



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza".

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

PURIFICACIÓN DE LA BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

PRESENTA:

CÉSAR MUÑOZ BACASEHUA

NAVOJOA, SONORA

JULIO 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



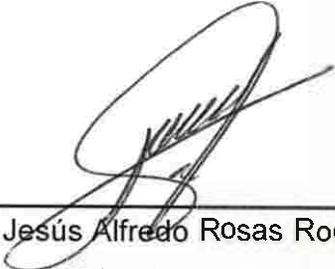
"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



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

FORMA DE APROBACIÓN

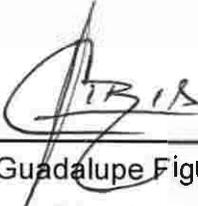
Los miembros del Jurado designado para revisar la Profesional de Cesar Muñoz Bacasehua, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez
(Director de Tesis)



Dr. Edgar Felipe Morán Palacio
(Secretario)



M.C. Ciria Guadalupe Figueroa Soto
(Vocal)

Dr. Adolfo Virgen Ortiz
(Suplente)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez por el apoyo que me brindo en todo momento durante la realización de este proyecto, por su guía, consejos, y sobre todo la amistad. Un claro ejemplo de vida de una persona esforzada que cumple con sus propósitos, que me motiva para mejorar mi formación académica y sobre todo por enseñarme los principios del maravilloso campo de la investigación.

Al Dr. José Guadalupe Soñanez Organis por el apoyo y la amistad que me brindo durante mi estancia en el laboratorio de Investigación Ciencias de la salud.

A la M.C. Ciria Guadalupe Figueroa Soto, por apoyarme en la adecuada redacción de este trabajo, por los consejos que fueron indispensables en la realización de la parte experimental del proyecto.

Al Dr. Adolfo Virgen Ortiz por su amistad, y por formar parte del comité de tesis.

Al Dr. Edgar Felipe Moran Palacio por sus comentarios brindados y por formar parte del comité de tesis.

A mis compañeros de laboratorio Cesar Jeravy, Mafiazel Ortega, Viridiana Gonzales, Magally Hernández por la colaboración y apoyo en la parte experimental de este trabajo. Por compartir conmigo la experiencia de concluir esta etapa de mi vida.

A la Universidad de Sonora unidad regional sur por abrirme sus puertas del conocimiento y hacerme formar parte de su grandeza.

DEDICATORIA

A **Dios Nuestro Señor**, por permitirme llegar con éxito al final de este proyecto, por darme la fuerzas para levantarme cada día y no desistir para cumplir mis metas.

A mis padres Cesar Muñoz Reyes y Carmela Bacasehua Guerrero, por darme la vida, y ser una importante fuente de buenos principios, que son ejemplo para mi vida, por apoyarme en todas la decisiones y estar siempre a mi lado. Gracias papás!!

A mis hermanas, Asiraneth, Hazarith, Kareem elisama, Carmen Dalí, por su cariño y comprensión.

A Karla Merary Ortega Vidal por ser parte de esta etapa de mi vida, por todo el apoyo moral, por darme ánimo y cariño cuando todo parecía difícil, por motivarme a seguir adelante cada día siempre, gracias.

A mis amigos que siempre me alentaron a salir adelante.

ÍNDICE

FORMA DE APROBACIÓN.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA.....	iii
Índice.....	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS.....	vii
OBJETIVOS	1
JUSTIFICACIÓN	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	1
Camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	1
Descripción de la especie	1
Ciclo biológico.....	3
Respuestas fisiológicas de <i>Litopenaeus vannamei</i> a condiciones de estrés ...	4
Enzima betaina aldehído deshidrogenasa.....	6
Estructura de la betaina aldehído deshidrogenasa	8
Organismos de los cuales se ha purificado la betaina aldehído deshidrogenasa.....	11
Métodos de purificación de proteínas	13
Precipitación en base a la solubilidad de la proteína	13
Métodos cromatograficos	14
Evaluación de la purificación de proteínas	18
Análisis de actividad enzimática	18
Métodos para determinar la concentración de proteínas.....	19
Métodos espectrofotométrico	19
Método de Bradford	20
METODOLOGÍA.....	21
Muestra.....	21
Ensayo de actividad enzimática.....	21
Actividad de BADH en tejido específico.....	21

Obtención del extracto crudo.....	22
Precipitación fraccionada con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	22
Desalado de muestras.....	22
Cromatografía de intercambio iónico.....	23
Electroforesis nativa (PAGE) y desnaturizante-reductora (SDS-PAGE).....	23
Determinación de la concentración de proteína.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
Actividad de BADH en tejido específico en camarón.....	24
Ensayo de Bradford.....	24
Extracto crudo.....	26
Precipitación fraccionada con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	27
Precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ del 40-70%.....	28
Eliminación de sulfato de amonio.....	30
Intercambio iónico.....	31
Cromatografía de afinidad.....	33
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	35
Tinción por actividad de BADH de camarón blanco.....	37
Tabla de purificación de BADH de <i>L. vannamei</i>	39
CONCLUSIÓN.....	41
RECOMENDACIONES.....	42
REFERENCIAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	2
Fig. 2. Ciclo biológico del camarón.....	5
Fig. 3. Mecanismo químico de la reacción catalizada por betaina aldehído deshidrogenasa.....	7
Fig. 4. Representación de los dominios principales de BADH.....	10
Fig. 5. Representación de la interacción de BADH con N6-(6- Amino) hexyl-AMP Sepharose mediante dominio de unión a NAD.....	17
Fig. 6. Curva de calibración de Bradford para determinar bajas concentraciones.....	25
Fig. 7. Cromatograma de la purificación de BADH mediante cromatografía de intercambio iónico.....	32
Fig. 8. Cromatograma de la purificación de BADH mediante cromatografía de afinidad.....	34
Fig. 9. Electroforesis bajo condiciones nativas en gel de poliacrilamida al 8%.....	36
Fig. 10. Zimograma en gel nativo al 8%.....	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Precipitación fraccionada del extracto crudo de camarón blanco y detección de actividad.....	29
Tabla 2. Purificación de la BADH de camarón blanco	40

OBJETIVOS

General:

Purificar la enzima Betaína Aldehído Deshidrogenasa a partir de tejido de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

Específicos:

- Evaluar la actividad enzimática de BADH en diferentes tejidos de camarón blanco.
- Diseñar un protocolo de purificación para la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de tejido de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) utilizando las técnicas cromatográficas: exclusión de peso molecular, intercambio iónico y afinidad.
- Evaluar la pureza a homogeneidad de BADH.

HIPÓTESIS

La Betaína Aldehído Deshidrogenasa está presente en tejido de camarón blanco y es una enzima activa que puede ser purificada con elevados valores de actividad específica.

JUSTIFICACIÓN

La enzima Betaina Aldehído Deshidrogenasa (BADH) ha sido descrita como una enzima implicada en la estabilidad fisiológica de ciertos organismos, ya que incrementa sus niveles de expresión bajo condiciones de estrés.

Diversos trabajos han descrito la importancia de la acumulación de glicina betaína, osmolito orgánico sintetizado por la BADH, para proporcionar adaptación en camarón. Ya que es una de las especies que constantemente se encuentra expuesto a condiciones de estrés, como variaciones en concentración de oxígeno (hipoxia), variaciones en concentraciones de salinidad y temperatura.

Se ha descrito la purificación de BADH de diversos organismos, sin embargo, la información sobre BADH en crustáceos es escasa y específicamente en camarón, es nula. Por lo anterior, poco se conoce sobre los mecanismos de acumulación y regulación de este osmolito en camarón blanco. Para obtener información al respecto es indispensable contar con la enzima pura y realizar estudios *in vitro*.

El desarrollo de un método para la purificación de la betaína aldehído deshidrogenasa a partir del tejido de camarón blanco, es el primer paso para estudiar a esta enzima y lograr realizar ensayos bioquímicos, estructurales y cinéticos sobre la BADH de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

RESUMEN

En el presente trabajo se estableció una metodología viable para la purificación de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de tejido de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). La enzima fue extraída del tejido por maceración, obteniendo un extracto crudo clarificado por centrifugación. Posteriormente se realizó un fraccionamiento con sulfato de amonio en un rango de 40-70% de saturación y se utilizaron centricones de corte de 30 KDa para realizar el desalado. Posteriormente la muestra fue sometida a cromatografía de intercambio iónico en una columna HiPrep 16/10 Q FF, y finalmente se realizó una cromatografía de afinidad en 1 ml de resina N6-(6-Amino) hexyl-AMP Sepharose.

Las fracciones obtenidas de las corridas cromatográficas no presentaron actividad enzimática. Posiblemente esto se debe a que la enzima BADH no se sintetiza en grandes cantidades en el camarón. Sin embargo, las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad, mostraron una sola banda de proteína en el gel de electroforesis nativa (sistema Laemli). Esta banda migra al mismo peso que la BADH renal de cerdo utilizada como control en las corridas electroforéticas. Nuestros resultados sugieren que la BADH de camarón blanco puede ser aislada y purificada de tejido de *L. vannamei*, utilizando el esquema propuesto y la proteína tiene un peso molecular de 233-250 kDa que corresponde a otras BADH de distintos organismos.

INTRODUCCIÓN

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es una especie muy importante para la economía en la región, ya que es un organismo fácil de cultivar a gran escala, además de ser el principal peneido comercializado y aceptado por el mercado extranjero (Ramos-Cruz, 2012). Durante 2009 la captura nacional de camarón fue de 196,456 toneladas, de las cuales el litoral del Pacífico contribuyó con el 89.4 % y el Golfo de México y Mar Caribe con el 10.6 %. En el litoral del Pacífico Mexicano las entidades federativas que históricamente han tenido una mayor participación en la producción de camarón a nivel nacional son Sinaloa y Sonora, con porcentajes históricos de 43.3 y 38.0%, respectivamente (Ramos-Cruz, 2012). Esta especie no es exigente en cuanto a condiciones controladas de temperaturas y salinidad, requiere una alimentación baja en proteínas lo que representa bajos costos al momento de cultivar a grandes hectáreas de terreno acuícola (Godínez-Siordia *et al.*, 2011). La importancia en esta especie de cultivo además recae en la gran capacidad de resistencia y adaptación del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) a bajos y altos niveles de salinidad, lo que indica la gran capacidad de osmoregulación que presenta este organismo. *L. vannamei* exhibe a bajas salinidades un patrón de regulación hiper-osmótico y a altas salinidades un patrón de regulación hipo- osmótico (Castille Jr *et al.*, 1981; Díaz, 2001).

Los estudios de adaptación a estrés, indican que uno de los métodos por los cuales se mantiene el equilibrio en el medio intracelular en respuesta al estrés osmótico, y esta se da por la acumulación de solutos orgánicos (Metil-aminas, aminoácidos, piloles, aminas cuaternarias) compatibles con la fisiología celular (Jahn *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que en los organismos acuáticos se incrementan los niveles de glicina betaina en respuesta a la exposición de prolongados periodos de estrés hiperosmótico, lo que nos indica que en organismos invertebrados la acumulación de glicina betaína, es muy importante durante los procesos de regulación osmótica (Jahn *et al.*, 2006).

Se ha demostrado en diversos estudios que glicina betaína puede ser encontrada en un gran número de organismos que van desde mamíferos, plantas, vertebrados

e invertebrados especialmente marinos y especies eurihalinas (Guérin, 2000). Sin embargo en los estudios de de acumulación de glicina betaína, no se ha considerado a la principal vía de síntesis de glicina betaína en organismos acuáticos, que es a través de la betaína aldehído deshidrogenasa.

Las BADHs son un grupo de enzimas consideradas de respuesta a estrés que pertenecen a la familia de las aldehído deshidrogenas, con una gran variedad de enzimas implicadas en el metabolismo endógeno y exógeno de los compuestos tóxicos aldehídos (Vasiliou *et al.*, 2013). Estas enzimas utilizan la nicotinamida adenina dinucleotido NAD(P⁺) como cofactor en la reacción en donde los aldehídos son transformados a sus ácidos carboxílicos correspondientes. El cual es liberado en su forma reducida como NADH o NADPH (Vasiliou *et al.*, 2013).

Se a purificado a la betaína aldehído deshidrogenasa de diferentes fuentes de origen animal (riñón de cerdo, hígado de rata, hígado de bacalao), bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Arthrobacter globiformis*), y en algunas plantas (amaranto) (Guzman-Partida *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 1998; Pietruszko *et al.*, 2001; Fujiwara *et al.*, 2008). En branquias de ostras se demostró que el proceso de síntesis de glicina betaína es dependiente de colina y ocurre en el interior de las mitocondrias y es mediado por las enzimas colina deshidrogenasa y betaína aldehído deshidrogenasa (Pierce *et al.*, 1995).

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo es purificar a la betaína aldehído deshidrogenasa a partir de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), como primer paso para la realización de posteriores estudios que nos ayuden a entender el rol fisiológico que desempeñan la enzima en el camarón.

ANTECEDENTES

Camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)

Descripción de la especie

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) (Figura 1) es un miembro de la Familia Penaeidae cuya distribución geográfica en el Pacífico Oriental abarca desde la parte norte del Golfo de California, hasta Tumbes, Perú (Godínez-Siordia *et al.*, 2011). Aun cuando su reproducción ocurre mar adentro, su ciclo de vida es altamente dependiente de sistemas estuarinos y lagunas costeras, a los que ingresa en estado postlarval y los abandona cuando alcanza la fase juvenil (≥ 80 mm de longitud total) (Ramos-Cruz, 2012). Es una especie eurihalina capaz de tolerar salinidades en el rango de 1 a 40 UPS, característica ecológica que lo hace un candidato idóneo para su cultivo en ambientes controlados (Ramos-Cruz, 2012).

L. vannamei es una especie conocida por habitar en un amplio intervalo de salinidades desde 1-2 ups hasta 40 ups y exhibe un patrón de regulación hiper-osmótico en bajas salinidades y un patrón de regulación hipo-osmótico en altas salinidades, con un punto isosmóticos entre 25-26 ups (Valdez *et al.*, 2008). Es uno de los peneidos más estudiados; ya que es el soporte de muchas pesquerías comerciales y es la especie de cultivo más importante a lo largo de la costa este del Pacífico y algunas zonas de Asia (Valdez *et al.*, 2008)

Litopenaeus vannamei se encuentra en hábitats marinos tropicales. Los adultos viven y se reproducen en mar abierto, mientras que la postlarva migra a las costas a pasar la etapa juvenil, la etapa adolescente y pre adulta en estuarios, lagunas costeras y manglares. Los machos maduran a partir de los 20 g y las hembras a partir de los 28 g en una edad de entre 6 y 7 meses (Frias-Espericueta *et al.*, 2000).

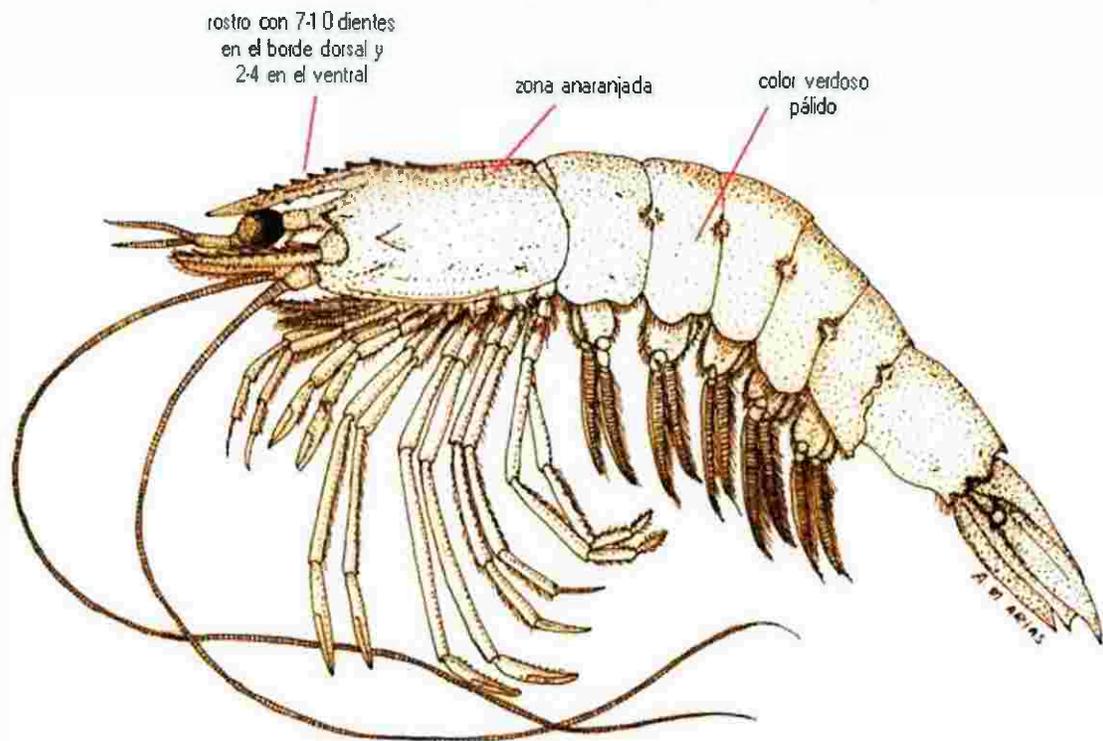


Fig. 1. Camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tomado de Arias *et al.* (1990)

Ciclo biológico

El ciclo de reproducción de *L. vannamei* (Figura 2) comienza cuando pesa entre 30 y 45 g. Este organismo puede liberar entre 100,000 y 250,000 huevos de aproximadamente 0,22 mm de diámetro (Tizol *et al.*, 2004). La incubación ocurre aproximadamente 16 horas después del desove y la fertilización. En la primera etapa, la larva, denominada nauplio, nada intermitentemente y es fototáctica positiva (Tizol *et al.*, 2004). Los nauplios no requieren alimentación, se nutren de su reserva embrionaria. Las siguientes etapas larvarias (protozoa, mysis y postlarva temprana respectivamente) continúan siendo planctónicas por algún tiempo, se alimentan del fitoplancton y del zooplancton, y son transportados a la costa por las corrientes mareales (Godínez-Siordia *et al.*, 2011). Las postlarvas (PL) cambian sus hábitos planctónicos unos 5 días después de su metamorfosis a PL, se trasladan a la costa y empiezan a alimentarse de detritos bénticos después de que las postlarvas alcanzan la etapa juvenil (80 mm de longitud total) abandonan los estuarios o lagunas costeras para dirigirse hacia mar adentro donde realizarán de nuevo su ciclo biológico (Frias-Espéricueta *et al.*, 2000)

Litopenaeus vannamei, durante todo su ciclo de vida, se encuentra expuesto a distintas condiciones de estrés abiótico, ya que estos organismos para reproducirse viajan y viven mar adentro (Frias-Espéricueta *et al.*, 2000). Cuando *Litopenaeus vannamei* alcanza su periodo reproductor, desciende a lo profundo del mar donde se encuentra sometido a condiciones de hipoxia. La concentración de oxígeno disuelto en la profundidad es menor a las que se encuentran en la superficie (Tizol *et al.*, 2004). Así mismo, el camarón se expone a variaciones de temperatura, debido a la baja de la temperatura en lo profundo del mar respecto a las temperatura de la superficie. El ciclo de vida del camarón es altamente dependiente de lagunas costeras, lo cual expone a los organismos a variaciones en las concentraciones de salinidad. En mar adentro se encuentran altas concentraciones de salinidad y bajas concentraciones de salinidad cuando ingresa a las lagunas costeras (Godínez-Siordia *et al.*, 2011).

Lo anterior sustenta la gran capacidad de osmoregulación que tiene el camarón blanco para adaptarse a distintas condiciones de estrés osmótico. Investigaciones recientes muestran, que la respuesta de supervivencia, que le confiere estabilidad y mantiene la tasa de crecimiento de *L. vannamei*, dependen de la temperatura, la salinidad y la interacción temperatura-salinidad (Valdez *et al.*, 2008).

Respuestas fisiológicas de *Litopenaeus vannamei* a condiciones de estrés

Las respuestas fisiológicas se pueden clasificar de acuerdo a las alteraciones fisiológicas ya sea conductuales o genéticas que ocurren en los organismos. En los peces de cultivo, se han descrito tres niveles de respuesta, la neuronal, en la química sanguínea y en las funciones bioquímicas (Ahuejote-Sandoval, 2004)

Las respuestas neuronales y neuroendocrinas, consiste en la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y del sistema simpato-adrenal. Las respuestas en la química sanguínea incluye cambios tisulares, bioenergéticos y en el balance de electrolitos (Ahuejote-Sandoval, 2004). Las respuestas en la alteración de las principales funciones bioquímicas ocasionan un desbalance en los procesos de crecimiento y reproducción, así como incremento en la susceptibilidad a enfermedades por el debilitamiento del organismo (Ahuejote-Sandoval, 2004).

Resultados de diferentes investigaciones muestran que la respuesta de supervivencia que presenta *Litopenaeus vannamei*, que le confiere estabilidad y mantiene la tasa de crecimiento en el cultivo, dependen de la temperatura, la salinidad y la interacción temperatura-salinidad (Valdez *et al.*, 2008; García-Araya, 2010).

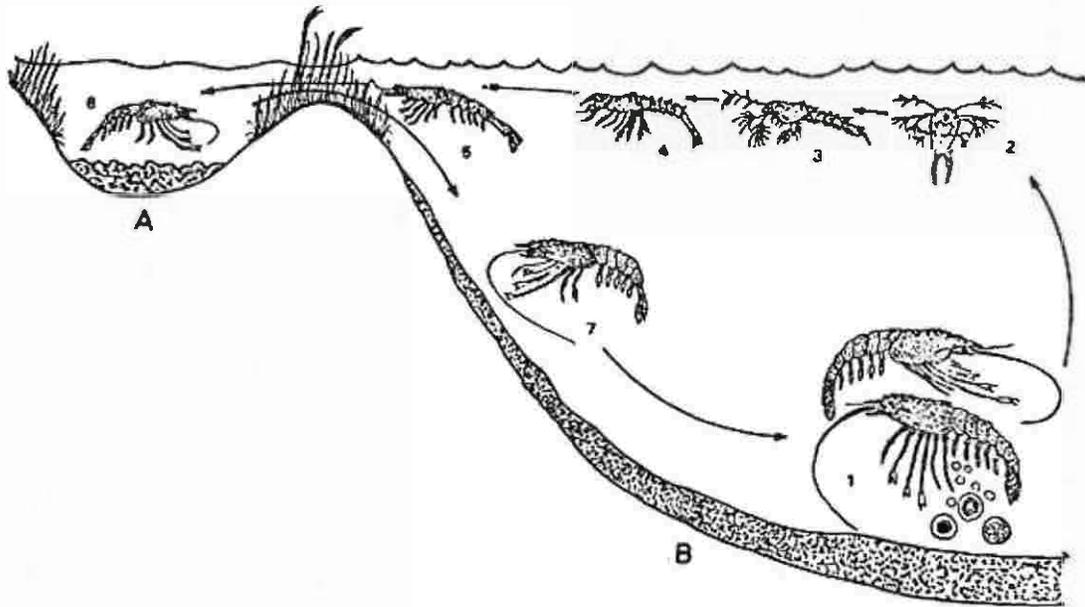


Fig. 2. Ciclo biológico del camarón. 1: maduración y reproducción; 2: nauplii; 3: protozoas; 4: mysis; 5: postlarvas; 6: juveniles; 7: adultos. Tomado de Fenucci (1988)

Enzima betaina aldehído deshidrogenasa

La actividad de la enzima betaina aldehído deshidrogenasa se observó por primera vez en 1942 en el hígado de rata por Klein y Handler. Las enzimas betaina aldehído deshidrogenasa (BADH, NAD⁺ oxidoreductasa E.C. 1.2.1.8), son un grupo de enzimas de respuesta a estrés que se caracterizan por estar presentes en la mayoría de los reinos de la naturaleza (planteé, animal, fungí, mónera), son unas de las enzimas aldehído deshidrogenasas más ancestrales (Muñoz-Clares *et al.*, 2009). Estudios bioquímicos recientes indican que las BADHs no son un grupo homogéneo en relación a la especificidad por el sustrato y coenzima que utilizan, como también su distribución subcelular y estado de oligomerización, propiedades cinéticas, número de subunidades y estabilidad (Muñoz-Clares *et al.*, 2009).

Las BADHs son enzimas que utilizan la nicotinamida adenina dinucleótido NAD(P⁺), como cofactor para catalizar la reacción de oxidación de betaina aldehído (BA) a su correspondiente ácido. En esta reacción se produce glicina betaina (GB) que es un eficiente osmoregulador compatible con la fisiología celular, durante la reacción el nucleótido es liberado en su forma reducida (Fig.3) (Muñoz-Clares *et al.*, 2010).

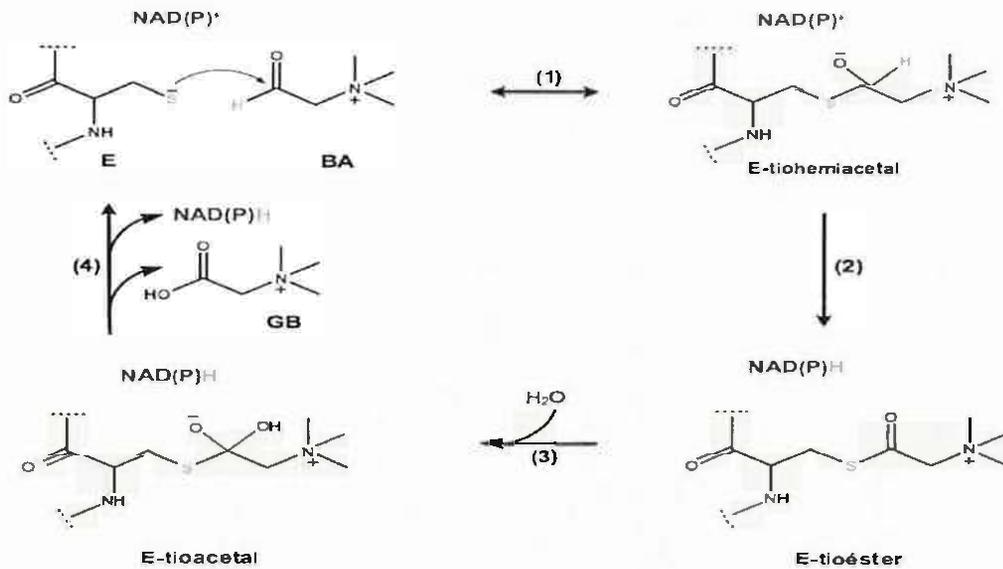


Fig. 3. Mecanismo químico de la reacción catalizada por betaina aldehído deshidrogenasa 1) acilación, (2) transferencia del hidruro, (3) desacilación, (4) liberación de los productos (Muñoz-clares, et al 2010).

Estructura de la betaina aldehído deshidrogenasa

Las enzimas betaina aldehído deshidrogenasa que se han estudiado a la fecha, presentan diferencias en cuanto a estructura. Se han identificado variaciones en su estructura cuaternaria y el tamaño de sus subunidades debido a la gran diversidad de enzimas existentes, sin embargo, todas ellas guardan una relación en la forma de plegarse. De este modo, pueden distinguirse tres dominios en la subunidad: el dominio de unión de la coenzima, el dominio catalítico y el de oligomerización (Johansson *et al.*, 1998; Julián-Sánchez *et al.*, 2007).

Todas las enzimas BADH son producto de un gen específico que se le conoce como gene ALDH9A1 que codifica para la síntesis de enzimas citosólicas, ya que las enzimas citosólicas y mitocondriales en mamíferos parecen ser producto del mismo gen. En plantas ocurre lo contrario, la actividad de BADH se encuentra localizada principalmente en el estroma del cloroplasto, y sólo una pequeña porción, alrededor de un 10% de su actividad total, es citosólica. Estas enzimas presentan secuencias conservadas, en las cuales los residuos de cisteína tienen un papel importante en el sitio activo. Los aminoácidos como aspartato, serina, lisina y arginina están implicados en la estabilidad de los dímeros y tetrámeros (Julián-Sánchez *et al.*, 2007; González-Segura *et al.*, 2009)

El tetrámero está formado de dos dímeros que interaccionan en sus lados opuestos al sitio de unión de la coenzima. Ambos dominios de oligomerización del dímero forman puentes de hidrógeno con las partes que corresponden del dímero vecino. El dominio de oligomerización es una extensión del dominio de unión de la coenzima, mediante el cual las subunidades de la BADH se pueden asociar en dímeros a través de puentes de hidrógeno. Hay regiones conservadas en todas las ALDH y BADH secuenciadas a la fecha que son residuos de cisteína: Cys286, 353, 377 y 439 y también lisina los cuales son importantes para la interacción entre los dímeros y monómeros que conforman la estructura tetrámerica (Johansson *et al.*, 1998; Rosas-Rodríguez, 2007; González-Segura *et al.*, 2009).

La primera BADH que se logró cristalizar fue la de hígado de bacalao, en donde se identificó que tanto el dominio de unión a la coenzima y el dominio catalítico son

dominios $\alpha\beta$ relacionados con un plegamiento tipo Rossmann (Fig. 4) (Johansson *et al.*, 1998).

Las características estructurales son importantes para el funcionamiento que desempeñan las enzimas, se conoce que las BADHs en mamíferos presentan actividad citosólica y mitocondrial, su estructura activa es homo-tetrámerica, mientras que en plantas y bacterias pueden encontrarse en forma de homo-dímero (Muñoz-Clares *et al.*, 2004). Los monómeros se han identificado como la forma inactiva de todas las BADHs estudiadas. La enzima caracterizada de espinaca presenta una estructura activa en forma de dímero con un peso molecular de 60-63 kDa (Weretilnyk *et al.*, 1989). Por otro lado, la BADH de *P. aeruginosa* es una enzima tetramérica que cataliza un paso intermedio del catabolismo de colina o de los precursores de colina (Velasco-García *et al.*, 1999). La BADH caracterizada de *E.coli* presenta estructura tetramérica y esta muestra el plegamiento característico de las ALDH: un dominio de oligomerización, un dominio de unión a la coenzima y un dominio de unión catalítica (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2006). La BADH de riñón de cerdo activa es un homotetrámero de 232 kDa que muestra preferencia por el NAD^+ como coenzima y es muy específica para betaina aldehído como sustrato (Figueroa-Soto *et al.*, 2000).

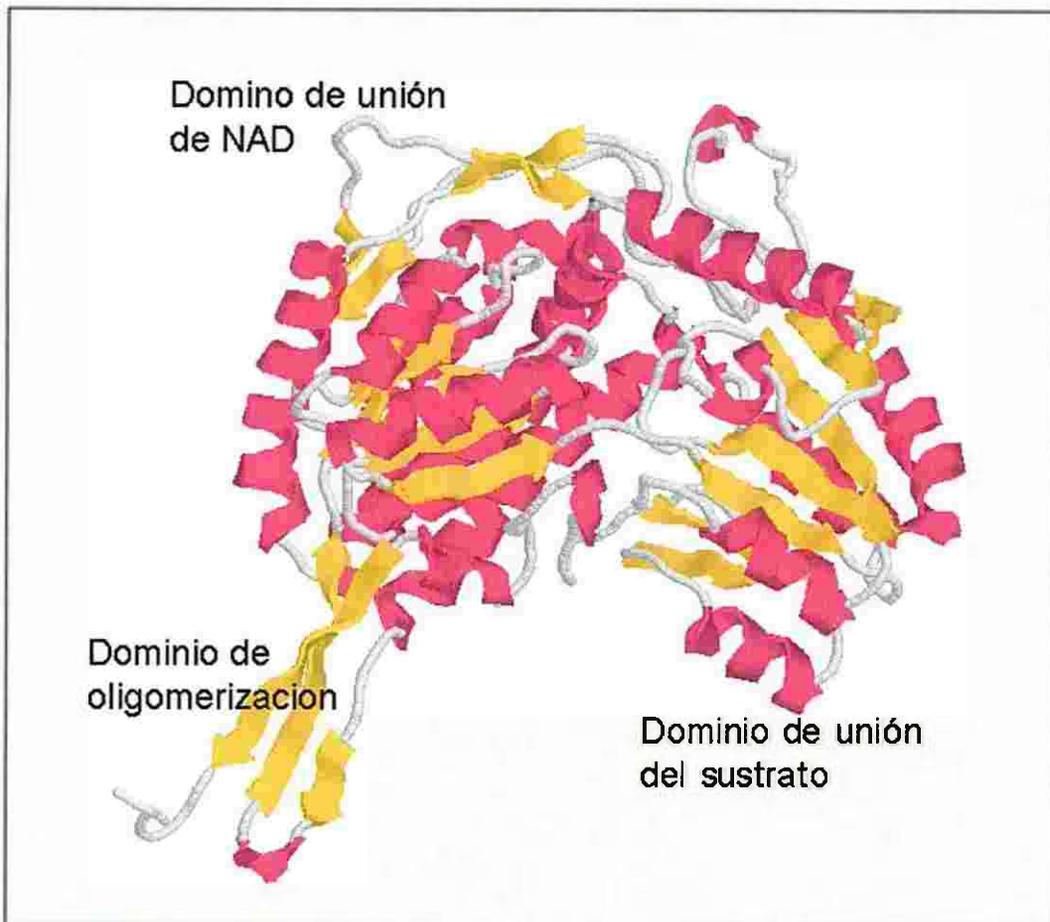


Fig. 4. Representación de los dominios principales de BADH. Tomado de (Rosas-Rodríguez, 2010).

Organismos de los cuales se ha purificado la betaina aldehído deshidrogenasa

La enzima betaina aldehído deshidrogenasa (BADH) ha sido purificada de microorganismos, vegetales y animales. Las BADHs en ostras del atlántico y de la bahía de Chesapeake fueron purificadas utilizando las técnicas de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel en una columna de Bio-Rad 10 – DG, cromatografía de intercambio aniónico en una columna dietilaminoetil (DEAE) Sepharose a 4 °C y una cromatografía de afinidad, con una recuperación de la enzima de 245 veces (Perrino *et al.*, 2000). Se llevó a cabo la cinética parcial de las enzimas, reportando valores similares de V_{max} entre las dos especies. En las ostras del atlántico la V_{max} fue de 1700 nmol/min/mg (± 100) y para las ostras de la bahía de 1700 nmol/min/mg (± 200) (Perrino *et al.*, 2000). Además se encontró que la actividad de estas enzimas está modulada por el incremento de sodio y potasio en el medio. Las BADH de las ostras de la bahía presentaron menor afinidad por su sustrato específico betaina aldehído ($K_m = 0,36$ mM), que la BADH de las ostras del Atlántico ($K_m = 0,1$ mM) (Perrino *et al.*, 2000).

Para la BADH de riñón de cerdo, se reporta una elevada actividad específica, y para su purificación se utilizaron métodos de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel con una columna Sephadex G-75, intercambio iónico con una columna Q-Sepharose, y cromatografía de afinidad 5'-AMP Sepharose (Guzman-Partida *et al.*, 1998). Reportando una elevada actividad específica, con 320 veces de purificación y una recuperación global del 11%. La BADH de riñón es estable en un rango de pH de 5-10, con un pH óptimo de 9.5. Esta enzima es un tetrámero y sus subunidades presentan un peso de 52 kDa.

Se logró purificar a homogeneidad la BADH de *Arthrobacter globiformis* mediante los métodos de fraccionamiento con sulfato de amonio a una saturación de 0-75%, seguido por cromatografía de intercambio aniónico en una columna DEAE-toyopearl, posteriormente se empleó cromatografía de interacción hidrofóbico en una columna butil-toyopearl, y finalmente una cromatografía de filtración en gel en una columna sephacryl S-200. La estructura que presenta la BADH de este organismo es un tetrámero de subunidades idénticas de 55 kDa. La enzima puede utilizar indistintamente como cofactor a NAD⁺ y NADP para llevar a cabo el mecanismo de catálisis (Mori *et al.*, 2002).

Para la purificación de BADH de *P. aeruginosa* se utilizó un protocolo rápido y eficiente, conformado por las técnicas de cromatografía de intercambio iónico en una columna Q-Sepharose Fast- Flow y de afinidad en una columna 2,5-ADP-Sepharose, que se traduce en un alto rendimiento y recuperación de enzima pura, con actividad específica a 30°C y pH de 7.5 de 74.5 U/mg de proteína. Las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS revelan que la estructura de la BADH presente en este organismo es un homo-dímero con subunidades idénticas de 61 kDa. La enzima se inactiva cuando la temperatura se incrementa cerca de los 40°C pero recupera la actividad cuando la temperatura desciende a los 30°C o por debajo del mismo, presenta un pH óptimo de 8 pero es estable en un rango de 6.5-7.8 de pH. A su vez, se encontró que el ion potasio ayuda a la estabilidad y actividad de BADH (Velasco-García *et al.*, 1999).

Al analizar los reportes de los distintos protocolos de purificación para BADH en los diferentes modelos de estudio, se evidencia que se utilizan características específicas de la enzima para una purificación exitosa. Los diversos protocolos se establecen tomando en consideración las características estructurales y cinéticas de la enzima como lo son la carga, el peso molecular y afinidad de unión a ligandos específicos. Lo anterior propone alternativas para el desarrollo de nuevos protocolos de purificación para la purificación de la BADH de *L. vannamei*.

Métodos de purificación de proteínas

Los métodos de purificación de proteínas se fundamentan en una serie de etapas o fases de fraccionamiento en base a las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de interés. El objetivo de cada una de las fases de purificación es eliminar de forma selectiva los demás componentes de la mezcla de manera que solo quede la sustancia de interés. En la purificación de proteínas se simplifican los métodos de separación cuando se conoce alguna característica particular de las proteínas, considerando las características más importantes como la solubilidad de la proteína, carga iónica, tamaño, polaridad y especificidad de unión a ligando. Un buen método de purificación se basa en el equilibrio entre un método, rápido, eficiente con alta resolución y elevada recuperación (Koolman *et al.*, 2004).

Precipitación en base a la solubilidad de la proteína

La precipitación se fundamenta en la solubilidad de las proteínas dado que estas presentan varios grupos cargados y su solubilidad depende de la concentración de sales disueltas en el medio, la polaridad del solvente, el pH y la temperatura. Algunas de estas variables o todas ellas, pueden manipularse para precipitar de manera selectiva ciertas proteínas mientras algunas otras se mantendrán disueltas. La solubilidad de una proteína en una concentración baja de iones aumenta, un fenómeno denominado salting-in. Los iones que son adicionados ocultan las numerosas cargas iónicas de las proteínas debilitando así las fuerzas de atracción entre moléculas individuales de proteína causando una agregación y/o precipitación. Cuando se agrega más sal, en especial sales de sulfato, la solubilidad de la proteína disminuye nuevamente lo que se conoce con el nombre de salting-out. Este proceso, es el resultado de la competencia de los iones de sal agregados y los otros solutos por las moléculas de solvente. A concentraciones muy elevadas de sales muchos de los iones agregados están solvatados y por lo tanto hay una menor cantidad de moléculas de solvente disponible para

interaccionar con las proteínas por lo que se lleva a cabo el proceso de precipitación (Voet *et al.*, 2007). El método de precipitación con sulfato de amonio es el más utilizado para la disminución de la solubilidad de las proteínas debido a que su elevada solubilidad (3.9 M en agua a 0°C) permite la preparación de soluciones con alta fuerza iónica. Consiste en ajustar la concentración de sal de una solución que contiene proteínas por debajo del punto de precipitación de la proteína a ser purificada, de esta forma se eliminan muchas de las proteínas no deseadas en la solución. Entonces, luego de retirar las proteínas por centrifugación o por filtración, la concentración de sal de la solución remanente se aumenta para precipitar a la proteína de interés. Este método hace fácil la recuperación de una cantidad significativa de proteína (Voet *et al.*, 2007). La precipitación con sulfato de amonio ha sido muy utilizada en la purificación de BADH de diversas fuentes.

Métodos cromatográficos

Son métodos de fraccionamiento de sustancias las cuales son disueltas en una fase líquida llamada fase móvil y se hace pasar por una columna que contiene una matriz sólida porosa (fase estacionaria). A medida que los solutos atraviesan la columna interactúan con la fase estacionaria y retardan su paso a través de la columna. Las fuerzas de retención dependen de las propiedades de cada soluto. Existen varios métodos cromatográficos utilizados en la purificación de BADH's como cromatografía de filtración en gel, intercambio iónico y afinidad (Voet *et al.*, 2007).

Cromatografía de filtración en gel

Es un método que se basa en la separación de solutos en base a su forma y peso molecular. La fase estacionaria está formada por esferas de gel que contiene poros de rangos de tamaño relativamente estrechos, el tamaño del poro está determinado por el entrecruzamiento de los polímeros que forman la fase estacionaria. Cuando una mezcla compleja de moléculas es corrida por la columna, las moléculas de mayor peso molecular serán eluidas primeramente.

Esto se debe a que éstas rodean la superficie de las esferas y de este modo su paso a través de la columna es más rápido que las de menor peso molecular ya que ellas entran en el poro de la esfera y son retenidas por más tiempo en la columna (Voet *et al.*, 2007). Esta cromatografía ha sido utilizada en la purificación de BADH de riñón de cerdo y de *Arthrobacter globiformis*, entre otros (Guzman-Partida *et al.*, 1988; (Mori *et al.*, 2002).

Cromatografía de intercambio iónico

Este tipo de cromatografía se fundamenta en que las moléculas cargadas se unen a grupos con cargas opuestas inmobilizadas en la matriz. Los aniones se unen a los grupos catiónicos de los intercambiadores de aniones y los cationes se unen a los grupos aniones de los intercambiadores de catiónicos. Se utilizan resinas a base de celulosa y de agarosa. La afinidad de unión de una proteína depende de la presencia de otros iones que compitan con la proteína por la unión con el intercambiador de iones y del pH de la solución que influye en la carga neta de la proteína.

Las proteínas a separar se disuelven en una solución reguladora de pH y una concentración de iones adecuados y se aplican a la columna que contiene el intercambiador de iones, la columna es lavada con la solución reguladora a medida que la columna se lava las proteínas con interacción relativamente baja se mueven con mayor rapidez que las proteínas que lo hacen con mayor interacción. Las proteínas son eluidas con la misma solución reguladora solo que con una concentración mayor de iones y un pH que favorezca la elución de la proteína de interés (Voet *et al.*, 2007).

Un ejemplo de la cromatografía de intercambio iónico es la que utilizaron (Guzman-Partida *et al.*, 1998) para llevar a cabo la purificación de la BADH renal de cerdo utilizaron una columna de QFF, y la elución la llevaron a cabo aplicando gradiente lineal 50-500 mM de cloruro de potasio. A la fecha se cuenta con columnas pre-empacadas como la HiPrep 16/10 Q FF, altamente reticulada de agarosa, con un tamaño de poro de partículas de 90 μm , tipo de medio fuerte anionico y grupos cargados $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Dicha columna contiene una capacidad

dinámica de unión de 120 mg HSA/ml medio, y puede desarrollarse en un sistema de alta presión, para optimizar el protocolo de purificación.

Cromatografía de afinidad

Esta cromatografía se fundamenta en la capacidad que presentan todas las proteínas de unirse fuertemente a moléculas específicas de manera no covalente, propiedad que es utilizada en la purificación de proteínas. Ya que una molécula llamada ligando (análogos no reactivos del sustrato de una enzima) se unen covalentemente a una matriz que interacciona de manera específica con la proteína de interés. Cuando una solución impura de proteínas es corrida en una columna de afinidad la proteína deseada se une al ligando previamente pegado a la matriz, de tal forma que se unen y se retrasa el paso a través de la columna. El resto son lavadas y eluidas de la columna con la solución reguladora. De este modo la proteína de interés puede recuperarse de forma pura cambiando las condiciones de elución para liberarla de la matriz (Voet *et al.*, 2007).

Un ejemplo de este tipo de cromatografía es utilizando la resina N6-(6-Amino) hexyl-AMP Sepharose, esta matriz tiene anclado a AMP que es un análogo del NAD, este último es un cofactor que utiliza la BADH para llevar a cabo la reacción de oxidación de betaina aldehído a glicina betaina. Al tener AMP y NAD estructuras similares tendrán afinidad con BADH, por lo que la enzima de la muestra reconoce la N6-(6-Amino) hexyl-AMP Sepharose, sin embargo, no ocurre catálisis y al momento de aplicar AMP en la fase móvil o en el buffer de elución la enzima es eluida por competencia (Fig. 5).

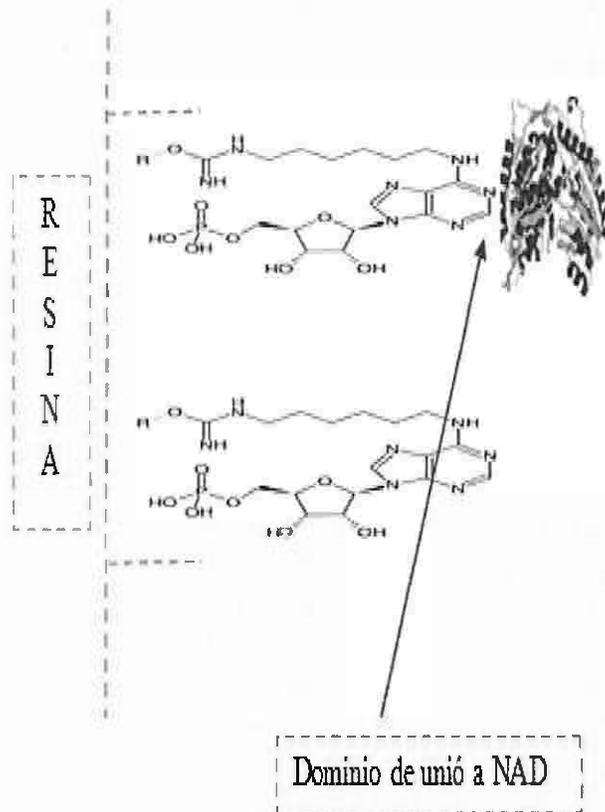


Fig. 5. Representación de la interacción de BADH con N6-(6-Amino) hexyl-AMP Sepharose mediante dominio de unión a NAD. Modificado de Jena-Bioscience (2013)

Evaluación de la purificación de proteínas

En cada proceso de purificación se requiere elaborar tablas de purificación para evaluar cada uno de los pasos del protocolo. En la tabla de purificación se registran cada uno de los pasos y el rendimiento que se obtiene en cada uno de ellos, desde el extracto crudo hasta la obtención de la enzima pura a homogeneidad. Los valores se obtienen de la siguiente forma.

Proteína total: es la concentración de proteína multiplicada por el volumen total de cada fracción.

La actividad total: es la actividad enzimática multiplicada por el volumen total de cada fracción.

La actividad específica: es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg prot).

Rendimiento: actividad total etapa/ actividad total de la etapa anterior por 100

Purificación total: es la actividad específica etapa/ la actividad específica de la primera etapa.

Análisis de actividad enzimática

Según la comisión de enzimas de la unión internacional de bioquímica, se define una unidad internacional de enzima (U) como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de producto por minuto bajo condiciones definidas.

La actividad molecular por tanto es el número de moles de sustrato transformados por minuto por mol de enzima (unidades por μmol de enzima) en condiciones óptimas.

Cuando la enzima tiene más de un centro de unión para el sustrato, se puede definir una actividad catalítica por centro, como el número de moles de sustrato transformadas por minuto por mol de centro activo bajo condiciones óptimas. La actividad molecular o la actividad catalítica por centro son equivalentes a la constante catalítica, k_2 (Arriaga, 1979)

Actividad específica

Se define la actividad específica de una preparación enzimática como el número de μmol de producto formado por minuto, por miligramo de proteína o por miligramo de enzima (Arriaga, 1979)

Actividad específica = μmol de producto formado/ min /mg de proteína o U/mg proteína

De manera general, se puede deducir la actividad específica de una enzima es igual a V_{max} /mg de enzima

$K_2 = V_{\text{max}} / (E) t = \mu\text{mol}$ de sustrato transformados/min. / μmol de enzima = min^{-1}

La BADH utiliza la NAD (P^+) como cofactor ya que es el aceptor de protones de la oxidación de betaina aldehído a glicina betaina. Por lo que la actividad de BADH se define como:

1 U = 1 μmol NADH formado /min/ mL

Métodos para determinar la concentración de proteínas

Métodos espectrofotométrico

La espectrofotometría es uno de los métodos de análisis más utilizados, y se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración. La espectrofotometría se rige en dos leyes fundamentales:

La ley de Beer afirma que la absorbancia es proporcional a la concentración de la especie absorbente. Esta ley se aplica a la radiación monocromática y funciona muy bien con disoluciones diluidas de la mayoría de las sustancias.

Ley de Lambert esta ley establece que cuando pasa luz monocromática por un medio homogéneo, la disminución de la intensidad del haz de luz incidente es proporcional al espesor del medio, lo que equivale a decir que la intensidad de la luz transmitida disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente el espesor del medio absorbente (Harris, 2007)

Método de Bradford

Es un método utilizado para la cuantificación de la concentración de proteína de una muestra problema, cuantifica la unión del colorante, Coomassie Azul brillante G-250 a la proteína desconocida y la compara con las diferentes cantidades de una proteína estándar conocida, usualmente albumina de suero bovino (BSA). La unión del colorante a la proteína provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm, el complejo colorante proteína presenta un máximo de absorbancia a 595 nm. Está método está diseñado para cuantificar entre 1 y 10 microgramos de proteína. Es un método simple, rápido, barato, y pocas sustancias interfieren en su determinación, el proceso de unión del colorante a la proteína es completa en aproximadamente 2 minutos y presenta una buena estabilidad del color durante 1 hora (Bradford, 1976; Giraldo *et al.*, 2010).

METODOLOGÍA

Muestra

Se utilizó camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) adulto reproductor, con un peso de 60 gr y una talla de 15 cm que provienen del laboratorio el camarón dorado Huatabampo Sonora. Transportado vivo en agua de mar al laboratorio Ciencias de la Salud ubicado en las instalaciones de la Universidad de Sonora unidad regional sur campus Navojoa. Al momento de iniciar la extracción fue utilizado el camarón completo.

Ensayo de actividad enzimática

Para la evaluación de la actividad enzimática se monitoreo la reducción de NAD^+ con el incremento en la extinción a 340 nm, empleando un espectrofotómetro UV/VIS LAMBDA 45 Perkin Elmer a temperatura ambiente (25 °C). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1ml, 100 mM de buffer Hepes-KOH pH 8.0, 0.1 mM de EDTA, BA 0.5 mM y 1.0 mM NAD^+ . La reacción dio inició por la adición de la enzima.

Actividad de BADH en tejido específico.

Previo a los pasos de purificación, se realizó un ensayo de actividad tejido específico. Se llevó a cabo una disección de los tejidos: hepatopáncreas, branquias, músculo, ojos, pleópodos y uropodos tomando 0.2 g de cada tejido, se homogenizaron en 1mL de buffer A (100mM de Tris-HCl pH 8.5, EDTA 1mM, glicerol al 10%(V: V) y 14 mM de β -mercaptoetanol), adicionando 10 μL de inhibidor de proteasas y 100 μL de PMSF. La homogenización se realizó con un Polytron PT 10-35 6T y se centrifugó durante 30 minutos utilizando un Centrífuga Prisma R LabNet. Se evaluó la actividad enzimática en el sobrenadante de cada uno de los extractos.

Obtención del extracto crudo.

Se utilizaron 100 gr. de tejido de camarón completo y se homogenizaron en 200 ml de buffer A relación (1:3. p/v) muestra/buffer. Se agregó 1ml PMSF por cada 100 ml de extracto y 100 µl de mezcla de inhibidores de proteasas por cada 100 gr de tejido.

Filtrando el homogenizado con doble gasa para eliminar grasa y tejido. Posteriormente se centrifugo a 10,000 rpm a 4°C por 1.5 horas, obteniendo el extracto crudo, al cual se le midió el volumen y se le determino proteína y actividad de BADH.

Precipitación fraccionada con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Se realizó una saturación del extracto crudo con sulfato de amonio en un rango de 40 a 100%. En base al volumen registrado en la tabla de saturación se agregó la sal en proporción señalada.

El sulfato de amonio fue agregado lentamente e incubado con agitación durante 15 minutos/4°C, hasta que la sal se solubilizo completamente. Se dejó reposar por 30 min y centrifugo por 20 min a 10000 RPM a 4 °C. Al sobrenadante y al precipitado re-suspendido en 10 mL de buffer B (HEPES-KOH pH 8.0, 10% de glicerol, y 14mM de β-mercaptoetanol), se les determino el volumen, proteína y actividad.

Posteriormente se desalo el sobrenadante y el re-suspendido, determinando su actividad y concentración de proteína. Procedimiento que se repitió para cada una de los distintos porcentajes de saturación. Para desalar se utilizaron centricones de corte de 30 KDa.

Desalado de muestras.

Para eliminar la cantidad excesiva de iones presentes en las muestras, se realizó el recambio de buffer de la muestra aplicando tres volúmenes de buffer sin sal, utilizando centricones de 30 kDa por centrifugación a 5000 xG a 4 °C. .

Las muestras desaladas fueron las obtenidas en cada paso de la purificación: extracto crudo, precipitación y sobrenadante de las muestras precipitadas con

sulfato de amonio (al 40% -100%), muestras de intercambio iónico y lo eluido de afinidad.

Cromatografía de intercambio iónico

La muestra desalada (precipitada al 70%) se aplicó a una columna de cromatografía de intercambio iónico (HiPrep 16/10 Q FF) el cual se equilibró con buffer B. La proteína se eluyó aplicando un gradiente lineal de KCl (50-500 mM) en buffer B. A las fracciones recuperadas se les determinó actividad y de acuerdo al cromatograma obtenido se unieron algunas. Los pools obtenidos fueron desalados cambiando la solución a buffer C (fosfato de potasio monobásico-dibásico 10 mM pH 6.6, glicerol 10% mercaptoetanol 14 mM), y se les midió volumen, proteína y actividad

Cromatografía de afinidad

El pool desalado obtenido de Intercambio iónico fue sometido a la cromatografía de afinidad con la matriz N6-(6-Amino) hexyl-AMP sepharose pre-equilibrada con buffer C. La elución de la proteína se realizó aplicando AMP 0.125 mM en buffer C.

Electroforesis nativa (PAGE) y desnaturizante-reductora (SDS-PAGE)

Ambas electroforesis se realizaron siguiendo el protocolo establecido por (Laemmli, 1970). El gel de poliacrilamida fue elaborado al del 8% y la electroforesis se llevó a cabo en "Mini-PROTEAN® Tetra Cell" de BIORAD. La proteína se reveló con tinción de comasse y plata de acuerdo al método de (Wray *et al.*, 1981).

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (Kit Quick star Bradford proteína assay de BIO-RAD). Se agregaron 20 µl de extracto en 1ml de reactivo de Bradford, se dejó incubar por 5 minutos y posteriormente se registró la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS a temperatura ambiente (25 °C).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad de BADH en tejido específico en camarón

Los resultados de la evaluación de la actividad de BADH en tejido específico de camarón blanco, muestran que la actividad está presente en hepatopáncreas (1.09×10^{-2} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$) branquias (3.39×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$) y músculo (4.20×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$). No se logró detectar actividad en pleopodos, uropodos y ojos. Los tejidos representan la mayor parte de la composición del camarón como lo es hepatopáncreas (2-5%), músculo (80%) y branquias (2-3%) (Habib *et al.*, 2013), fueron en los que se detectó actividad de BADH.. Dado lo anterior, se decidió utilizar el organismo completo para iniciar el protocolo de purificación y considerando además, que la disección y manipulación del tejido, incrementaría el riesgo de pérdida de actividad por la hidrólisis de las enzimas proteolíticas.

Ensayo de Bradford

Se realizó una curva de calibración con el método Bradford (Bradford, 1976), utilizando la albumina de suero bovino (BSA) como patrón de referencia en un rango de 62.5 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Obteniendo un índice de correlación de 0.9626, por lo que se pudo determinar de forma confiable la concentración de proteína de las muestras problema (Fig. 6).

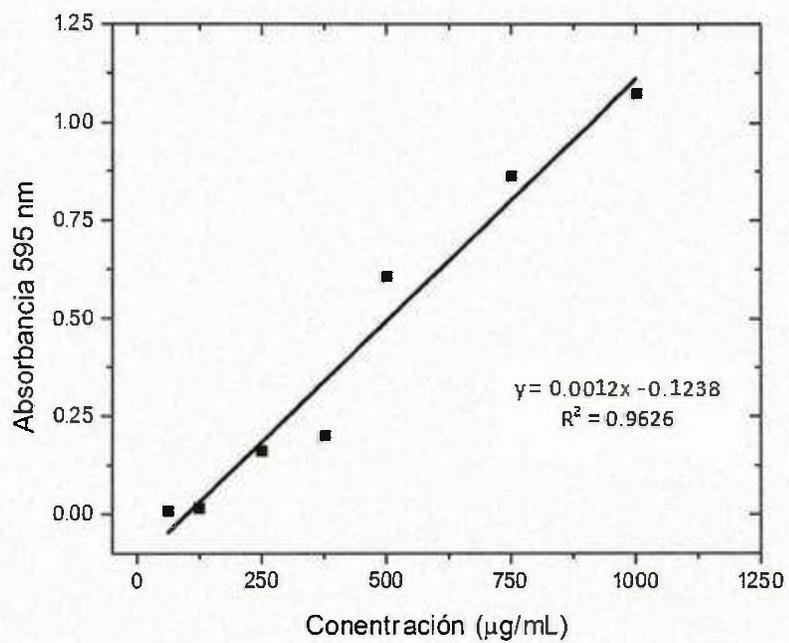


Fig. 6. Curva de calibración de Bradford para determinar bajas concentraciones

Extracto crudo

Se homogenizaron 100 gr de tejido de camarón en 200 ml de buffer A (proporción 1:3, muestra buffer), 2 ml de PMSF y 100 μ l de inhibidor de proteasas. Se obtuvieron 84 ml de sobrenadante del extracto crudo, el cual presento una actividad total de 1.008 U, proteína total de 276.21 mg y una actividad específica 0.0036 U/mg proteína

La elevada concentración de proteína detectada en el extracto crudo, se debe a que el extracto obtenido es una muestra compleja con una gran diversidad de constituyentes proteicos, siendo los principales grupos de proteínas que están presentes: 1) Proteínas Sarcoplásmicas (PS), 2) Proteínas miofibrilares (PMF), 3) Proteínas solubles en álcali (PSA) y 4) Proteínas de estroma (PE); es por eso que el extracto crudo tiene una gran concentración de proteínas, sin descartar el gran contenido de quitina, y grasa que forman parte del de camarón. (Osuna-Lizárraga *et al.*, 2014) Estos organismos cuentan con un sistema de defensa, que se basa en la liberación de proteínas que ayudan a mantener las funciones inmunoprotectoras (Rendón *et al.*, 2003), se ha demostrado en otros estudios que los peneidos requieren una alta dieta en proteínas, ya que estas son utilizadas, en funciones de contracción musculares, en la restructuración del exoesqueleto cuando se muda (Urdaneta, 1992).

El hepatopáncreas es el órgano más importante del sistema digestivo de los decápodos, en él se sintetizan una gran variedad de enzimas proteolíticas, que en base a su mecanismo de acción se pueden clasificar en 4 grupos: a) Serina-proteasas; b) Aspártico-proteasas c) Sulfhidril-proteasas, también llamadas tior proteasas o cisteína proteasas y d) Metallo-proteasas. Que tienen la capacidad para hidrolizar proteínas (Franceschini-Vicentini *et al.*, 2009). Al momento de realizar el macerado de todo el tejido del camarón, se lisa esta glándula liberando una gran cantidad de enzimas digestivas. La inhibición de la actividad proteolítica, es necesario para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de todos los componentes proteicos presentes en el extracto crudo, dentro de las cuales se encuentra la betaina aldehído deshidrogenasa. Se logro inhibir la

actividad proteolítica, ya que al momento de monitorear la actividad BADH en el extracto crudo la betaina aldehído deshidrogenasa se mantenía activa.

Otro punto fundamental que hay que cuidar al momento de realizar el extracto crudo es la relación buffer-muestra (relación 1:3), ya que se ha observado que la actividad de la betaina aldehído deshidrogenasa se pierde cuando no se tiene el volumen adecuado de buffer de extracción. La enzima BADH está conformada por unidades idénticas, lo cual favorece la formación de agregados de alto peso molecular, cuando no existe la disponibilidad de soluto adecuada. Los agregados de alto peso molecular de BADH, pueden precipitar o bien, perder su actividad enzimática.

Precipitación fraccionada con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Al extracto crudo se le realizó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio para disminuir la carga de proteínas que no sean BADH y reducir el volumen de la muestra para el siguiente paso de purificación.

Inicialmente en un estudio previo, se monitoreo la actividad para betaina aldehído deshidrogenasa en el sobrenadante y el precipitado de cada uno de los distintos rangos de saturación con sulfato de amonio (40% al 100%), para determinar y establecer los porcentajes de saturación a los cuales de la BADH precipitaba. Como resultado de este ensayo se observó que al momento de realizar la saturación al 40, 50 y 60% de sulfato de amonio. La BADH aún se encontraba en solución (Tabla 1). Al 70% de saturación la actividad de la BADH se encontraba solo en el precipitado. Por lo que se decidió trabajar con una precipitación fraccionada de 40-70% de saturación con sulfato de amonio.

Es importante destacar que las condiciones descritas por (Guzman-Partida *et al.*, 1998), en donde la BADH renal precipitaba a un 55% de sulfato de amonio, no funcionaron para la BADH de camarón. Esto debido a que posterior a la precipitación con sulfato de amonio al 55%, el 72% de la actividad de BADH aún se encontraba en solución.

Lo que nos indica que la enzima BADH tiene mayor capacidad de ser soluble a altas concentraciones de fuerza iónica, lo que en teoría es de esperarse ya que los organismos acuáticos trabajan fisiológicamente con una fuerza iónica de 0.3 M, a

diferencia de los animales terrestres como en mamíferos, humanos y otros organismos que trabajan a una fuerza iónica de 0.15 M.

La BADH de camarón se encuentra inmersa en un medio con altas concentración de iones. Lo que nos indica que su estructura contiene una mayor cantidad de aminoácidos hidrofílicos expuestos, por lo que la interacción con las moléculas de agua disponible serán más fuertes, requiriendo una mayor concentración de iones llevar a cabo el proceso conocido como salting-out.

Precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ del 40-70%

El extracto crudo (84 mL) se llevó a una saturación del 40% con sulfato de amonio, obteniendo un volumen de 74 ml de sobrenadante y el precipitado fue re-suspendido en 50 ml de buffer B, a ambas fracciones se les determino concentración de proteína, actividad y actividad específica.

Se observó que la actividad total en el sobrenadante era de 0.756 U y una concentración de proteína de 265 mg. Lo que representa una recuperación del 75% de actividad total y un 95.9% de proteína.

En el precipitado la actividad fue de 0.09 U y 11 mg de proteína, representando solo 8% de la actividad no recuperada y eliminando 4% de proteínas ajenas a BADH.

Los 74 ml del sobrenadante al 40% que tenía actividad de BADH se llevaron a una saturación del 70 % con sulfato de amonio. En los 74 ml del sobrenadante se observó que la actividad de 0.04 U y una concentración de proteína de 23 mg, es decir se eliminó el 10% de proteína contaminante y se perdió solo el 5% de actividad de BADH.

En el precipitado se detectó actividad de 0.8 U y una concentración de proteína de 242.1 mg. Lo que representa una recuperación de 79 % de actividad total y un 87.65% de proteína, logrando reducir el volumen de muestra y facilitar así el siguiente paso de la purificación que es ua cromatografía de intercambio iónico.

Tabla 1. Precipitación fraccionada del extracto crudo de camarón blanco y detección de actividad.

Precipitación	Actividad BADH
0%	
Extracto crudo	(+)
40%	
Sobrenadante	(+)
Precipitado	(-)
50%	
Sobrenadante	(+)
Precipitado	(-)
60%	
Sobrenadante	(+)
Precipitado	(+)
70%	
Sobrenadante	(-)
Precipitado	(+)
80%	
Sobrenadante	(-)
Precipitado	(-)
90%	
Sobrenadante	(-)
Precipitado	(-)
100%	
Sobrenadante	(-)
Precipitado	(-)

La BADH de camarón presenta rangos de saturación con sulfato de amonio similares a la BADH de ostras que fue estudiada por (Perrino *et al.*, 2000), ya que en ellos utilizaron un rango de saturación de 45-60%, estos modelos de estudios guardan una relación en común ya que los dos se encuentran encontrados, altas fuerzas iónicas, por lo que la BADH de camarón y de ostra pudieran tener características similares.

Eliminación de sulfato de amonio

A la muestra obtenida con la precipitación al 70% fue desalada utilizando centricones de corte de 30 KDa, para eliminar la cantidad excesiva de iones presentes, siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos.

Al desalar la fracción de la precipitación al 70% se detecta una actividad de 0.003 U y 41.2 mg de proteína, lo que representa la pérdida de 99.55% de la actividad enzimática y un 85 % de la proteína.

Para desalar la muestra se utilizaron centricones de corte de 30 KDa ya que en teoría se esperaba que la BADH de camarón pudiera ser una estructura, homotetrámerica con un peso alrededor de 232-250 KDa, con subunidades de 50-55 KDa, por lo que al momento de realizar la diálisis la proteína de interés no debe cruzar la membrana y por tanto mantenerse en los centricones. Esta disminución de actividad y proteína se puede deber a que al momento de realizar la diálisis, ocurriese una falla técnica con los centricones y se diera una fractura en la membrana provocando la pérdida de la proteína y de su actividad. También es posible que al momento de desalar la muestra, las condiciones de alta velocidad y baja temperatura favorezcan la formación de agregados de alto peso molecular y se ve reflejada en una pérdida de la actividad enzimática.

Intercambio iónico

La muestra desalada se aplicó a una columna de cromatografía de intercambio iónico (HiPrep 16/10 Q FF), la cual se equilibró con buffer B y la enzima se eluyó aplicando un gradiente lineal de KCl (50-500 mM) en buffer B. En el cromatograma obtenido de intercambio iónico (Figura 7), se observan dos picos, el primero a una concentración de 150 mM KCl, abarcando de las fracciones 23-33. El segundo a 400mM de KCl, correspondiente a las fracciones 56-64. Los pool's de las fracciones correspondientes a estos picos se juntaron y se concentraron y desalaron a un volumen de 10 ml.

La concentración de proteína en cada una de los pool's QF1 (23-33), QF2 (56-64) fue de 8.2 mg y 91 mg respectivamente, y no se detectó actividad enzimática. Una de las razones por las cuales asumimos se pierde la actividad es que la cantidad de proteína inyectada a la columna de intercambio iónico es muy baja, mientras que la columna de intercambio iónico tiene 20 mL de resina. Dicha cantidad de resina es elevada en comparación con la baja concentración de proteína que se está aplicando, por lo que al eludir se diluye la actividad enzimática y se pierde la señal por completo.

En base a lo anterior, para el siguiente paso de purificación (cromatografía de afinidad) se utilizó la fracción QF1. Esto debido a que dicha fracción se eluyó a una concentración de 150 mM de KCl, que coincide con la concentración en la que eluye la BADH de riñón de cerdo (Guzman-Partida *et al.*, 1998), cuyo protocolo también emplea esta misma matriz. Coincide también con lo reportado por (Mori *et al.*, 2002) y con la purificación de la BADH de ostra que realizó (Perrino *et al.*, 2000) la fracciones que se eluyeron a una concentración de 100 mM de NaCl fueron las que presentaron actividad después de realizar la cromatografía de intercambio iónico.

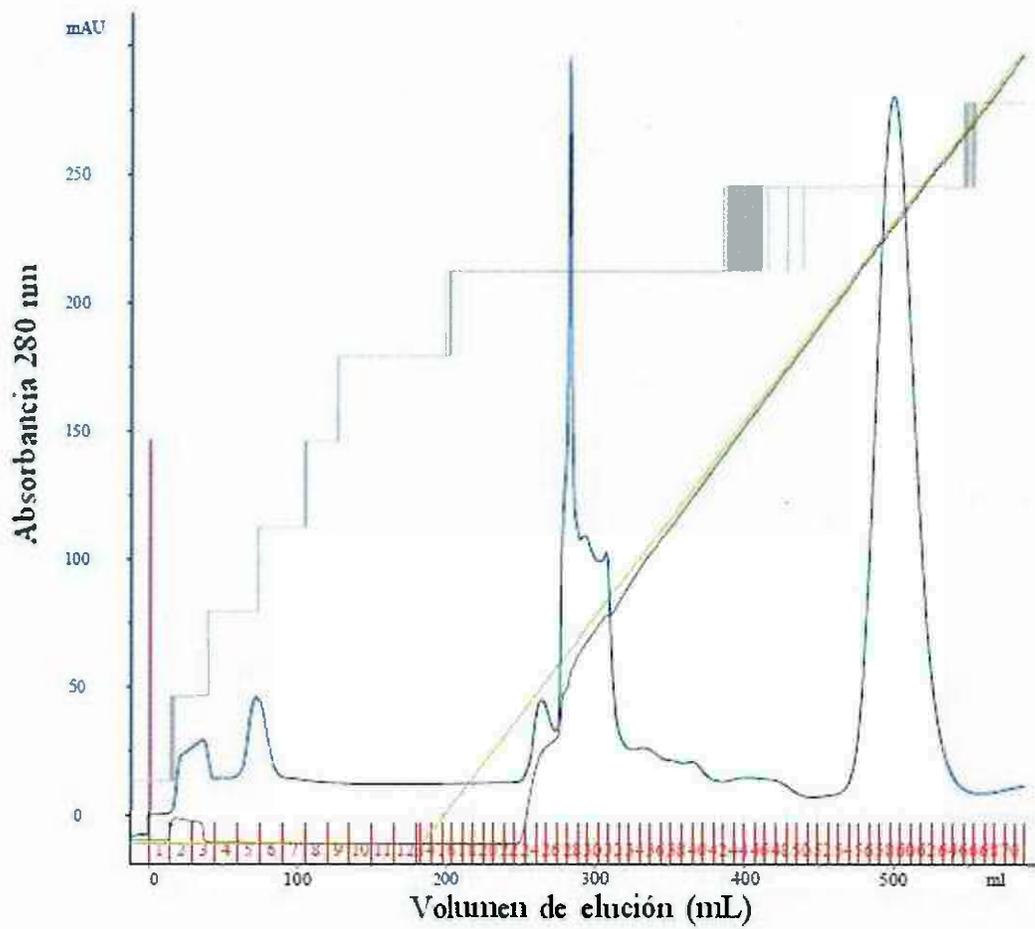


Fig. 7. Cromatograma de la purificación de BADH mediante cromatografía de intercambio iónico. Se muestra la absorbancia a 280 nm (azul), elución con KCl (verde) y colección de fracciones (rojo).

Cromatografía de afinidad

La fracción QF1 desalada se aplicó a una columna de cromatografía de afinidad N6-(6-Amino) hexyl-AMP Sepharose. El cual se equilibró con buffer C y la enzima se eluyó aplicando AMP a una concentración de 0.125 mM

Una vez terminada la corrida cromatografica de afinidad se colectaron todas las fracciones (No pegado, lavado y fracciones eluidas con AMP) y se les midió la actividad enzimática a cada una, sin lograr detectar actividad espectrofotométricamente. Sin embargo, a la muestra eluida se le detecto proteína, por lo que se procedió a realizar un concentrado para su posterior análisis electroforético.

En el cromatograma se observa que hay una gran cantidad de proteína que no tiene interacción con la resina ya que se observa una señal de absorbancia a 280 nm alrededor de los 1000 mAU, lo cual es de esperarse ya que la mayoría de las proteínas no serán afines con el AMP anclado a la matriz. Al momento de realizar la elución con AMP a una concentración de 0.125 mM, se observa como empieza a despegarse una cantidad de proteína, que da una señal de absorbancia alrededor de 140 mAU (Fig. 8), mucho menor que lo no pegado, y son proteínas que tuvieron afinidad con AMP, y que al agregar este compuesto en altas concentraciones por competencia desplazara a la proteína anclada.

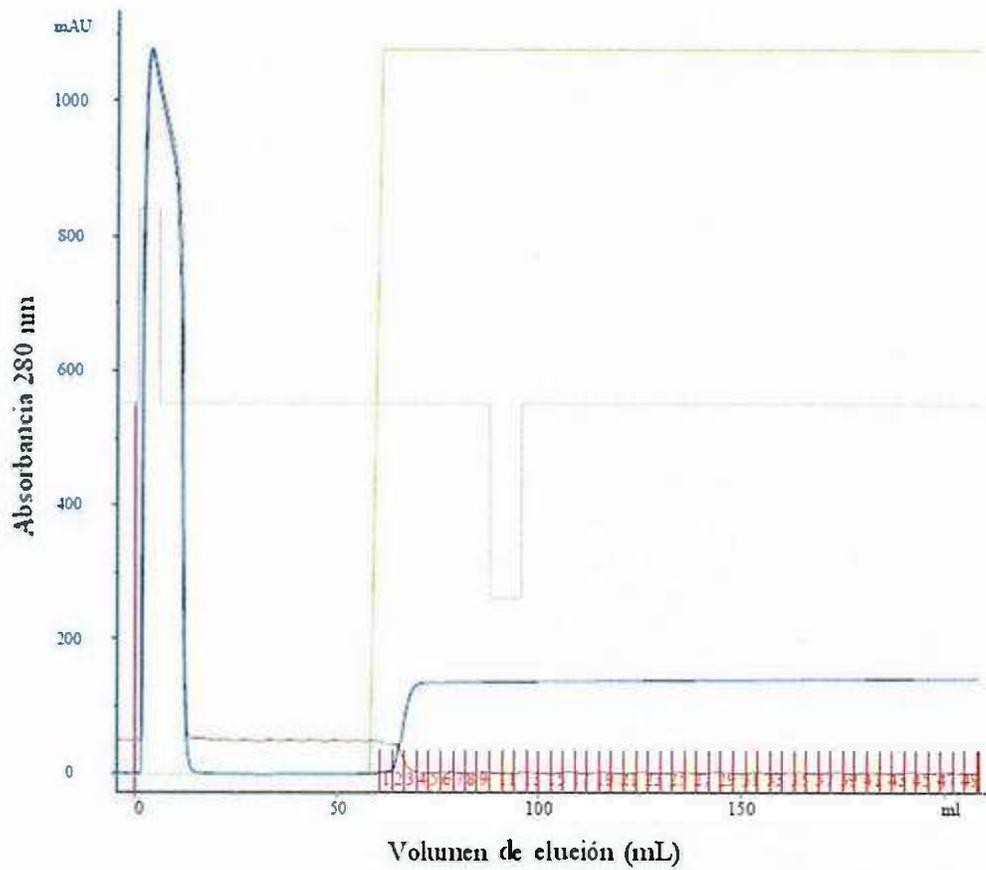


Fig. 8. Cromatograma de la purificación de BADH mediante cromatografía de afinidad. Se muestra la absorbancia a 280 nm (azul), elución con AMP (verde) y colección de fracciones (rojo).

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para analizar la composición proteica de las muestras obtenidas a lo largo de este protocolo de purificación, se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 8 % en condiciones nativas de acuerdo con la metodología descrita por (Laemmli, 1970). Las corridas electroforéticas se efectuaron a 80-100 V y corriente variable durante aproximadamente 3.30 horas. Una vez finalizada la corrida, los geles se tiñeron con Coomassie Blue R-250 y plata de acuerdo al método de (Wray *et al.*, 1981).

Con el fin de tener la mayor concentración posible en el gel, se utilizó el buffer carga a una concentración 5x. Se mezclaron 4 μ l de buffer muestra con 16 μ l de muestra de cada uno de los pasos de purificación: extracto crudo, precipitación al 40%, precipitación al 70%, desalado con centricones de corte de 30 KDa, pool QF1 de intercambio iónico y eluido de afinidad. Se inyectaron al gel 15 μ l de estas mezclas.

Se utilizó Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis, como patrones de referencia para estimar el peso molecular de las fracciones obtenidas en cada paso de la purificación

En las muestras del extracto crudo y los precipitados con sulfato de amonio se observan un patrón de proteína muy similar con 10 bandas (Fig. 9). Las cuales claramente disminuyen a partir de intercambio iónico, en el carril 7 se muestran solo 4 bandas, y en la fracción de afinidad se muestra 1 sola banda con tinción con plata.

En todos los carriles destaca una banda muy marcada con peso de 232-250 KDa, que es la única presente en la muestra eluida de la cromatografía de afinidad. El peso molecular de esta banda presente en los extractos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es similar al de la BADH renal, lo que indica que posiblemente si se haya logrado purificar a la BADH de *L. vannamei* con el protocolo propuesto. Sin embargo, para comprobarlo es indispensable detectar actividad en esa fracción, o bien comprobar su identidad empleando anticuerpos Anti-BADH u obtener su secuencia mediante análisis de masas.

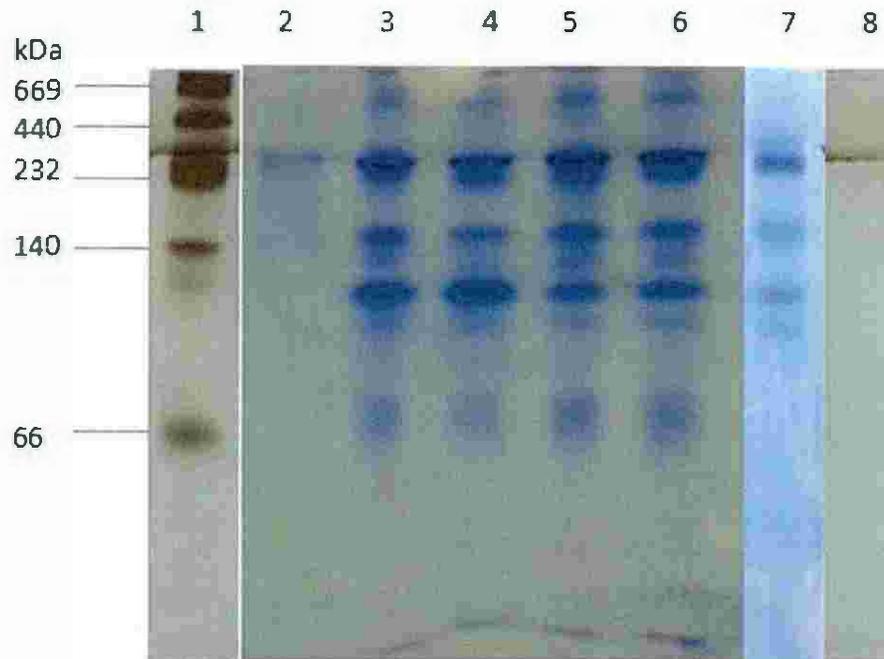


Fig. 9. Electroforesis bajo condiciones nativas en gel de poliacrilamida al 8%. Carril (1) PM, (2) BADH renal, (3) extracto crudo (4) Sobrenadante 40% (5) Precipitado 70% (6) desalado C30 KDa (7) Fracción 1 QFF (8) fracción de afinidad.

Tinción por actividad de BADH de camarón blanco

Se realizó una tinción por actividad de en un gel nativo al 8 % de poliacrilamida con las fracciones de la purificación de camarón blanco, utilizando como control positivo para actividad la BADH renal de cerdo (Figura 10). La tinción se llevó a cabo en incubación a 37 °C por 20min.

El resultado de la tinción muestra una banda con actividad positiva en la BADH renal (2), con PM de 232 kDa. Sin embargo, no se obtuvo una banda con actividad en las muestras de camarón blanco obtenidas de los paso intercambio iónico (3) y la fracción obtenida del paso de afinidad (4).

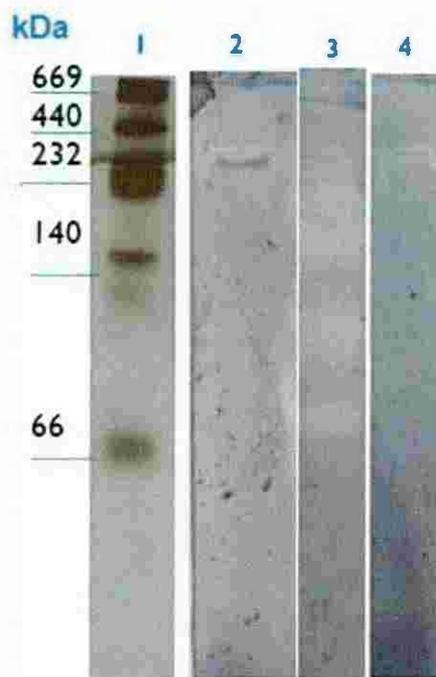


Fig. 10. Zimograma en gel nativo al 8%. Carriles (1) PM, (2) BADH renal, (3) fracción QF1 (4) fracción de afinidad

Tabla de purificación de BADH de *L. vannamei*.

En la tabla 2 se muestra el resumen de evaluación del protocolo de purificación, claramente se muestra que las unidades de actividad enzimática en el extracto crudo son valores bajos de actividad específica de 0.00364 U/mg, actividad total de 1.008 U y proteína total de 276.2 mg.

En la muestra precipitada con sulfato de amonio al 70% se presenta una ligera disminución tanto en la actividad específica (0.00330U/mg de proteína), actividad total (0.8 U) y en la proteína total (242.1 mg). En el paso de precipitación se observa una recuperación del 79.3% y con un 0.905 veces de purificación.

La tabla muestra claramente que al momento de realizar el desalado se pierde un 97.03 % de la actividad enzimática (0.03 U) y un 85.0% de la proteína (41.2 mg) respecto la muestra con sal. Presentando con una recuperación de solo el 2.97% y veces de purificación de 0.199.

Una vez que se llega al paso de intercambio iónico y después de afinidad se observa que la actividad se pierde por completo.

Analizando estos resultados, podemos inferir que BADH no se expresa en concentraciones considerables en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Posiblemente la expresión de BADH es menor en organismos provenientes de las granjas de cultivo, en donde las condiciones ambientales y de crecimiento procuran que sean las óptimas para el desarrollo adecuado de los organismos, ya que los camarones utilizados para este estudio provenían de este tipo de ambientes.

Tabla 2. Purificación de la BADH de camarón blanco

Tabla de purificación							
	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad umol/min/mL	Actividad total	Actividad específica umol/mg prot	Recuperación (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	84	276.2	0.012	1.008	0.00364	100	1
Sobrenadante 40%	84	265.3	0.009	0.756	0.00284	75	0.780
Precipitado 70%	50	242.1	0.016	0.8	0.00330	79.3	0.905
Centricones 30 kDa	5	41.2	0.006	0.03	0.00072	2.97	0.199
Intercambio iónico QF F1	10	8.2	0	0	0	0	0
Afinidad	10	1.1	0	0	0	0	0

CONCLUSIÓN

De acuerdo con los objetivos propuestos en este trabajo, se detectó y se demostró que la betaina aldehído deshidrogenasa se encuentra activa en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. A su vez, se demostró que la actividad de BADH se encuentra principalmente en hepatopáncreas, y en menor grado en los tejidos de branquias y músculo.

No se logró purificar la BADH de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, debido a que la proteína purificada no presentó actividad específica para el sustrato betaina aldehído.

El protocolo desarrollado permite la purificación a homogeneidad electroforética de una proteína cuyas características de movilidad, comportamiento cromatográfico y peso molecular son similares a las que tiene la BADH renal de cerdo.

RECOMENDACIONES

- Definir las condiciones para incrementar la expresión de la actividad de BADH, dado que demostramos que está presente en camarón blanco.
- Determinar la cantidad inicial de camarón que debe utilizarse para obtener un mejor rendimiento.
- Comprobar si la proteína purificada con el protocolo propuesto es BADH, utilizando para su identificación anticuerpo Anti-BADH o bien realizar una secuenciación a través de análisis de masas.
- Evaluar si es viable la purificación de BADH de camarón, o bien optar por herramientas de biología molecular para su sobreexpresión y posterior purificación.

REFERENCIAS

- Ahuejote-Sandoval, M.** 2004. Estrés oxidativo en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en respuesta a hipoxia y reoxigenación, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Arias, A. M. y Drake, P.** 1990. Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la Bahía de Cádiz. Digital.CSIC: 168pp.
- Arriaga, M. D.** 1979. Cinética enzimática: manejo de datos, Universidad de Oviedo.
- Bradford, M. M.** 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical biochemistry 72(1): 248-254.
- Castille Jr, F. L y Lawrence, A. L.** 1981. "The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 68(1): 75-80.
- Díaz, F., C. Farfán., E. Sierra, y A. D. Re.** 2001. "Effects of temperatura and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone." Marine Freshwater Behavior and Physiology 34: 93-104.
- Fenucci, J. L.** 1988. Manual para la cría de camarones peneidos. Brasília, Brasil, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Figueroa-Soto, C. G. y Valenzuela-Soto, E. M.** 2000. "Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase." Biochemical and biophysical research communications 269(2): 596-603.
- Franceschini-Vicentini, I. B., Ribeiro, K., Papa, L. P., Marques Junior, J., Vicentini, C. A. y Valenti, P. M. C. M.** 2009. "Histoarquitectura del Hepatopáncreas del Camarón de la Amazonia *Macrobrachium amazonicum*." International Journal of Morphology 27(1): 121-128.
- Frias-Espericueta, M., Harfush-Melendez, M. y Páez-Osuna, F.** 2000. "Effects of ammonia on mortality and feeding of postlarvae shrimp *Litopenaeus vannamei*." Bulletin of environmental contamination and toxicology 65(1): 98-103.
- Fujiwara, T., Hori, K., Ozaki, K., Yokota, Y., Mitsuya, S., Ichiyonagi, T., Hattori, T. y Takabe, T.** 2008. "Enzymatic characterization of peroxisomal and

- cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley." *Physiologia plantarum* 134(1): 22-30.
- García-Araya, R.-A. A.** 2010. "Efecto de la Temperatura sobre el Crecimiento y Sobrevivencia del Camarón de Río Del Sur (*Samastacus spinifrons*, Phillipi: 1992) en su etapa Joven." *Revista AquaTIC*(32): 7-21.
- Giraldo, G. A. G., Chamorro, N. L. y Doria, C. M. M.** 2010. Laboratorio de Bioquímica: Una Visión Práctica, ELIZCOM SAS.
- Godínez-Siordia, D. E., Chávez-Sánchez, M. C. y Gómez-Jiménez, S.** 2011. "Acuicultura epicontinental del camarón blanco del pacífico, *Litopenaeus vannamei*." *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14(1): 55-62.
- González-Segura, L., Rudiño-Piñera, E., Muñoz-Clares, R. A. y Horjales, E.** 2009. "The Crystal Structure of A Ternary Complex of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* Provides New Insight into the Reaction Mechanism and Shows A Novel Binding Mode of the 2'-Phosphate of NADP⁺ and A Novel Cation Binding Site." *Journal of molecular biology* 385(2): 542-557.
- Guérin, M.** 2000. "Uso de betaina en alimentos acuícolas: Atractante, osmoregulador o metabolito lipotrófico." *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, La Paz, BCS, México: 492-508.
- Guzman-Partida, A. M. y Valenzuela-Soto, E. M.** 1998. "Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 119(3): 485-491.
- Habib, F., Zarrien, A., Syed, A. A. y Ghazala, S.** 2013. "Biochemical composition of the hemolymph, hepatopancreas, ovary, and muscle during ovarian maturation in the penaeid shrimps *Fenneropenaeus merguensis* and *F. penicillatus* (Crustacea: Decapoda)." *Turk J Zool* 37: 334-347.
- Harris, C. D.** 2007. *Análisis químico cuantitativo*. España, Reverte.
- Jahn, M. P., Cavagni, G. M., Kaiser, D. y Kucharski, L. C.** 2006. "Osmotic effect of choline and glycine betaine on the gills and hepatopancreas of the *Chasmagnathus granulata* crab submitted to hyperosmotic stress." *Journal of experimental marine biology and ecology* 334(1): 1-9.
- Jena-Bioscience.** 2013. N6-(6-Amino)hexyl-adenosine 5'-monophosphate (N6-(6-Amino)hexyl-AMP) immobilized on Agarose. J. B. GmbH. Germany, <http://www.jenabioscience.com>.

- Johansson, K., Ramaswamy, S., Eklund, H., El-Ahmad, M., Hjelmqvist, L. y Jörnvall, H.** 1998. "Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution." *Protein science* 7(10): 2106-2117.
- Julián-Sánchez, A., Riveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L., Velasco-García, R. y Muñoz-Clares, R.** 2007. "Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases." *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 13: 64-76.
- Koolman, J., Röhm, K.-H. y** 2004. *Bioquímica: texto y atlas*, Ed. Médica Panamericana.
- Laemmli, U. K.** 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *nature* 227(5259): 680-685.
- Mori, N., Fuchigami, S. y Kitamoto, Y.** 2002. "Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase with high affinity for NADP from *Arthrobacter globiformis*." *Journal of bioscience and bioengineering* 93(2): 130-135.
- Muñoz-Clares, A. R. y Velasco-García, R.** 2004. "Genio y figura de la Betaina Aldehído Deshidrogenasa." *Mensaje Bioquímico* 28.
- Muñoz-Clares, R. A., Díaz-Sánchez, Á. G., González-Segura, L. y Montiel, C.** 2010. "Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: Mechanistic and regulatory implications." *Archives of biochemistry and biophysics* 493(1): 71-81.
- Muñoz-Clares, R. A., Díaz, S. Á. G. y Carmina, M.** 2009. "Como convertir un inhibidor competitivo en incompetitivo: el caso de las betainas aldehído deshidrogenasas." *Mensaje Bioquímico* 33.
- Osuna-Lizárraga, A., Escobedo-Lozano, A., Méndez Gómez, E., Vázquez-Olivares, A. y Martínez-Sánchez, H.** 2014. "Extracción, caracterización parcial y evaluación de la digestibilidad in vitro de la proteína asociada al exoesqueleto del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)" *Revista Bio Ciencias* 2(4): 293-301.
- Perrino, L. A. y Pierce, S. K.** 2000. "Betaine aldehyde dehydrogenase kinetics partially account for oyster population differences in glycine betaine synthesis." *Journal of Experimental Zoology* 286(3): 238-249.
- Pierce, S. K., Rowland-Faux, L. M. y Crombie, B. N.** 1995. "The mechanism of glycine betaine regulation in response to hyperosmotic stress in oyster mitochondria: a comparative study of Atlantic and Chesapeake Bay oysters." *Journal of Experimental Zoology* 271(3): 161-170.

- Pietruszko, R. y Chern, M.-K.** 2001. "Betaine aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondrial matrix." *Chemico-biological interactions* 130: 193-199.
- Ramos-Cruz, S.** 2012. "Aspectos biológicos y poblacionales del camarón blanco *litopenaeus vannamei*, durante la veda de 2006 en el golfo de tehuantepec, México." *CICIMAR Oceánides* 27(1): 11-24.
- Rendón, L y Balcázar, J. L.** 2003. "Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances." *Revista AquaTIC* 19: 27-33.
- Rodríguez-Zavala, J. S., Allali-Hassani, A. y Weiner, H.** 2006. "Characterization of *E. coli* tetrameric aldehyde dehydrogenases with atypical properties compared to other aldehyde dehydrogenases." *Protein science* 15(6): 1387-1396.
- Rosas-Rodríguez, J. A.** 2007. Efecto del estrés oxidativo sobre la actividad y parámetros cinéticos de la betaina aldehído deshidrogenasa de riñón de cerdo. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Son. : 48.
- Rosas-Rodríguez, J. A.** 2010. Cambios en la estabilidad estructural y el estado redox de la BADH renal frente a estrés oxidativo. Coordinación de Ciencias de los Alimentos. Hermosillo, Sonora, México, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Tesis de Doctorado.
- Tizol, R., Jaime, B., Laria, R., Pérez, L., Machado, R. y Silveira, R.** 2004. "Introducción en Cuba del camarón blanco del pacífico *L. vannamei*. Etapa I Cuarentena."
- Urdaneta, R. E. P.** 1992. "Resultados preliminares sobre los requerimientos proteicos de juveniles de camarón blanco (*Penaeus Schmitti, Burkenroad*) en acuarios experimentales." *Zootecnia Tropical* 10(2): 189-203.
- Valdez, G., Díaz, F., Re, A. D. y Sierra, E.** 2008. "Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone)." *Hidrobiológica* 18(2): 105-115.
- Vasiliou, V., Thompson, D. C., Smith, C., Fujita, M. y Chen, Y.** 2013. "Aldehyde dehydrogenases: from eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells." *Chemico-biological interactions* 202(1): 2-10.
- Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G. y Muñoz-Clares, R. A.** 1999. "Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of bacteriology* 181(4): 1292-1300.

Voet, D., Voet, J. y Pratt, C. 2007. "2ª edición. Ed. Panamericana." Fundamentos de Bioquímica.

Weretilnyk, E. A. y Hanson, A. D. 1989. "Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: Purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity." *Archives of biochemistry and biophysics* 271(1): 56-63.

Wray, W., Bouliskas, T., Wray, V. P. y Hancock, R. 1981. "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." *Analytical biochemistry* 118(1): 197-203.