

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

SOBREEXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA  
HEMOLISINA DEPENDIENTE DE LECITINA (HDL) DE LA  
BACTERIA *Vibrio parahaemolyticus*

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
CON OPCIÓN EN:  
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

1942

LUIS EDUARDO TELLECHEA ROBLES

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



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

## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Luis Eduardo Tellechea Robles la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Biotecnología.



---

Dr. Alonso Alexis López Zavala  
Director de Tesis



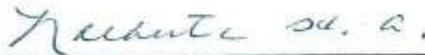
---

Dr. Enrique de la Re Vega  
Secretario



---

Dra. Gloria Irma Ayala Astorga  
Sinodal



---

M.C. Nolberta Huerta Aldaz  
Suplente

## DEDICATORIA

A mis padres y a mi hermana, las personas que más amo y las más importantes en mi vida, que siempre compartieron mis alegrías, tristezas, estrés, enojos y toda forma posible de temperamento; por todo su apoyo y amor incondicional a lo largo de mis 24 años de vida, mi carrera y ahora en la realización de este trabajo, por demostrarme que, aunque las cosas se pongan difíciles, siempre estará el apoyo de la familia sin ninguna condición.

A mis tíos, Marcela, Alma Delia, Yael y Arturo, por siempre haber estado al pendiente de mis logros a lo largo de mi crecimiento, tanto personal como profesional.

A mis abuelos, Norma, Marcos, Socorro y Humberto que, aunque ya no están aquí físicamente, hicieron notar su presencia en todo momento quitándome obstáculos del camino y poniendo nuevos escalones para que pudiera llegar más alto y poder concretar mis sueños.

A mis amigos Ingenieros en Mecatrónica, Sergio Garza, Heriberto Encinas (Tito), Nadir Carreón, Nadia Contreras, Julio Padilla, Oscar Morales (Elsa), Isaac Herrera, Jesús López (Chuy) y Carlos Romero, que comprendieron que el cambio de carrera sería para mi beneficio y que siempre se interesaron por conocer un poco de la Biología, haciendo preguntas que muchas veces no pude responder, de tan buenas que eran; pero que, aún así, jamás dejaron de mostrar un interés genuino por saber cuáles eran mis gustos e intereses profesionales. Gracias por haber estado siempre al pie del cañón y acompañarme a pesar de habernos separado hace ya cuatro años.

A mis compañeros de la especialidad en Biotecnología, que aún no sé cómo fue que empezamos a llevarnos tan bien, con tanta soltura y que todavía logran sorprenderme con sus ocurrencias día a día. Sin duda, gracias a ustedes las clases de mis últimos dos semestres de la carrera valieron totalmente la pena, sin temor a equivocarme.

A mis amigos, Angel Ortega, Tania Burgos, Renee Mange, Tadeo de la Cruz, Teresa Ibarra, Cynthia Machado y Jorge Jiménez, por acompañarme siempre y apoyarme en todo. Gracias por haber estado siempre ahí y por estar ahora.

Dedico esta tesis a cada uno de los pasos que di, a todas las bifurcaciones que se presentaron durante mi camino por la carrera, a toda la serie de cambios, tanto pequeños como drásticos, que me condujeron hasta el lugar y momento en el que ahora estoy y a las personas con las que ahora tengo el placer y la dicha de compartir mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por abrirme las puertas y darme los medios necesarios para concretar este trabajo.

Al Dr. Rogerio Sotelo, por brindarme siempre su apoyo, y guiarme de esa manera tan profesional y desinteresada como solamente él sabe hacerlo, por esforzarse para que nunca nos faltara nada en el laboratorio y poniendo siempre en primer lugar los intereses y el futuro de sus estudiantes.

A la maestra Karina García, por recibirme en mis primeros días en el CIAD, haber sido mi instructora y darse tiempo para atender mis dudas cuando recién empezaba a trabajar.

Al Dr. Alonso López, por haberse comprometido a dirigir mi tesis con todo lo que eso implicaba, por trabajar en equipo conmigo, por su paciencia y apoyo a lo largo de todo este tiempo.

A Daniel Ibarra, Luz Vázquez, Dr. Eduardo Guevara, M. C. Ignacio Valenzuela y M. C. Leonardo Fox, por estar siempre dispuestos a dejar por un momento lo que estaban haciendo para auxiliarme o ayudarme a resolver algún problema y por darle un toque no tan serio al laboratorio haciendo el trabajo diario más ameno.

Al Dr. Enrique de la Re, por siempre estar disponible y mostrar gran interés en ver concretado mi trabajo de forma correcta, haciéndome ver la importancia de conocer los fundamentos de las técnicas asociadas a éste y a futuros trabajos.

A la Dra. Gloria Ayala, por haberse entregado completa y oportunamente a la revisión de mi tesis, incluso cuando su salud no era la óptima, además de siempre enfatizar lo importante de ajustar mi escrito a los lineamientos correspondientes, e instruirme a lo largo de mi último semestre de la carrera en la asignatura de Enzimología.

A la maestra Nolberta Huerta, por haberse comprometido tan amablemente a ser parte de este trabajo y por su manera tan profesional de señalar constructivamente mis errores, además de mostrar interés en que la calidad de mi tesis fuera la mejor sin dejar de reconocer siempre los detalles positivos en mi trabajo.

Al Dr. Genaro Pimienta, por aceptarme como su tesista de maestría en CICESE, por su gran amabilidad en el poco contacto que hemos tenido y por darme motivación para esta nueva etapa de mi vida. ¡Nos veremos muy pronto!

A la Universidad de Sonora, por haberme abrigado durante seis años y haberme enseñado, a base de caídas y golpes, que decisiones como la de elegir una carrera deben pensarse más de una vez.

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1    La Acuicultura y su Impacto a Nivel Mundial	3
II.2    La Camaronicultura y su Impacto a Nivel Mundial	4
II.3    La Camaronicultura y su Impacto Ambiental en México	5
II.3.1    Eutrofización	6
II.3.2    Salinización/acidificación de suelos y desmonte	6
II.3.2.1    Destrucción de manglares	6
II.3.3    Afectación a la producción pesquera local	7
II.3.4    Otros impactos	7
II.4    Biología y Ecología del Camarón	8
II.4.1    Camarón blanco	11
II.5    Enfermedades Asociadas a Granjas Camaronícolas	12
II.6    Vibriosis	14
II.7    Bacteria <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15
II.8    Enzimas Hemolisinas	17
II.9    Sobreexpresión de Proteínas Recombinantes	18
II.9.1    Sistema de regulación de expresión Operón Lactosa	20
II.9.2    Cuerpos de inclusión y replegamiento <i>in vitro</i> en proteínas	21
II.10   Purificación de Proteínas	24
II.10.1   Cromatografía de afinidad a metales	24
II.10.2   Cromatografía de exclusión molecular	25

III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	28
V.1    Objetivo General	28
V.2    Objetivos Específicos	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	29
VI.1    Transformación Bacteriana	29
VI.2    Preparación del Inóculo Bacteriano	30
VI.3    Cinética de Sobreexpresión	30
VI.4    Lavado de Cuerpos de Inclusión y Replegamiento <i>in vitro</i> de la Proteína	31
VI.4.1    Lavado de cuerpos de inclusión	31
VI.4.2    Replegamiento de la proteína	33
VI.5    Cromatografía de Afinidad a Metales	34
VI.6    Ensayo de Actividad de Fosfolipasa	35
VI.7    Cromatografía de Exclusión Molecular	36
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
VII.1    Cinética de Sobreexpresión	38
VII.2    Replegamiento de la Proteína	40
VII.3    Purificación de la HDL por Cromatografía de Afinidad a Metales	41
VII.4    Ensayo de Actividad de Fosfolipasa	44
VII.5    Cromatografía de Exclusión Molecular	46
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. RECOMENDACIONES	51
X. LITERATURA CITADA	52

## LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I	Descripción de enfermedades comunes en camarones de cultivo.	13
Tabla II	Sistemas de expresión comerciales más utilizados en la sobreexpresión de proteínas recombinantes.	19
Tabla III	Composición del buffer de lavado 1 (base a 100 mL)	32
Tabla IV	Composición del buffer de lavado 2 (base a 100 mL).	32
Tabla V	Composición del buffer de extracción (base a 100 mL).	33
Tabla VI	Estándares de peso molecular para la cromatografía de exclusión molecular.	36
Tabla VII	Características de los estándares de peso molecular. PM: Peso molecular.	47
Tabla VIII	Cálculo de peso molecular de los picos obtenidos en la corrida. PM: Peso molecular.	48

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Zonas costeras del mundo impactadas significativamente por el hombre en el ámbito acuícola.	4
Figura 2	Zonas costeras de México impactadas significativamente por actividades humanas.	8
Figura 3	Estadios de desarrollo de los camarones peneidos: a) larva nauplio, b) larva protozoa, c) larva mysis, d) postlarva, e) juvenil-adulto.	10
Figura 4	Morfología externa del camarón blanco.	12
Figura 5	Lesiones características de la enfermedad vibriosis cuticular en un ejemplar de camarón.	15
Figura 6	Microscopía electrónica de barrido de la bacteria <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	16
Figura 7	Esquema del mecanismo de regulación del Operón Lactosa.	20
Figura 8	Niveles de organización en proteínas.	22
Figura 9	Replegamiento <i>in vitro</i> de la ribonucleasa pancreática. Se emplea también el $\beta$ -mercaptoetanol como agente reductor de los puentes disulfuro e interactúa con la urea en la desnaturalización y renaturalización al eliminarse ambos compuestos del medio donde se encuentra la proteína.	23
Figura 10	Principio de la cromatografía de afinidad a metales.	25
Figura 11	Principio de la cromatografía de exclusión molecular.	26
Figura 12	Mecanismo de la diálisis para eliminar impurezas en una muestra de proteína.	34

Figura 13	Gel SDS-PAGE al 12 % de la cinética de sobreexpresión indicando las muestras de las fracciones corridas P (precipitado) y S (sobrenadante) a las 0 (P0H y S0H), 4 (P4H y S4H), 6 (P6H y S6H) y 24 (P24H y S24H) horas respectivamente. El gel se tiñó con azul de comassie al 0.1%. MPM, Marcador de peso molecular.	39
Figura 14	Gel de electroforesis (SDS-PAGE) del proceso de replegamiento de la HDL. En cada carril se aplicó una muestra de las diferentes concentraciones de urea utilizadas en las soluciones de replegamiento (8-0M). Carril 1: MPM, Marcador de peso molecular, carril 2: 8M, carril 4: 4M, carril 6: 1M, carril 8: 0M.	41
Figura 15	Cromatograma de la purificación de la HDL. Lavado: F1 y F2. Uniones inespecíficas: F7 y F8. Uniones específicas (HDL): F9-F13.	43
Figura 16	Gel de electroforesis de la purificación de la HDL. MPM: marcador de peso molecular, Ex. Cr: extracto crudo, F1: pico 1, F8: pico 2, F9-13: pico 3.	44
Figura 17	Actividad de fosfolipasa de la HDL en una placa de Petri con medio Agar-Fosfatidilcolina. La concentración inicial de la solución de la proteína fue de 0.453 mg/mL.	45
Figura 18	Cromatograma de los estándares de peso molecular utilizados para la corrida y su correspondiente gráfica de regresión lineal (mU: miliunidades de absorbancia).	47
Figura 19	Cromatograma de la corrida donde se observan las poblaciones P1 y P2 de la HDL (mU: miliunidades de absorbancia).	48

## RESUMEN

La camaronicultura, al ser una actividad productiva de gran importancia, tanto a nivel nacional como internacional, genera grandes responsabilidades en cuanto a las precauciones y medidas de sanidad que deben aplicarse para mantener un control de calidad. Las enfermedades en granjas de cultivo son un obstáculo en la búsqueda de lo anteriormente mencionado, debido a que ocasionan diversos impactos tales como la disminución de la calidad del producto y en muchos casos, una amplia tasa de mortalidad de los ejemplares. Los estudios realizados en el laboratorio son un buen inicio con respecto a la búsqueda de respuestas ante esta problemática global ya que conlleva el desarrollo de nuevas estrategias que en el futuro puedan evitar diversas enfermedades y recuperar la calidad del producto o incluso incrementarla. Al conocer los factores que ocasionan los daños, tanto a nivel biológico como bioquímico, se facilita el uso de las metodologías empleadas para encontrar las causas y una posterior solución a la problemática. En el presente trabajo se realizó la sobreexpresión de la enzima hemolisina dependiente de lecitina (HDL) recombinante de *Vibrio parahaemolyticus*, para realizar una caracterización parcial de la misma. La HDL se sobreexpresó en forma de cuerpos de inclusión en *E. coli*. La proteína fue replegada por medio de diálisis del agente desnaturizante (urea) y purificada por cromatografía de afinidad a metales. Además, presentó actividad de fosfolipasa al utilizar como sustrato la fosfatidilcolina y se calculó el peso molecular de la proteína por medio de cromatografía de exclusión molecular. Estos estudios servirán como precedente para realizar una caracterización completa de la enzima, dado que se tienen escasas investigaciones al respecto. Este trabajo establece las bases para determinar el papel de la HDL durante la infección de *V. parahemolyticus* en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

## I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas recombinantes constituyen a todas las moléculas de naturaleza proteica que pueden producirse en organismos distintos a la fuente natural. Es decir, se introduce en un organismo diferente del original la información genética necesaria para producir la proteína deseada. Este proceso es posible mediante el método de transformación de células competentes, como bacterias (procariotas) o levaduras (eucariotas), además de células de insecto y de mamíferos, mediante la inserción de un plásmido recombinante, utilizando la resistencia a un antibiótico como método de selección. Ésta es una herramienta molecular ampliamente utilizada para la caracterización de proteínas que son difíciles de obtener de su fuente natural. De tal forma que la información obtenida permite realizar aproximaciones sobre la importancia biológica de las moléculas en estudio.

Las actividades acuícolas en el Estado de Sonora son consideradas de gran importancia en relación con la producción e impacto social, ya que proveen de alimentos ricos en proteína y en grandes cantidades para satisfacer las necesidades humanas. Una de las consecuencias derivadas de la práctica de la acuicultura es el sometimiento de los animales de cultivo a estrés, el cual es considerado como una respuesta de los organismos ante las condiciones subóptimas que pueden presentarse en el ambiente de cautiverio donde éstos se desarrollan, por lo que sus capacidades adaptativas se llevan hasta su límite y sus defensas se ven disminuidas, razón por la cual, a largo plazo, dichos organismos muestran mayor predisposición a manifestar enfermedades diversas (Gómez-Gil et al., 2001).

En los últimos años, la acuicultura ha sido afectada severamente debido a la presencia de patógenos en las granjas de cultivo, tanto de peces, como de moluscos bivalvos y crustáceos (Lightner y Lewis, 1975.), por lo que se considera pertinente orientar las investigaciones hacia la solución de esta problemática. El cultivo de camarón se ve ampliamente afectado por la presencia de organismos patógenos de diversos tipos, siendo las bacterias los agentes causales más persistentes de enfermedades como la vibriosis, principalmente, enfermedad que ocasiona grandes bajas en la producción de las granjas acuícolas.

El problema de la vibriosis toma su nombre debido a que es provocado por bacterias de género *Vibrio*. Son varias las especies a las que se les ha asociado esta enfermedad, entre las que destacan por su patogenicidad, *V. penaeicida*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y recientemente *V. parahaemolyticus*, entre otras (Lightner, 1996; Flegel et al., 2008). Todas estas especies son Gram-negativas halófilas, considerablemente patógenas, cuyo hábitat ideal es el ambiente marino.

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria que posee proteínas llamadas hemolisinas, capaces de degradar la membrana fosfolipídica de las células de la hemolinfa de los camarones, provocando daños fisiológicos y extrapolando los daños a los consumidores de éstos, ya que se le ha atribuido la causa de envenenamiento de alimentos en Japón, así como de mortalidad en cultivos acuícolas, tanto de peces como de crustáceos (Nash et al., 1992). Ésta es la principal problemática que se plantea dentro del marco teórico de la presente investigación, por lo que será necesario realizar estudios posteriores de caracterización biofísica de la proteína para profundizar en el conocimiento del papel de las enzimas hemolisinas en la salud de los camarones de cultivo.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 La Acuicultura y su Impacto a Nivel Mundial

La acuicultura es considerada una de las actividades primarias más importantes y de mayor crecimiento en el sector alimenticio, por ser proveedora de alimentos ricos en proteína y en grandes cantidades para satisfacer las necesidades de los consumidores a nivel global (Lightner y Lewis, 1975). Ante el avance de la tecnología, las pesquerías han podido desplazarse más allá de los mares marginales, por lo que las nuevas especies para captura comenzaron a sobreexplotarse y a finales del siglo XX, las capturas de peces, moluscos y crustáceos alcanzaron los 85 millones de toneladas por año (Rana e Immink, 2000). Durante las décadas de 1980 y 1990, la producción por parte de la acuicultura, tanto en las aguas continentales como marinas, tuvo un incremento acelerado, con una producción que alcanzó más de 18 millones de toneladas por año (FAO, 1995).

En cuanto a la distribución geográfica global, la producción acuícola se inclina muy fuertemente hacia el continente Asiático, particularmente hacia China, como se muestra en la Figura 1. En el año 1997, el continente Asiático produjo el 97% del total de toda la producción acuícola a nivel mundial, siendo China el país que contribuyó mayormente (67%), seguido de la India (4.9%) y Japón (3.7%). La producción acuícola en China tiene mayor influencia, siendo la mayor parte para consumo local. A nivel mundial, las zonas costeras han sido utilizadas predominantemente para el cultivo de moluscos y plantas acuáticas. Los peces y crustáceos se cultivan en grandes cantidades, siendo de los más cultivados el camarón tigre (*Penaeus monodon*), el cual se encuentra entre las diez especies de crustáceos más cultivadas. Ante el acelerado crecimiento de producción de la acuicultura desde finales del siglo XX hasta el presente, en muchos países se ha confirmado la premisa de que esta actividad puede contribuir de manera significativa al bienestar de la población, tanto local como internacionalmente. Por lo tanto, muchos países se han propuesto llevar a cabo una planeación adecuada para que, de manera colectiva, se apoye al sector y se mantenga un ambiente saludable (Rana e Immink, 2000).

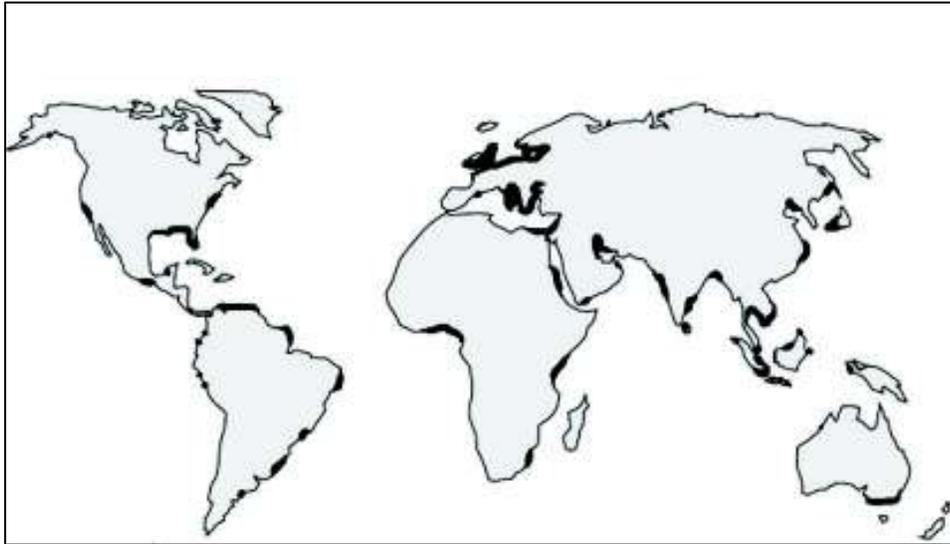


Figura 1. Zonas costeras del mundo impactadas significativamente por el hombre en el ámbito acuícola (Páez-Osuna, 2005).

## II. 2 La Camaronicultura y su Impacto a Nivel Mundial

En los últimos veinte años, la camaronicultura ha sido la actividad económica que mayormente ha acelerado su crecimiento en áreas tropicales y subtropicales. El desarrollo de la camaronicultura se ha visto acompañado de un controvertido debate sobre los impactos ambientales, económicos y sociales que la actividad implica (Páez-Osuna, 2001a). Entre 1 y 1.5 millones de hectáreas de las zonas costeras del mundo se han convertido en granjas de cultivo, principalmente en países como China, Tailandia, India, Filipinas, Malasia, Ecuador, México, Honduras, Panamá y Nicaragua (Páez-Osuna, 2001b). En diversas localidades de estos países, el crecimiento de la camaronicultura ha alcanzado un nivel de desarrollo tal que ya comienzan a manifestarse algunos síntomas de impacto ambiental. Estos impactos han ocasionado una disminución significativa en la producción y por lo tanto, diversas preocupaciones en materia de salud sobre el manejo y sustentabilidad de las zonas costeras (Páez-Osuna et al., 2003).

En el ámbito internacional, existe un consenso general respecto a la captura de camarón silvestre, ya que éste ha alcanzado su máximo sustentable (aproximadamente 1.6-2.2 millones de toneladas) y su demanda puede ser solamente satisfecha por medio de la camaronicultura. En el año 1998, se documentó una producción de camarón de 850,000 toneladas, obtenidas a partir de un área de operación de 999,350 hectáreas, de las cuales, la mayoría fue producida en el continente Asiático y lo demás en Latinoamérica (Páez-Osuna et al., 2003). Cinco de las especies cultivadas incluyen casi la totalidad de la producción acuícola de Asia, siendo el camarón tigre el más cultivado, por su gran tamaño y crecimiento rápido. Los camarones banana e hindú se cultivan comúnmente también en el continente Asiático. Otras especies de gran importancia en la región son el camarón oriental, cultivada en China y el camarón kuruma en Japón, Taiwan, China y Brasil (Rosenberry, 1998). El camarón blanco y el camarón azul son las especies con mayor producción en el continente americano (Páez-Osuna, 2001a).

### **II. 3 La Camaronicultura y su Impacto Ambiental en México**

El cultivo de camarón no fue destacado nunca como una actividad tradicional de la región, pero con el transcurso del tiempo comenzó a convertirse en una de las industrias con más rápido desarrollo. En tan sólo 20 años, la camaronicultura del Golfo de California llegó a representar el 90% de la capacidad nacional en esa industria (Martínez y Seijo, 2001) y es un gran ejemplo de producción a nivel latinoamericano; en ocasiones, la producción regional se ha consumido mayormente en el mercado nacional, pues los precios que se ofertan han sido mayores que los del mercado extranjero (Matsuo, 1984).

Hace aproximadamente 10 años, se consideraba que la industria camaronícola regional no implicaba daños ambientales significativos (WWF, 2000), pero actualmente se reconoce lo contrario (CIBNOR-SAGARPA, 2008). Existen diversos efectos que ocasionan los cultivos de camarón en las costas del Golfo de California, algunos de los cuales se mencionan a continuación.

### **II. 3. 1 Eutrofización**

Las bases del cultivo de camarón se encuentran en la maximización del crecimiento de los individuos por medio de alimento artificial y/o fertilizantes inorgánicos (Hernández y Magallón, 1991). Por esta razón, es bastante común que el alimento y los fertilizantes se administren de manera excesiva, pero rara vez la tasa de transformación de alimento a biomasa es mayor al 50%, por lo que la formación de sedimentos y nitrógeno disuelto en agua al final es algo inevitable (González-Félix y Pérez, 2007). La liberación de grandes cantidades de aguas de desecho con sedimentos y nitrógeno azolva y eutrofiza a los sistemas costeros.

### **II. 3. 2 Salinización/acidificación de suelos y desmonte**

Al abandonarse las granjas por poca productividad o por haber tenido incidencia de enfermedades, los suelos se vuelven hipersalinos, ácidos y erosionados. Estas características químicas de los suelos se alteran también con la aplicación de cal para tratar de eliminar patógenos en el ambiente. Además de alterar las condiciones del suelo, se presenta el problema del desmonte de amplias extensiones de terreno para la instalación de granjas camaronícolas. Se ha recomendado que las granjas se instalen sobre la línea de costa, con el fin de evitar daños a la vegetación por desmonte (González-Ocampo et al., 2004).

#### **II.3. 2. 1 Destrucción de manglares**

Los manglares se consideran como un tipo de biomasa formada por árboles altamente tolerantes a la sal, que ocupan la zona intermareal cercana a desembocaduras de cursos de agua dulce de las costas de latitudes tropicales y subtropicales de la Tierra, entre las que se incluyen los estuarios y zonas costeras.

Poseen una gran diversidad biológica con alta productividad primaria, por lo que son hábitats donde se encuentran muchas especies de aves, peces, moluscos, crustáceos entre otras (Hogarth, 1999).

Grandes extensiones importantes de mangle han sido destruidas a causa de la expansión urbana e industrial en México (Brand, 1982). Se estima que a principios de la década de 1990 se destruyeron 10,000 hectáreas de mangle para la construcción de granjas camaronícolas a lo largo del Golfo de California (Flores-Verdugo et al., 1992).

### **II. 3. 3 Afectación a la producción pesquera local**

Al bombear agua marina hacia las granjas de cultivo, se succionan larvas de todo tipo de organismos vertebrados e invertebrados locales. La succión de agua en zonas importantes para la pesca puede reducir la producción. Se estima que el bombeo de agua por granjas de camarón con extensiones mayores a 4,000 hectáreas puede causar la extracción de postlarvas silvestres en suficiente cantidad como para reducir la producción total de camarón silvestre (Aburto-Oropeza et al., 2008).

### **II. 3. 4 Otros impactos**

En general, como se muestra en la Figura 2, las costas mexicanas pueden verse afectadas significativamente por diversos factores. Así, los florecimientos algales pueden deteriorar la calidad del agua marina aledaña, o bien, especies exóticas utilizadas como alimento pueden escapar de las granjas de cultivo hacia el entorno (Páez-Osuna et al., 2003). Las aguas de baja salinidad propicia el crecimiento de algunas especies de camarón, por lo que la práctica extendida de la camaronicultura en el noroeste de México puede amenazar la disponibilidad de agua dulce (Pérez-Velázquez et al., 2007).

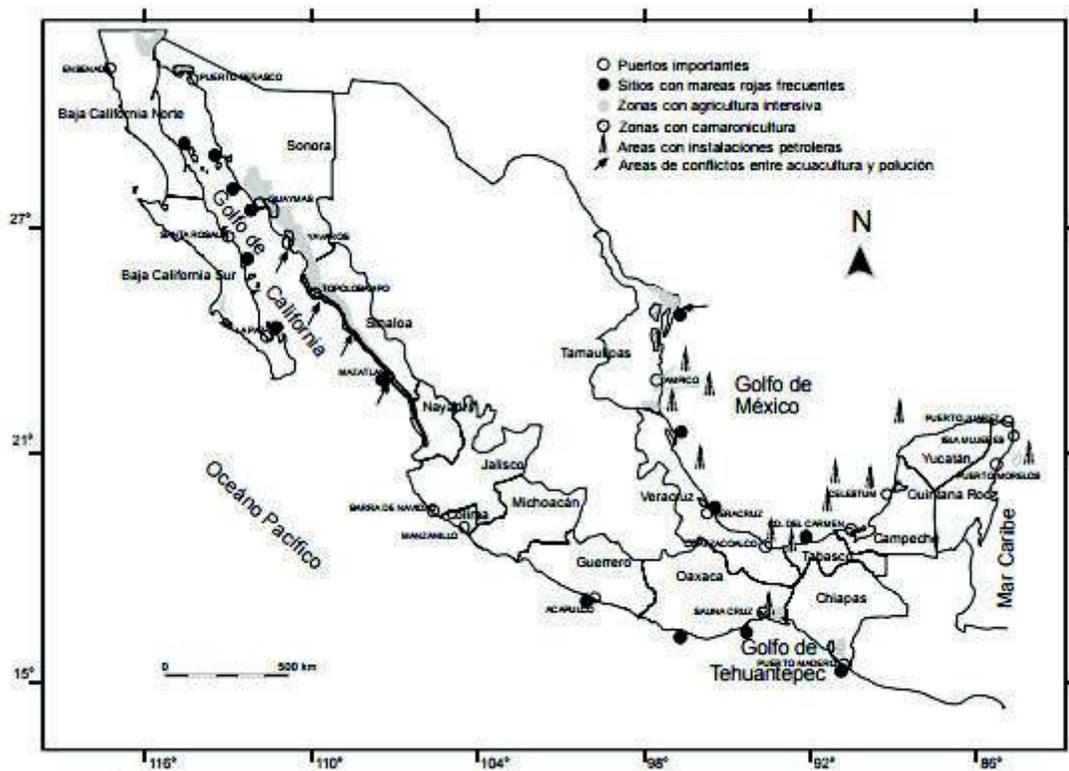


Figura 2. Zonas costeras de México impactadas significativamente por actividades humanas (Páez-Osuna et al., 1998).

## II. 4 Biología y Ecología del Camarón

El camarón es un crustáceo de la familia Penaeidae que pertenece al orden Decapoda, el cual es el más extenso, con alrededor de 10,000 especies, distribuidas entre camarones, cangrejos y langostas. La distribución geográfica de los camarones comprende las zonas costeras de mares intertropicales y subtropicales, asociados a estuarios y lagunas costeras, en donde se encuentran fondos fangosos con gran cantidad de materia orgánica y vegetación sumergida (Branford, 1981; Rönnbäck et al., 2002).

Este crustáceo se reproduce en el mar, pero usualmente las larvas planctónicas son arrastradas por corrientes hacia estuarios y lagunas costeras rodeados por manglares (Boschi 1974; Gillet, 2008), donde las larvas tienen oportunidad de aprovechar la materia orgánica

para su alimentación y comenzar su crecimiento. En el momento de convertirse en juveniles (aproximadamente 10 cm de longitud), regresan hacia el océano abierto para incorporarse a la población de adultos (Boschi, 1974). De esta manera, estuarios y lagunas costeras funcionan como ecosistemas importantes, por poseer abundante alimento que propicia la crianza de estos organismos, así como otras especies marinas tales como cangrejos y peces (Lindén y Jernelöv, 1980).

La fisiología de los camarones va cambiando a lo largo de su ciclo de vida, ya que deben modificarse sus procesos de osmorregulación; es decir, el intercambio de material entre su cuerpo y el agua que lo rodea con diferentes concentraciones de salinidad, agua salada en el océano, y agua salobre o casi dulce en lagunas costeras y estuarios (Lemaire et al., 2002). En el desarrollo del camarón, cuando la larva eclosiona, cerca del fondo marino, tienen un estadio pequeño y simple, es decir, pocas estructuras en su cuerpo, conocido como nauplio; conforme se desarrolla, estas larvas poco a poco aumentan el número de sus apéndices y comienza a cambiar el recubrimiento quitinoso de su superficie en un proceso conocido como ecdisis o muda, y es hasta entonces cuando su apariencia física se transforma de manera drástica. Los diferentes estadios larvarios están divididos en: nauplio, zoea, mysis, postlarvas y juveniles, como se muestra en la Figura 3 (García y Le Reste, 1987).

Las larvas en etapa de nauplio se alimentan de partículas diminutas y microorganismos suspendidos en el agua, cuando comienzan a crecer se alimentan de fitoplancton y posteriormente de pequeños organismos del zooplancton (Robertson, 1988; Rodríguez et al., 1994). Los camarones juveniles crecen hasta convertirse en adultos sexualmente maduros, los cuales tienen un período continuo de reproducción a lo largo del año, con variaciones de intensidad en algunos meses dependiendo de la especie que se trate (García y Le Reste 1987). Los camarones son omnívoros, a lo largo de su ciclo de vida se alimentan de algas y algunos invertebrados, según abundan en su entorno. También pueden aprovechar los restos de otros organismos muertos, lo que los hace de cierta forma animales carroñeros, que pueden incluso alimentarse también de materia orgánica y bacterias que se encuentran distribuidas en el fango (McTigue y Zimmerman, 1991).

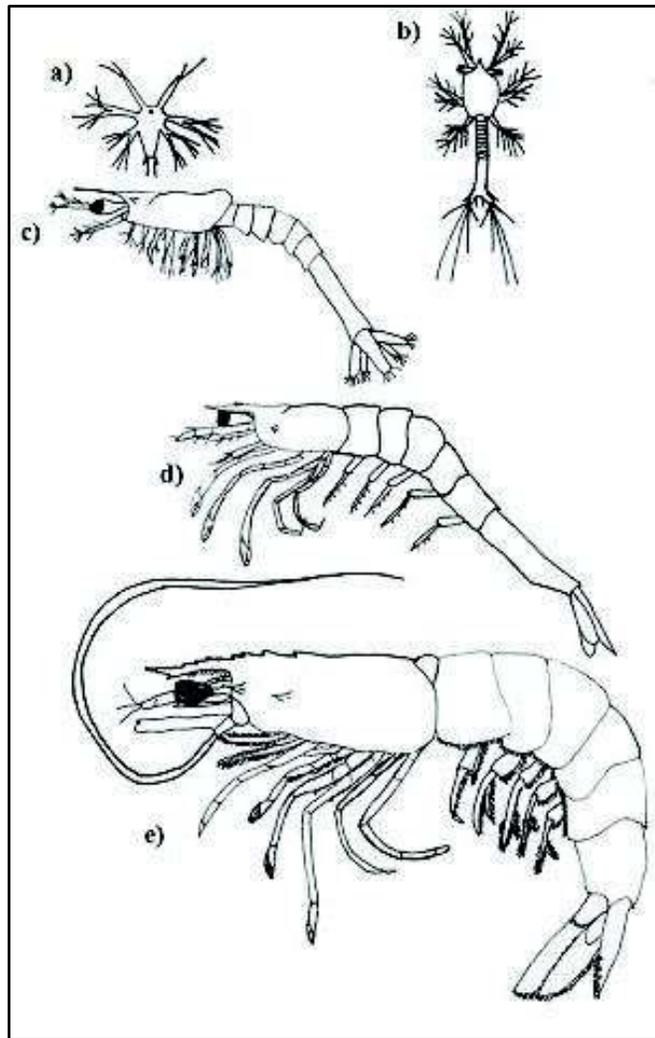


Figura 3. Estadios de desarrollo de los camarones peneidos: a) larva nauplio, b) larva protozoa, c) larva mysis, d) postlarva, e) juvenil-adulto (García y Le Reste, 1987)

En la mayoría de las especies de camarón, las larvas suelen distribuirse cerca del fondo marino durante el día, mientras que durante la noche se desplazan hacia la superficie (Rothlisberg, 1982). Este es un patrón de migración vertical que sigue la mayor parte de las especies que conforman el zooplancton, con la finalidad de protegerse de los depredadores durante el día (Iwasa, 1982; Loose y Dawidowicz, 1994). Los camarones, a su vez, son el alimento de muchos otros organismos marinos y estuarinos, como ciertos peces (Robertson,

1988), por lo que su papel y presencia en el ecosistema se considera de vital importancia dentro de la cadena trófica de los organismos marinos.

Sin embargo, los camarones sufren de una explotación excesiva y en ocasiones los pescadores los atrapan en sus redes en su fase juvenil y de adultos tempranos (Cifuentes-Lemus et al., 1997), lo que no permite que alcancen su estado reproductivo y, como consecuencia, provoca que no se reproduzca la población y no sea posible su recuperación de manera adecuada. Otro hecho lamentable es la destrucción de zonas de manglar y que los estuarios y lagunas costeras se ven contaminados con desechos urbanos e industriales. Esto representa un gran impacto a los ecosistemas, pues son estas zonas donde ocurre la mayor parte de la crianza y alimentación para el camarón y muchas otras especies de organismos marinos.

#### **II. 4. 1 Camarón blanco**

El camarón blanco (Figura 4) es una especie de crustáceo decápodo nativa de la costa oriental del Océano Pacífico, por lo que se le encuentra desde Sonora, México hacia Centro y Sudamérica en las costas de Perú. Esta especie se encuentra mayormente distribuida en hábitats marinos tropicales. En 1973, esta especie fue introducida en el estado de Florida para la producción acuícola, con base en ejemplares capturados de las costas de Panamá. Los cultivos de camarón blanco ampliaron su extensión después hacia el sudeste de Asia y en otros países de Latinoamérica. La producción de camarón blanco a nivel mundial en el año 2004 alcanzó 1,116,000 toneladas, sobrepasando la producción de camarón tigre en países asiáticos como China, Taiwán y Tailandia (Bermúdez et al., 2002).

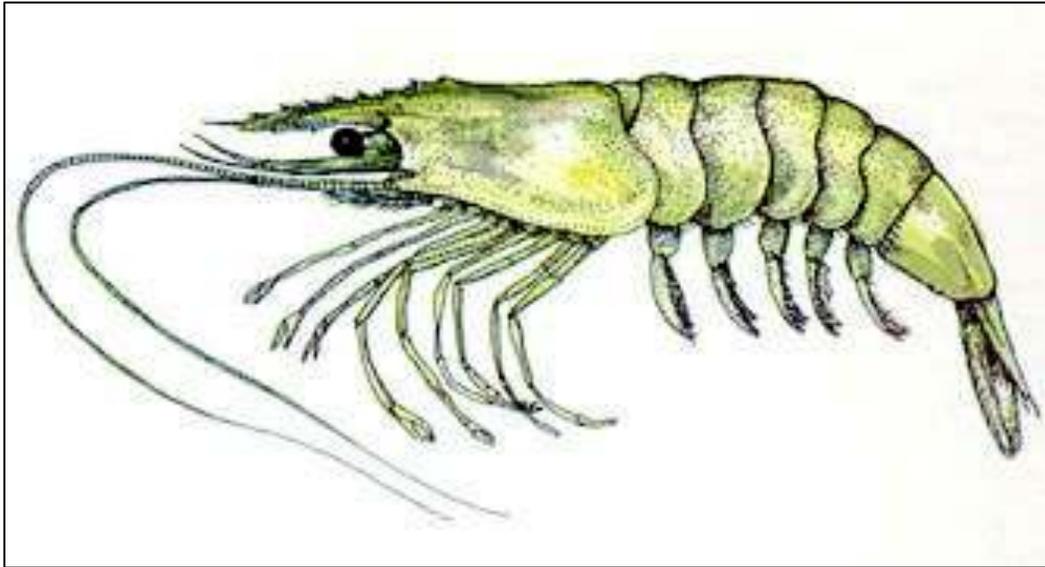


Figura 4. Morfología externa del camarón blanco.

## **II. 5 Enfermedades Asociadas a Granjas Camaronícolas**

Existe en la actualidad un claro vínculo entre la calidad del agua de las granjas de cultivo y las enfermedades, el cual cada vez es considerado más delimitado. El estrés es una de las principales causas del desgaste excesivo de los organismos, pues las condiciones ambientales subóptimas que se ejercen sobre estos organismos extienden sus respuestas adaptativas más allá de lo que sus posibilidades lo permiten (Gómez-Gil et al., 2001). El efecto de estos estresores se presenta desde niveles bioquímicos y moleculares de forma inicial, por lo que se induce una serie de respuestas funcionales y estructurales en los procesos de regulación hormonal, osmorregulación, metabolismo y regulación inmunológica, afectando así la capacidad de supervivencia, reproducción y crecimiento de los organismos. En la Tabla I se desglosan algunas de las enfermedades más comunes asociadas a los cultivos de camarones.

Tabla I. Descripción de enfermedades comunes en camarones de cultivo (FAO, 1995)

ENFERMEDAD	AGENTE	SÍNDROME	MEDIDAS
<b>Mancha blanca (WSD); también conocida como WSBV o WSSV</b>	Parte del síndrome de manchas blancas, complejo (recientemente reclasificado en una nueva familia como nimavirus)	El camarón severamente infectado manifiesta reducción en el consumo de alimentos, letargo; alta mortalidad, que puede alcanzar hasta del 100% de la población entre los 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 iodo, 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.
<b>Síndrome del Taura (TS); también conocido como Virus del Síndrome de Taura (TSV) o Enfermedad de Cola Roja</b>	Virus de ARN de una sola banda (Picornaviridae)	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 apéndices; la mortalidad varía de 5 a 95%; 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.
<b>Necrosis infecciosa hipodermal y hematopoiética (IHHNV), causando Síndrome de Deformidad (RDS)</b>	Parvovirus sistémico	Baja mortalidad de <i>P. vannamei</i> ; resistente; pero hay una reducción en la alimentación y baja 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.	Uso de cepas libres de patógenos específicos (SPF) y resistentes a patógenos específicos (SPR); lavar y desinfectar huevos y nauplios; desinfección total de las instalaciones de cultivo para evitar la reintroducción.
<b>Necrosis Baculoviral de la Glándula Intestinal (BMN); también conocida</b>	Baculovirus entérico no ocluido	Infecta los estadios larvales y postlarvales, causando una gran mortalidad;	Separar los huevos de las heces, lavar huevos y nauplios con agua de mar

como enfermedad de la glándula intestinal turbia o enfermedad del hígado blanco turbio.

turbidez blanca del hepatopáncreas 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.

limpia y desinfectarlos con iodo y/o formalina; desinfectar instalaciones infectadas para evitar nuevos brotes.

Puede causar varios síndromes importantes, tales como luminiscencia y los llamados síndromes zoea-2 y de bolitas.

Manejo cuidadoso del sistema.

En incubadora, se ve como luminiscencia en el agua y/o cuerpo del camarón; menor alimentación y alta mortandad.

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.

## Vibriosis

*Vibrio* spp., particularmente *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*

En estanques, los altos niveles de bacterias del género *Vibrio* se asocian con la decoloración roja del camarón (especialmente en las colas) y necrosis interna y externa; menor alimentación y mortalidad crónica; una segunda infección resultado de un pobre manejo ambiental debilita al camarón, el cual es susceptible a infecciones virales.

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.

## II. 6 Vibriosis

La vibriosis es una de las enfermedades que mayores daños ocasiona en cultivos de bivalvos y de peces. Así mismo, la vibriosis se presenta en organismos marinos alrededor de todo el mundo y en todos los crustáceos marinos, incluyendo a los camarones, los cuales son muy susceptibles. Esta enfermedad es causada por bacterias Gram-negativas pertenecientes a la familia Vibrionaceae, de las cuales, las más patógenas son 14 especies, entre las que se encuentra *Vibrio parahaemolyticus*. Todas las especies del género *Vibrio* forman parte de la

microflora de los camarones, tanto de vida silvestre como de granjas de cultivo y se vuelven patógenos oportunistas cuando las defensas del organismo se ven suprimidas.

Esta enfermedad presenta diferentes síndromes, como vibriosis oral y entérica, vibriosis cuticular y de apéndice, heridas de vibriosis localizadas (Figura 5), vibriosis sistémica y hepatopancreatitis (Lightner, 1996).



Figura 5. Lesiones características de la enfermedad vibriosis cuticular en un ejemplar de camarón (Lightner, 1996).

### **II.7 Bacteria *Vibrio parahaemolyticus***

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria anaerobia facultativa, halófila, de forma bacilar, Gram-negativa que habita en todos los océanos de forma permanente. En la figura 6 se muestra una imagen de la morfología de *V. parahaemolyticus*. Esta bacteria pertenece a la familia Vibrionaceae y es el microorganismo patógeno responsable de epidemias masivas en cultivos de Tailandia (Nash et al., 1992) y en Filipinas (Lavilla-Pitogo et al., 1998). Se le ha

atribuido su patogenicidad a enzimas llamadas hemolisinas. La especie *V. parahaemolyticus* es muy diversa y sus miembros pueden diferir hasta en un 60% en la secuencia del ADN de sus genomas (Makino et al., 2003). Esta diversidad es muy clara en *V. parahaemolyticus* aislados del mar, bivalvos y peces. No obstante, en epidemias recientes no se detecta diversidad en aquellos vibrios aislados de las deposiciones de pacientes infectados por esta bacteria (Oliver y Kaper, 1997).

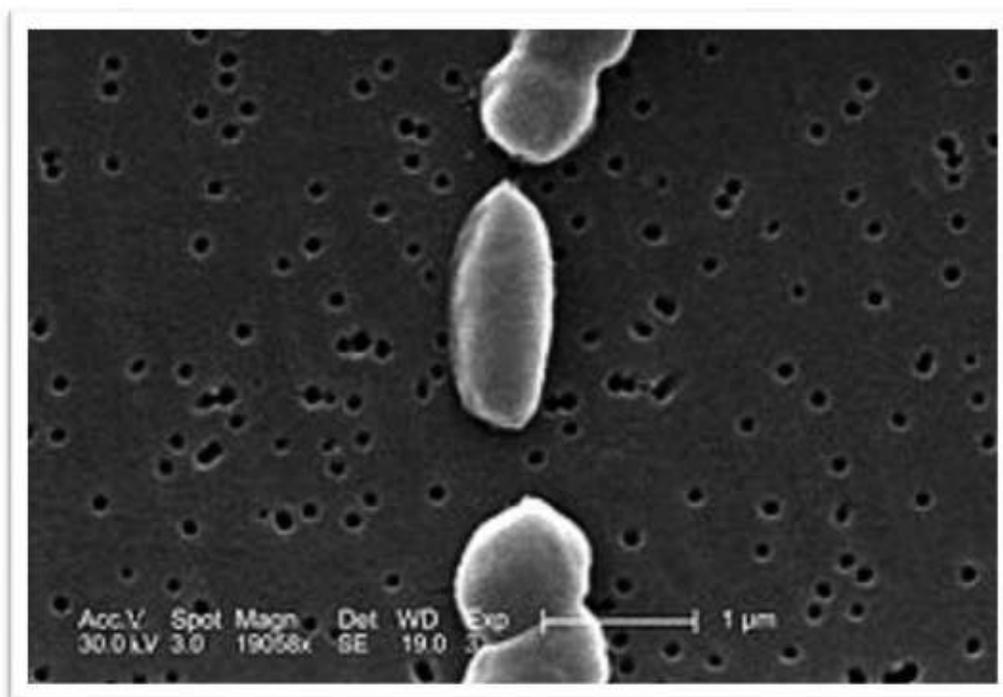


Figura 6. Microscopía electrónica de barrido de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*.

Los factores de virulencia asociados a estos vibrios patogénicos incluyen los productos de los genes *HDT*, los cuales codifican para una hemolisina directa termoestable, asociada con el fenómeno de Kanagawa (Daniels et al., 2000) además del gen *HTR* que codifica para una hemolisina estrechamente relacionada con la hemolisina directa termoestable (HDT). Estas hemolisinas son enzimas con capacidad hemolítica como lipasas, sin embargo los mecanismos por los cuales estos factores aumentan la virulencia no han sido debidamente caracterizados (Park et al., 2004).

## II. 8 Enzimas Hemolisinas

Las enzimas hemolisinas son un tipo de proteínas que ocasionan lisis en los glóbulos rojos (eritrocitos) de la sangre al dañar su membrana celular. Aunque la actividad lítica de algunas enzimas hemolisinas microbianas en las células de la sangre se consideran de importancia para adquirir nutrientes, pueden ocasionar una disminución en la concentración de glóbulos rojos y originar un síndrome conocido como anemia. Muchos organismos patógenos productores de hemolisinas no causan una lisis significativa durante una infección. Las hemolisinas pueden lisar eritrocitos *in vitro* y tienen también capacidad de apuntar hacia otras células, lo que representa uno de los efectos de estas enzimas al infectar un organismo (Miyamoto et al., 1969).

Muchas bacterias producen este tipo de enzimas y pueden detectarse en un laboratorio mediante ensayos de actividad hemolítica *in vitro*. Como se mencionó previamente, no solamente atacan a los eritrocitos, pues son considerados potencialmente citotóxicos para leucocitos, monocitos, linfocitos y macrófagos, lo que puede ocasionar autólisis y muerte celular. Una forma en la que las enzimas hemolisinas actúan, es mediante la formación de poros en la bicapa de fosfolípidos de las células. Otros tipos de hemolisinas se encargan de lisar los eritrocitos mediante hidrólisis de los fosfolípidos en la bicapa (Honda et al., 1989).

La bacteria *V. parahaemolyticus*, así como otras especies del género *Vibrio*, posee enzimas hemolisinas (Zhang y Austin, 2005), que ocasionan graves daños al camarón de cultivo en granja al ocasionarle problemas de vibriosis. De todos los tipos de hemolisinas estudiadas, la hemolisina directa termoestable (HDT) es la enzima más documentada como el agente responsable que causa el fenómeno de Kanagawa en humanos. También han sido reportadas y documentadas, otras hemolisinas similares a la HDT producidas por cepas KP-negativas de *V. parahaemolyticus* (u otros vibrios), que son las que no provocan el fenómeno de Kanagawa. Similar a la HDT, se ha reportado otro factor hemolítico de *V. parahaemolyticus* que es activado a través de la adición de lecitina (fosfatidilcolina), a la que

se denominó “Hemolisina dependiente de lecitina” o HDL, la cual se ha reportado que también podría tener actividad de fosfolipasa (Yanagase et al., 1970).

Muchas de las enzimas hemolisinas producidas por especies del género *Vibrio* se consideran factores de virulencia muy representativos, y se han detectado genes codificantes para hemolisinas en las cepas patógenas de estos Vibrios (Miyamoto et al., 1969; Honda et al., 1989). Se ha reportado también que algunas de estas bacterias son causantes de distintos síntomas de vibriosis, lo que causa considerables pérdidas económicas en la industria camaronícola a lo largo de todo el mundo (Karunasagar et al., 1994; Saeed, 1995).

## II. 9 Sobreexpresión de Proteínas Recombinantes

Un sistema de expresión consiste en un conjunto de elementos genéticos que se encuentran configurados óptimamente para llevar a cabo el control de la transcripción y la traducción de las secuencias a expresar. La bacteria *Escherichia coli* se encuentra constituida por dos componentes: uno que actúa como huésped y otro como vector de expresión, el cual posee todos los elementos genéticos que se necesitan para la transcripción y traducción en el interior de dicha bacteria. En lo que se refiere a la bacteria, es necesario tomar en cuenta ciertos criterios (por ejemplo, nutrientes, temperatura, oxigenación, etc.), con el fin de obtener una expresión eficiente (Makrides, 1996).

Con referencia a la segregación plasmídica, es importante el mecanismo de retención del vector en la célula. Un mecanismo común que se utiliza para evitar el inconveniente de la segregación es la coexpresión de un gen codificante para la resistencia a un marcador de selección, generalmente un antibiótico, en el vector de clonación, de manera que únicamente las células que posean el vector en su interior sean capaces de propagarse en un medio de cultivo, el cual también debe contener el marcador de selección. Otro mecanismo que se utiliza para prevenir la segregación del vector y evita el uso de antibióticos, es la inserción dentro del vector, de regiones cromosómicas que complementen la auxotrofia de una determinada cepa bacteriana (Vidal et al., 2008). Es decir, que solamente las células que

posean el vector sean capaces de crecer en un medio de cultivo que carezca del elemento para el que la cepa es auxótrofa.

La cepa de *E. coli* que más se utiliza en sistemas de expresión es BL21, esto debido a que es defectiva en las proteasas OmpT y Lon, que están involucradas en la degradación de proteínas. En un caso concreto, hablando sobre los sistemas que utilizan los vectores de expresión pETy pRSET, la cepa de expresión lleva contenido el ADN del bacteriófago DE3 integrado al cromosoma. A la vez, el bacteriófago DE3 contiene el gen que codifica para la T7 ARN polimerasa regulado por el promotor lacUV5, cuyo proceso de transcripción es inducido mediante la adición del agente inductor isopropil- $\beta$ -D- tiogalactopiranosido.

En la Tabla II se muestran los sistemas de expresión más comúnmente utilizados para la sobreexpresión de proteínas, entre los que se encuentran los sistemas pETy pRSET, anteriormente mencionados.

Tabla II. Sistemas de expresión comerciales más utilizados en la sobreexpresión de proteínas recombinantes (Makrides, 1996).

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]

## II. 9. 1 Sistema de regulación de expresión Operón Lactosa

La regulación de los genes en organismos procariontas se lleva a cabo mediante sistemas llamados operones. Un operón es conocido como una unidad genética funcional formada por un grupo de genes capaces de ejercer la regulación de su propia expresión a través de los sustratos con los que interaccionan las enzimas codificadas por sus genes (Kennell y Riezman, 1977). El Operón Lactosa es un sistema de regulación de tipo inducible de control negativo, es decir, que en condiciones normales no se expresa, debido a la acción de una proteína de carácter represor que impide el proceso de transcripción, la cual sólo se activa en respuesta a un agente inductor que funciona como activador (Oehler et al., 1990). En la Figura 7 se representa un diagrama con los componentes del Operón Lactosa y su función.

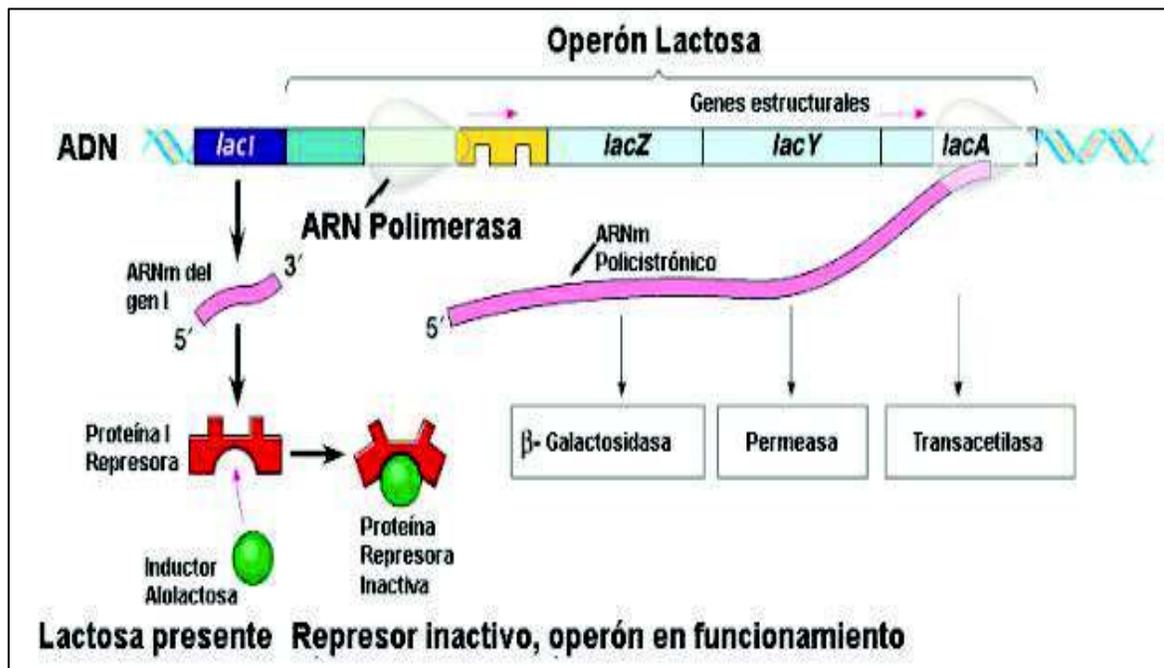


Figura 7. Esquema del mecanismo de regulación del Operón Lactosa (Jacob y Monod, 1961).

## II. 9. 2 Cuerpos de inclusión y replegamiento *in vitro* en proteínas

Con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante desde los años 1970's, se comenzó con la producción en organismos manipulables y con la comercialización de proteínas de interés específico, por parte de compañías farmacológicas principalmente. Estas industrias utilizan mayormente bacterias como los organismos productores, debido a que facilitan el diseño de procesos de producción rápidos y de menor costo. A pesar de las grandes ventajas que se presenta en el uso de bacterias en procesos de ingeniería genética, en la actualidad se presenta un obstáculo relevante que se considera necesario vencer, tratándose de la agregación proteica (García-Fruitos et al., 2007).

La agregación proteica es un fenómeno que ocurre cuando las bacterias muestran un estrés celular, ocasionado por consecuencia de forzarlas a producir una proteína de interés en concentraciones muy elevadas, lo que provoca que las proteínas que se producen se acumulen en forma de agregados insolubles, denominados comúnmente "cuerpos de inclusión". Los cuerpos de inclusión se definen como agregados proteicos de alta densidad, refráctiles, muy hidratados, resistentes a detergentes y de medida variable. Se piensa que estos agregados estaban formados por proteína en estado inactivo, la cual, de esta manera no resulta útil para fines biotecnológicos. Recientemente se ha de mostrado que, contrario a lo que se creía, la proteína presente en muchos de los agregados proteicos de bacterias se encuentra de forma activa y dispuesta en el núcleo de los agregados siguiendo un patrón definido, por lo cual muchas veces es posible recuperar la proteína de interés experimental de forma activa y funcional, lo que permite procesarla mediante diversos métodos (García-Fruitos et al., 2007).

Cuando la proteína se expresa como cuerpos de inclusión es necesario solubilizarlos y proceder a métodos de replegamiento *in vitro* para obtener la forma funcional de la proteína tal y como se encuentra en la naturaleza; es decir, obtener el plegamiento correcto y organización estructural que permite que ésta desarrolle su función. La información necesaria para la formación de una determinada estructura tridimensional de una proteína radica en su secuencia

de aminoácidos; partiendo de ésta, es posible llevarla hasta presentar su estructura funcional (terciaria), con base en los diferentes niveles de organización (Figura 8).

El tratamiento de una proteína con urea, ocasiona un desplegamiento completo de ésta mostrando la estructura primaria (Figura 9). La urea es una sustancia desnaturizante que desestabiliza las interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, etc.) al competir con los grupos funcionales de la molécula. La proteína reducida y desnaturizada es enzimáticamente inactiva, pues la estructura tridimensional nativa se ha destruido; si la urea se elimina, la proteína vuelve a plegarse normalmente (Peretó et al., 2007) (véase el caso de la proteína ribonucleasa pancreática en la Figura 9).

El plegamiento nativo de una proteína debe ser lo más estable termodinámicamente. El proceso es prácticamente espontáneo, ya que existen interacciones favorables, energéticamente hablando, entre los grupos de la molécula plegada, como uniones electrostáticas, enlaces de Van der Waals y puentes de hidrógeno internos. Datos como éstos han sido verificados a partir de estudios en el plegamiento *in vitro* (Peretó et al., 2007).

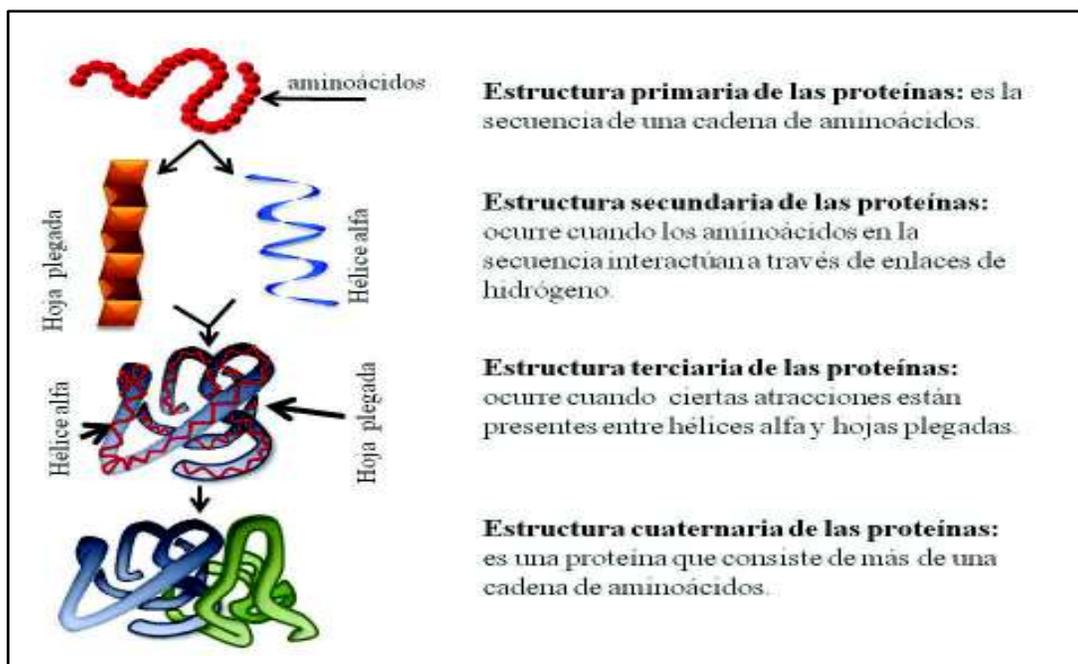


Figura 8. Niveles de organización en proteínas (Nelson y Cox, 2000).

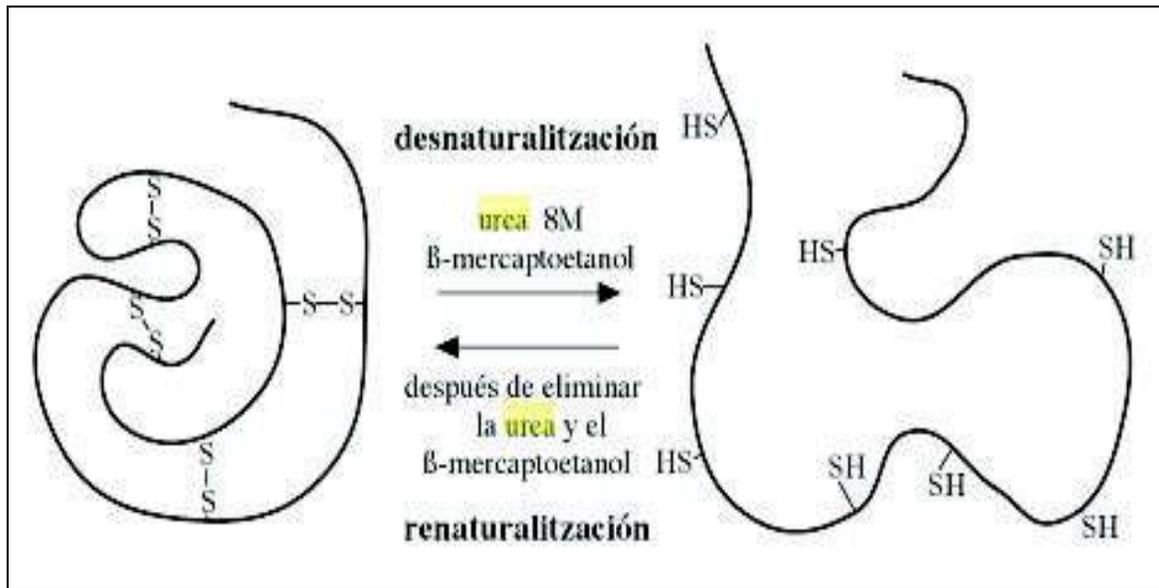


Figura 9. Replegamiento *in vitro* de la ribonucleasa pancreática. Se emplea también el  $\beta$ -mercaptoetanol como agente reductor de los puentes disulfuro e interactúa con la urea en la desnaturalización y renaturalización al eliminarse ambos compuestos del medio donde se encuentra la proteína (Peretó et al., 2007).

Existen proteínas que catalizan o ayudan en el proceso de plegamiento en la célula; algunos ejemplos son las proteínas disulfuro isomerasas, que llevan a cabo la formación de enlaces disulfuro, otras son las peptidil prolil isomerasas, las cuales catalizan la isomerización de los enlaces cis-trans de los enlaces peptídicos de Prolina (Pro), además de otro tipo de proteínas, conocidas como carabinas moleculares (chaperonas), que intervienen en la aceleración del proceso de plegamiento, además de reparar proteínas dañadas o plegadas incorrectamente (Peretó et al., 2007).

## **II.10 Purificación de Proteínas**

La purificación es un conjunto de procesos diversos que permiten el aislamiento de una proteína de interés de una mezcla compleja o extracto crudo. La purificación de proteínas es de vital importancia para una posterior caracterización de funciones y estructura, así como su interacción con algún receptor celular o anticuerpo. La materia prima para una purificación se obtiene generalmente de material biológico o cultivo microbiano. El proceso de purificación consiste en: extraer o liberar la proteína de la matriz donde se encuentra (membrana, periplasma, etc.), hacer una separación de las partes proteica y no proteica, para finalmente, separar solamente la proteína deseada de todas las demás (GE Life Sciences, 2007).

### **II. 10. 1 Cromatografía de afinidad a metales**

La cromatografía de afinidad nos permite separar mezclas proteicas a través de su afinidad o capacidad de unión de la proteína a un ligando determinado; de esta manera, las proteínas que son retenidas en la columna son exclusivamente aquellas que pueden unirse específicamente a un ligando previamente unido de forma covalente a la matriz de la columna. Cuando ciertas proteínas no se unen al ligando, son lavadas a través de la columna; la proteína de interés que quedó retenida en la columna se eluye de la matriz empleando una solución que contenga, ya sea el ligando de forma libre u otro compuesto que rompa la interacción entre el ligando y la proteína (Valcárcel y Gómez, 1988). Lo anterior se considera el fundamento de la técnica, el cual se representa gráficamente en la figura 10.

Cuando la homogeneidad de la proteína se ha establecido, es posible llevar a cabo la caracterización de ésta, lo cual puede hacerse mediante métodos para conocer su peso molecular, determinar si contiene una cadena polipeptídica simple o múltiple, hallar el peso molecular de cada una de ellas y su secuencia de aminoácidos correspondiente (Haschemeyer y Haschemeyer, 1973).

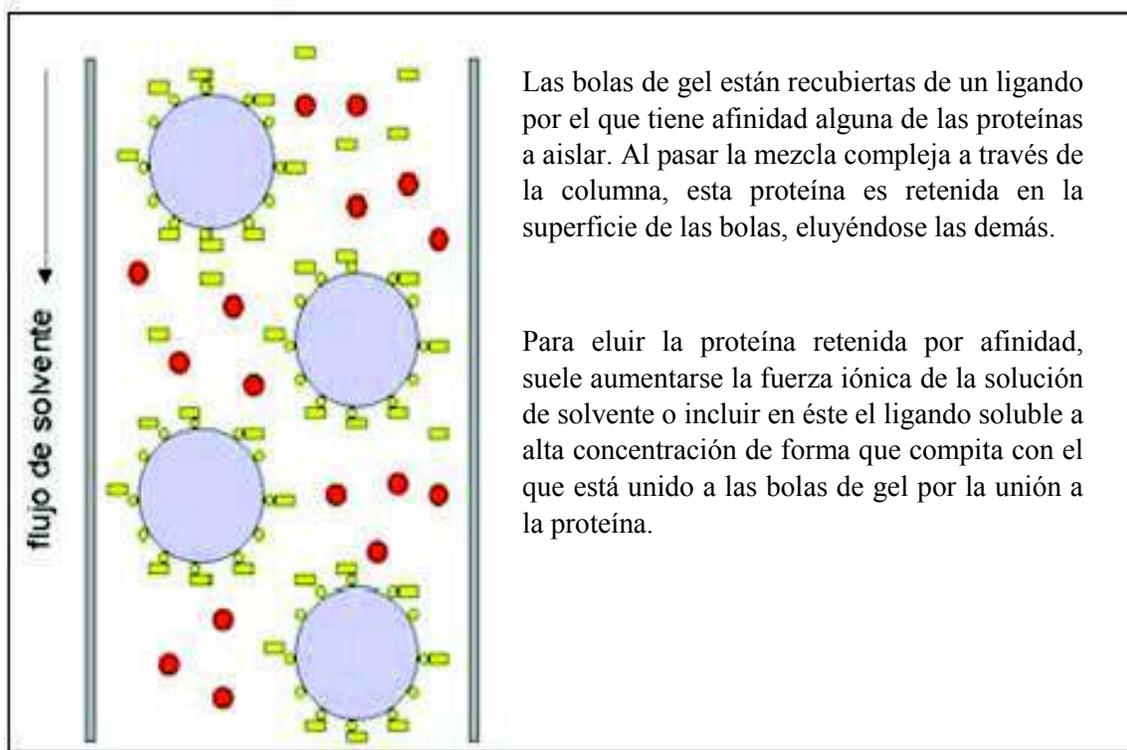


Figura 10. Principio de la cromatografía de afinidad a metales (Valcárcel y Gómez, 1988).

## II. 10. 2 Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular, o de filtración en gel, es una técnica que permite la separación de moléculas en función de su tamaño. La capacidad separadora reside en un gel cuya matriz se compone de una gran cantidad de esferas porosas microscópicas, las cuales están formadas por largas cadenas de polímeros unidas entre ellas mediante enlaces químicos, formando una red tridimensional; cada tipo de gel es caracterizado por tener un cierto rango de fraccionamiento, que se basa en el tamaño de sus poros (Alexander y Griffiths, 1993). Una vez que el gel se encuentra hidratado, es depositado en una columna de vidrio para su posterior uso (Figura 11).

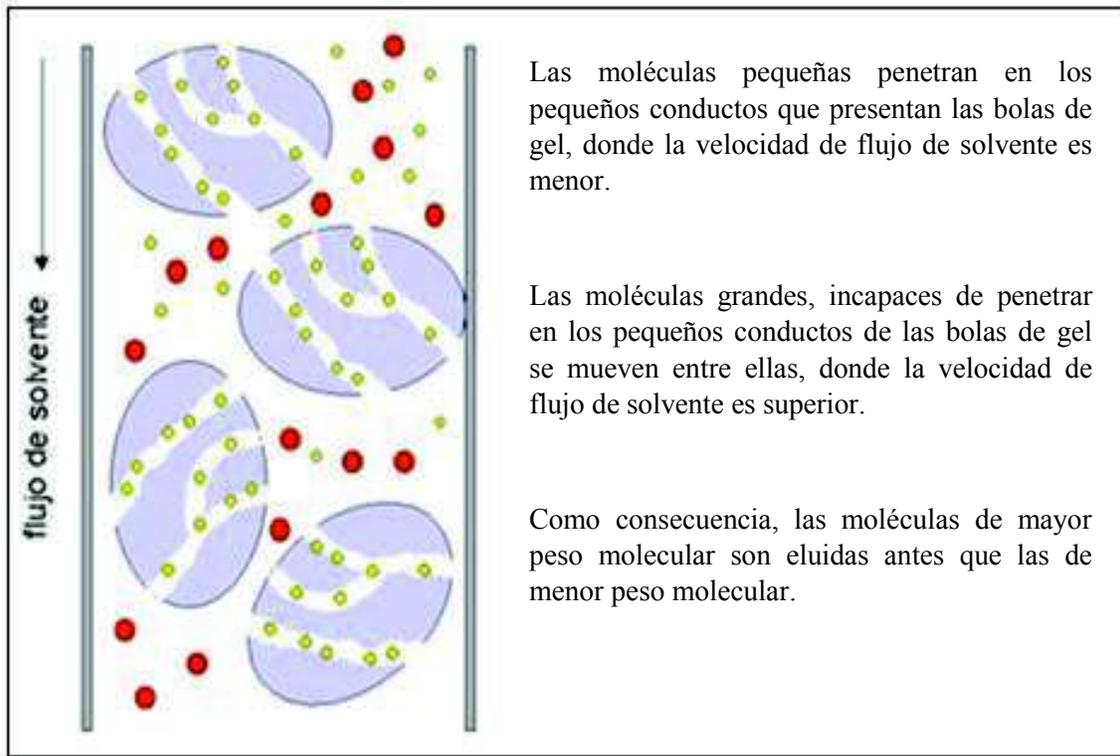


Figura 11. Principio de la cromatografía de exclusión molecular (Fischer et al., 1980).

Una vez que una mezcla con moléculas de tamaños distintos se hace pasar a través de la columna de gel, se lleva a cabo la separación en función de que las moléculas de pequeño tamaño pueden penetrar en el interior de las esferas del gel y por consiguiente, no pueden ser extraídas de la columna hasta que haya pasado a través de ella un volumen de líquido igual al volumen total de la misma. Por otro lado, aquellas moléculas de tamaño mayor al de los poros de las esferas, no podrán penetrar en su interior, de manera que atraviesan la columna recorriendo los espacios vacíos entre las esferas, lo que resulta en que sean las primeras en salir de la columna. Cuanto mayor sea el peso molecular de una molécula, será menos capaz de acceder al interior de las esferas de gel y, por lo mismo, menor será el volumen de líquido requerido para extraerla de la columna. Se debe considerar que para proteínas globulares el tamaño está relacionado directamente con el peso molecular, y este tipo de cromatografía separa las sustancias en función de dichos pesos moleculares (Fischer et al., 1980).

### III. JUSTIFICACIÓN

Ante la problemática que se presenta en relación con la alta mortalidad de animales de granjas acuícolas debido a la presencia de organismos patógenos en éstas, es pertinente orientar las investigaciones hacia las causas que ocasionan estos daños tan severos y que impactan negativamente a la camaronicultura, a largo plazo. El estudio de la función biológica de la hemolisina dependiente de lecitina establecerá las bases para entender los posibles mecanismos de la bacteria *V. parahaemolyticus* causales de afectaciones a los cultivos de camarón.

## **IV. HIPÓTESIS**

La hemolisina dependiente de lecitina recombinante presenta actividad de fosfolipasa.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1 Objetivo General**

Purificar y caracterizar parcialmente la hemolisina dependiente de lecitina (HDL) de *Vibrio parahaemolyticus* sobreexpresada en *Escherichia coli*.

### **V.2 Objetivos Específicos**

- 1- Sobreexpresar la enzima hemolisina recombinante HDL en *E. coli*, cepa Rossetta 2.
- 2- Purificar la enzima hemolisina HDL mediante cromatografía de afinidad a metales.
- 3- Determinar la actividad de la enzima fosfolipasa HDL en medio Agar-fosfatidilcolina.
- 4- Determinar el peso molecular y homogeneidad de la HDL por medio de cromatografía de exclusión molecular.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1 Transformación Bacteriana

La transformación de la bacteria *E. coli*, cepa Rosetta 2 se realizó por el método de choque térmico. Se utiliza esta cepa para mejorar el rendimiento de la expresión de proteínas recombinantes, en dado caso de que la proteína deseada presente codones raros de *E. coli*, lo cual en muchas ocasiones provoca que disminuya la calidad de la expresión.

Para iniciar con el proceso de transformación se tomó un microtubo Eppendorf que contenía células de *E. coli* (Rossetta 2) y se colocó en una cama de hielo para que se descongelara. Una vez líquida, se resuspendió con golpes suaves con el dedo para posteriormente agregar 1  $\mu\text{L}$  de plásmido (gen sintético de la HDL, a una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La solución se mezcló completamente con cuidado y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, la mezcla se incubó durante un minuto a una temperatura de 42°C, se regresó rápidamente al hielo y se dejó reposar durante 2 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de medio Super Optimal Broth, (SOC por sus siglas en inglés) (20 g/L Triptona, 5 g/L extracto de levadura, 4.8 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 3.603 g/L glucosa, 0.5g/L NaCl y 0.186 g/L KCl) se mezcló por agitación con la micropipeta e incubó durante 3 horas a 37°C en un agitador orbital a 220 revoluciones por minuto (rpm). Posteriormente se sembraron 3 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  con 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  y 150  $\mu\text{L}$  de cultivo bacteriano. Se utilizó como método de siembra el método de extensión en superficie en placas de Petri, las cuales se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 37°C en una incubadora de convección marca Thermo Scientific.

## **VI.2 Preparación del Inóculo Bacteriano**

Las placas de Petri previamente inoculadas se usaron como base para la sobreexpresión, ya que a partir de ellas se seleccionaron colonias aisladas para sembrar una nueva placa por el método de estriado y se incubaron a 37°C de temperatura. Además, se utilizó una colonia aislada como inóculo para un tubo de ensayo conteniendo 5 mL de caldo Luria (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 0.5 g/L NaCl) al que se adicionó ampicilina a una concentración de 100 µg/ml, el cual se mantuvo en agitación a una temperatura de 37°C durante toda la noche en un agitador orbital a 220 rpm.

## **VI.3 Cinética de Sobreexpresión**

La colonia bacteriana recombinante que se cultivó en un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL de caldo Luria con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml, se incubó durante 3 horas y posteriormente se adicionó el volumen total del matraz a otro que contenía 1000 mL del mismo medio de cultivo con el antibiótico de selección.

Una vez inoculado el cultivo bacteriano de 1 L se monitoreó la densidad óptica en un espectrofotómetro Cary 50 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 fase exponencial de su ciclo de crecimiento (Moreno et al., 2013). Fue en esta etapa cuando se realizó 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 0.1 mM, y la sobreexpresión se llevó a cabo a una temperatura de 25°C y con agitación de 220 rpm.

Para el control de la cinética de sobreexpresión se tomaron alícuotas de 1 mL de medio de cultivo cada 2, 4, 6 y 24 horas después de la inducción. Las células se recuperaron por centrifugación a 6,000 x g por 15 minutos a 4°C de temperatura. El botón de células bacterianas se resuspendió en el buffer Lisis (Tris HCl 20 mM, NaCl 500 mM, PMSF 0.1 mM, Lisozima de huevo 0.1 mg/mL, Benzamidina 5 mM) y se lisaron por sonicación en una cama

de hielo (6 pulsos de 10 segundos cada uno). El producto de la homogenización se clarificó por centrifugación (16,000 x g a 4°C por 20 minutos) y se separó la fracción soluble (sobrenadante) e insoluble (precipitado). Ambas fracciones se analizaron mediante 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 1 hr. Lo anterior con la finalidad de determinar el tiempo en el cual se encontró la mayor cantidad de proteína sobreexpresada, además de determinar en qué fracción del producto de la homogenización se obtuvo, es decir si resultó soluble (sobrenadante) o insoluble (precipitado). 24 horas después de la inducción de la expresión génica, las células se cosecharon tomando el volumen total del matraz (1000 mL) y se centrifugó a 7000 rpm durante 30 minutos en una centrífuga Sorvall a 4°C de temperatura. El botón de células bacterianas se almacenó en un ultracongelador a -80°C hasta su uso.

#### **VI.4 Lavado de Cuerpos de Inclusión y Replegamiento *in vitro* de la Proteína**

##### **VI.4.1 Lavado de cuerpos de inclusión**

Debido a que la proteína se sobreexpresó en cuerpos de inclusión, fue necesario realizar un lavado de los mismos, ya que la proteína, al presentarse en su forma nativa, no mostró características funcionales.

El lavado de los cuerpos de inclusión se inició a partir de la biomasa obtenida al final de la cinética de sobreexpresión en las células de *E. coli*. Se tomó un gramo del botón de células bacterianas y se resuspendió totalmente en buffer lisis (Tris HCl 20 mM, NaCl 500 mM, PMSF 0.1 mM, Lisozima de huevo 0.1 mg/mL, Benzamidina 5 mM) a razón de 20 mL por cada gramo de biomasa bacteriana, se sonicó en hielo durante 10 segundos por 6 ocasiones. Una vez que el botón de células bacterianas quedó resuspendido en buffer lisis, se centrifugó a 16,000 x g por 30 minutos a 4°C de temperatura en una centrífuga Sorvall RC 5C Plus, se separó el precipitado y se descartó el sobrenadante.

Al precipitado obtenido se le adicionó buffer de lavado 1 a una razón de 4 mL por cada gramo de precipitado. La composición de buffer de lavado 1 se muestra en la Tabla III. Posteriormente se sonicó hasta que se resuspendió totalmente y se centrifugó de nuevo bajo las condiciones mencionadas arriba. Se recuperó el pellet y se descartó nuevamente el sobrenadante. El pellet se resuspendió en buffer de lavado 2 a una razón de 4 mL por cada gramo de pellet obtenido, el cual se preparó como lo muestra la Tabla IV. Una vez resuspendido el pellet en el buffer, se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante obtenido y se repitió nuevamente el lavado.

Tabla III. Composición del buffer de lavado 1 (base a 100 mL)

Tris HCl 50 mM, pH 7.0	5 mL (partiendo de un stock 1 M)
DTT 5 mM	80 mg
Triton X-100 (2%)	2 mL
EDTA 5 mM	1 mL (partiendo de un stock 0.5 M)

Tabla IV. 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 5 mM	1 mL (partiendo de un stock 0.5 mM)
DTT 5 mM	80 mg

El precipitado obtenido se resuspendió totalmente mediante sonicación (6 pulsos durante 10 segundos) en buffer de extracción a una razón de 4 mL por gramo de precipitado, el cual se preparó como lo señala la Tabla V. Se incubó en hielo y se almacenó en refrigeración a 4°C durante toda la noche, posteriormente se centrifugó la muestra nuevamente

bajo las mismas condiciones establecidas. Se descartó el precipitado y se recuperó la totalidad del sobrenadante, al cual se le midió su concentración de proteína en un espectrofotómetro Nanodrop Thermo Scientific a 280 nm de longitud de onda.

Tabla V. Composición del buffer de extracción (base a 100 mL)

Tris HCl 50 mM, pH 7.0	5 mL (partiendo de un stock 1 M)
EDTA 5 mM	1 mL (partiendo de un stock 0.5 mM)
DTT 5 mM	80 mg
Urea 8 M	48 g

#### **VI. 4. 2 Replegamiento de la proteína**

Para llevar a cabo el proceso de replegamiento, se disminuyó gradualmente la concentración de urea en pasos escalonados empezando en 8, 4, 1 hasta 0 M mediante diálisis utilizando una membrana con un tamaño de poro de 12-14 kDa. En cada paso se realizó un recambio de 250 mL del buffer de diálisis (Tris HCl 50 mM, pH 7.0, EDTA 5 mM, urea 8, 4 y 1 M según se requirió). La diálisis (Figura 12) se llevó a cabo a 4°C por 3 horas con agitación constante (150 rpm). El último paso del replegamiento (1 a 0 M urea) se realizó con un volumen de buffer sin urea (Tris HCl 50 mM, pH 7.0, EDTA 5 mM) de 500 mL con 2 recambios de 250 mL cada uno. El segundo recambio se mantuvo por toda la noche. Posteriormente, se recuperó la solución de la membrana de diálisis y se centrifugó a 16, 000 x g por 20 minutos a una temperatura de 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se midió la concentración de proteína a 280 nm en un espectrofotómetro marca Nanodrop.

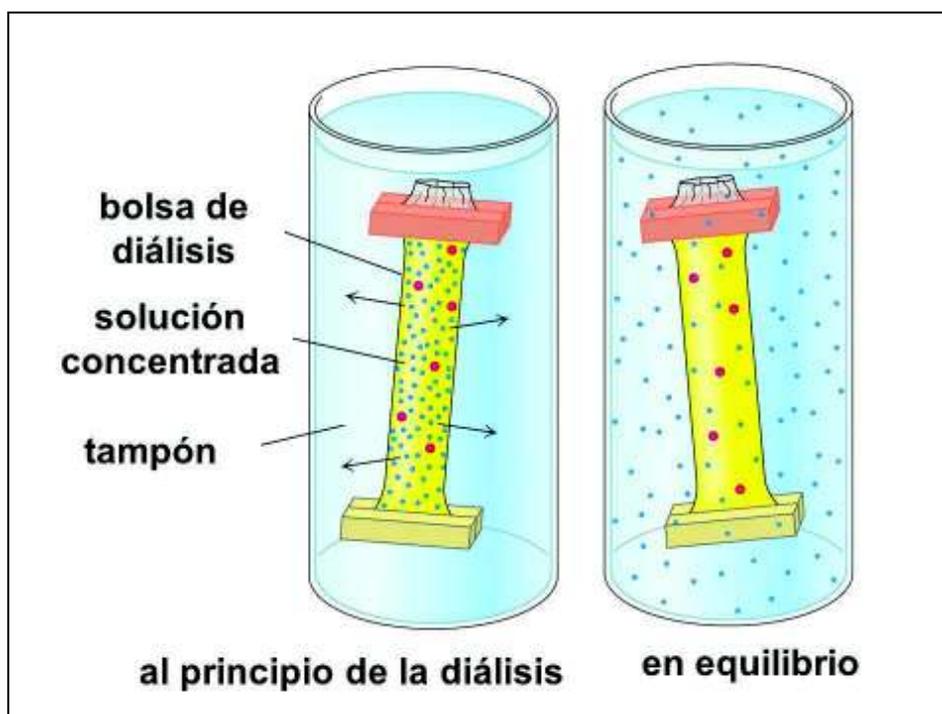


Figura 12. Mecanismo de la diálisis para eliminar impurezas en una muestra de proteína.

### VI.5 Cromatografía de Afinidad a Metales

La proteína replegada fue dializada contra 500 mL de buffer A (Tris HCl 20 mM pH 7.4 y 500 mM NaCl) en 2 recambios de 250 mL cada uno. El EDTA es un agente quelante de metales y puede interferir en el proceso de purificación. Por lo tanto, la proteína quedó solamente en solución con buffer Tris HCl 50 mM y 500 mM NaCl antes de la cromatografía de afinidad.

El procedimiento para realizar la purificación se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (General Electric, Life Sciences). El protocolo consistió en la recarga de una columna *HisTrap FF crude* de un volumen de 1 mL con 500  $\mu$ L de sulfato de níquel a una concentración de 100 mM. La columna se lavó con 5 mL de agua milli Q para eliminar el exceso de sulfato de níquel. Posteriormente, la columna se equilibró con buffer A. El cromatógrafo (AKTAprime, GE) se lavó utilizando agua milli-Q filtrada y posteriormente,

se equilibró tanto con buffer A y buffer B (buffer A + 500 mM de imidazol) para posteriormente hacer la inyección de la muestra de extracto crudo de proteína.

La purificación de la HDL se realizó mediante el lavado de la columna con 10 mL de buffer A con un flujo de 1 mL/min y posteriormente se aplicó un gradiente lineal de buffer B de 0 al 100% en 20 mL al mismo flujo. Se monitoreó la proteína mediante absorbancia a 280 nm. Se colectaron fracciones de 3 mL de los picos donde la absorbancia fue mayor, que correspondían a la proteína unida inespecíficamente, y fracciones de 1 mL correspondientes a la proteína unida específicamente. Todas las fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras y desnaturizantes. La pureza se determinó a homogeneidad en aquellas fracciones que sólo contenían una banda del peso molecular esperado para la HDL (47 kDa). Estas fracciones se agruparon y dializaron contra buffer A para eliminar el exceso de imidazol. La solución que contenía la proteína pura se almacenó en un baño de hielo a 4°C de temperatura hasta su uso (se obtuvo una concentración final de 0.453 mg/mL).

## **VI.6 Ensayo de Actividad de Fosfolipasa**

El ensayo de actividad de fosfolipasa es un método simple para conocer la funcionalidad de una proteína de esta naturaleza, como la HDL. Para este propósito, se preparó el medio agar-fosfatidilcolina (Agar-Agar 3%, fosfatidilcolina 0.1%); el Agar-Agar (3%) se disolvió en 50 mL de buffer Tris HCl 50 mM y se calentó en un horno de microondas durante 15 segundos hasta su homogenización completa. La fosfatidilcolina (0.1%) se solubilizó en etanol 96% por mostrar insolubilidad en medio acuoso; se añadió y se homogenizó completamente antes de vaciar su contenido en las placas de Petri (aproximadamente 25 mL de agar en cada una de ellas) cubiertas con papel aluminio para evitar exposición a la luz.

Se realizaron 4 perforaciones donde se vaciaron volúmenes diferentes de la proteína: 5, 10, 20 y 50  $\mu$ L, respectivamente, y se incubaron a una temperatura de 37°C durante toda la noche.

## VI. 7 Cromatografía de Exclusión Molecular

La cromatografía de exclusión molecular se realizó utilizando una columna tipo Sephadex Superdex G200 de 24 mL. La columna se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (General Electric, Life Sciences). Se equilibró con 50 mL de buffer de corrida (Fosfatos de sodio 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM) a un flujo de 0.2 mL/min. La solución que contenía la HDL fue dializada contra 500 mL de buffer de corrida mediante 2 recambios de 250 mL cada uno a 4°C de temperatura con agitación constante. Se aplicaron 500 µL de la HDL purificada a una concentración de 2 mg/ml. Se monitoreó la elución de la proteína midiendo la absorbancia a 280 nm. Los estándares de peso molecular para el cálculo del peso molecular que se utilizaron se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI. Estándares de peso molecular para la cromatografía de exclusión molecular.

Proteína	Peso molecular en Dalton (Da)
Aprotinina	6,500
Ribonucleasa A	13,700
Ovoalbúmina	44,000
Aldolasa	158,000
Tioglobulina	669,000

Se realizó un análisis de regresión lineal de los estándares de peso molecular graficando el logaritmo del peso molecular contra la constante de elución ( $K_{av}$ ) de cada estándar. Esta constante se calculó con la siguiente fórmula:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

Donde  $V_e$  es el volumen de elución,  $V_0$  es el volumen vacío y  $V_c$  es el volumen geométrico de la columna.

Para los picos de elución de la HDL se calcularon las constantes ( $K_{av}$ ) correspondientes y mediante el análisis de la regresión lineal, se calculó el peso molecular de las fracciones obtenidas. La polidispersión se determinó mediante la observación del cromatograma obtenido.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII.1 Cinética de Sobreexpresión

El plásmido recombinante que contenía el gen de la HDL fue transformado en *E. coli* en la cepa Rosetta 2. Una vez obtenidas las colonias aisladas, se procedió a realizar la cinética de sobreexpresión de la HDL. Lo anterior con la finalidad de determinar el tiempo en el cual se obtuvo la mayor cantidad de proteína, y si ésta se sobreexpresó en la fracción soluble o insoluble del cultivo bacteriano. Tanto la fracción soluble como insoluble de las muestras del cultivo se analizaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% a las 0, 4, 6 y 24 horas post inducción (HPI). Se encontró que la HDL se expresó abundantemente en forma de cuerpos de inclusión en todos los tiempos muestreados, como se muestra en la Figura 13. Se observó también una banda de la proteína de interés de aproximadamente 47 kDa, lo cual corresponde al peso molecular deducido de la secuencia de aminoácidos de la HDL (47 kDa). Además, se observó que la proteína se expresó de manera basal antes de realizar la inducción. El nivel máximo de la sobreexpresión de la HDL se encontró que fue a las 6 HPI. Cabe señalar que se observó una ligera disminución de la banda correspondiente a la HDL a las 24 HPI. Esto pudo ser derivado de que los sustratos del medio del cultivo se agotan y ya no es posible producir más proteínas. Así mismo, es posible que la proteína sea parcialmente degradada por proteasas producidas intrínsecamente por la bacteria hospedera (*E. coli*). Por lo que se estableció que el tiempo óptimo para la sobreexpresión de la proteína fue de 6 HPI.

Por otro lado, se observó una pequeña banda del peso molecular esperado en la fracción soluble (Fig. 13). Esta fracción fue aplicada a la columna de afinidad a metales, pero no se unió por lo que se consideró que esta banda es parte del metabolismo de la *E. coli*. Por lo que se continuó trabajando con la fracción insoluble de la sobreexpresión (cuerpos de inclusión, CI). Algunos autores como Jia et al., (2010), han reportado la sobreexpresión de otras hemolisinas como la de *Vibrio alginolyticus*. Estos autores reportaron que la HDL se sobreexpresaba en la fracción soluble del cultivo, pero en muy bajos niveles de producción.

De igual forma, Zhong et al., (2006) reportó que la hemolisina termoestable de *Vibrio harveyi* se sobreexpresa en la fracción soluble de cultivo. Las diferencias encontradas pueden deberse a diversos factores como son la cepa utilizada, condiciones de cultivo, etc. Si bien estas proteínas son hemolisinas, presentan diferencias a nivel de secuencia de aminoácidos las cuales originan características funcionales y fisicoquímicas propias de cada especie.

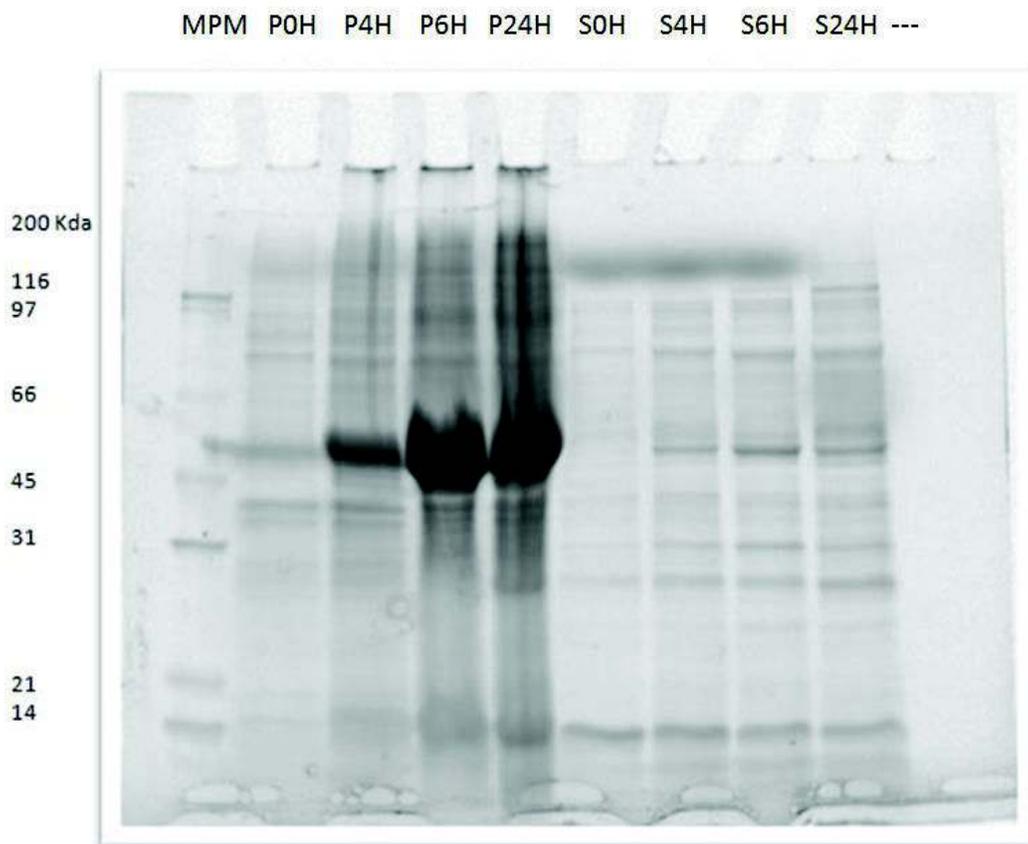


Figura 13. Gel SDS-PAGE al 12 % de la cinética de sobreexpresión indicando las muestras de las fracciones corridas P (precipitado) y S (sobrenadante) a las 0 (P0H y S0H), 4 (P4H y S4H), 6 (P6H y S6H) y 24 (P24H y S24H) horas respectivamente. El gel se tiñó con azul de comassie al 0.1%. MPM, Marcador de peso molecular.

## VII .2 Replegamiento de la Proteína

Partiendo del hecho de que la proteína se sobreexpresó en cuerpos de inclusión, se recuperó la biomasa obtenida para realizar el replegamiento *in vitro*. Primeramente, se purificaron los cuerpos de inclusión mediante lavados con los buffers cuya composición se especificó en las Tablas III y IV. Posteriormente, se solubilizó la proteína en buffer de extracción con urea 8 M para llevar a cabo el replegamiento de la forma nativa de la HDL, que se obtuvo a una concentración de 11.495 mg/mL. El replegamiento se realizó mediante diálisis, disminuyendo la concentración de urea, desde 8 M hasta 0 M y se utilizó una membrana de diálisis de 12-14 kDa de tamaño de poro. La Figura 14 muestra los resultados del proceso de replegamiento, en la que se observó una banda muy intensa que corresponde al peso molecular esperado de 47 kDa en los carriles 2, 4, 6 y 8, correspondientes a cada una de las etapas del replegamiento. Para que la proteína se pliegue correctamente no debe precipitarse; es decir, debe mantenerse en solución (fracción soluble) en las diferentes concentraciones de urea utilizadas. Como se observa en la Figura 14, la banda de aproximadamente 47 kDa, correspondiente a la HDL se conservó a lo largo del replegamiento y notablemente, se encontró que la HDL se mantuvo en solución cuando se eliminó la urea del buffer de replegamiento. Este resultado indica que la proteína se plegó correctamente, puesto que la conformación estructural que adopta le permite mantenerse en solución al ser eliminada gradualmente la urea (Peretó et al., 2007).

Los resultados obtenidos indicaron que el replegamiento de la HDL es un proceso relativamente sencillo y que no requiere de aditivos para llevarse a cabo, como se presenta en el ejemplo de la Figura 9 de los antecedentes, que muestra el caso del replegamiento de la ribonucleasa pancreática, donde se emplea el  $\beta$ -mercaptoetanol para que actúe en conjunto con la urea en el proceso de desnaturalización y renaturalización de la proteína (Peretó et al., 2007). Una vez que la proteína se llevó hasta una concentración de 0 M de urea, se corrió un gel de electroforesis SDS-PAGE en las condiciones establecidas. Al final del replegamiento se obtuvieron 4.5 mL de extracto a una concentración de proteína de 10.376 mg/mL. La eficiencia de recuperación fue del 90%.

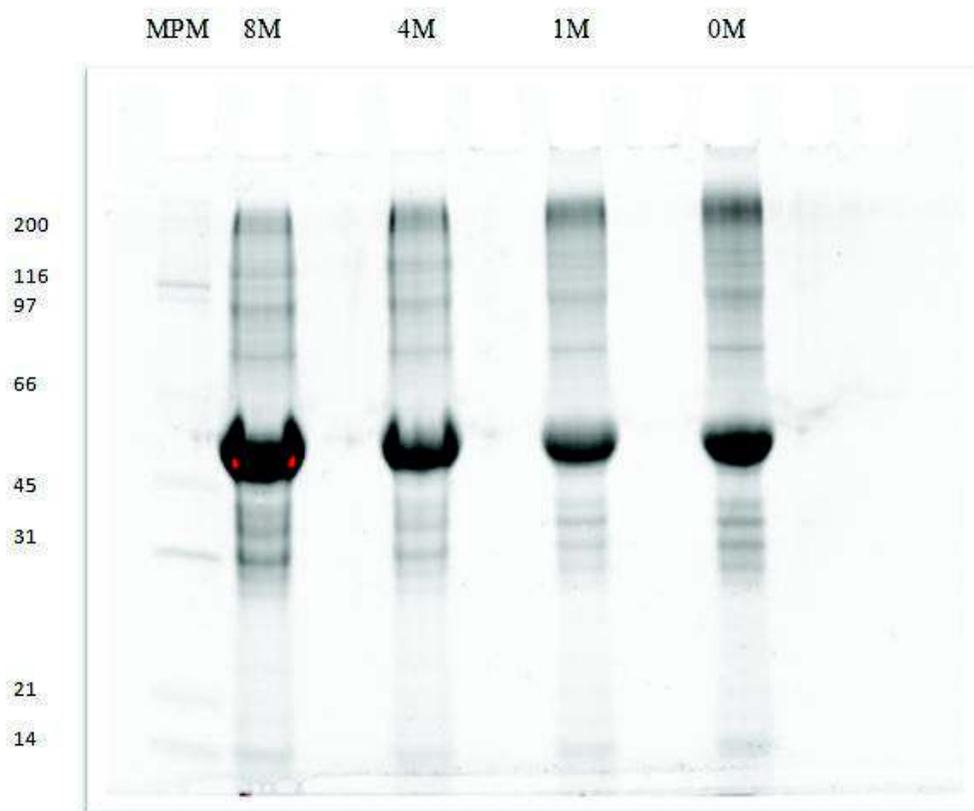


Figura 14. Gel de electroforesis (SDS-PAGE) del proceso de replegamiento de la HDL. En cada carril se aplicó una muestra de las diferentes concentraciones de urea utilizadas en las soluciones de replegamiento (8-0M). Carril 1: MPM, Marcador de peso molecular, carril 2: 8M, carril 4: 4M, carril 6: 1M, carril 8: 0M.

### VII.3 Purificación de la HDL por Cromatografía de Afinidad a Metales

El volumen total de extracto recuperado después del replegamiento fue de 4.5 mL. La solución que contenía la HDL replegada se dializó para eliminar el EDTA (quelante de metales). Posteriormente, éste se aplicó a la columna de afinidad a metales (HisTrap FF crude de 1 mL). En la Figura 15 se muestra un cromatograma típico de la purificación de la HDL. La proteína no unida se eluyó (Pico 1) mediante un lavado con buffer A. Una vez que la absorbancia a 280 nm no mostró la presencia de más proteína lavada, se aplicó un gradiente lineal de imidazol de

0 a 500 mM. En la elución se obtuvieron 2 picos, el primero (Pico 2) eluyó al 17% y el segundo (Pico 3) al 31% del buffer B. Estos porcentajes corresponden a una concentración de imidazol de al 85 mM y 155 mM, respectivamente.

Las fracciones obtenidas se analizaron en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 12%. En la Figura 16 se muestra el patrón de bandeo de cada una de las fracciones. En el Pico 1 (F1) se observa una banda de 47 kDa correspondiente a la HDL. Esto indica que parte de la HDL no se unió a la columna. Lo anterior debido posiblemente a que la columna de purificación llegó al límite de saturación de la proteína que puede unir. En el Pico 2 (F8) no se observó la presencia de bandas de proteína. La absorbancia registrada pudo ser causada por otros compuestos que contengan grupos funcionales que causen un aumento en la absorbancia. La mayor parte de la HDL se obtuvo en la fracción correspondiente al Pico 3 (F9 a F13). En estas fracciones se observa una banda única que corresponde al peso molecular esperado para la HDL (47 kDa). Esto indica que la proteína fue totalmente purificada en un solo paso cromatográfico. Una vez identificadas las fracciones que contenían la HDL pura, se mezclaron y se midió concentración en un espectrofotómetro marca Nanodrop, la cual dio un valor de 0.453 mg/mL. Posteriormente, fueron dializadas para eliminar el exceso de imidazol y se usaron para los ensayos de actividad de fosfolipasa y para la cromatografía de exclusión molecular.

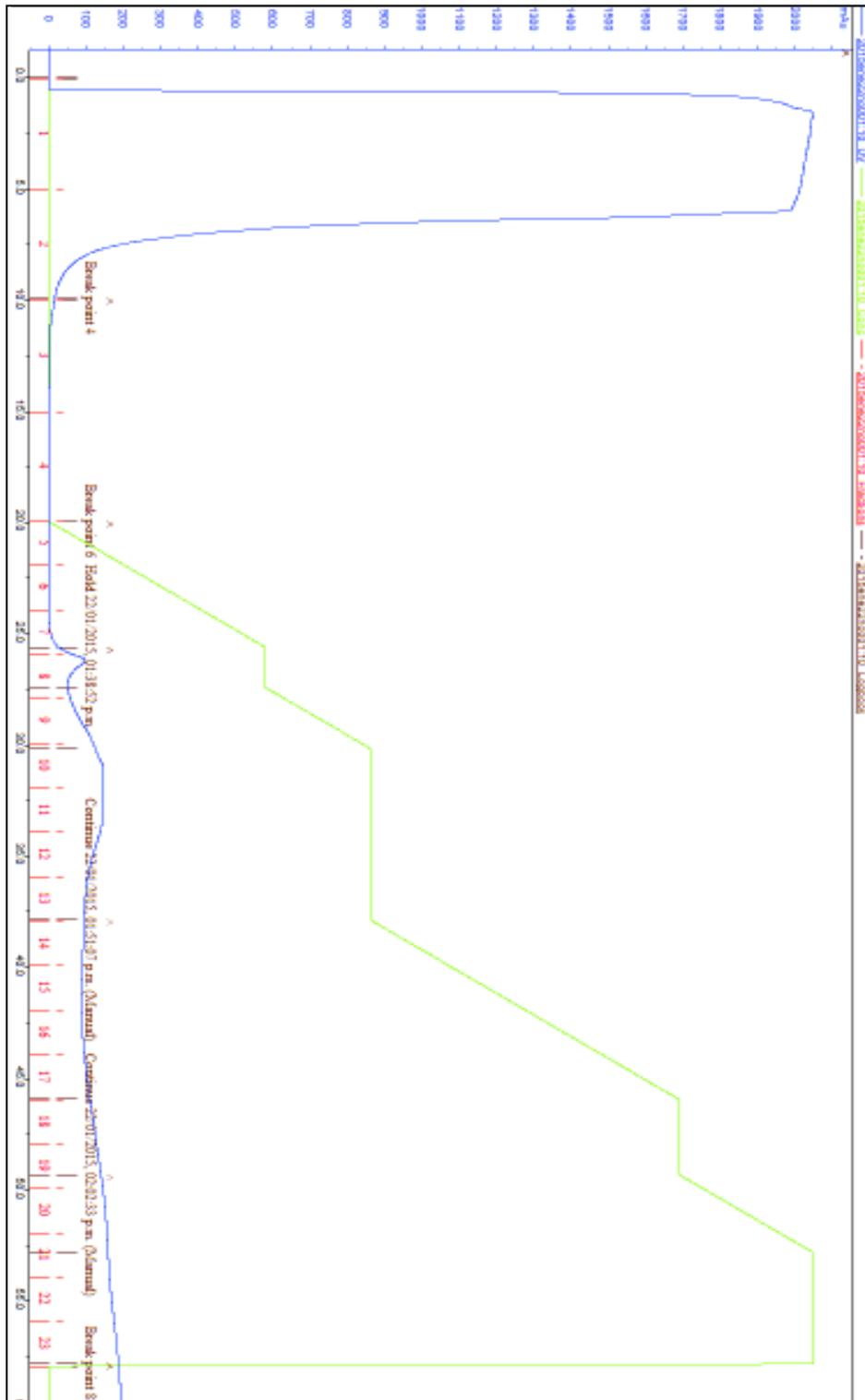


Figura 15: Cromatograma de la purificación de la HDL. Lavado: F1 y F2. Uniones inespecíficas: F7 y F8. Uniones específicas (HDL): F9-F13.

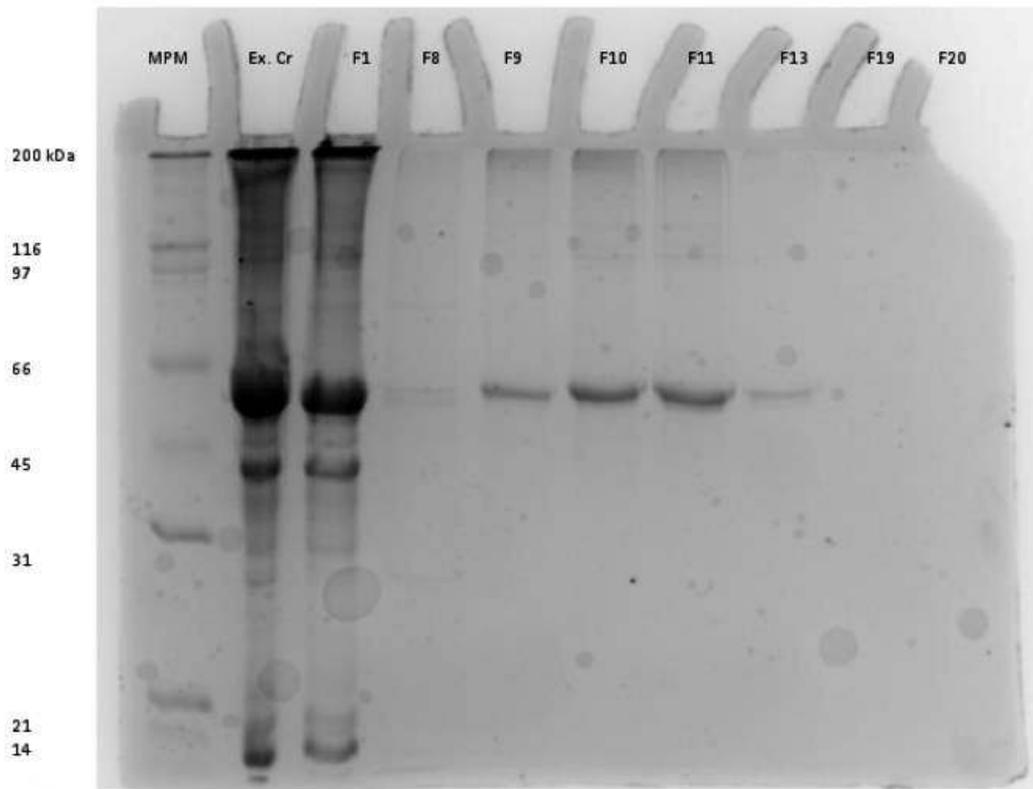


Figura 16. Gel de electroforesis de la purificación de la HDL. MPM: marcador de peso molecular, Ex. Cr: extracto crudo, F1: pico 1, F8: pico 2, F9-13: pico 3.

#### VII.4 Ensayo de Actividad de Fosfolipasa

El replegamiento de la proteína permitió que ésta se plegara correctamente aún habiéndose sobreexpresado en cuerpos de inclusión. Sin embargo, el replegamiento por sí mismo no indica que la proteína adoptó su estructura terciaria funcional. Por lo que posterior a la purificación de la HDL, se realizó un ensayo de la actividad de la enzima fosfolipasa.

Las placas mostraron anillos claros alrededor de los pozos con la muestra como se observa en la Figura 17, los cuales indicaron actividad de la proteína.

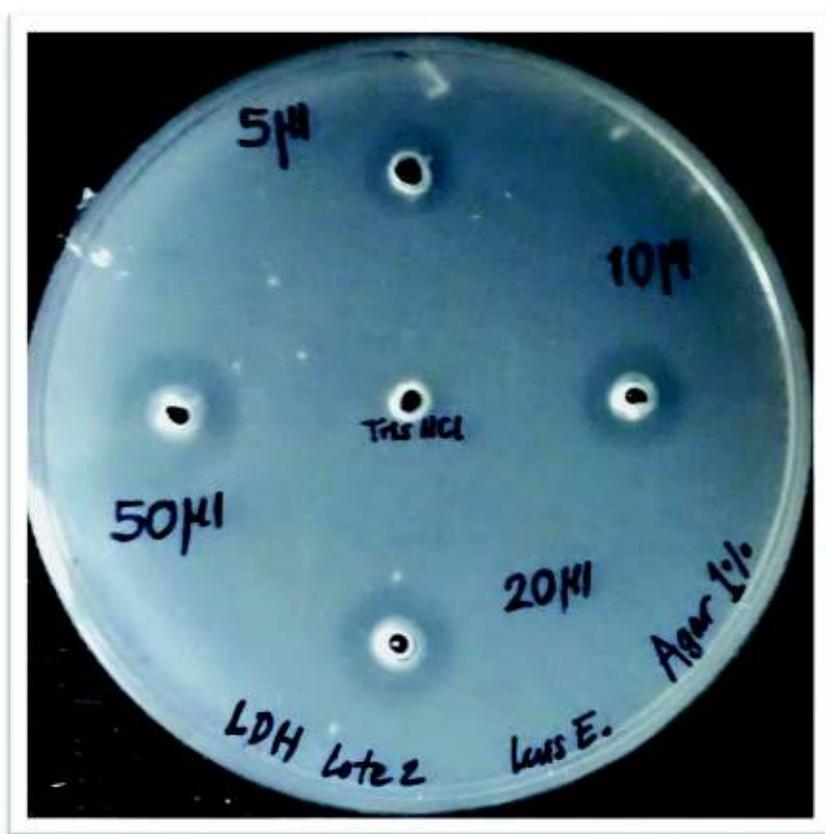


Figura 17. Actividad de fosfolipasa de la HDL en una placa de Petri con medio Agar-Fosfatidilcolina. La concentración inicial de la solución de la proteína fue de 0.453 mg/mL.

El cambio de tonalidad en el agar se debe a la ausencia de sustrato (fosfatidilcolina) al ser degradado por la fosfolipasa HDL. El diámetro de los anillos aumenta en función de la cantidad de proteína contenida en el pozo, razón por la cual se observa mayor degradación en el pozo que contiene 50 µL de muestra. En una investigación similar, se realizó un ensayo de actividad de fosfolipasa para la misma proteína, donde además de mostrar actividad, se realizaron estudios cuantitativos en la cantidad de sustrato degradado y en la obtención de ésteres de ácidos grasos hidrolizados, además de un ensayo de actividad hemolítica con eritrocitos de oveja (Shinoda et al., 1991). En el caso del presente trabajo, el ensayo de actividad de fosfolipasa se realizó únicamente como estudio cualitativo para determinar la actividad de la HDL, con el fin de realizar análisis posteriores.

## VII.5 Cromatografía de Exclusión Molecular

La cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel es otro método eficaz para la purificación de proteínas. Además de servir como método de separación, también es una herramienta muy útil para calcular el peso molecular y el estado de agregación de las proteínas. Al aplicar una muestra de una mezcla de proteínas, se lavan primeramente las moléculas de mayor tamaño, mientras que las proteínas de tamaño menor son las últimas en atravesar la columna (Alexander y Griffiths, 1993).

En este caso, la HDL se encontraba pura, por lo que se utilizó esta herramienta para calcular el peso molecular y su polidispersión. La HDL se encontraba en buffer de fosfatos de sodio (50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM) por ser el buffer donde se encontraban disueltos los estándares de peso molecular para realizar la corrida. La curva del cromatograma correspondiente a la corrida de estos estándares se muestra en la Figura 18 con las características generales de cada uno (Tabla VII).

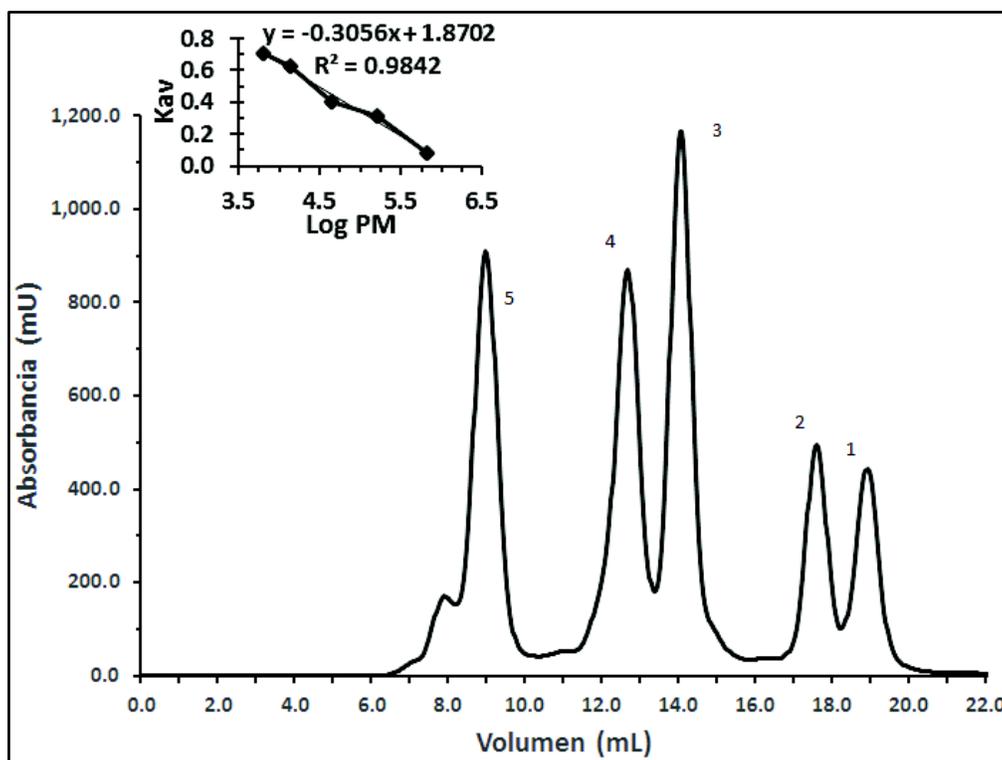


Figura 18. Cromatograma de los estándares de peso molecular utilizados para la corrida y su correspondiente gráfica de regresión lineal (mU: miliunidades de absorbancia).

Tabla VII. Características de los estándares de peso molecular. PM: Peso molecular.

Proteína	PM (Da)	Volumen Elución (mL)	Coefficiente de Partición (Kav)	Log PM
1. Aprotinina	6,500	18.9	0.748	3.81
2. Ribonucleasa A	13,700	17.57	0.660	4.13
3. Ovoalbúmina	44,000	14.04	0.426	4.64
4. Aldolasa	158,000	12.66	0.334	5.19
5. Tioglobulina	669,000	8.95	0.088	5.82

La corrida de la HDL se llevó a cabo aplicando 500  $\mu$ L a una concentración de 2 mg/mL a un flujo de 0.2 mL/min. A partir de esto, se generó el cromatograma de esta corrida, el cual se muestra en la Figura 19. De igual forma se muestra también la gráfica de regresión lineal calculada por los valores de Log PM de la Tabla VII. El cromatograma de la Figura 19

mostró la presencia de dos poblaciones de proteína HDL (P1 y P2). La primera población (P1) se presentó a una absorbancia de 23 mU y la segunda (P2) 20 mU. Así mismo se encontró que los volúmenes de elución fueron de 7.88 mL para P1 y 15.87 mL para P2. Con estos resultados, se procedió a realizar los cálculos de peso molecular correspondiente a cada población, que se muestran en la Tabla VIII.

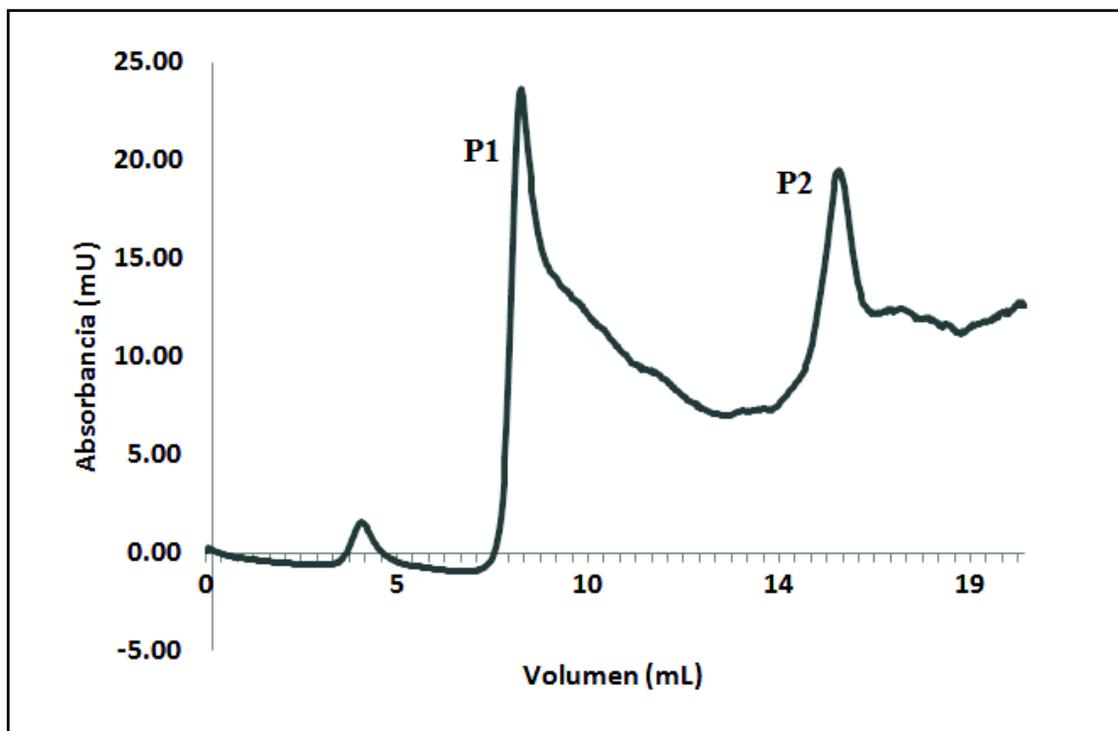


Figura 19. Cromatograma de la corrida donde se observan las poblaciones P1 y P2 de la HDL (mU: miliunidades de absorbancia).

Tabla VIII. Cálculo de peso molecular de los picos obtenidos en la corrida. PM: Peso molecular,  $V_e$ : Volumen de elución,  $K_{av}$ : Coeficiente de partición.

Muestra	$V_e$ (mL)	$K_{av}$	Log PM	PM (kDa)
HDL P1	7.88	0.017	6.0753	1,189.7
HDL P2	15.87	0.547	4.3381	21.7

La población 1 del cromatograma, obtenida a un volumen de elución de 7.88 mL mostró un peso molecular de 1,189 kDa, correspondiente a un posible agregado de 25 monómeros de la proteína HDL. El peso molecular deducido a partir de la secuencia de aminoácidos esperado para la HDL es de 47 kDa. La población 2 del cromatograma, obtenida a un volumen de elución de 15.87 mL, tuvo un peso molecular de 21.7 kDa, que corresponde al 46.3439% del peso molecular de un monómero de la proteína. Los resultados de la población 2 pueden interpretarse como una posible degradación de la HDL. Estos resultados indican que la HDL se encuentra en 2 poblaciones, en donde cada una de ellas representa el 50% de la población, por lo que se considera que es una solución polidispersa.

## VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a la información obtenida en el presente trabajo, se concluye que la HDL recombinante de *V. parahaemolyticus* se sobreexpresó en la bacteria *E. coli*, cepa Rosetta 2, donde el nivel máximo de producción de la proteína se obtuvo a las 6 horas después de iniciada la inducción con IPTG.

El análisis electroforético de la cinética de la sobreexpresión reveló que la HDL se produjo en forma de cuerpos de inclusión, por lo que fue solubilizada con urea como agente desnaturizante.

El replegamiento de la proteína se logró mediante diálisis seriadas eliminando el agente desnaturizante, el cual mostró un rendimiento de recuperación del 90% de la proteína.

La HDL se purificó en un solo paso mediante cromatografía de afinidad a metales.

La HDL mostró tener actividad enzimática tipo fosfolipasa al utilizar como sustrato la fosfatidilcolina.

Se determinó que la HDL en solución forma agregados de alto peso molecular que contienen aproximadamente 25 monómeros.

## IX. RECOMENDACIONES

- 1- Realizar ensayos de actividad hemolítica *in vitro* utilizando eritrocitos de oveja y hemocitos de camarón.
- 2- Determinar si la HDL por si sola es capaz de causar daño tisular en camarón asociado a la infección por *Vibrio parahaemolyticus* mediante la realización de bioensayos.
- 3- Continuar con estudios de caracterización bioquímica y estructural de la HDL para determinar si la enzima presenta actividad contra otro tipo de células.
- 4- Establecer las condiciones en las que la HDL se mantiene en solución en su forma monomérica.

## X. LITERATURA CITADA

- Aburto-Oropeza, O., Ezcurra, E., Danemann, G., Valdez, V., Murray, J., y Sala, E. 2008. Mangroves in the Gulf of California increase fishery yields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30): 10456-10459.
- Alexander, R. R., y Griffiths, J. M. 1993. Cell components. *Basic biochemical methods*: 234-266.
- Bermúdez, A., Campos, N., y Navas, G. 2002. "*Litopenaeus vannamei*"; N. Ardila, G. R. Navas y J. Reyes. (Eds.) Libro rojo de invertebrados marinos de Bogotá, Colombia: INVEMAR. Ministerio de Medio Ambiente: 110-112.
- Boschi, E. 1974. Biología de los crustáceos cultivables en América Latina. FAO, *Informes de Pesca*, vol. 2(159): SR/7.
- Brand, T. 1982. Potential use of mangrove lagoons in mariculture: Baja California, México. *Atlantica* 5(2): 16.
- Branford, J. 1981. Sediment and the distribution of penaeid shrimp in the Sudanese Red Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 13(3): 349-354.
- CIBNOR-SAGARPA. 2008. Diagnóstico y Planificación Regional de la Pesca y Acuicultura en México. Resumen ejecutivo. 37 p.
- Cifuentes-Lemus, J., Torres-García, M., y Frías-Mondragón, M. 1997. El océano y sus recursos X. *Pesquerías*, 2a edición. Fondo de Cultura Económica, México, D. F. 228p.

- Daniels, N. A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan II, A. L. y Angulo, F. J. 2000. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: a prevention quandary. *Jama*, 284 (12): 1541-1545.
- FAO, 1995. Code of Conduct for Responsible Fisheries. FAO, Rome, Italy. 41 p.
- Fischer, L., Work. T. S. y Burdon, R. H. 1980. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Gel Filtration Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 9: 24–54.
- Flegel, T.W., Lightner, D.V., Lo, C.F. and Owens, L. 2008. Shrimp disease control: past, present and future, pp. 355-378. En: Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (Eds.) Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 505 p.
- Flores-Verdugo, F., González-Farías, F., Zamorano D.S., y Ramírez-García, P. 1992. Mangrove ecosystems of the Pacific coast of Mexico: distribution, structure, litterfall, and detritus dynamics. En: Coastal Plant Communities of Latin America. Academic Press Inc. 269-288 p.
- García, S., y Le Reste, L. 1987. Ciclos vitales, dinámica, explotación y ordenación de las poblaciones de camarones peneidos costeros (Vol. 203). 1-180 p. FAO.
- García-Fruitos, E., Aris, A., y Villaverde, A. 2007. Localization of functional polypeptides in bacterial inclusion bodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(1): 289-294.
- Gillett, R. 2008. Global study of shrimp fisheries FAO Fisheries Technical Paper No. 475, Rome:
- Gómez-Gil, B., Roque, A. y Guerra, F. A. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos, 315-346 p. En:

Camaronicultura y Medio Ambiente. México: Unidad Académica Mazatlán. Páez-Osuna F. (Eds.) Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Mazatlán, Sin.

González-Félix, M.L., y M. Pérez-Velázquez. 2007. Un panorama de los presupuestos de nitrógeno para cultivo de camarón. Panorama Acuícola Magazine. Sep-Oct, 28-35

González-Ocampo, H., Romero-Schmidt, H., Serrano-Pinto, V., Arguelles, C., Salinas, F., Rodríguez, A., y Ortega-Rubio, A. 2004. Environmental impacts of two kind of ponds for shrimp production at Northwest Mexico. Journal of Environmental Biology, 25(1), 27-38. J. Environ. Biol. 25(1):27-38.

GE Life Sciences. 2007. Affinity Chromatography, Principles and Methods. Versión 10.

Haschemeyer, R. H., y Haschemeyer, A. E. 1973. Proteins: a guide to study by physical and chemical methods. John Wiley & Sons. 219-224 p.

Hernández-Llamas, A., y Magallón-Barajas, F. J. 1991. Análisis bioeconómico del cultivo del camarón azul (*Penaeus stylirostris*) con fertilizantes orgánicos y alimentación balanceada. Investigaciones Marinas CICIMAR, 6(2): 267-281.

Hogarth, P.J. 1999. The Biology of Mangroves. Oxford University Press, 228p.

Honda, T., Ni, Y., y Miwatani, T. 1989. Purification of a TDH-related hemolysin produced by a Kanagawa phenomenon-negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus* 06: 46. FEMS Microbiology Letters, 57(2): 241-245.

Iwasa, Y. 1982. Vertical migration of zooplankton: a game between predator and prey. American Naturalist, 171-180 p.

- Jacob, F., y Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3(3): 318-356.
- 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.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R., y Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128(3): 203-209.
- Kennell, D., y Riezman, H. 1977. Transcription and translation initiation frequencies of the *Escherichia coli lac* operon. *Journal of Molecular Biology*, 114(1): 1-21.
- Lavilla-Pitogo, C. R., Leano, E. M., y Paner, M. G. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, 164(1): 337-349.
- Lemaire, P., Bernard, E., Martinez-Paz, J. A., y Chim, L. 2002. Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 209(1): 307-317.
- Lightner, D. V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 236 pp.
- Lightner, D. V., y Lewis, D. H. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev*, 37(5-6): 25-28.
- Linden, O., y Jernelov, A. R. N. E. 1980. The mangrove swamp: an ecosystem in danger. *Ambio (Sweden)*, 9(2): 81-88.

- Loose, C. J., y Dawidowicz, P. 1994. Trade-offs in diel vertical migration by zooplankton: the costs of predator avoidance. *Ecology*, 2255-2263.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K. y Iida, T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *The Lancet*, 361: 743-749.
- Makrides, S. C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews*, 60(3): 512-538.
- Martinez, J. A., y Seijo, J. C. 2001. Alternative cycling strategies for shrimp farming in arid zones of Mexico: Dealing with risk and uncertainty. *Marine Resource Economics*, 51-63.
- Matsuo, H.K. 1984. Guía ilustrada del cultivo de camarón. Secretaría de Educación Pública de México.
- McTigue, T. A., y Zimmerman, R. J. 1991. Carnivory vs. herbivory in juvenile *Penaeus setiferus* (Linnaeus) and *Penaeus aztecus* (Ives). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 151(1): 1-16.
- 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.
- Moreno, L. Y., Guerrero, C. A., y Acosta, O. 2013. Expression and purification of rotavirus structural proteins VP5\* and VP8\* in bacteria *E. coli* BL21 (DE3). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1): 82-97.

- Nash, G., Nithimathachoke, C., Tungmandi, C., Arkarjamorn, A., Prathanpipat, P., y Ruamthaveesub, P. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand. *Diseases in Asian aquaculture*, 1: 143-155.
- Nelson, D. L., y Cox, M. M. 2000. The three-dimensional structure of proteins. *Lehninger principles of biochemistry*, 159-202 p.
- Oehler, S., Eismann, E. R., Krämer, H., y Müller-Hill, B. 1990. The three operators of the lac operon cooperate in repression. *The EMBO journal*, 9(4): 973 p.
- Oliver J. D. y Kaper J. B. 1997. *Vibrio* species. En: *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. (Eds.) Doyle M. P., Beuchat L. R., Montville T. J. (American Society for Microbiology, Washington, D.C.). 228-264 p.
- Páez-Osuna, F. 2001a. Camaronicultura y Medio Ambiente. UNAM y El Colegio de Sinaloa, México, D.F. 34: 290-297.
- Páez-Osuna, F. 2001b. The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects and mitigating alternatives. *Environmental Management*, 28: 131-140.
- Páez-Osuna, F. 2005. Retos y perspectivas de la camaronicultura en la zona costera. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 1: 21-31.
- Páez-Osuna, F., Guerrero-Galván, S. R., y Ruiz-Fernández, A. C. 1998. The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 36(1): 65-75.

- Paez-Osuna, F., Gracia, A., Flores-Verdugo, F., Lyle-Fritch L.P., Alonso-Rodríguez R., Roque A. y Ruiz-Fernández A.C. 2003. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin*, 46(7): 806-815.
- Park, K.S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.H., Lida, T. y Honda, T. 2004. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol*, 48:313-318.
- Peretó, J., Sendra, R., Pamblanco, M. y Bañó, C. 2007. Fundamentos de bioquímica, Universidad de Valencia. 173-180 p.
- Pérez-Velázquez, M., M. González-Félix y F. Jaimes Bustamante. 2007. Crecimiento de *Litopenaeus vannamei* cultivado en salinidades extremas. *Panorama Acuícola Magazine*. Nov-Dic, 2007.
- Rana, K. J., e Immink, A. J. 2000. Farming of aquatic organisms, particularly the Chinese and Thai experience. *Seas at the Millenium: An environmental evaluation*. Pergamon, Elsevier Science Ltd. Oxford, 165-177 p.
- Robertson, A. I. 1988. Abundance, diet and predators of juvenile banana prawns, *Penaeus merguensis*, in a tropical mangrove estuary. *Marine and Freshwater Research*, 39(4): 467-478.
- Rodríguez, A., Le Vay, L., Mourente, G., y Jones, D. A. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Marine Biology*, 118(1): 45-51.

- Rönnbäck, P., Macia, A., Almqvist, G., Schultz, L., y Troell, M. 2002. Do penaeid shrimps have a preference for mangrove habitats? Distribution pattern analysis on Inhaca Island, Mozambique. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55(3): 427-436.
- Rosenberry, B. 1998. *World Shrimp Farming*. Shrimp News International, San Diego, USA. 328 p.
- Rothlisberg, P. C. 1982. Vertical migration and its effect on dispersal of penaeid shrimp larvae in the Gulf of Carpentaria, Australia. *Fish. Bull.*, 80: 541-554.
- Saeed, M. O. 1995. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. *Aquaculture*, 136(1): 21-29.
- Shinoda, S., Matsuoka, H., Tsuchie, T., Miyoshi, S. I., Yamamoto, S., Taniguchi, H., 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.
- Valcárcel Cases, M., y Gómez Hens, A. 1988. *Técnicas analíticas de separación*. Reverté, Barcelona, España. [reimp. 2003] 778 p.
- Vidal, L., Pinsach, J., Striedner, G., Caminal, G., y Ferrer, P. 2008. Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 134(1): 127-136.
- WWF. 2000. *Shrimp aquaculture, people and the environment on the Gulf of California*. Technical Report. 4-10 p.

Yanagase, Y., Inoue, K., Ozaki, M., y Hi, T., Amano, T. y Chazono, M. 1970. Hemolysins and related enzymes of *Vibrio parahaemolyticus* I. Identification and partial purification of enzymes. Biken Journal, 13: 77-92.

Zhang, X. H., Austin, B. 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. J Appl. Microbiol., 98:1011–1019.

Zhong, Y., Zhang, X. H., Chen, J., Chi, Z., Sun, B., Li, Y., y Austin, B. 2006. Overexpression, purification, characterization and pathogenitiy of *Vibrio harveyi* haemolysin VHH. Infect. Immun., 74: 6001–6005.