrigeración a una temperatura de 4 °C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó la muestra mediante las mismas condiciones ya mencionadas y se descartó el precipitado, recupero el sobrenadante. Se midió la concentración de proteína utilizando un espectrofotómetro Nanodrop Thermo Scientific a 280 nm de longitud de onda.

Replegamiento de Proteínas.

El replegamiento *in vitro* de la HDL se realizó disminuyendo gradualmente la concentración de urea en pasos escalonados empezando 8 M, 4 M, 1 M hasta alcanzar una concentración de 0 M de urea. Este procedimiento se llevó a cabo mediante diálisis utilizando una membrana con un tamaño de 6-8 kDa. En cada paso se realizó un recambio de 500 mL de buffer diálisis. La diálisis se llevó a cabo a una temperatura de 4 ° C por tres horas con agitación constante de 150 rpm, hasta llegar al último paso de replegamiento de proteínas con un buffer sin urea de 1000 mL, con 2 recambios de 500 mL cada uno, el último recambio se mantuvo durante toda la noche. Posteriormente se recuperó la solución de la membrana de diálisis y se centrifugó a 20,000 × g durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se midió la concentración de la proteína en un espectrofotómetro Nanodrop a 280 nm.

Ensayo de Actividad de Fosfolipasa, Temperatura Óptima y Estabilidad Térmica

Para medir la funcionalidad de la proteína se realizó el ensayo de actividad de fosfolipasa descrito por Shinoda S. *et al.* (1991). Se preparó el medio agar con fosfatidilcolina (agar-agarosa 1.5 %, fosfatidilcolina 0.1 %). El agar-agarosa se disolvió en 50 mL de buffer Tris HCl 50 mM y se calentó en una placa de calentamiento hasta su homogenización completa. La fosfatidilcolina se solubilizó en etanol 96 % (en una dilución 1:2), después, se añadió a la solución de agarosa (a una temperatura de 60 °C) y se homogeneizó completamente. Posteriormente la solución vertió en placas Petri (25 mL de agar a cada una de las placas) tapadas con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. Después se realizaron perforaciones al agar donde se vaciaron diferentes volúmenes de la proteína a 10, 20, 30 y 50 μ L y se incubó a 37 °C durante 24 horas. La actividad de fosfolipasa se determinó en aquellos pozos donde se observó halos claros a su alrededor. Lo anterior es una indicación directa de la hidrólisis del sustrato fosfatidilcolina por acción de la HDL. Como control se utilizó buffer Tris 50 mM pH 7.4.

La temperatura óptima de la enzima se determinó utilizando el ensayo anteriormente descrito en un rango de temperatura de incubación de 10, 20, 30, 40, 45, 50, 60 y 70 °C Por otro lado, se determinó la estabilidad térmica de la HDL incubando la solución que contenga la proteína por 15 minutos a diferentes temperaturas de 10 a 70 °C (intervalos de 10 °C). Posteriormente se evaluó la actividad enzimática con el ensayo de actividad de fosfolipasa descrito anteriormente.

Estabilidad Térmica de Almacenamiento

Para evaluar la estabilidad de almacenamiento se incubó en tubos Eppendorf 500 μ L de la proteína a diferentes temperaturas de almacenamiento. Las temperaturas que se utilizaron fueron de 4, -20 y -80 °C, de las cuales se tomó una muestra de cada temperatura cada 7 días por un período de 5 semanas y se midió la actividad enzimática.

Actividad Lítica de la HDL Utilizando Hemocitos de Camarón.

Se extrajo la hemolinfa de camarones utilizando un jeringa de insulina de 1 mL (316 × 8 mm) que contenía 200 µL de solución anticoagulante SIC-EDTA estéril (HEPES 10 Mm pH 7.4, EDTA 20 mM, KCl 10 mM, NaCl 450 mM). Posteriormente se añadió rosa de bengala (3 % p/v) a la solución que contenía la hemolinfa. 1 mL de esta solución se agregó a 15 mL de agar-agar (3 %), se homogeneizó y vertió en placas Petri (Chin L. *et al.*, 2000). Una vez que solidificó el agar se realizaron 4 perforaciones agregando diferentes concentraciones de la HDL (10, 20, 30 y 50 µL) y se incubó a temperatura ambiente (24 °C). La actividad lítica se evaluó observando halos claros alrededor de cada pozo, lo cual, esto determina la actividad lítica de la HDL sobre los hemocitos de camarón.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Transformación de Cepas de *Escherichia coli* con Gen de la HDL

La transformación de la bacteria *E. coli* cepa Rosetta 2 se llevó a cabo por el método de choque térmico. Se observó un crecimiento de colonias convexas, redondas y lisas de color blanco características de *E. coli* lo cual es indicativo que las bacterias poseen su respectivo plásmido insertado. Es decir, la presencia en el plásmido del gen de resistencia a ampicilina permite seleccionar las bacterias que contienen la secuencia de la proteína de interés. Esta resistencia está dada a la capacidad para crecer en presencia de dicho antibiótico (el gen de resistencia codifica una beta lactamasa, enzima que degrada la ampicilina) existen otros tipos de vectores que codifican para otros antibióticos como es vPBR322 resistente a tetraciclina y ampicilina (Cultek S.L.U., 2006).

Sobreexpresión y Replegamiento *in vitro* de la HDL

El plásmido recombinante que contenía el gen de la HDL fue transformado en *E. coli* en la cepa BL21 rosetta 2. Las cepas transformadas se crecieron en el medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) a una densidad óptica de 0.4 unidades de absorbancia a 600 nm. Posteriormente, se indujo la producción de la proteína recombinante agregando IPTG a una concentración final de 0.4 mM. El cultivo se incubó por 18 horas a 25 °C y agitación de 220 rpm. Es importante que la incubación no sea superior a 24 h debido a que la producción de proteína disminuye esto puede ser debido a que los sustratos del medio de cultivo se agotan y ya no es posible aumentar la producción de proteína. Así mismo es posible que la proteína sea degradada parcialmente por proteasas producidas intrínsecamente por la bacteria hospedadora. Por lo que se consideró que el tiempo óptimo para la sobreexpresión es de 6 horas pos-inducción, al igual que lo descrito por Tellechea-Robles (Tellechea, 2015). Después, las células se recuperaron y analizaron tanto la fracción soluble como insoluble mediante electroforesis en gel SDS- PAGE al 12 %. Se observó una banda de aproximadamente 47 kDa, el cual corresponde al peso molecular deducido de la secuencia de aminoácidos de la HDL. Además se encontró que la HDL se sobreexpresó en la fracción insoluble, es decir, se obtuvo en cuerpos de inclusión como era de esperarse (Tellechea, 2015). En este trabajo se menciona que se observaba una

pequeña banda en la fracción soluble del peso molecular esperado para la HDL. Esta fracción fue aplicada a la columna de afinidad de metales, pero no se unió por lo que se concluyó que esta banda corresponde a una proteína que puede ser parte del metabolismo de la *E. coli*. De acuerdo con nuestros resultados y lo reportado previamente, se continuó trabajando con la parte insoluble de la sobreexpresión, es decir, con la HDL en forma de cuerpos de inclusión. Algunos autores como Zhang *et al.*, (2006) han reportado que la hemolisina termoestable de *Vibrio harveyi* se sobreexpresa en la fracción soluble del cultivo. Las diferencias encontradas pueden deberse a diversos factores como la cepa utilizada, condiciones de cultivo, diferencias a nivel de secuencias de aminoácidos lo cual originan características funcionales y fisicoquímicas para cada especie.

Para llevar a cabo el replegamiento se purificaron los cuerpos de inclusión mediante lavados, de acuerdo al protocolo descrito por Tellechea-Robles (Tellechea, 2015). Brevemente, la proteína se solubilizó en buffer de extracción con urea 8 M como agente desnaturizante y DTT como reductor. Esta solución se clarificó por centrifugación para llevar a cabo el replegamiento de la HDL y obtener su estructura nativa y funcional. La concentración de proteína que se obtuvo en esta etapa fue de 48 mg/mL. Este resultado indica que el rendimiento de la producción de la proteína recombinante por cada litro de medio de cultivo fue de aproximadamente 192 mg/mL de la HDL en forma de cuerpos de inclusión. En la Figura 12 se observa la abundancia de la banda correspondiente a la HDL después del lavado con el buffer 1 y en solución con urea 8 M en los carriles L1 y 8 M, respectivamente.

El replegamiento se realizó mediante diálisis, disminuyendo la concentración de urea de 8 M hasta 0 M utilizando una membrana de diálisis de 6-8 kDa de tamaño de poro. La concentración de la proteína antes de la diálisis se ajustó a 10 mg/mL. Ya que a una mayor concentración de proteína se observó que esta se precipitaba durante el proceso de replegamiento. Posteriormente, la proteína replegada se analizó mediante un gel SDS-PAGE, lo cual se observó una banda muy intensa que corresponde al peso molecular esperado de 47 kDa de la HDL. Además, podemos observar que la HDL se conservó a lo largo del proceso de replegamiento y notablemente se encontró que la proteína se mantuvo en solución cuando se eliminó la urea del buffer de replegamiento. Esto se hace visible en los carriles 4 M, 1 M, 0 M y 0 M del gel de electroforesis donde se muestra el proceso de replegamiento de la HDL (Figura

12). Este resultado es indicativo que la HDL se plegó correctamente, puesto que la conformación estructural que adopta le permite mantenerse en solución al ser eliminada gradualmente la urea (Pereto et al., 2007). Después del proceso de replegamiento se obtuvo una concentración final de 5.025 mg/mL de HDL. A partir de esta solución se realizaron los ensayos posteriores para determinar su actividad y efecto de temperatura.

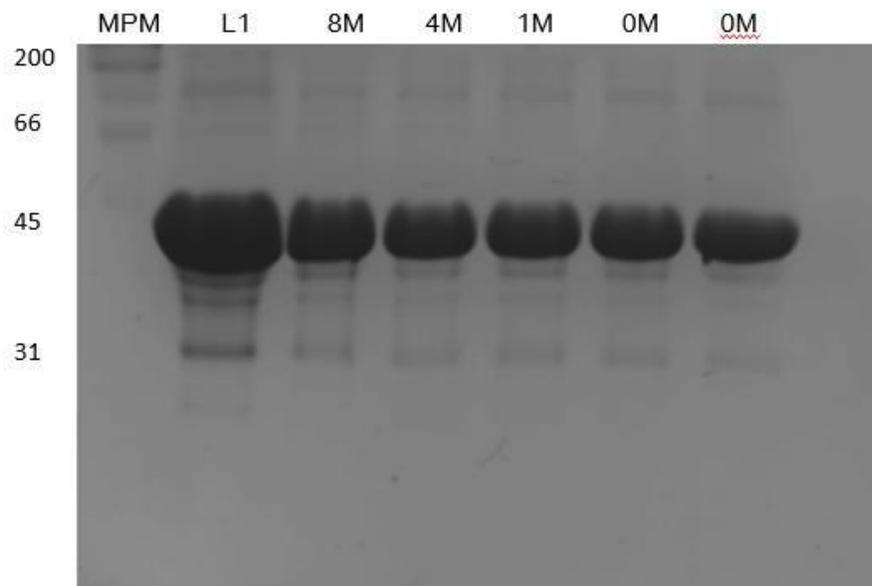


Figura 12. Gel de electroforesis SDS-PAGE del proceso de replegamiento de la HDL mediante diálisis, disminuyendo la concentración del agente desnaturizante (urea).

MPM (marcador de peso molecular), L1 (lavado 1), 8M, 4M, 1M, 0M (concentración de urea para el replegamiento de la HDL)

Temperatura Óptima y Estabilidad Térmica

Actividad Enzimática

Posterior al plegamiento de la proteína se realizó un ensayo de actividad fosfolipasa mediante placas con agarosa utilizando como sustrato, fosfatidilcolina. Las placas mostraron halos claros alrededor de los pozos con la muestra como se muestra en la Figura 13, lo cual esto nos indica que la proteína se plegó correctamente ya que adoptó su estructura terciaria y es enzimáticamente funcional.

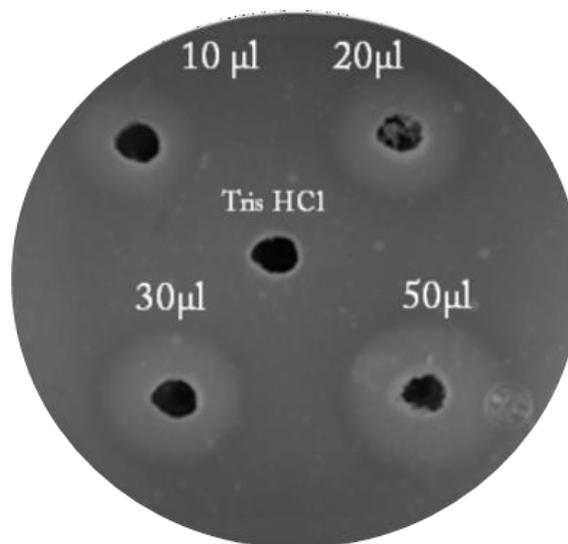


Figura 13. Actividad de fosfolipasa de la HDL en una placa Petri con medio agarosa al 1.5 % mas fosfatidilcolina al 0.1 %. A una concentración inicial de la proteína de 5.025 mg/mL. Tris-HCl, corresponde al buffer en que se encontraba la enzima y fue utilizado como control negativo (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA).

El cambio de tonalidad en el agar se debe a la ausencia de sustrato (fosfatidilcolina) al ser degradado por la HDL a lisofosfatidil-colina, el cual es un producto más soluble. El diámetro de los anillos es proporcional a la cantidad de muestra contenida en el pozo razón por la cual se observa mayor degradación en el pozo que contiene 50 µL, es decir se cuenta con una mayor actividad enzimática de la proteína.

Temperatura óptima

La temperatura óptima se determinó midiendo la actividad enzimática incubando las placas con el sustrato a diferentes temperaturas. Cada determinación se realizó por cuadruplicado utilizando 100 μ L de la solución de la HDL a una concentración de 5 mg/mL. Se midió el diámetro de los halos obtenidos en cada una de las placas. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad relativa tomando como el 100 % la temperatura donde se obtuvo la mayor actividad enzimática. En la Figura 14 podemos observar que la temperatura de 40 °C es donde la enzima tiene mayor actividad enzimática, mientras que la menor actividad se registró a los 60 °C. Esto se evidencia en la Figura 15 en la que podemos observar de manera representativa las placas con un mayor halo en la placa de 40 °C lo cual puede resultar evidente ya que a nivel general el aumento de temperatura favorece la velocidad de la mayoría de reacciones enzimáticas. Sin embargo, debido a su carácter proteico, a cierta temperatura las enzimas inician su desnaturalización, este punto coincide con su máxima actividad. No obstante es propio de cada enzima, aunque la mayoría de estas presentan su mayor efecto en el rango comprendido entre 30 y 50 °C (<http://www.ehu.eus/biomoleculas/enzimas/enz22>). Además, no se observó actividad enzimática de la HDL en las placas incubadas a 70 °C. Esto puede ser derivado a que la enzima se encuentra desnaturalizada o a un error técnico del método utilizado, ya que se observó que a esta temperatura la agarosa perdía integridad estructural.

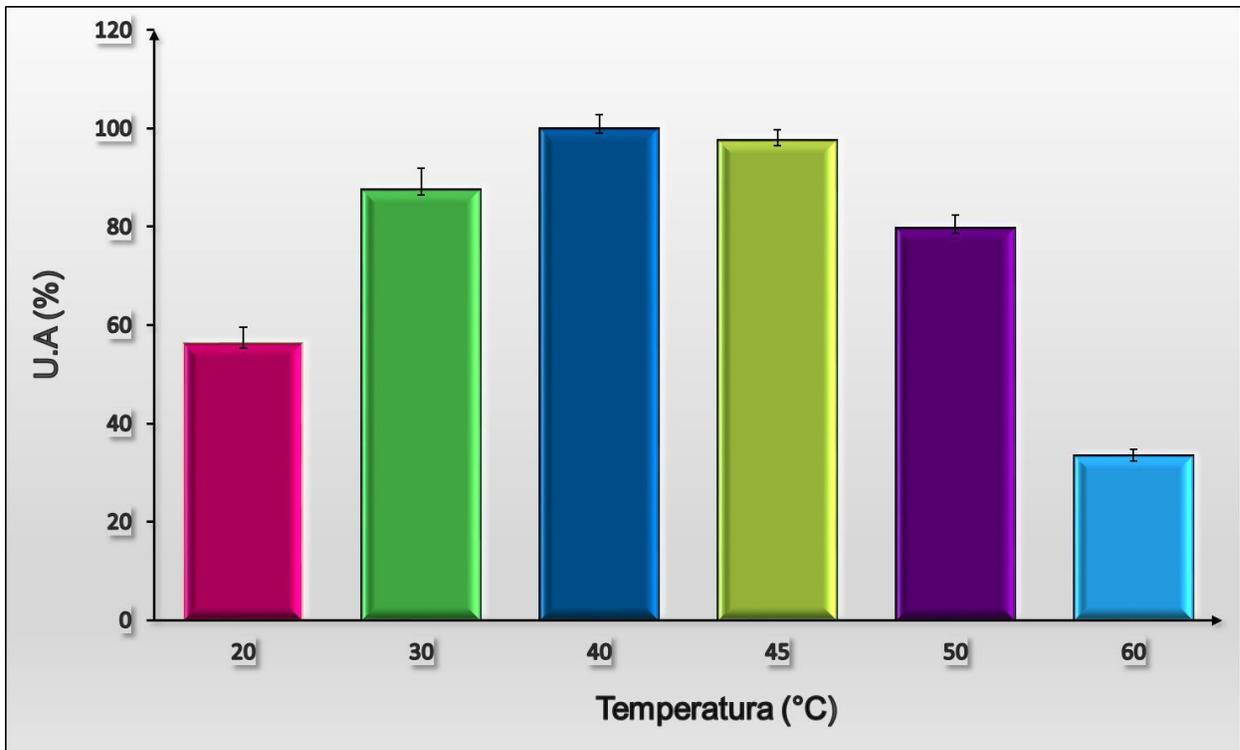


Figura 14. Temperatura Óptima de la actividad catalítica de la HDL incubada a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 45, 50 y 60 °C) medido en porcentaje de actividad tomando como 100 % 40 °C (mayor actividad enzimática).

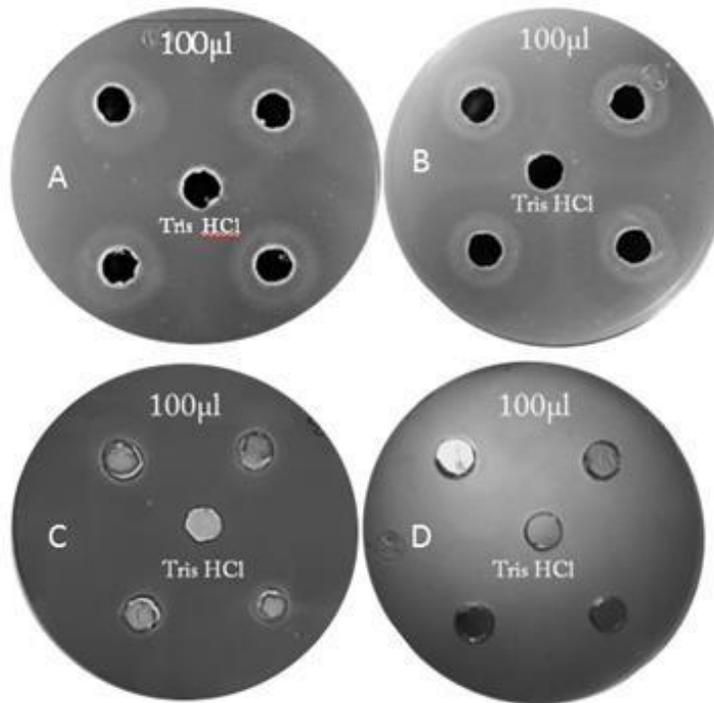


Figura 15. Temperatura óptima de la HDL en placa agarosa-fosfatidilcolina. Halo de actividad enzimática incubado a 20 °C (A). Placa incubada a 40 °C obteniendo una mayor actividad enzimática (B). Disminución de la actividad a una temperatura de 60 °C (C) e inactividad de la enzima a 70 °C (D). Control negativo, Tris HCl.

Los resultados obtenidos indican que la HDL es una proteína con baja tolerancia a altas temperaturas. Ya que a partir de los 50 °C la enzima muestra una disminución del 20 % de la actividad enzimática respecto a la temperatura óptima. Así mismo, se observó un 35 % de actividad residual de la HDL cuando el ensayo de actividad se realizó a 60 °C. Estos resultados son consistentes con los reportados con una hemolisina termolábil (rPhIA) producida por *V. mimicus*, que al igual cuenta con una temperatura óptima de alrededor de 40 °C, siendo estable entre los 20 y 40 °C. Además, esta proteína cuenta con un peso molecular de 53 kDa muy similar a la de la HDL (47 kDa) producida por *V. parahaemolyticus* (Lee, et al 2002). Esta similitud puede deberse a que la mayoría de las proteínas producidas por Vibrios son muy semejantes pero no idénticas. Además se ha reportado que la proteína producida por *V. harveyi* pierde su actividad a una temperatura de 65 °C después de 30 minutos indicando que la

hemolisina es lábil al calor (Zhong et al, 2006). Por lo tanto, podemos concluir que la HDL de *V. parahaemolyticus* también es una hemolisina termolábil la cual a diferencia de la hemolisina directa termoestable (TDH) esta no es inactivada a una temperatura de 100 °C por 10 minutos. Además la actividad de la TDH no se potencia con la adición de lecitina lo cual indica que es una hemolisina directa sobre los eritrocitos (Sakurai J.A et al 1973).

Estabilidad Térmica

Para la evaluación de la estabilidad se calentó 400 µL de la muestra, en una placa par microtubos a diferentes temperaturas durante 15 minutos cada una. Una vez transcurrido el tiempo se colocaron cada una de las muestras en el ensayo de actividad de fosfolipasa anteriormente descrito. Se midieron los halos producidos por la degradación del sustrato y se graficó en base a un promedio de los tres halos de cada temperatura, tomando como 100 % la temperatura donde se encontró mayor actividad (Figura 16).

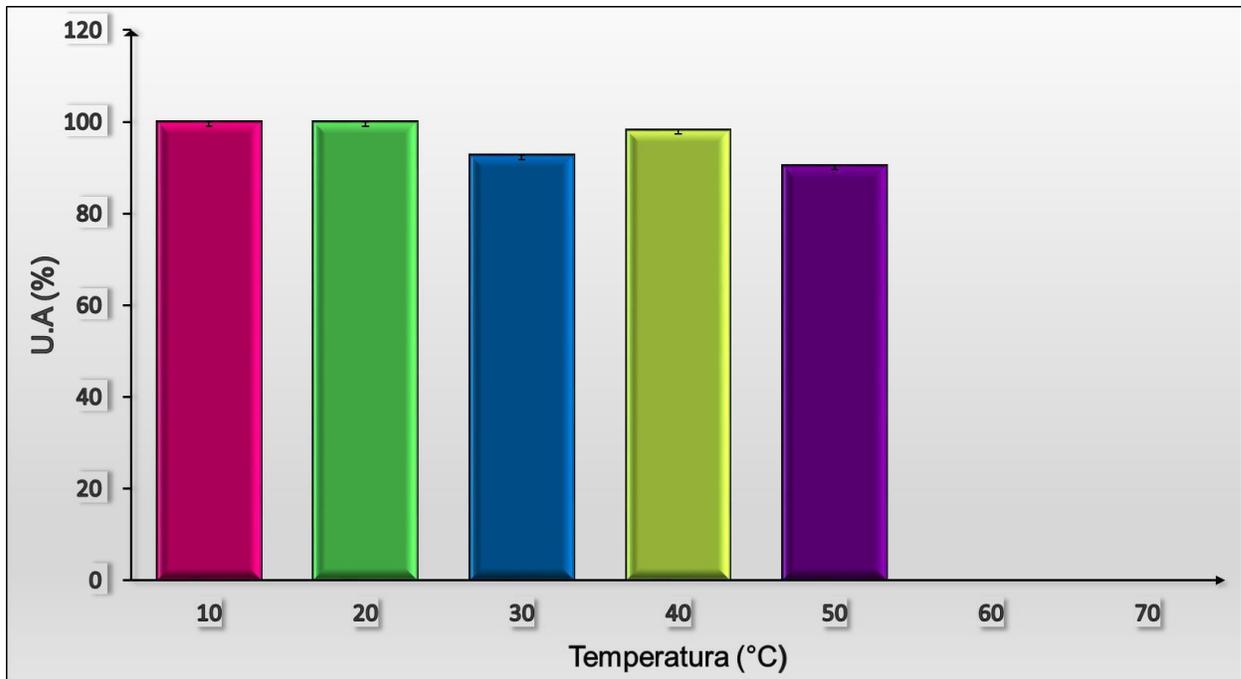


Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad enzimática de la HDL bajo diversas temperaturas (10 – 70 °C con intervalos de 10 °C). Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de actividad relativa, tomando como el 100 % la actividad registrada a la temperatura de mayor estabilidad de la HDL (10 °C). (UA: Unidades arbitrarias de actividad).

La Figura 16 nos muestra que la actividad de la HDL se mantiene estable desde una temperatura de 10 °C hasta los 40 °C. Después de incubar la enzima a por 15 minutos a 50 °C se observó una ligera disminución (10 %) de la actividad. Sin embargo, cuando la HDL se incubó a 60 y 70 °C la actividad enzimática no fue detectada (Figura 17). Esto indica que la HDL es termolábil a temperaturas superiores a 60 °C aun por períodos cortos de incubación. Este resultado confirma lo encontrado por análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de la HDL, lo que indicaba una alta similitud de secuencia con otras hemolisinas dependientes de lecitina termolábiles como la TLH de *Vibrio mimicus* y *Vibrio harveyi* (Zhang et al, 2001). Previamente se ha reportado que la hemolisina termolábil producida por *Vibrio harveyi* pre-incubada a una temperatura de 55 °C durante 30 minutos perdía su actividad enzimática un 75 %, la totalidad de la actividad enzimática

se perdió después de 30 minutos a 65 °C indicando que la hemolisina era lábil al calor, por lo tanto podemos concluir que la HDL es sensible a temperaturas superiores a 60 °C siendo termolábil (Zhong et al, 2006).

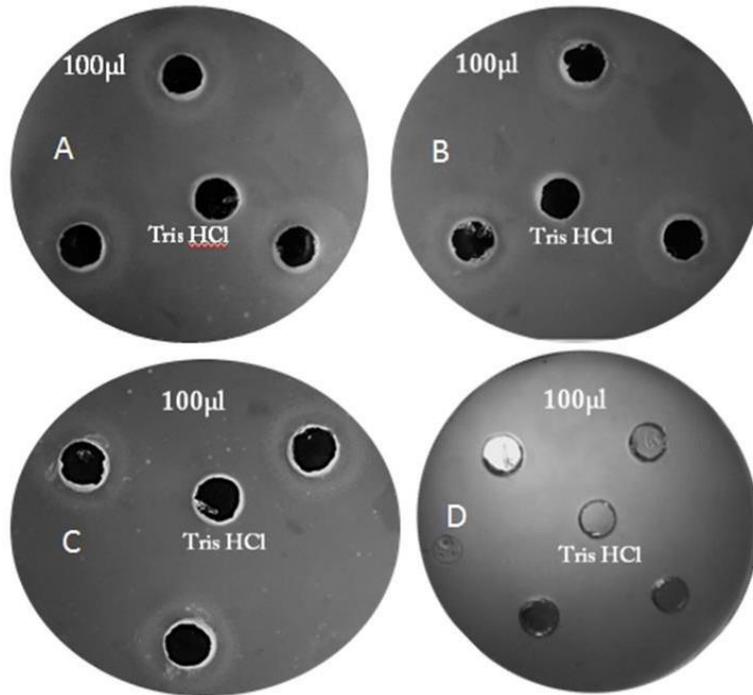


Figura 17. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad enzimática de la HDL. 20 °C (A). 40 °C (B). 50 °C (C) y 60 °C (D) utilizando como control negativo el buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5.

Estabilidad Térmica de Almacenamiento

El efecto de la temperatura y tiempo sobre la actividad enzimática de la HDL se llevó a cabo almacenando a bajas temperatura la enzima durante cinco semanas. Cada semana se evaluó la actividad enzimática por medio del método descrito anteriormente y por triplicado. De igual manera se realizó medición de los diámetros producidos por la degradación de la fosfatidilcolina

graficando los datos obtenidos en base a su promedio y porcentaje de actividad tomando como el 100 % de la actividad la temperatura óptima de la HDL (40 °C).

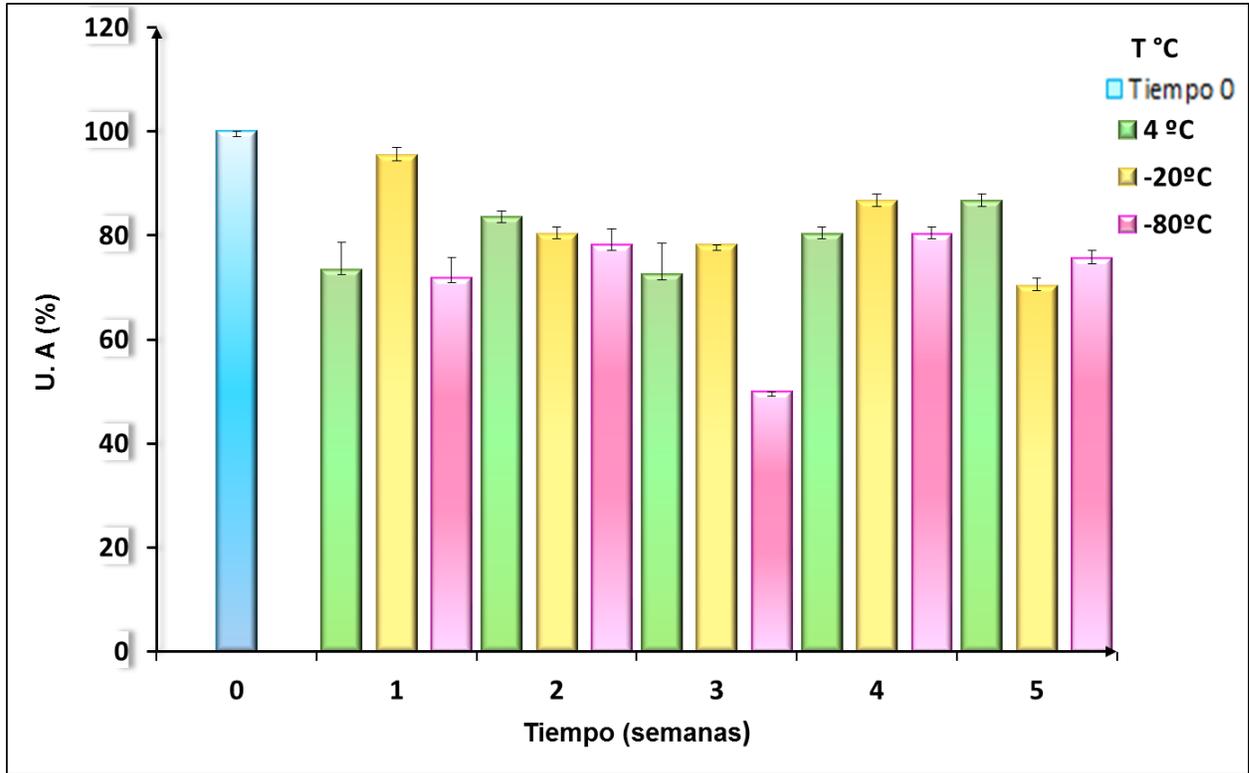


Figura 18. Temperatura óptima de almacenamiento de la enzima HDL durante cinco semanas a bajas temperaturas (-80, -20 y 4 °C).

En la Figura 18 podemos observar que la temperatura más adecuada para el almacenamiento de la HDL es de -20 °C, debido a que se mantiene más estable al transcurrir cada semana a diferencia de la almacenada a los 4 °C y -80 °C. No obstante la proteína también puede ser almacenada a 4 °C por cuestiones de equipo y costo, ya que no representa una disminución considerable en su actividad enzimática respecto a la almacenada a -20 °C. También podemos observar una disminución en la actividad de la enzima en la tercera semana, esto puede ser producido a un error técnico ocasionado por la preparación de las placas de agar con el sustrato fosfatidilcolina, al ser está solamente soluble en solventes orgánicos,

además, de ser higroscópica y fotosensible, si es expuesto a la luz esto produce su auto-oxidación y descomposición, lo que se evidencia en la gráfica en la cuarta y quinta semana observando una similitud en los valores de la primera y segunda semana.

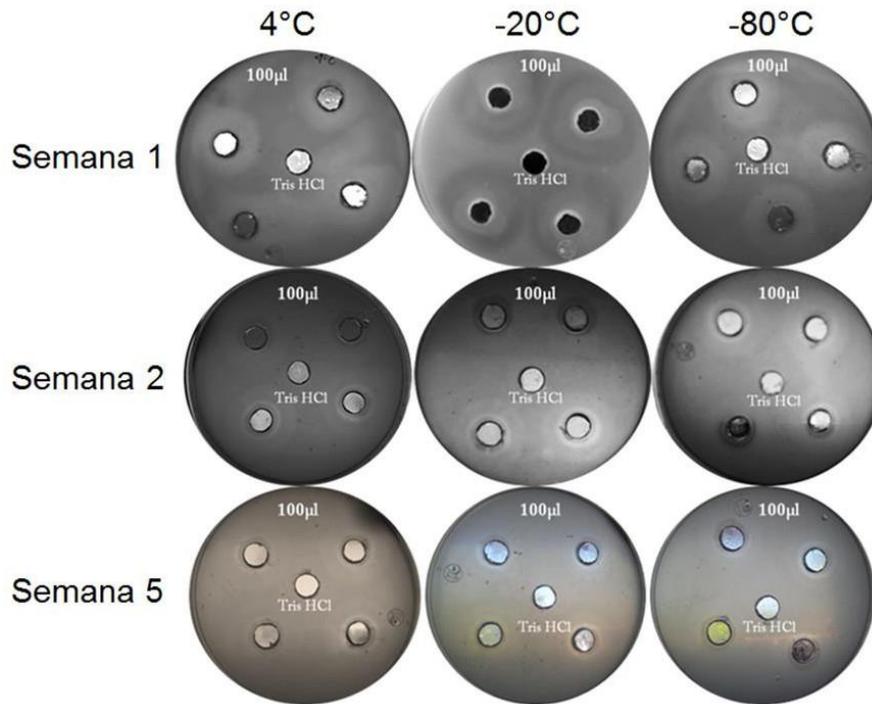


Figura 19. Temperatura óptima de almacenamiento de la HDL durante cinco semanas por cuadruplicado utilizando como control buffer Tris HCl.

Actividad Lítica de la HDL Utilizando Hemocitos de Camarón

En la Figura 20 podemos observar cambio de tonalidad en el agar (halos), lo cual es indicativo que la HDL destruyó los hemocitos de camarón. Además podemos observar que el diámetro de los halos aumentó en función de la cantidad contenida en cada pozo por lo que hay una mayor degradación en el pozo que contiene 50 µL de la muestra. Por lo tanto, la HDL es capaz de lisar los hemocitos presentes en la hemolinfa de camarón. Este resultado podría ser de relevancia para asociar a la HDL como un factor de patogenicidad de *V. parahaemolyticus* en camarón.



Figura 20. Actividad lítica de la HDL utilizando hemocitos de camarón. Utilizando hemolinfa de camarón teñida con rosa de Bengala al 3 % e incubada a temperatura ambiente.

Tanto las bacterias patógenas como no patógenas se encuentran a menudo en el hepatopáncreas del camarón y se ha sugerido que su actividad hemolítica puede estar correlacionada con su patogenicidad ya que se han excluido factores como la adhesión y la invasión aunque todavía hay muchos desacuerdos entre la hemólisis y patogenicidad. Además, en algunos *Vibrios* las fosfolipasas muestran actividad hemolítica en eritrocitos, por ejemplo: PhIA de *Vibrio mimicus* mostró alta actividad hemolítica en eritrocitos de la trucha arcoíris y de tilapia (Lee et al, 2002). Así mismo, la fosfolipasa A2 de *V. vulnificus* extracelular y lisofosfolipasa tiene actividad hemolítica para eritrocitos de ovinos y de ratón (Testa et al, 1984) al igual que la tlh producida por *Vibrio alginolyticus* que tiene actividad hemolítica contra eritrocitos de platija (Jia et al, 2010). Incluso se han reportado fosfolipasas de tipo A2 de veneno de víbora o abeja que muestra tener actividad hemolítica indirecta por hidrólisis de fosfolípidos a lisofosfolípidos los cuales debido a su actividad superficial disocian las membranas eritrocitarias. Entre las características de estas enzimas se conoce el efecto anticoagulante, hemorrágico e inhibidor de agregación plaquetaria (Martin et al, 1975; Kemparajo et al. 1994). Las hemolisinas son sin duda, las exotoxinas más ampliamente distribuida entre los *Vibrios* patógenos y hay muchas evidencias epidemiológicas y experimentales que sugieren su participación en la patogénesis de la enfermedad (Iridia & Honda, 1997; Shinoda 1999; Zhang & Austtin 2005). Por lo tanto, se considera de importancia continuar con la caracterización de la

actividad hemolítica de la HDL de *V. parahaemolyticus* para elucidar su rol durante la infección de este patógeno para camarón.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentados se concluye que la HDL recombinante de *V. parahaemolyticus* presenta actividad de fosfolipasa y es sensible a las temperaturas mayores a 40 °C, por lo tanto es una enzima termolábil. Adicionalmente, se demostró que la enzima aquí estudiada presenta capacidad de lisar hemocitos de camarón mediante un ensayo semi-cuantitativo. Lo anterior indica que la HDL de *V. parahaemolyticus* podría desempeñar un papel importante durante el proceso de infección de la bacteria y su patogenicidad para camarón.

RECOMENDACIONES

- Establecer un método cuantitativo para medir la actividad enzimática y hemolítica de la HDL.
- Realizar experimentos *in vivo* para determinar la toxicidad de la HDL para camarón.
- Continuar con la caracterización bioquímica y biofísica de la HDL para proponer posibles inhibidores de la enzima.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akeda Y, Nagayama K, Yamamoto K, Honda T (1997). Invasive phenotype of *Vibrio parahaemolyticus*. J Infect Dis. 1997 Sep; 176(3):822-4
- Alvarez J. D Austin *, Brian **, Alvarez Ana. M ***, Quintero Belkys ***, Reyes H.. (1999). Estudio bacteriológico en camarones peneidos silvestres y bajo cultivo en Venezuela. Revista de difusión de tecnología agrícola y pesquera del FONAIAP No. 62. Pag
- Anderson, I.G., Shamsudin, M.N. and Shariff, M. 1988. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. Asian Fis.Sci. 2: 93-108.
- Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MC, Jones PD, Kaysner CA. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh, trh. J Microbiol Methods. 36(3):215-225.
- Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:13703-08.
- Brock J.A. Ligthner D.V. 1990. Chapter 3: Diseases of Crustacea. In: O. Kinne (ed.) Diseases of Marine Animals Vol. 3, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. Pp. 245-424
- Cisneros-Ruiz, M. y Rito-Palomares. M. (2005). Estrategias de bioingeniería para la recuperación primaria de productos biológicos. Revista Mexicana de Ingeniería Química 4,131- 139.
- Chen, D. 1992. An overview of the disease situation, diagnostic techniques, treatments and preventatives used on shrimp farms in China. In: W. Fuls and K.L.Main (eds.) Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the Unites States. The Oceanic Institute, Hawaii. pp. a
- Chin-1, C., Wen-Yu, S. Chung-Zen. 2000. Use of prawn blood agar hemolysis to screen for bacteria pathogenic to cultured tiger prawns *Penaeus monodon*. Dis Aquat Organ. 43 (2): 153-157.
- DANIELS NA, EVANS MC, GRIFFIN PM. 2000. Noncholera Vibrios. In W. M. Scheld, W. A. Craig, and J. M. Hughes (eds). Emerging Infections 4. ASM Press, Washington, DC,; 237-47
- Ferrer N, Domingo J, Corchero J, Vázquez E, Villaverde A. 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. Microbial Cell Factories;8(1):17-8.
- García José, Santana Zeila, Zumalacárregui Lourdes, Quintana Marisel, González Diamilé, Furrzola Gustavo, Cruz Oscar. 2013. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia Coli*. Vaccimonitor; 22 (2)30-39. www.finaly.sld.cu/vaccimonitor.htm.
- Gassama-Diagne, J. Fauvel and H Chap. 1989. Purification of a new, Calcium-independent, high molecular weight phospholipase A2/lysophospholipase (phospholipaseB) from guinea pig intestinal brush-border membrane. The Journal of Biological Chemistry. 264.9470-9475.

- GE life sciences. 2007. Affinity Chromatography, principles and Methods. Versión 10.
- Harris L. 1995. The involvement of toxins in the virulence of *Vibrio harveyi* strains pathogenic to the black tiger shrimp *Penaeus monodon* and the use of commercial probiotics to reduce shrimp hatchery disease outbreaks caused by *V. harveyi* strains. CRC for Aquaculture, Scientific Conference abstract, Bribie Island, Australia. Holzapfel W, Haberer P, Snel J, Schillinger U. 1988. Overview of gut flora probiotics. *Int J Food Microbiol* 41: 85-101
- Harvey Lodish, Arnold Berk, Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, S, Lawrence Zipursky y James Darnell. *Biología celular y molecular*. 5a ed. La reimp.- 11
- Honda, T., Y. Ni, and T. Miwatani. 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. *Infect. Immun.* 56:961-965.
- Jacob, F., y Monod, J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3 (3):318-356.
- Ibarra Gamez José Cuauhtémoc, González Galaviz José Reyes, Galaviz Lucio, Silva Ziinnia J. Moliina Garza, Luna Badillo Cecilia. ("*Vibriosis asociada a cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei**", IX Congreso de ciencia de los alimentos y V foro de Ciencia y Tecnología de alimentos. 2007(consultado: 30 de diciembre del 2015) disponible en: [file:///C:/Users/user/Downloads/CNCA-2007-61%20\(9\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/CNCA-2007-61%20(9).pdf)
- Jia, A., Woo, N. Y., & Zhang, X. H. (2010). Expression, purification, and characterization of thermolabile hemolysin (TLH) from *Vibrio alginolyticus*. *Diseases of aquatic organisms*, 90(2), 121-127.
- Kemparaju K., B. Nijaguna & V. Gowda. 1994. Purification of a basic phospholipase A2 from indian saw scaled viper *Echis carinatus* venos: characterization of antigenic, catalytic and pharmacological properties. *Toxicon*. 32, 1178-1196
- Lavilla- Pitogo et al., 1990 Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines
- Lee JH, Ahn SH, Kim SH, Choi YH, Park KJ, Kong IS (2002) Characterization of *Vibrio mimicus* phospholipase A (PhIA) and cytotoxicity on fish cell. *Biochem Biophys Res Commun* 298:269–276
- Lehmann K, Hoffmann S, Neudecker P, Suhr M, Becker W M, Rosch P. High-yield expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h2. *Protein Expr Purif* 2003;31:250-9
- Lehmann K, Hoffmann S, Neudecker P, Suhr M, Becker W M, Rosch P. High-yield expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h2. *Protein Expr Purif* 2003;31:250-9.
- Lightner, D.V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Liu, P.C., Lee, K.K. and Chen, S.N. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology* 22: 413-416

- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iida, T. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *The Lancet*, 361(9359), 743-749. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12659-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12659-1)
- Makrides, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews*, 60 (3): 512-538.
- Martin S., M. Luthra, M. Wells, et al. 1975. Phospholipase A2 as a probe of phospholipid distribution in erythrocyte membranes: factors influencing the apparent specificity of the reaction. *Biochemistry*. 14. 5400
- Martinez-Urtaza J1, Huapaya B, Gavilan RG, Blanco-Abad V, Ansedo-Bermejo J, Cadarso-Suarez C, Figueiras A, Trinanés J.(2008). Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Niño. *Epidemiology*. 2008 Nov;19(6):829-37. doi: 10.1097/EDE.0b013e3181883d43
- Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K y Yamai, S. 1969. In vitro haemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus* : its close correlation with human pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 100:1147-1149.
- Morales, V., & Cuéllar- Angel, J. (2008). Guía técnica: Patología e Inmunología de camarones penaeidos. Panamá, República de Panamá: CYTED
- Morales-Covarrubias, M.S. 2008. Enfermedades bacterianas. En: V. Morales, y J. Cuéllar- Anjel, editores, Guía técnica - patología e inmunología de camarones penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. p. 117-134.
- Morales-Covarrubias, M.S. 2013. Camarón análisis en fresco, herramienta de diagnóstico. 1era edición. México. CIAD-OIRSA
- Nash, G. Nithimathachoke, C., Tungmandi, C., Arkarjamorn, A., Prathanpipat, P. and Ruamthaveesub, P. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand. In: M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Authur (eds.) *Diseases in Asian Aquaculture 1*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. pp. 143-155.
- Nordstrom JL1, Vickery MC, Blackstone GM, Murray SL, DePaola A. (2007). Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Sep;73(18):5840-7. Epub 2007 Jul 20
- Nordström K, Uhlin B E. Runaway replication plasmids as tools to produce large quantities of proteins from cloned genes in bacteria. *Biotechnology* 1992;10:661-6.
- Okuda J, M Ishibashi, E Hayakawa, T Nishino, Y Takeda, A K Mukhopadhyay, S Garg, S K Bhattacharya, G B Nair, and M Nishibuchi (1997). Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J Clin Microbiol*. 1997 Dec; 35(12): 3150–3155

- Oliver JD. y Kaper JB., 1997....Oliver, J.D. and Kaper, J.B. 1997. *Vibrio* Species. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville, eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, p228-264. Washington, D.C., ASM Press.
- Oliver, J.D. 1989. *Vibrio vulnificus*. In M.P. Doyle, ed. *Foodborne Bacterial Pathogens*, p569-600. New York, Marcel Decker, Inc.
- Perry Chou C. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;76:521–32
- Senevirathne R.N., M.E. Janes and J.G. Simonson. 2008. Detection and Enumeration of *Vibrio vulnificus* by Direct colony immunoblot. *Journal food science*; 74 (1):M4 1-5. DOI: 10.1111/j.1750-3841.
- Ruby, E.G., Greenberg, E.P. and Hastings, J.W. 1980. Planktonic marine luminous bacteria: species distribution in the water column. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 302-306...
- Sakurai, J., A. Matsuzaki, and T. Miwatani. 1973. Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 8:775–780
- Santana H, Martínez E, Sánchez J C, Moya G, Sosa, R, Hardy E, et al. Molecular characterization of recombinant human interferon alpha-2b produced in Cuba. *Biocología Aplicada* 1999;16(3):154-9
- Seas C, Gotuzzo E. *Vibrio Cholerae*. En: Mandell G, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. 6a edición. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005.p.2536-44
- Shinoda S., Matsuoka, H., Tsuchie, T., Miyoshi, S. I., Yamamoto, S., y 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 (12): 2705-2711.
- Sindermann, C.J. 1990. *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish*, Vol. 2, 2nd edition. Academic Press, New York
- Singh, S.M. y Panda, A.K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, 303-310.
- Sorensen, H.P.; Mortensen, K.K. *J Biotchnol*, 2005, 115 (2), 113-128.
- Takeda, Y. 1983. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmac. Ther.* 19:123-146. Taniguchi, H., H. Hirano, S. Kubomura, K. Higashi, and Y. Mizuguchi. 1986. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb. Pathogenesis.* 1:425-432.
- Testa J, Daniel LW, Kreger AS (1984) Extracellular phospholipase A2 and lysophospholipase produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 45:458–463
- Twedt, R. M. 1989. *Vibrio parahaemolyticus*. In M. P. Doyle, ed. *Foodborne Bacterial Pathogens*, p543-568. New York, Marcel Decker, Inc.

- Valdés Rodríguez, Yolanda C., Miguel Bilbao Díaz, José L. León Álvarez y Francisco Merchón González. (2002). Origen e importancia de la fosfolipasa A2 de secreción. *Rev Cubana farm.*; 36 (2):121-8.
- Vidal, L., Pinsach, J., Striedner, G., Caminal, G., & Ferrer, P. (2008). Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 134(1-2), 127-136. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.01.011
- World Health Organization. Cholera. WHO Reporto on Global Surveillance of Epidemic.Prone Infectious Diseases. Geneva, 2000. Report No.: WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1
- Yangase, Y., Inoue, K., Ozaki, M., y Hi, I., Amano, T. y Chazona, M. 1970. Hemolysins and related enzymes of *Vibrio parahaemolyticus* I. Identification and partial Purification of enzymes. *Biken Journal*, 13:77-92.
- Zhang XH, Meaden PG, Austin B (2001) Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Appl Environ Microbiol* 67:3161–3167
- Zhang, X.H., Austin, B. 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. *J. Appl. Microbiol.*, 98:1011-1019.
- Zhong Y, Zhang XH, Chen J, Chi Z, Sun B, Li Y, Austin B (2006) Overexpression, purification, characterization and pathogenitiy of *Vibrio harveyi* haemolysin VHH. *Infect Immun* 74:6001–6005

Páginas consultadas en internet:

- Center for Food Security and Public health. Síndrome de mortalidad temprana (EMS). Cuéllar-Anjel Jorge. Agosto de 2013. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/acute-hepatopancreatic-necrosis-disease-es.pdf> Consultado el 10 de diciembre de 2015
- Cultek S.L.U 2006. Tecnología del DNA recombinante Disponible en:
<http://www.cultek.com/link/link.asp?link=/inf/otros/soluciones/DNArecombinante/Tecnica%20DNA%20recombinante.pdf> (fecha de acceso: 12 de Enero 2017)
- Ecured (2015). Consultado en: <http://www.ecured.cu/Camarón> (Fecha de acceso 20 de octubre de 2015)
- FAO 2006-2016. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Briggs, M. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 7 April 2006. [Citado 21 February 2016] http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es
- Global Biotech Consulting Group (2011). Consultado en: <http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/especies/crustaceos/camaron.html> (fecha de acceso: 20 de octubre de 2015)

Gonzalez Mañas, J.M. Cursos de biomoléculas. Consultado:

<http://www.ehu.es/biomoleculas/index.htm/> (fecha de acceso 22 de febrero 2017)

PROAQUA Aqua Negocios SA de CV. Industria acuícola. Enfermedades de camarones peneidos causados por diferentes Agentes patógenos en la camaronicultura de las Américas. (Revista electrónica. Vol. 3.6. Septiembre 2007) (consultado 13 de enero 2016). <https://issuu.com/industriaacuicola/docs/ia35>

Secretaria de agricultura, ganaderia, desarrollo rural, pesca y alimentación (2014). Consultado en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B192.aspx> (fecha de acceso 25 de octubre de 2015)

Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (2013). Consultado en: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/seguimiento_mensual_de_la_produccion_de_camaron_20 (fecha de acceso 25 de febrero de 2016)

Servicio de información agroalimentaria y pesquera (2012) <http://www.siap.gob.mx/produccion-camaron-atun/> (fecha de acceso 25 de octubre de 2015)

Voet Donlad y Judith G. Voet. Bioquímica 3a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2006.1776p; consultado: https://books.google.com.mx/books?id=r5bedH_aST0C&printsec=frontcover&dq=voet+dona+id&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiRof-M5OjLAhVKuIMKHXYEB2UQ6AEIHTAA#v=onepage&q=voet%20donald&f=false

Zamora Pantoja Diana Ruth, Quiroz Santiago Carolina, Quiñonez Ramirez Elsa Irma, Vásquez Salinas Carlos. "Coordinación de publicaciones digitales. Direccion general de servicios académicos UNAM" 2005. Vol. 6. (Consultado 15 de enero del 2016). ISSN: 1067-6079