

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS LA SALUD

Determinación de Condiciones Experimentales para la  
Generación de Cristales de Tripsina de Sardina Monterey  
(*Sardinops sagax caerulea*)

The seal of the University of Sonora is a circular emblem. It features a central shield with a face, a book, and a scale. The shield is surrounded by a wreath. The text "UNIVERSIDAD DE SONORA" is written around the top and sides of the circle. The year "1944" is at the bottom. The motto "TODO LO ILUMINAN" is written across the shield.

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Dalia Guadalupe Cruz Moreno

# 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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Campus Cajeme en el marco del proyecto general FEC-09-2015 “Equipamiento de Laboratorios de Investigación”.

## VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Dalia Guadalupe Cruz Moreno hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado Determinación de Condiciones Experimentales para la Generación de Cristales de Tripsina de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente:

---

**Dra. Idania Emedith Quintero Reyes**  
**Presidente**

---

**Dr. Joel Arias Martínez**  
**Secretario**

---

**Dr. Aldo Arvizu Flores**  
**Vocal**

---

**Dra. Luz Angelica Ávila Villa**  
**Suplente**

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todos sus esfuerzos para que concluyera mi carrera, por el tiempo y el amor que han invertido en hacer de mí el ser humano que soy ahora, soy muy afortunada de tenerlos.

A mis hermanos Manuel y Azalea, son los mejores compañeros de vida que me pudieron tocar y doy gracias cada día por eso.

A la Universidad de Sonora y sus docentes por darme la oportunidad de cultivarme como profesional.

A mi comité de tesis: el Doctor Joel Arias, el Doctor Aldo Arvizu y la Doctora Angélica Ávila por su disponibilidad y consejos.

A mi directora de tesis la Dra. Idania Quintero por toda su paciencia, el tiempo invertido en mí, su apoyo, las oportunidades brindadas y sobre todo la confianza que siempre mostró en mí, no tengo manera de pagarle todas sus atenciones.

A mis amigos y compañeros de QBC por los momentos compartidos, sobre todo a Marco, Paulina y Daniel, sin su ayuda y buen humor todo habría sido más difícil. Son personas muy valiosas y espero conservar su amistad por mucho tiempo.

A mis amigas Dinorah, Gabriela y Ana Gabi que me han acompañado tantos años brindándome su amistad de manera totalmente desinteresada y por siempre estar para mí en los momentos más difíciles.

## **DEDICATORIA**

A mi familia que me hacen fuerte sin importar los problemas que se han cruzado en el camino.

## CONTENIDO

VOTOS APROBATORIOS.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	5
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	13
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos.....	13
ANTECEDENTES.....	14
Actividad Pesquera en México.....	14
Sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ).....	15
Enzimas.....	16
Enzimas Proteasas.....	16
Aplicaciones de Proteasas.....	16
Clasificación de Enzimas Proteasas.....	17
Serina Proteasas.....	18
Tripsina.....	19
Activación del Zimógeno.....	20
Mecanismo de Acción.....	21
Características Estructurales.....	22
Características Cinéticas.....	23
Características termodinámicas.....	24
Enzimas Adaptadas al Frío.....	25
Purificación de Proteínas.....	29
Cromatografía de Intercambio iónico.....	29
Cromatografía de Exclusión Molecular.....	32
Cristalografía.....	33
Celda Unitaria.....	34
Cristales de Origen Proteico.....	34

Métodos de Cristalización .....	37
Método de Mezcla Directa “Batch” .....	38
Difusión en Vapor .....	40
Difusión en fase líquida.....	42
Difracción de Rayos X.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS .....	46
Obtención de la Muestra .....	46
Preparación de la Muestra .....	46
Purificación de Tripsina I por Cromatografía.....	46
Ensayo de Actividad Amidasa/Esterasa Específica .....	47
Electroforesis SDS-PAGE .....	47
Ensayos de Cristalización de Tripsina .....	48
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	53
Purificación de Tripsina I a Partir del Ciego Pilórico de Sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ) .....	53
Tamizaje con WIZARD I y II .....	54
Tinción Diferencial IZIT.....	58
CONCLUSIONES .....	61
RECOMENDACIONES .....	62
REFERENCIAS .....	63

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros termodinámicos de activación de tripsina de sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ) y bovina ( <i>Bos taurus</i> ).....	25
Tabla 2. Condiciones del kit WIZARD I de Jena Bioscience.....	50
Tabla 3. Condiciones del kit WIZARD II de Jena Bioscience.....	51
Tabla 4. Resumen de condiciones experimentales con precipitados cristalinos.....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ).....	15
Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de reacción de tripsina.....	22
Figura 3. Modelo teórico de tripsina de sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ).....	23
Figura 5. Estructura de tripsina de psicrófila de salmón ( <i>Oncorhynchus keta</i> ) .	27
Figura 6. Estructura de tripsina mesófila de <i>Streptomyces erythraeus</i> .....	28
Figura 7. Esquema representativo de cromatografía de intercambio iónico. ....	30
Figura 8. Esquema representativo de cromatografía de afinidad. ....	31
Figura 9. Esquema representativo de cromatografía de exclusión por tamaño. ....	33
Figura 10. Diagrama de fases o regiones de saturación de macromoléculas.....	36
Figura 11. Representación esquemática de difusión de vapor por gota colgante.....	41
Figura 12. Representación esquemática de difusión de vapor por gota posada.....	42
Figura 13. Representación esquemática de gota en sándwich.....	42
Figura 14. Representación del método de difusión de fase líquida/diálisis. ....	43
Figura 15. Representación esquemática de los componentes de un difractor de rayos X. 45	
Figura 16. Perfil electroforético de tripsina I en gel de poliacrilamida al 15%, teñido con azul de Comassie.....	54
Figura 17. Cristal observado por el método de microbatch, bajo la siguiente condición: solución amortiguadora MES 100 mM, pH 6.0, PEG 8,000 al 10% p/v y acetato de zinc 200 mM. Ubicado en el pocillo A7. ....	55
Figura 18. Cristal observado por el método de microbatch en solución amortiguadora MES 100 mM pH 6.5 con Citrato de sodio 1 M; ubicado en el pocillo B2.....	55
Figura 19. Cristal observado por el método de microbatch el cual se encuentra en solución amortiguadora Imidazol 100 mM pH 8 con PEG 3,000 al 10% p/v y sulfato de litio 200 mM; el cual se encuentra ubicado en el pocillo B3.....	56
Figura 20. Cristal observado por el método de microbatch con solución amortiguadora de fosfato 100 mM pH 6.2 con Cloruro de sodio 2.5 M; ubicado en el pocillo B4.....	56
Figura 21. Cristal observado por el método de difusión de vapor (gota colgante) con la condición PEG 8, 000 al 20% p/v con amortiguador HEPES 100 mM, pH 7.5; ubicado en el pocillo B9 ...	57
Figura 22. Comparación de cristales teñidos con la tinción diferencial IZIT.....	59

## RESUMEN

La tripsina es la serina proteasa más estudiada debido a sus múltiples aplicaciones biotecnológicas, en el caso de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), muestra características cinéticas y termodinámicas que la definen como una enzima adaptada al frío, estas características están íntimamente relacionadas con su estructura. Actualmente se conoce la estructura terciaria de tripsina I *in silico*, generada a partir de la estructura cristalográfica de salmón PDB (1HJ8), el cual presenta una identidad del 88% en su secuencia de aminoácidos con tripsina de sardina la cual brinda una idea general de la posible distribución de la proteína, pero este modelo no muestra la posición exacta de los aminoácidos en el espacio, las zonas de la proteína con mayor flexibilidad o la distancia entre los residuos en el sitio activo responsables de la catálisis. Sin embargo, conocer estas características es clave en la comprensión del proceso de adaptación al frío; de ahí surge la necesidad de obtener la estructura cristalográfica. Por lo que este trabajo tiene como objetivo determinar las condiciones necesarias para la obtención de cristales de tripsina I a partir del ciego pilórico de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), con el fin de establecer el primer paso en la caracterización de su estructura por difracción de rayos X. Para alcanzar este objetivo se purificó tripsina I a partir del ciego pilórico de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), haciendo uso de los métodos de cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico; la presencia de la proteína con un 90% de pureza se evidenció en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 15 %, donde se observó la banda de 25 kDa característica que corresponde a tripsina I. Durante el establecimiento de las condiciones de cristalización se utilizaron los Kits comerciales de Jena Bioscience WIZARD I y II, ambos con un total de 96 condiciones de cristalización que contienen condiciones de pH, fuerza iónica, aditivos y soluciones amortiguadoras las cuales fueron evaluadas por dos técnicas de cristalización distintas microbatch y difusión de vapor por gota colgante. Por la técnica de microbatch fue posible observar el crecimiento de sólidos cristalinos en cuatro de las condiciones y uno 1 por difusión de vapor. La composición de los cristales se identificó por medio de la tinción diferencial IZIT la cual demostró el origen salino de los cristales.

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos, ya que tienen la capacidad de acelerar reacciones químicas. Las proteasas son una familia de enzimas biológicamente importantes estructural y funcionalmente conservadas, que se caracterizan por romper el enlace peptídico entre aminoácidos específicos. Siendo la tripsina, la proteína alcalina más estudiadas. En animales marinos, las proteasas son producidas de manera abundante por órganos del sistema digestivo (ciego pilórico, intestino y tejido pancreático), y al igual que en otros organismos cumplen funciones múltiples al catalizar la degradación hidrolítica de proteínas. Las proteasas de animales marinos pueden ser clasificadas con base a su sensibilidad de pH. Entre las proteasas alcalinas se encuentra la tripsina, la cual es la enzima más estudiada (Haard y Simpson, 2000; Castillo y col., 2005). El análisis de características bioquímicas de tripsinas aisladas de sardinas (*Sardinops melanostica* y *Sardinops sagax caerulea*) presentan características bioquímicas similares a proteasas de peces adaptados al frío que presentan baja termo estabilidad, sensibilidad pH ácido, aumento en la eficiencia catalítica ( $K_{cat}/K_M$ ) a bajas temperaturas, disminución en la energía de activación durante la catálisis y mayor autólisis comparada con sus análogas mesófilas, y es por esto que surgió el interés de conocer su estructura; actualmente solo existe el modelo *in silico* de la estructura dan una idea de su disposición espacial y su flexibilidad, pero no genera información concluyente acerca de su adaptación a bajas temperaturas, para ello es necesario en un primer paso generar cristales de la proteína los cuales permitirán generar la estructura cristalográfica la cual brindará información acerca de los residuos en el sitio activo que participan en los mecanismos de reacción, el tamaño de la abertura en el sitio catalítico y la cantidad de interacciones moleculares en su superficie, que favorecen la adaptación de la enzima a bajas temperaturas (Kishimura y col., 2006; Arvizu y col., 2012; Baird, 2013). La determinación de la estructura cristalográfica de una enzima en particular es totalmente dependiente de la generación de cristales bajo condiciones lo más parecidas a su medio natural posibles. Al existir una gran cantidad de variables bioquímicas, físicas y químicas que pueden afectar el proceso, la herramienta más popular para cristalizar proteínas son los ensayos por screening o tamizaje, los cuales aumentan la probabilidad de identificar la condición en la que una proteína forma una red cristalina, combinando distintos precipitantes, aditivos, soluciones amortiguadoras y concentración de proteína, siendo esta última la variable más importante ya que deben tomarse en cuenta sus características intrínsecas y a la pureza de la enzima, el cual debe ser elevado. La cromatografía de exclusión por tamaño, intercambio iónico y afinidad es una herramienta excelente para lograr el nivel de pureza necesario.

## HIPÓTESIS

La utilización de distintas condiciones químicas como el pH, la concentración de proteína, fuerza iónica y temperatura permitirán la determinación de condiciones experimentales para la generación de cristales de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar las condiciones experimentales necesarias para generar cristales de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) en las que se incluyen pH, concentración de proteína, fuerza iónica y temperatura.

### Objetivos Específicos

- Extraer y purificar tripsina I a partir del ciego pilórico de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) utilizando cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico.
- Determinar condiciones de pH, concentración de proteína, fuerza iónica y temperatura para lograr la generación de cristales de tripsina proveniente de ciegos pilóricos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) utilizando el kit de Jena Bioscience WIZARD I y II.

## **ANTECEDENTES**

### **Actividad Pesquera en México**

La pesca es una actividad económica sumamente importante para la república mexicana. En el periodo de 2012 a 2013 México ha ocupado la posición número 16 en producción pesquera a nivel mundial, donde la captura de pelágicos menores como sardinas, anchovetas y macarela, representan la proporción más alta con un 37% de la producción total, siendo las especies de sardina las de importancia principal en volumen, y quinto en posición en cuanto a valor económico. La zona en la que se desarrolla en mayor proporción la captura de sardina en el territorio nacional se encuentra en el litoral noroccidental del Pacífico y dentro del Golfo de California. Hasta el año 2013 el estado de Sonora ocupó el primer lugar nacional en volumen pesquero, aportando un total de 60.64% a la producción de sardina de la República Mexicana, seguidos por los estados de Sinaloa con 18.87% y Baja California Sur con 12.58% (FAO, 2014; SAGARPA, 2013).

Los altos volúmenes de sardina capturados en el estado de Sonora suelen encontrar su destino comercial como harina de pescado para el consumo humano indirecto y enlatado, para el consumo directo (Doode, 1999; Vázquez y col., 2014).

Durante el proceso de enlatado de sardina 40% del cuerpo es removido, específicamente, la cabeza, la cola, y el conjunto de vísceras, este material derivado es descartado directamente en el océano sin ningún tipo de tratamiento, provocando contaminación ambiental y problemas ecológicos. Por lo que la recuperación y uso de estos subproductos tan valiosos en el desarrollo de herramientas bioquímicas, podría ser una solución atractiva para la industria pesquera (Castro y col. 2012; Salazar y col. 2013)

Las vísceras representan alrededor de un total del 5% en masa, es uno de los productos derivados más importantes de la actividad pesquera ya que se ha reconocido que estas poseen un alto potencial como fuente de proteasas digestivas, en especial proteasas con elevada actividad bajo diversas condiciones de pH y temperatura, además de alta actividad catalítica en bajas concentraciones, características que presentan una demanda creciente sobre todo en la industria alimentaria (Castillo y col, 2005; Nasri y col., 2011)

### **Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*)**

La sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es un pez pequeño (Figura 1), incluido en el grupo de los pelágicos menores, peces que logran alcanzar longitudes entre 10 cm y 40 cm; tienen una vida máxima de 14 años, sin embargo, rara vez sobrepasan los 30 cm y los 5 años de edad, debido al continuo acoso de depredadores y a la actividad pesquera (SAGARPA, 2013)

Este pez forma parte de la familia de los Clupeidae al igual que el arenque y el menhaden. Suelen habitar en zonas costeras de alta productividad biológica y se alimentan de fitoplancton y de zooplancton. La sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) habita desde Alaska hasta el Golfo de California y en años fríos se extiende hasta Mazatlán, Sinaloa; sus poblaciones experimentan fluctuaciones naturales durante períodos de aproximadamente 60 años (SAGARPA, 2013). En general la sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) presenta un cuerpo semi cilíndrico, no muy comprimido, con coloración verde azulada en la zona del dorso y flancos plateados, tienen una serie de manchas oscuras a lo largo de la línea medio lateral del cuerpo segunda o incluso tercera, serie de manchas más cortas. Una característica que le ha brindado especial atención a la sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es que se señala como un organismo adaptado al frío, ya que su hábitat se encuentra entre los 7°C a 22°C (Castillo y col., 2009; Whitehead, 1995).



Figura 1. Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

La sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es un pez susceptible a la autodegradación abdominal después de su captura. Su rápido deterioro es una característica que se ha adjudicado a la presencia de enzimas proteolíticas en su tracto digestivo, lo que sugiere que estos tejidos contienen una vasta cantidad de estas enzimas. Muchísimos estudios de enzimas digestivas en una gran variedad de especies de peces han revelado que las proteínas

responsables de este fenómeno son las serina proteasas, enzimas distribuidas en sus intestinos (Castillo y col., 2005).

## **Enzimas**

Las enzimas son catalizadores biológicos que tienen la capacidad de acelerar reacciones químicas al disminuir la cantidad de energía que éstas requieren para llevarse a cabo, sin que las enzimas se vean alteradas en el proceso. La principal ventaja de las enzimas frente a los catalizadores inorgánicos es que actúan en condiciones suaves de pH y temperatura, con una gran eficiencia y especificidad; estas características se consiguen gracias a que las enzimas poseen una estructura tridimensional característica en el centro activo, con un entorno químico adecuado que permite la interacción entre la enzima y su sustrato, formando el complejo enzima-sustrato (Mathews y col., 2002).

## **Enzimas Proteasas**

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de proteínas, produciendo pequeños péptidos y aminoácidos, estas enzimas están distribuidas en todas las variedades de formas de vida y en diversas condiciones ambientales (Sanatan y col., 2013; Canosa, 2014).

Las enzimas proteasas de peces e invertebrados acuáticos más importantes son: la proteasa aspártica, pepsina que es secretada por la mucosa gástrica y las serina proteasas tripsina y quimiotripsina, que son secretadas por el ciego pilórico y el intestino (Nasri y col., 2011).

Aunque las proteasas de peces son similares a sus homólogos de mamíferos, algunas diferencias y propiedades catalíticas han sido reportadas, las proteasas de peces han mostrado mejor actividad catalítica en una amplia gama de condiciones de pH y temperatura, en concentraciones relativamente bajas ( Villalba y col., 2011).

## **Aplicaciones de Proteasas**

En la actualidad, las proteasas constituyen el grupo más importante de enzimas usadas en la industria, aportando aproximadamente el 60% del total de enzimas presentes en el mercado mundial, sus aplicaciones son diversas en procesos de manufactura de detergentes, fármacos, ablandamiento pieles, síntesis de péptidos bioactivos de proteínas y en la recuperación de plata utilizada en films de rayos X o el tratamientos de aguas residuales; específicamente las enzimas

proteolíticas obtenidas de peces han encontrado su mayor demanda en la industria alimentaria donde participan en el proceso de manufactura de quesos, texturización de cereales, entre otros (Arvizu y col., 2012; Horcasitas y Plaza, 2002; Mathews y col., 2002; Koolman y Röhm, 2005; Mansilla, 2012; Nasri y col., 2011; Salazar, 2013).

### **Clasificación de Enzimas Proteasas**

La comisión de enzimas de la IUBMB ha dado a cada enzima un número con cuatro partes. Los tres primeros números definen la clase principal, la subclase y la sub-subclase, respectivamente. El último es un número de serie dentro de la sub-subclase que indica el orden de inclusión en la lista (Mathews y col. 2002).

El método estándar de clasificación propuesta por la comisión de enzimas (EC), está basado en el tipo de catálisis que estas proteínas realizan. Las enzimas en las diferentes clases se distinguen según varios criterios como son: la naturaleza de los grupos en su sitio catalítico, su sustrato específico, su respuesta a inhibidores, o su estabilidad a diferentes condiciones de pH (Haard y Simpson, 2000).

Todas las serino proteasas están definidas por los siguientes tres dígitos EC 3.4.2X. el dígito en la primera posición es el número de grupo asignado con base al tipo de reacción química que cataliza, por lo que el 3 representa a hidrolasas; el segundo dígito es dado a las enzimas hidrolasas basándose en el tipo de enlace que rompen, ya que hidrolizan enlaces peptídicos, se le asigna el número 4. El tercer dígito es el que subdivide la enzima en un grupo particular de subclase que define estrechamente el tipo de enlace que hidroliza o identifica la naturaleza química de los grupos esenciales en el sitio catalítico de la enzima. El cuarto número indica el orden en el que cada enzima se ha añadido a la lista, la cual se encuentra en continuo crecimiento (Haard y Simpson, 2000; Mathews y col., 2002).

A las serinas proteasas se les asigna el número EC 3.4.21.; estas enzimas se caracterizan por ser endoproteasas y poseer residuos de serina, histidina y aspartato en su sitio activo. Como grupo, las serina proteasas son inhibidas por di-isopropil-fosfo-fluorhidrato (DFP), son activas de pH alcalino a neutro, e inactivas o inestables en pH ácido. Las tres serina proteasas más importantes que se han purificado y caracterizado a partir de las glándulas digestivas de animales marinos son tripsina, quimotripsina y elastasa, las cuales son proteasas alcalinas (Haard y Simpson, 2000).

La tripsina tiene asignado el código EC 3.4.21.4., esta enzima tiene una estrecha especificidad por enlaces peptídicos en el sitio carboxílico de arginina y lisina. La quimotripsina

tiene asignado el código EC 3.4.21.1. La cual escinde enlaces peptídicos envolviendo aminoácidos con cadenas voluminosas y ácidos no polares como tirosina, fenilalanina, triptófano y leucina. La elastasa es asignada como EC 3.4.21.11. Esta enzima exhibe preferencial especificidad por alanina, valina y glicina (Castillo y col., 2005; Haard y Simpson, 2000).

Las serina proteasas digestivas son generadas en tejido pancreático, ciego pilórico e intestinos de animales; las enzimas de animales marinos pueden ser clasificados por el mismo criterio que las proteasas de otros organismos, con base a su similitud o sus características como: i) tipo-tripsina, ii) tipo-quimotripsina, iii) tipo-quimosina o iv) tipo-catapsinas, estas pueden ser clasificadas en base de su sensibilidad al pH como proteasas ácidas, neutras y alcalinas (Klomklao, 2008). Las enzimas alcalinas son comúnmente encontradas en vísceras de peces como tripsina, quimiotripsina y elastasa (Castillo y col., 2005).

### **Serina Proteasas**

Las serina proteasas comprenden un grupo de enzimas digestivas altamente especializadas que provienen de todos los reinos filogenéticos, es un grupo abundante, biológicamente importante, de estructura conservada. Todas las enzimas miembros de este grupo participan en múltiples procesos fisiológicos cuidadosamente controlados, tales como la coagulación de la sangre, la fibrinólisis, la activación del complemento, la fertilización y la activación de hormonas (Brackney y col., 2010; Devlin, 2004; Voet y Voet, 2006).

La principal característica que poseen en común las serina proteasas son los residuos de serina, aspartato e histidina agrupados alrededor de la depresión del sitio activo los cuales desempeñan un papel crucial en el proceso catalítico; la mayoría de estas enzimas poseen estructuras tridimensionales semejantes y una relación evolutiva evidente. La diferencia entre cada una de las serina proteasas radica en el bolsillo que siempre se encuentra situado cerca de la serina del sitio activo. Como característica general estas enzimas catalizan la hidrólisis del enlace peptídico de las cadenas laterales, tienen la habilidad de hidrolizar una amplia gama de ésteres, hecho que a nivel fisiológico tiene poca importancia, pero que puede ser aprovechada en estudios cinéticos. En su mayoría las serina proteasas son enzimas sintetizadas como zimógenos en el páncreas y secretadas en el duodeno (Voet y Voet, 2006).

Desde hace más de dos décadas las enzimas proteasas derivadas de peces más comúnmente estudiadas son pepsina, tripsina, quimotripsina, gastricina y elastasa (De Vecchi y Coppes, 1996).

## Tripsina

Tripsina es el miembro más importante de las serina proteasas alcalinas. Es una enzima que posee un peso molecular típico de entre 22 a 28 kDa; es altamente discriminante, ya que hidroliza específicamente un péptido después de arginina o lisina, en el lado carboxilo y tienen actividad endopeptidasa. Se trata de una de las enzimas digestivas más importante debido a su extenso estudio. Es bien conocido que la tripsina es una proteína que como principal función interviene en el proceso de digestión, mediante la degradación de polipéptidos largos en pequeños fragmentos, aunque también cumple funciones de regulación importantes como la activación del receptor de la insulina por medio de proteólisis, en la coagulación y participa en el proceso de inflamación (Baird, 2013).

Desde su descubrimiento se ha identificado en insectos, bacterias, peces y mamíferos; en vertebrados es producida en las células acinares del páncreas y posteriormente es liberada por medio del ducto pancreático en el tracto gastrointestinal (Baird, 2013; Vandermarliere y col., 2013).

La tripsina ha sido aislada del ciego pilórico, tejido pancreático e intestino de animales marinos como: anchoas (*Engraulis encrasicolus*), bacalao del atlántico (*Gadus morhua*), capelán (*Mallotus villosus*), mullet (*Mugil cephalus*), sardina (*Sardinops sagax*), pez gato (*Parasilurus asotus*), entre otros; al comparar las características de tripsinas de distintos organismos, se observan diferencias con aquellas obtenidas de organismos terrestres, por ejemplo, las purificadas de animales marinos tienden a ser más estables a pH alcalino, pero inestables a pH ácido, a diferencia de la tripsina de mamíferos que son más estables a pH ácido, otra diferencia significativa entre tripsina de especies marinas y terrestres puede ser su secuencia de aminoácidos, según algunos análisis la tripsina de sardina tiene mayor número de residuos hidrofóbicos comparado con tripsina bovina, lo que puede promover una disminución en los enlaces de hidrógenos. Por ejemplo, una característica importante observada en la secuencia de aminoácidos y el modelo molecular de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es la sustitución de dos aminoácidos polares Asn y Tyr, que se encuentran conservados en tripsinas mesófilas, por dos aminoácidos hidrofóbicos Leu y Phe. Tanto Asn como Tyr son residuos que estabilizan la red de puentes de hidrógeno que conecta los  $\alpha$ -hélices carbono terminal a los dos dominios en las tripsinas mesófilas (Castillo y col., 2005; Haard y Simpson, 2000; Koolman y Röhm, 2005).

## Activación del Zimógeno

Las enzimas proteasas con regularidad no se sintetizan en su forma activa, ya que una batería de proteasas libres en el tejido secretor es capaz de causar una digestión del mismo. En su lugar se producen en forma de moléculas ligeramente más grandes y catalíticamente inactivas, denominadas zimógenos. Los zimógenos deben romperse proteolíticamente en el intestino para producir a las enzimas activas. En todos los sistemas naturales, la tripsina se expresa en forma inactiva, conocida como tripsinógeno. En los mamíferos, el tripsinógeno se expresa en el páncreas y luego se secreta en el duodeno, donde es activado por una segunda serina proteasa llamada enteropeptidasa. La enteropeptidasa reconoce el péptido de activación para producir a tripsina como enzima activa (Baird, 2013).

En el primer paso de la activación de la tripsina en el duodeno, se elimina un hexapeptido del extremo amino terminal del tripsinógeno por la enteropeptidasa, una proteasa secretada por las células duodenales. Este paso produce la tripsina activa y correctamente plegada, la cual activará otras moléculas de tripsinógeno para formar más tripsina activa, ya que se trata de una proteína auto catalítica. Los zimógenos inactivos pueden representar un peligro para el tejido secretor, la presencia de una sola molécula activa de tripsina podría poner en marcha toda la cadena de manera prematura, en consecuencia, el tejido secretor se protege a si mismo mediante la síntesis de una proteína denominada inhibidor de la tripsina secretora, la cual se une de manera muy intensa al sitio activo, inactivándola de manera eficaz, incluso a una concentración muy baja. Este inhibidor se encuentra presente a una concentración muy baja, inferior a la necesaria para inhibir toda la tripsina producida, así que solo inhibe una fracción de la enzima generada en el duodeno y el resto puede activarse de manera independiente (Mathews y col., 2002).

Una comparación de las estructuras cristalinas de alta resolución de tripsinógeno y tripsina reveló que después de la eliminación del segmento amino terminal específico, un aspartato enterrado (Asp194) gira alrededor del esqueleto polipeptídico y forma un puente salino con la nueva amina N-terminal de Ile16. Esta interacción estabiliza el agujero de oxianión, un sitio en el polipéptido formado por los extremos amino terminales de grupos de glicina y serina que juegan un papel importante al estabilizar la carga negativa generada por la formación del intermediario tetraédrico en el proceso de catálisis. Una vez estabilizada esta región, la tripsina se activa de forma irreversible (Isaksen y col., 2014; Mathews y col., 2002).

## Mecanismo de Acción

La tripsina cataliza la hidrólisis de un enlace peptídico mediante un mecanismo de reacción en dos etapas, conocido como mecanismo de carga y transferencia (Figura 2).

En el paso inicial la serina que tiene carácter nucleofílico, puede atacar el enlace escindible específico del sustrato donando un protón a la histidina, el nitrógeno correspondiente aumenta la electronegatividad debido a la formación de un puente de hidrógeno con el aspartato del sitio catalítico; este ataque da lugar a la formación de un intermediario covalente de acil-enzima y a la liberación del fragmento amino terminal del enlace peptídico escindido. En el segundo paso, una molécula de agua es activada por la histidina y ataca el intermedio acil-enzima; este ataque es seguido por la liberación del fragmento carbono terminal del enlace peptídico. Esta última liberación se consigue cuando el protón regresa desde la histidina a la serina del sitio catalítico para restablecer la enzima durante otro ciclo (Vandermarliere y col., 2013).

La tríada catalítica en este mecanismo consiste en Ser 195, His 57 y Asp 102 (este esquema de numeración convencional sigue la numeración de los residuos de la quimotripsina), donde la función de la serina es iniciar la reacción usando su carácter nucleofílico, mientras que, la histidina tiene una función dual. La etapa de acilación es el primer paso, para ello la histidina actúa primero como base para aceptar un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de la serina, que promueve la formación del intermedio tetraédrico, después la histidina actúa como ácido donando un protón al grupo amino, el cual sale al colapsar el intermediario tetraédrico. Durante el segundo paso se lleva a cabo la etapa de desacilación, la histidina actúa como una base para activar la molécula de agua, y luego actúa como un ácido y dona un protón al oxígeno que saldrá desde el grupo hidroxilo de serina. El aspartato cumple la función de orientar a la histidina de tal manera que pueda formarse un enlace de hidrógeno entre ambos, esto con el fin de que la orientación facilite la abstracción de un protón de la serina y se genere un potente nucleófilo (Vandermarliere y col., 2013).

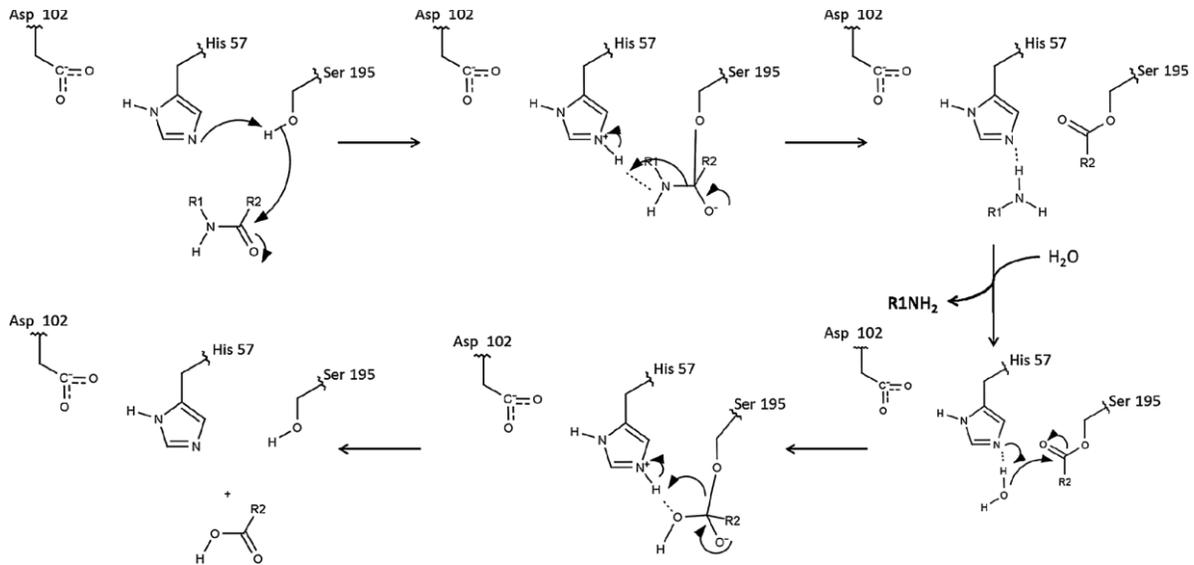


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de reacción de tripsina.

### Características Estructurales

La tripsina es una enzima cuyos componentes son dos barriles beta, que guardan entre ellos los residuos del sitio catalítico, His 67 y Asp 102, los cuales comienzan desde el barril C-terminal. La estructura es estabilizada gracias a seis puentes disulfuro completamente conservados que permiten que la enzima soporte el entorno reductor extracelular del tracto gastrointestinal (Vandermarliere y col., 2013).

El análisis detallado de estructuras cristalinas de alta resolución de diversas fuentes de tripsina ha proporcionado la comprensión inicial de cómo su estructura tridimensional se relaciona con su función, estas estructuras se han resuelto en una amplia gama de condiciones en presencia y ausencia de inhibidores, moléculas pequeñas y macromoléculas. Los análisis de estas estructuras han identificado aminoácidos clave que son importantes para la activación, catálisis y reconocimiento de sustrato (Baird, 2013).

En el caso de la estructura de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), solo se encuentra disponible su modelo teórico (Figura 3), el cual ha sido generado tomando las coordenadas de la estructura cristalográfica de tripsina de salmón depositado en el banco de proteínas PDB (1HJ8) por comparación de su secuencia de aminoácidos con lo correspondiente a sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), las cuales coinciden en un 88%. El modelo simulado muestra que la tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) se compone

de dos barriles beta, conectados por regiones bucle y una región alfa hélice. El sitio activo está localizado en la cavidad formado por el dominio intermedio y presenta una triada altamente conservada. Con anterioridad se han realizado estudios comparativos entre el modelo teórico de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) y el modelo de tripsina bovina, los cuales muestran que el sitio activo y el núcleo proteico podrían ser casi idénticos (Arvizu y col., 2012).

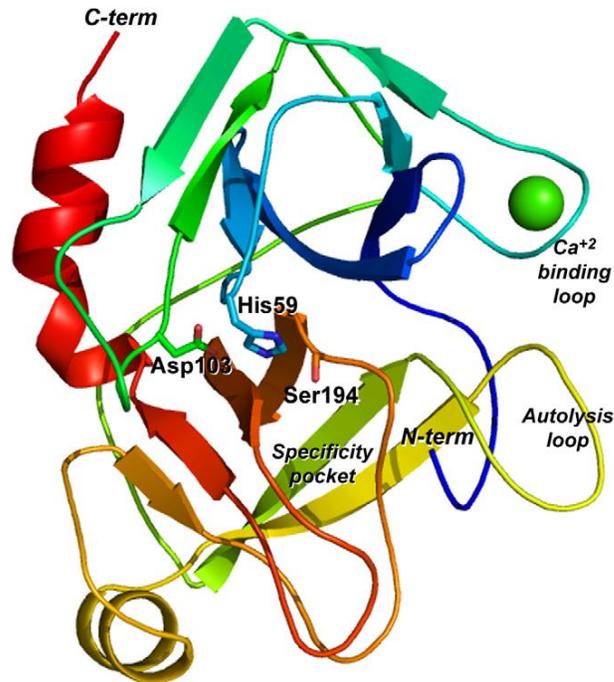


Figura 3. Modelo teórico de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

### Características Cinéticas

La determinación de las características bioquímicas es de gran importancia. Arvizu y col. (2012) han realizado el análisis cinético y termodinámico de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) a distintas temperaturas (4°-20°C), donde comparan los parámetros cinéticos contra tripsina bovina (*Bos taurus*), y observaron que el valor de  $K_{cat}$  o número de recambio para tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), es mayor a todas las temperaturas estudiadas, por lo tanto, es una enzima que puede convertir su sustrato en productos con mayor rapidez que la tripsina de bovino una vez que se encuentra saturada.

En el caso del valor de la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es más alta comparada con su homóloga mesófila de bovino, a pesar que es una enzima adaptada al frío, las cuales suelen tener valores menores de  $K_M$  ante sus contrapartes termoestables, aunque hay ocasiones que esto ocurre de manera opuesta. En cuanto a su eficiencia catalítica, la tripsina de sardina (*Sardinops sagax caerulea*) muestra valores de ( $K_{cat}/K_M$ ), mucho mayores a los de bovino (*Bos taurus*), indicando una alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas, comportamiento común en las enzimas adaptadas al frío (Arvizu y col., 2012).

### **Características termodinámicas del proceso de activación**

En la literatura científica los parámetros termodinámicos del proceso de activación son usualmente comparados entre los organismos adaptados al frío con sus análogos mesófilos. Si se considera a tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) como psicrófila y a bovina como mesófila, pueden compararse por sustracción (p-m); esta comparación define que la tripsina de sardina es más eficiente que tripsina bovina a 5°C y 15°C, ya que sus valores de activación de Gibbs  $\Delta(\Delta G^*)^{p-m}$ , que indican variación en la constante  $K_{cat}$  entre ambas enzimas, son negativos. En cuanto a los parámetros entálpicos de  $\Delta(\Delta H^*)^{p-m}$  mostraron valores negativos, lo que indica que la energía de activación de tripsina es más pequeña comparada con la bovina, lo cual concuerda con la adaptación molecular al frío. Los valores entrópicos  $T\Delta(\Delta S^*)^{p-m}$  sugieren que la tripsina de sardina (*Sardinops sagax caerulea*) posee una estructura más flexible y un sitio activo psicrófilo menos estable, tal como se muestra en la Tabla 1 (Arvizu y col., 2012).

	$\Delta G^*$ (KJ/mol)	$\Delta H^*$ (KJ/mol)	$T\Delta S^*$ (KJ/mol)	$\Delta(\Delta G)^{p-m}$ (KJ/mol)	$\Delta(\Delta H)^{p-m}$ (KJ/mol)
(15°C)					
Sardina Tri I	68.96	30.56	-38.40	-3.67	-7.22
Tripsina	72.63	37.78	-34.85		
Bovina					
(15°C)					
Tripsina del	70.50	40.60	29.90	-0.90	42
bacalao del					
atlantico					
Tripsina	71.40	82.60	11.30		
Bovina					

Tabla 1. Parámetros termodinámicos del proceso de activación de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) y bovina (*Bos taurus*).

### Enzimas Adaptadas al Frío

La temperatura es uno de los aspectos ambientales más importantes para la vida, ya que influye en las reacciones químicas. La proporción más grande de la biosfera terrestre está colonizada por organismos que pueden vivir en medio ambientes fríos, la habilidad de estos seres vivos de proliferar en ambientes de temperaturas hostiles es atribuida a su capacidad para sintetizar enzimas adaptadas al frío (Collins y col., 2008; Isaksen y col., 2014; Siddiqui y Cavicchioli, 2006).

Hasta la fecha no se conoce a detalle el mecanismo estructural detrás de las propiedades universales de las enzimas adaptadas al frío, estas enzimas involucran una variedad de estructuras que le confieren un alto nivel de flexibilidad comparada con sus homólogas termoestables. La alta flexibilidad, particularmente alrededor del sitio catalítico es traducida en una menor entalpia de activación, menor afinidad por el sustrato, y alta actividad específica a bajas temperaturas. La alta flexibilidad también está acompañada de una compensación en su estabilidad, resultando en labilidad ante el calor y en algunos casos estudiados, labilidad ante el frío (Isaksen y col., 2014; Siddiqui y Cavicchioli, 2006).

En orden de superar el efecto perjudicial de las bajas temperaturas, los organismos psicrófilos han desarrollado varias estrategias adaptativas que son observables desde el nivel

molecular hasta organismos complejos; por ejemplo, la adaptación al frío ha mostrado regular la fluidez de las membranas, promover la síntesis de moléculas especializadas conocidas como proteínas de choque frío, crioprotectores y moléculas anticongelantes, la regulación de la permeabilidad de los canales iónicos, y dado que una consecuencia de la exposición a bajas temperaturas es la modificación de la cinética enzimática ya que disminuye la velocidad de la reacción química (Georlette y col., 2004).

Las proteasas digestivas de animales marinos, particularmente las adaptadas al régimen ártico o sub-ártico, poseen habilidades distintas a proteasas homólogas de animales homeotermos, algunas de estas propiedades son: energía de activación de Arrhenius baja, energía libre de activación ( $\Delta G^*$ ) relativamente baja, una constante de Michaelis-Menten aparentemente alta de las enzimas adaptadas al frío con respecto a las de aguas tropicales, estabilidad al frío, una baja temperatura óptima, baja termo estabilidad y un alto pH óptimo.

La relación entre la estructura y la función de la de las enzimas de animales marinos adaptados al frío, a juzgar por sus valores de  $\Delta S^*$ , sugieren que las proteasas de este tipo han desarrollado una estructura más flexible y menos estable que sus contrapartes terrestres, esto promueve la disminución en su energía de activación de barrera durante la catálisis. La mayor flexibilidad de las estructuras está asociada con una alta actividad catalítica y baja termo estabilidad (Haard y Simpson, 2000).

Las principales aplicaciones biotecnológicas de estas enzimas adaptadas al frío recaen en la industria alimentaria, donde las proteasas son un grupo de enzimas de gran importancia. Durante el procesamiento alimentario, muchas operaciones son hechas a bajas temperaturas para disminuir el crecimiento bacteriano o prevenir reacciones paralelas indeseables. Para estas aplicaciones las proteasas de bacterias en frío o de fuentes recombinantes han sido estudiadas, con dificultades relacionadas con la sensibilidad a la inactivación por calor, bajo pH, degradación autolítica y la formación de agregados insolubles. Hay casos donde proteínas recombinantes no son consideradas, ya que el aislamiento y purificación de proteasas de productos marinos puede ser una solución (Arvizu-Flores y col., 2012; Castillo y col., 2009; Voet y Voet, 2006)

En algunos estudios de enzimas adaptadas al frío se ha observado que conservan residuos en el sitio activo que participan en los mecanismos de reacción, los cuales también se encuentran presentes en sus homólogos adaptados a otras temperaturas, esas estructuras sugieren que hay una abertura más grande en el sitio catalítico; por ejemplo, la tripsina de Salmón (*Oncorhynchus keta*), cuya estructura se ilustra en la Figura 4, esta mayor accesibilidad ayuda a reducir la energía necesaria para que el sustrato se acomode y reaccione. También se ha observado que algunos factores estructurales que están presentes en enzimas mesófilas se

atenúan con fuerza y número en enzimas adaptadas al frío; por ejemplo: aumento del número de residuos de glicina, disminución de residuos de prolina en los bucles, reducción de residuos de arginina capaz de formar interacciones electrostáticas y puente de hidrógeno, reducción de interacciones aromáticas, hidrofóbicas en comparación a sus contrapartes mesófilas, aunque cada proteína utiliza las alteraciones estructurales con el fin de adquirir la flexibilidad necesaria para la temperatura que requiere (D'amico y col., 2002; Toyota y col., 2002).

Leiros y col, (2002) Analizaron la estructura cristalográfica de tripsina de distintas especies comparando las diferencias conformacionales, interacciones de puentes de hidrógeno, puente salino, interacciones aromáticas y densidad de empaquetamiento de los núcleos. Con base a esto se observó que los puentes de hidrógeno son un factor estabilizador importante en la estructura de proteínas. Entre las tripsinas adaptadas al frío y mesófilas hubo diferencias en regiones de la estructura. Existen regiones que son de suma importancia; por ejemplo, el sitio donde se conectan los dos dominios de tripsina, esta zona determina los movimientos entre dominios, es importante en la estabilidad y capacidad catalítica de la proteína (Hoyos, 2017; Leiros y col., 2000).

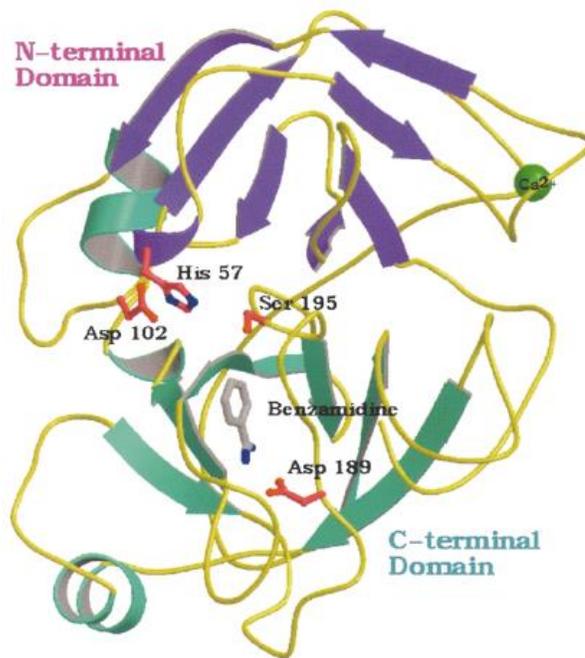


Figura 4. Estructura de tripsina de psicrófila de salmón (*Oncorhynchus keta*).

Las tripsinas mesófilas cuentan con cinco puentes de hidrógeno entre dominios, en contraste, ninguno de estos enlaces se encuentra presente en las tripsinas adaptadas al frío (Hoyos, 2017).

Aunque proteínas de ambientes similares puedan poseer características semejantes, dilucidar la estructura particular de las enzimas brinda una visión más amplia sobre su mecanismo de acción, además, permite observar características que de no establecer la estructura cristalográfica serían poco probables de determinar, tal es el caso de la tripsina mesófila de *Streptomyces erythraeus*, cuya estructura se ilustra en la Figura 5, la cual cuenta con el bucle de autólisis observado en la tripsina bovina, pero carece de un residuo de lisina o arginina y es por lo tanto insensible a la proteólisis, otra particularidad es que no contiene los residuos ácidos conservados que forman el sitio de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  (Blankenship y col., 2014).

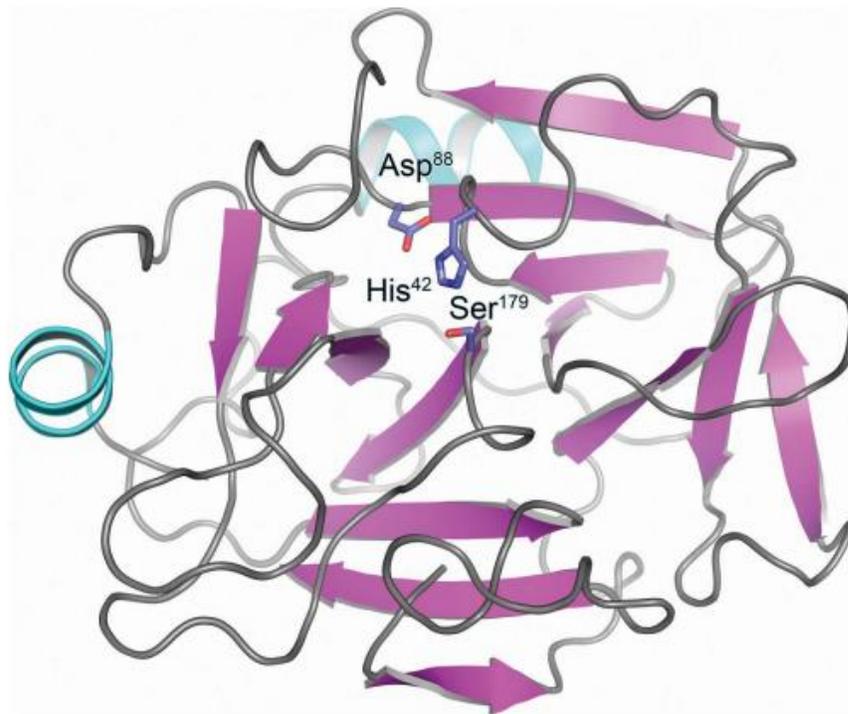


Figura 5. Estructura de tripsina mesófila de *Streptomyces erythraeus*.

## **Purificación de Proteínas**

Las proteasas digestivas se han aislado y purificado a partir de una gran cantidad de organismos marinos. Las técnicas de purificación usadas más comúnmente se basan en las distintas propiedades que las proteínas poseen, tales como diferencia de tamaño, diferencia de cargas y la capacidad de unión a ligandos específicos, tal es el caso de las técnicas de cromatografía por exclusión molecular, intercambio iónico y de afinidad (Haard y Simpson, 2000).

### **Cromatografía de Intercambio Iónico**

La cromatografía de intercambio iónico es utilizada para separar las moléculas de acuerdo con su carga eléctrica y no por su tamaño (Figura 6). Para ello se suelen utilizar resinas de intercambio iónico, que son polianiones o policationes, como los grupos dietilaminoetil (DEAE) o carboximetil (CM). En el caso de los grupos DEAE, que están cargados positivamente, pueden unir como intercambiadores de aniones a las proteínas cargadas negativamente de una mezcla que fluye a través de la columna (Müller, 2008).

Para que las proteínas aniónicas difundan a través de la columna una vez que se han unido a la resina de la fase estacionaria, se utiliza un amortiguador de elución con una concentración elevada de cloruro sódico. Los aniones cloruro compiten con las proteínas cargadas negativamente para ocupar los centros de unión iónicos. Para determinada concentración de cloruros se libera una determinada proteína cargada y se eluye de la columna (Müller, 2008).

En la cromatografía de intercambio iónico los factores exógenos desempeñan un gran papel, dado que la carga de la proteína depende del pH del amortiguador, variando la fuerza iónica, además, según el valor de pH se puede obtener separaciones considerablemente diferentes. Por ello, la cromatografía de intercambio iónico es un proceso de separación muy eficaz y constituye a menudo el primer paso de un laborioso proceso de purificación de proteínas (Mathews y col., 2002; Müller, 2008).

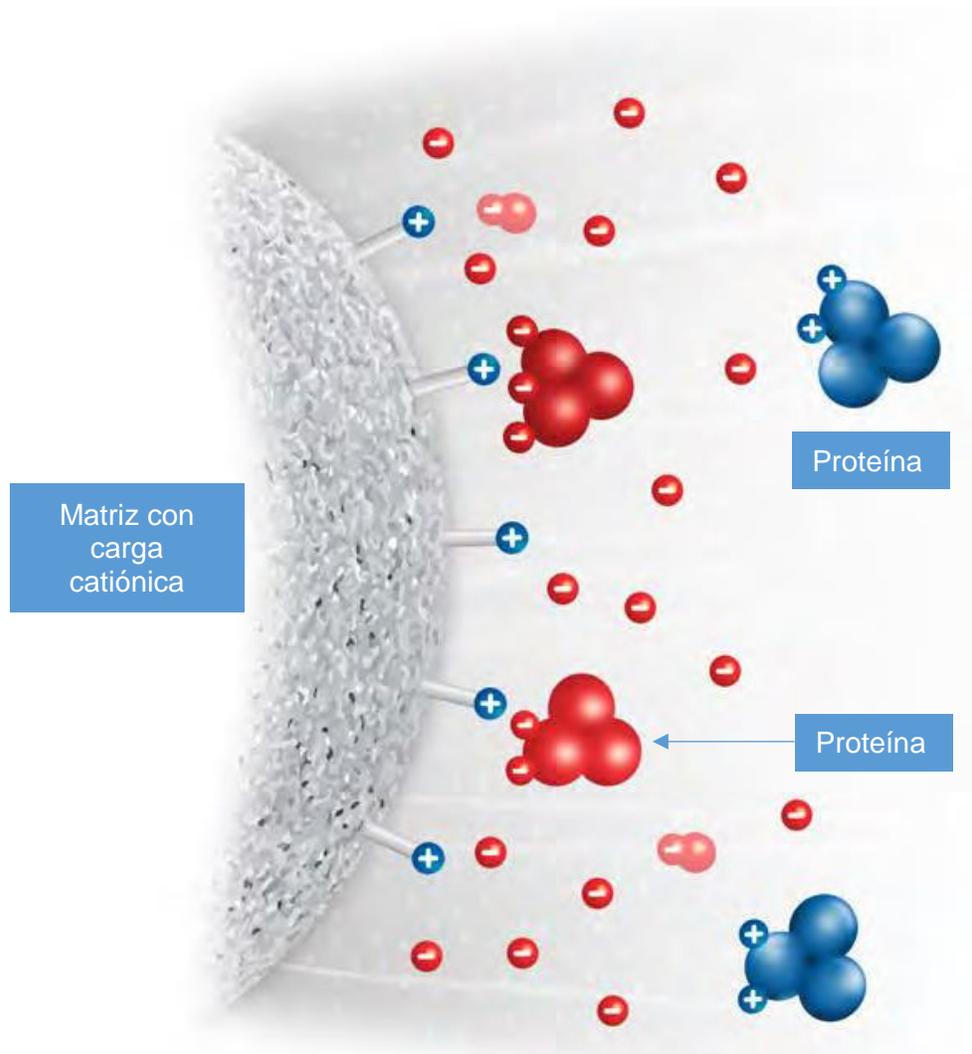


Figura 6. Esquema representativo de cromatografía de intercambio iónico.

### Cromatografía de Afinidad

Esta técnica se basa en la capacidad biológica de las proteínas de unirse de forma reversible y específica ante determinadas moléculas acopladas a la matriz, conocidas como ligandos (Figura 7). La naturaleza del ligando puede ser muy diversa, por ejemplo, metales, moléculas orgánicas de bajo peso molecular u otras proteínas. Es una clase de cromatografía específica, ideal para aislar pocas proteínas de una mezcla compleja. Muchas proteínas presentan interacciones bastante fuertes con otras moléculas, por ejemplo, las interacciones de las enzimas con análogos de sus sustratos o con cofactores, las moléculas adecuadas, acopladas de modo covalente a una matriz inerte, actuarán como “anzuelos” moleculares para captar la proteína deseada. Todas las

proteínas restantes simplemente pasaran a través de la columna. Las moléculas proteicas capturadas pueden liberarse posteriormente eluyendo la columna con una solución amortiguadora que contenga copias libres de las moléculas anzuelo o algún reactivo que pueda romper la interacción (Mathews y col., 2002; Müller, 2008).

La cromatografía de afinidad puede utilizarse para separar biomoléculas activas de formas desnaturalizadas o funcionalmente diferentes para aislar sustancias puras presentes a baja concentración en grandes volúmenes de muestra y también para eliminar contaminantes específicos. El inhibidor sintético *p*-aminobenzamidina se usa como el ligando de afinidad para tripsina, proteínas de serina tipo tripsina y zimógenos (GEH1, 2017).

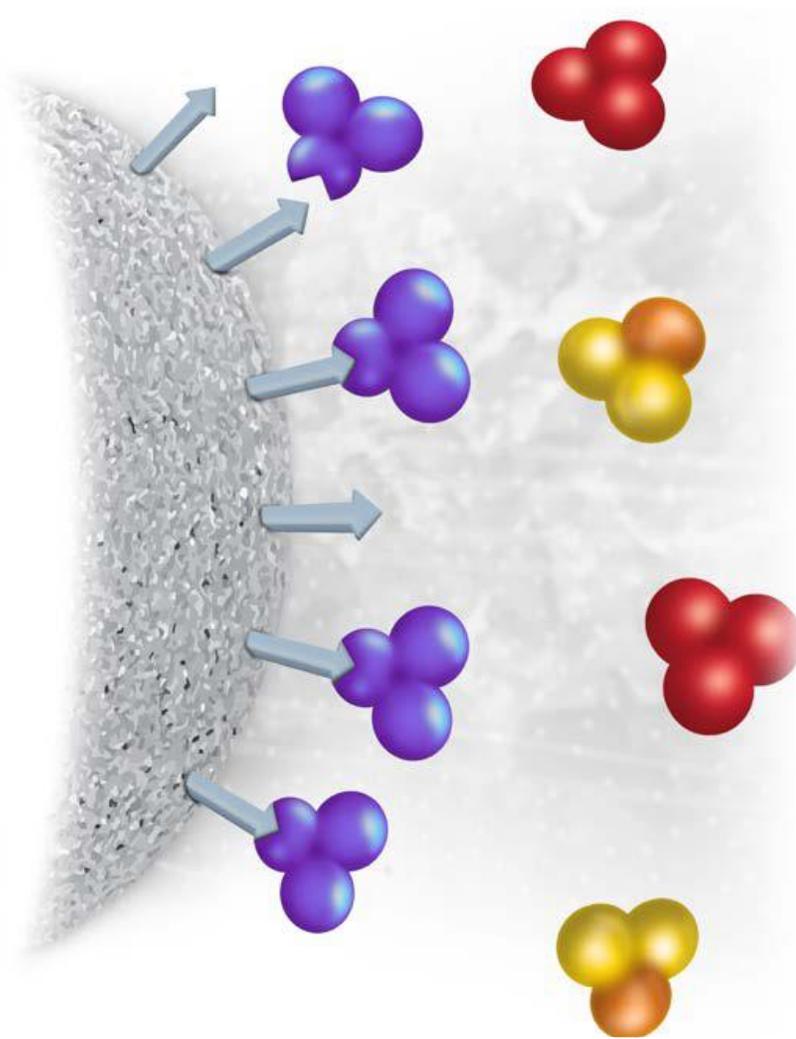


Figura 7. Esquema representativo de cromatografía de afinidad.

## **Cromatografía de Exclusión Molecular**

La cromatografía de exclusión molecular (Figura 8), también conocida como filtración en gel, es un tipo de cromatografía que fundamenta la separación de una mezcla completa según el tamaño molecular en lugar de las propiedades químicas. A menudo, constituye un método adecuado para separar las macromoléculas de tamaño diferente o para eliminar los contaminantes de peso molecular bajo de las aquellas de moléculas de mayor tamaño (Mathews y col., 2002).

La capacidad de separación de esta técnica, reside en los geles utilizados como fase estacionaria, cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas, estas esferas porosas están constituidas por largas cadenas de polímeros unidas entre sí por enlaces químicos, por ejemplo, la agarosa, el dextrano o la poliacrilamida, para formar una red tridimensional con pequeños espacios en forma de cueva, su diámetro puede variar de 10-250  $\mu\text{m}$ . Cada gel se caracteriza por un rango de fraccionamiento que depende del tamaño de sus poros. Cuando una mezcla de moléculas de diferentes tamaños en la fase móvil, se hace pasar a través de la columna de gel con la porosidad elegida se produce la separación según la siguiente prioridad: i) Las moléculas de tamaño muy pequeño penetran en el interior de las esferas que componen el gel y, por consiguiente, no son extraídas de la columna hasta que no ha pasado a través de ella el volumen total de líquido, ii) las moléculas de tamaño intermedio, presentan una mayor o menor facilidad para difundir al interior de las esferas en función de su tamaño, siendo extraídas fraccionadamente con volúmenes que están comprendidos entre el  $V_T$  y el  $V_0$ . iii) las proteínas globulares o de gran volumen son las primeras en salir por su tamaño molecular (Mathews y col., 2002; Müller, 2008).

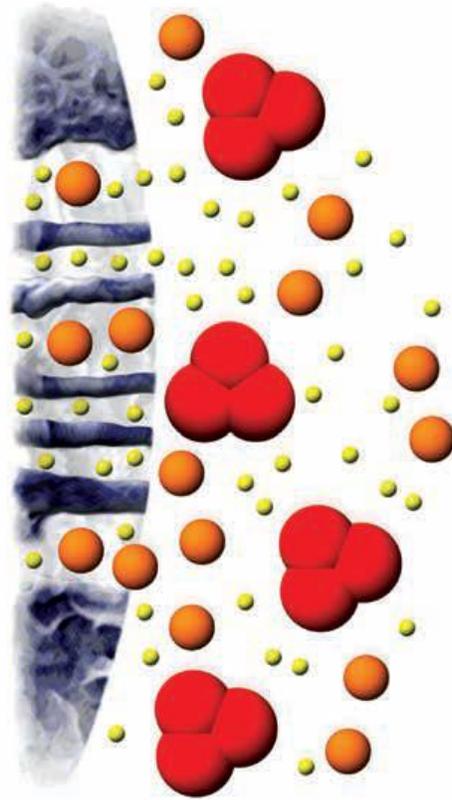


Figura 8. Esquema representativo de cromatografía de exclusión por tamaño.

### **Cristalografía**

La cristalografía como se encarga de estudiar la materia ordenada y forma una herramienta elemental para el estudio de cualquier tipo de material: cerámicos inorgánicos, superconductores, fármacos y polímeros biológicos (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos). La cristalografía permite estudiar la interacción de la radiación X con la materia, identificar a los materiales, sus patrones o espectros de difracción, puede determinar la estructura tridimensional de las moléculas o de los compuestos no moleculares, pudiéndose observar la forma, tamaño e interacciones entre los átomos y moléculas.

En moléculas biológicas la cristalografía busca obtener una visión de la función de las macromoléculas (Liebschner y col., 2013).

Los cristales son sólidos que tienen sus moléculas ordenadas en estructuras geométricas bien definidas, estas estructuras tienen una celda elemental, que al repetirse producen el cristal macroscópico. Esta celda elemental, también llamada celda unitaria, localiza y aloja los átomos

constituyentes, de modo que conociendo el acomodamiento microscópico de las moléculas se pueden calcular las propiedades macroscópicas de la materia. Un cristal ideal está formado por el acomodamiento de celdas unitarias en las tres dimensiones, que si se acomodan sin errores llenan completamente el espacio ocupado (SMC, 2001).

### **Celda Unitaria**

Una celda unitaria es la unidad estructural básica que se repite en un sólido cristalino. La representación común de una celda unitaria consiste en esferas que representan a los átomos, iones o moléculas, denominadas punto reticular. Hay distintos tipos de celdas unitarias: cúbica simple, tetragonal, ortorrómbica, romboédrica, monoclinica, triclinica y hexagonal. Cuales quiera de las celdas unitarias, al reproducirlas en el espacio tridimensional, forman una estructura reticular característica de un sólido cristalino (Chang y Goldsby, 2013).

Los requisitos generales para que se forme un cristal se entienden si se analizan las distintas formas en que se pueden empacar varias esferas idénticas para formar una estructura tridimensional ordenada. La estructura tridimensional se forma al colocar una capa encima de otra de tal manera que las esferas de una capa cubren totalmente a las de la capa inferior (Chang y Goldsby, 2013).

### **Cristales de Origen Proteico**

Los sistemas vivos se basan casi exclusivamente en la química acuosa, dentro de intervalos estrechos de temperatura y pH. Así las macromoléculas han desarrollado una compatibilidad adecuada a este medio, así las perturbaciones son raramente toleradas. Como consecuencia, todos los cristales de proteína deben crecer a partir de soluciones acuosas a las que sean tolerantes, y estas soluciones se llaman licores madre; por lo tanto, los cristales de proteínas solo se han hecho crecer a partir de estos medios (Mcperson y Gavira, 2014).

Los cristales protéicos están formados de igual manera que los cristales de moléculas inorgánicas, y su empaquetamiento molecular y su simetría se rigen por las mismas reglas, aunque hay algunas diferencias fundamentales en su composición que afectan a sus propiedades mecánicas y ópticas; estos cristales de proteínas pueden adoptar estados sólidos distintivos que incluyen, precipitados amorfos, aceites o geles. Los cristales de proteínas están compuestos de aproximadamente el 50% de solvente en promedio, aunque esto puede variar de 25 a 90% dependiendo en la proteína en particular. La proteína ocupa el volumen restante y la estructura

general suele ser permeable, con espacios intersticiales extensos a través de los cuales el solvente y otras moléculas pequeñas difunden libremente (Jena, 2015; McPherson y Gavira, 2014).

A pesar que se puede comparar la morfología y apariencia, hay diferencias significativas entre cristales de bajo peso molecular y los de proteínas. Los cristales de moléculas convencionales se caracterizan por poseer fuerzas cristalinas firmes, son relativamente más ordenados, son físicamente duros y quebradizos, son fáciles de manipular, por lo general pueden estar expuestos al aire, tienen fuertes propiedades ópticas y difractan los rayos X intensamente, en cambio, los cristales macromoleculares son en comparación, más pequeños, muy blandos y pueden ser rotos con facilidad, suelen desintegrarse si se deshidratan, exhiben propiedades ópticas y difractan los rayos X de forma pobre, son sensibles a la temperatura y sufren daños extensos por exposición prolongada a la radiación, por ello, con frecuencia varios cristales deben analizarse para determinar una estructura con éxito (McPherson y Gavira, 2014).

El primer paso para determinar una estructura por medio de la cristalografía y al mismo tiempo, el más complicado y limitante es la obtención de cristales de tamaño suficiente; en principio la cristalización de una proteína no es muy diferente a la de moléculas pequeñas, en el proceso hay que pasar del estado líquido al cristalino, para ello debe reducirse la solubilidad de la molécula creando una solución sobresaturada en la macromolécula, pero que exhiba condiciones que no perturben significativamente su estado natural, por ello la disolución debe sobresaturarse de forma gradual, lo que desencadena la formación espontánea de centros de crecimiento cristalino también conocidos como núcleos. Una metodología comúnmente empleada es incrementar la concentración de los agentes precipitantes o alterando alguna propiedad fisicoquímica del sistema como pH y temperatura. Por regla general, esto da origen a la formación de una precipitación amorfa. Sin embargo, si las condiciones se han elegido de tal manera que en la superficie de la molécula se hallen áreas complementarias entre sí, se pueden dar variaciones específicas entre las moléculas protéicas. Si la geometría de estas variaciones es favorable, se formarán los cristales (Dale y col., 2003; González Ramírez, 2011; McPherson y Gavira, 2014).

En la cristalización se distinguen principalmente dos pasos: (i) la nucleación y (ii) el crecimiento del cristal. Ambos pasos tienen lugar solo si las condiciones son favorables. Desafortunadamente, para la nucleación se requiere más sobresaturación que para el crecimiento. El área de formación nuclear donde se da la sobresaturación también se denomina zona inestable o lábil, mientras que el área de crecimiento se conoce como zona meta estable. Para la nucleación es necesario que la solución llegue a la zona lábil, sin embargo, una vez allí

los núcleos crecerán rápidamente y los cristales resultantes serán muchos y muy pequeños. Como el interés es formar cristales grandes, es necesario limitar la cantidad de núcleos en formación. En el experimento, por tanto, hay que aproximarse a la fase de nucleación muy lentamente. Para garantizar que los núcleos tengan tiempo suficiente para crecer (Jena, 2015).

El paso de una solución estable a una sobresaturada se puede realizar fácilmente variando la proporción de la mezcla de proteína y precipitante guiándose por un diagrama de fases, como el que se muestra en la Figura 9. Para ello, se pueden variar las concentraciones de proteína o de precipitante (Jena, 2015).

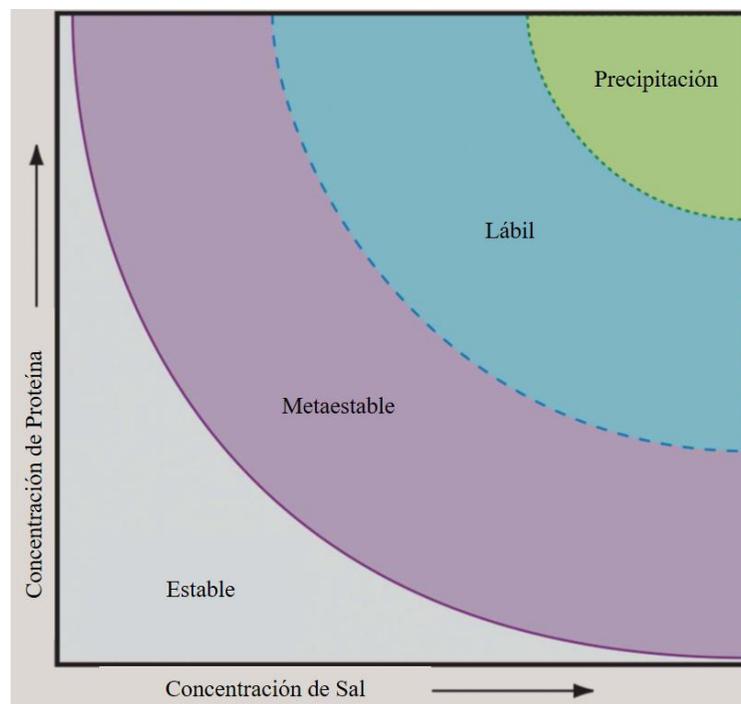


Figura 9. Diagrama de fases o regiones de saturación de macromoléculas.

Cuando se cristalizan proteínas para el análisis de difracción de rayos X, por lo general se trata con macromoléculas homogéneas, y en algunas ocasiones moléculas excepcionalmente puras, y el objetivo puede ser hacer crecer sólo unos pocos cristales grandes, de alta calidad y alto rendimiento. Es importante enfatizar que mientras el número de cristales necesarios puede ser escaso, a menudo la cantidad de la proteína disponible puede estar severamente limitada (Mcpherson y Gavira, 2014).

La cantidad y calidad de los cristales dependerá del ambiente químico de la disolución y de la técnica experimental que se realice (González, 2011). La extensión del patrón de difracción de un cristal está directamente correlacionada con su grado de orden interno. Cuanto más vasto sea el patrón o cuanto mayor es la resolución a la que se extiende, serán más uniformes las moléculas en el cristal y más preciso será su arreglo periódico. El nivel de detalle al que las posiciones atómicas pueden ser determinadas por el análisis de la estructura cristalina corresponde estrechamente a este grado de orden cristalino.

Mientras los cristales convencionales a menudo difractan a su límite teórico de resolución, los cristales de proteína, por comparación, producen patrones de difracción de una extensión más limitada (González, 2011; Mcpherson y Gavira, 2014).

Los canales de líquido y las cavidades llenas de disolvente que hacen permeable a los cristales moleculares son los responsables de la resolución limitada de los patrones de difracción. Debido a los espacios relativamente grandes entre las moléculas adyacentes y por consecuencia una red cristalina débil. Todas las moléculas del cristal no pueden ocupar la misma orientación y posición, pero pueden variar ligeramente dentro o entre varias celdas unitarias. Aunque la presencia de extensas regiones disolventes es el mayor contribuyente a la calidad de difracción de los cristales de proteína. Debido al alto contenido de solvente, las macromoléculas individuales en los cristales de proteínas son rodeados por capas de agua que mantienen su estructura prácticamente sin cambios con respecto a la solución. Como consecuencia, los enlaces, las características enzimáticas, espectroscópicas y otras características bioquímicas son esencialmente las mismas que para la molécula totalmente disuelta (Mcpherson y Gavira, 2014).

### **Métodos de Cristalización**

Los métodos de cristalización utilizan la modificación de medios físicos y químicos para inducir sobresaturación en una solución ambiente. Hay dos fases en la búsqueda de obtener cristales de proteína para un estudio de difracción de rayos X, y estos son i) la identificación de condiciones químicas, bioquímicas y físicas que puedan producir algunos materiales cristalinos, aunque no en todos los casos el cristal será adecuado; en esta etapa se realiza una variación sistemática de lo que se creen son las variables más importantes: tipo de precipitante y su concentración, pH, temperatura, etc. este método requiere de una gran cantidad de proteína. De manera subsecuente comienza la ii) realización de alteraciones sistemáticas de estas condiciones iniciales para incrementar las oportunidades de obtener muestras óptimas para el análisis de difracción. Este segundo paso proporciona muchas más oportunidades para que las condiciones

útiles escapen al descubrimiento, pero en general requiere menos recurso (Luft y col., 2014; Mcpherson y Gavira, 2014).

Actualmente, una gran variedad de Kits de tamizaje de cristalización de numerosas empresas están disponible en el mercado, la disponibilidad y facilidad de uso de estos Kits de precio relativamente modesto, pueden utilizarse conjuntamente con una variedad de métodos de cristalización, lo que hace de ellos la primera herramienta de elección para atacar un nuevo problema de cristalización dado que estos Kits varían distintos factores como tipos de precipitantes, rango de pH, adición de aditivos, entre otros, que aumentan la probabilidad de obtener las condiciones particulares para que una proteína cristalice. Una vez que algunos cristales, aunque sólo sean micro cristales, se observan y se demuestra que son de origen proteico, entonces comienza la optimización (Mcpherson y Gavira, 2014).

Una forma de categorizar los métodos existentes para cristalizar una macromolécula es dividirlos con base a como se ajustan y varían las condiciones químicas de la disolución. Es decir, si son fijadas al inicio del experimento o varían en el curso del mismo. Con base a esta consideración, la mayoría de los métodos están clasificados en tres categorías; difusión de vapor, mezcla directa o “Batch” y difusión en fase líquida (González, 2011).

### **Método de Mezcla Directa “Batch”**

También conocido como método de estado estático, es una técnica en la cual los niveles de sobresaturación se ajustan al inicio del experimento y permanecen sin cambios hasta el final, por lo tanto, en un experimento por el método de “batch” no hay exploración del diagrama de fases, dado que las condiciones iniciales permanecen (González, 2011; Russo y col., 2013).

Tradicionalmente esta técnica involucra la mezcla de grandes volúmenes de proteína con un precipitante hasta que una leve opalescencia se observe. El objetivo de este experimento es lograr una sobresaturación sin alcanzar el punto de nucleación espontaneo. Claramente el inconveniente de este enfoque radica en la cantidad de muestra requerido (Rayment, 2002)

Para obtener cristales que difracten correctamente, la nucleación tiene que comenzar durante la preparación de la gota, cuando las concentraciones relativamente altas de proteína y solución precipitante entran en contacto entre sí, y después de mezclar la solución debe estar en la zona metaestable para que se garantice un crecimiento ordenado. Aunque la evaporación del agua de la gota cubierta por el aceite es insignificante, ocurre, y por lo tanto con el tiempo las gotas disminuyen su volumen, dando como resultado un aumento en las concentraciones tanto de proteína como de precipitante, lo que puede producir precipitados o cristales de proteína. La

principal desventaja de este método es que en muchos el equilibrio ocurre muy rápidamente, afectando así la tasa de crecimiento de los cristales y en consecuencia su calidad. Para evitar que las gotas se sequen durante periodos prolongados es posible controlar la velocidad de disminución del volumen de las mismas mediante la regulación de la presión de vapor dentro de la bandeja de cristalización (Russo y col., 2013). En el método "batch", la muestra es mezclada con el precipitante y aditivos apropiados para crear un medio de cristalización homogéneo, entonces la mezcla se deja intacta. La técnica puede miniaturizarse sumergiendo gotas de solución de cristalización pequeñas en un aceite inerte, lo que impide la evaporación de la muestra, este es el llamado método "microbatch" (Russo y col., 2013).

**Microbatch bajo aceite.** Es un poderoso procedimiento para obtener cristales de proteína en el que la muestra y el reactivo se combinan y sellan (HR, 2017). Utilizando este método, proteínas en solución acuosa son distribuidas bajo aceite, el agua se evapora a través de esta capa acompañado de un incremento en la concentración de proteína y precipitante hasta que el punto de nucleación es alcanzado. Este método es ampliamente utilizado, pueden emplearse nanolitros de proteína y precipitante, los cuales son dispensados en pocillos individuales de una bandeja de cristalización, y luego se cubren con aceite de parafina líquido o una mezcla de parafina y aceites de silicona (Russo y col., 2013).

Uno de los inconvenientes significativos del método es la desecación completa de las soluciones de gotas acuosas dentro de varias semanas después de que se ha establecido el experimento, el secado excesivo da lugar a menudo a la formación de depósitos de sal, dando como resultado la desintegración de los cristales de proteína, con una pérdida de potencia de difracción en consecuencia. La innovación clave es incluir un depósito acuoso dentro de la bandeja de cristalización de microplacas. Haciendo una elección adecuada de la presión de vapor de la solución dentro de este depósito, es posible tanto controlar la velocidad de evaporación de las gotas de micropartículas como eliminar el riesgo de su desecación (Brumshtein y col., 2008).

**Microbatch sin aceite.** En este método proteína y precipitante se mezclan a su concentración final desde el comienzo del experimento. La gota es entonces almacenada en presencia de un depósito con la misma concentración de precipitante, para evitar la evaporación de gotas. La ventaja de este procedimiento es la eliminación de inconvenientes significativos del método de microbatch bajo el aceite, es decir, la evaporación lenta de agua desde las gotas de cristalización que en algún momento producen la formación de depósitos de sal que interfieren con la proteína crecimiento de cristales (Russo y col., 2013).

## Difusión en Vapor

Esta técnica utiliza la evaporación y difusión del agua entre una pequeña gota, que contienen proteína, solución amortiguadora, precipitante, y un depósito que contiene una solución con amortiguador y un precipitante similar, pero a concentraciones más altas con respecto a la gota. Los pozos se sellan creando una interfaz de grasa de vacío entre el borde de cada pocillo y el revestimiento de cubierta o cinta de sellado (Russo y col., 2013).

Difusión de vapor es el método más popular para el crecimiento de cristales de macromoléculas adecuados para el análisis estructural. Como beneficio se requiere una pequeña cantidad de muestra para cada experimento y es fácil de aplicar a una proteína nueva por medio de los “barridos” de cristalización, a pesar de ello, es ampliamente conocido que el campo de crecimiento de cristales por difusión de vapor contiene problemas inherentes cuando se intentan crecer cristales grandes, la razón de esto es simple, primeramente la concentración del precipitante requerido para el crecimiento de cristales es más bajo que el necesario para la nucleación, que regularmente resulta en muchos cristales pequeños que crecen con rapidez, en segundo lugar, las condiciones de cristalización cambian durante el proceso de equilibrio. En un experimento típico de difusión de vapor, microlitros de proteína son mezclados con un volumen igual de precipitante y se recupera el equilibrio. Durante la equilibración la presión de vapor aumenta a medida que la solución de proteína se cristaliza, después, el agua se evapora para mantener el equilibrio, lo cual, causa que la concentración del precipitante aumente. Por lo tanto, si el crecimiento del cristal es sensible a la concentración precipitante, la difusión del vapor puede forzar rápidamente la mezcla a condiciones inestables donde el crecimiento y la nucleación son demasiado rápidos (Russo y col., 2013)

La diferencia entre la concentración del precipitante en la gota y en la solución del pocillo provoca la evaporación del agua de la gota hasta que la concentración del precipitante es igual a la de la solución del pozo. Dado que el volumen de la solución del pozo es mucho mayor que el volumen de la gota, su dilución por el vapor de agua que sale de la gota es insignificante (Jena, 2015).

La difusión de vapor es la técnica óptima para tamizar un gran número de condiciones, variando la composición de cada solución de pocillo o para aumentar o disminuir la concentración de la proteína en el estado equilibrado con respecto a su concentración inicial, variando el volumen de la proteína mezclada con la solución del pocillo cuando la gota se configura inicialmente (Rayment, 2002).

**Gota Colgante o “Hanging Drop”.** En este método la gota se coloca en la parte inferior de un vidrio siliconado (Krauss 2013). La técnica de difusión de vapor de gota colgante es un método popular para la cristalización de macromoléculas. En esta técnica una gota compuesta de una mezcla de muestra y reactivo se coloca en equilibrio de vapor con un depósito líquido de reactivo. Típicamente, la gota contiene una concentración de reactivo más baja que el depósito. Para lograr el equilibrio, el vapor de agua sale de la gota y finalmente termina en el depósito. A medida que el agua sale de la gota, la muestra sufre un aumento en la sobresaturación relativa. Tanto la muestra como el reactivo aumentan en concentración cuando el agua deja la gota para el depósito (Figura 10). El equilibrio se alcanza cuando la concentración de reactivo en la gota es aproximadamente la misma que en el depósito (HR, 2017).

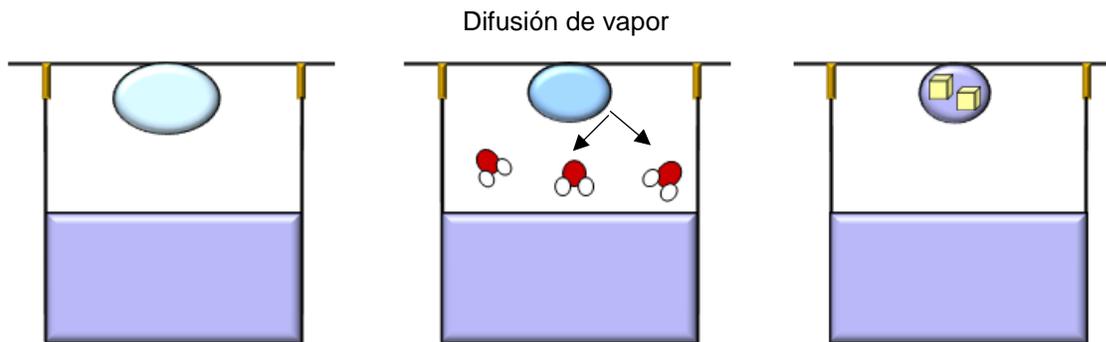


Figura 10. Representación esquemática de difusión de vapor por gota colgante.

**Gota Posada o “Sitting Drop”.** La gota se coloca sobre un soporte de plástico o de vidrio por encima de la superficie del depósito, a veces los cristales pueden adherirse a la superficie de apoyo, dificultando su eliminación (Russo y col., 2013).

Una gota compuesta de una mezcla de muestra y reactivo se coloca en equilibrio de vapor con un depósito líquido de reactivo. Habitualmente, la gota contiene una concentración de reactivo más baja que el depósito. Para lograr el equilibrio, el vapor de agua sale de la gota y finalmente termina en el depósito. A medida que el agua sale de la gota, la muestra sufre un aumento en la sobresaturación relativa. Tanto la muestra como el reactivo aumentan en concentración cuando el agua deja la gota para el depósito. El equilibrio se alcanza cuando la concentración de reactivo en la gota es aproximadamente la misma que en el depósito (Figura 11) (HR, 2017).

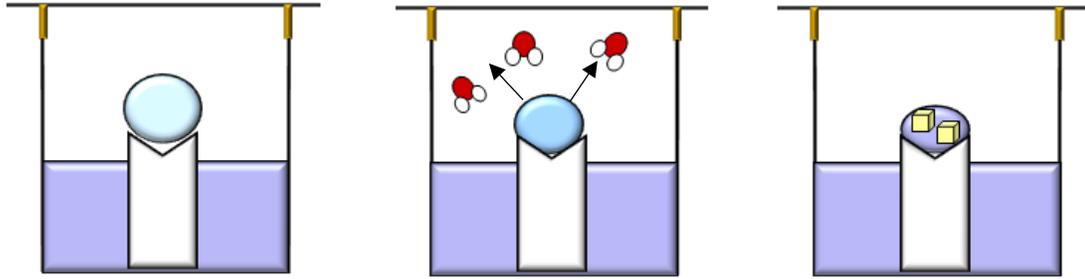


Figura 11. Representación esquemática de difusión de vapor por gota posada.

**Sandwich.** La proteína mezclada con el precipitante se coloca entre dos tapas, una de las cuales cierra el pozo.

El método de gota en sándwich (Figura 13) tiene la ventaja de reducir la superficie expuesta de la gota, disminuyendo así la velocidad a la que la solución del depósito precipitador extrae agua de la gota y retarda el proceso de equilibrio (Russo y col., 2013).

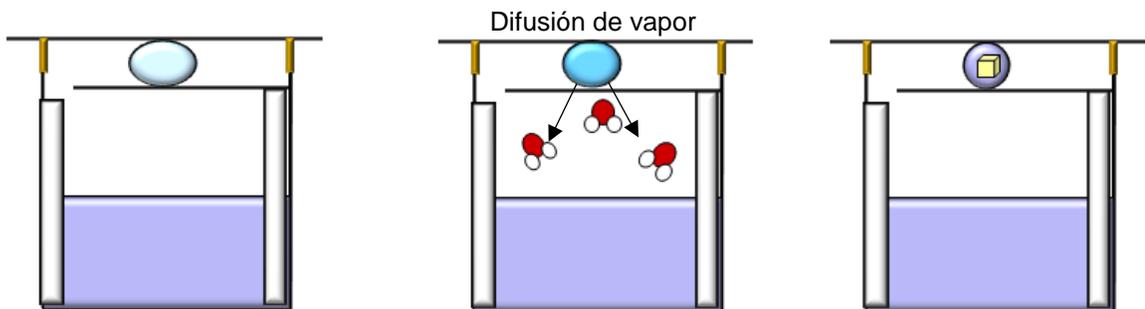


Figura 12. Representación esquemática de gota en sándwich.

### Difusión en Fase Líquida

Esta técnica utiliza la difusión y el equilibrio de las moléculas precipitantes a través de una membrana semipermeable como medio para acercarse lentamente a la concentración a la que cristaliza la macromolécula. Siempre que el precipitante sea una molécula pequeña, puede penetrar en la membrana de diálisis, y la proteína se pone lentamente en equilibrio con la solución precipitante (Figura 13). Los tubos de diálisis pueden utilizarse por sí mismos en el caso de que se disponga de grandes cantidades de proteína.

Los botones de microdiálisis ofrecen una manera conveniente de realizar ensayos de cristalización con una pequeña cantidad de muestra, en este caso, la muestra de proteína se

coloca dentro una pequeña cámara en la parte superior del botón, que es capaz de acomodar volúmenes que van desde 5 a 100  $\mu\text{L}$ ; la muestra se cubre con una membrana de diálisis de corte de peso molecular apropiado y luego se coloca en un depósito que contiene la solución precipitante. La diálisis tiene varias ventajas, incluyendo la posibilidad de cambiar la composición del depósito cualquier número de veces, simplemente moviendo el botón de una condición a otra. Esta permite reciclar continuamente la solución de muestra hasta que las condiciones correctas para la cristalización sean encontradas. Además, la tasa de equilibrio puede modularse variando el diferencial entre concentración dentro y fuera de la membrana. Por otro lado, este método no funciona con soluciones concentradas de polietilenglicol, ya que tienden a extraer toda el agua del botón, dando precipitación de proteínas, y no permite cambiar la concentración de proteínas (Russo y col., 2013).

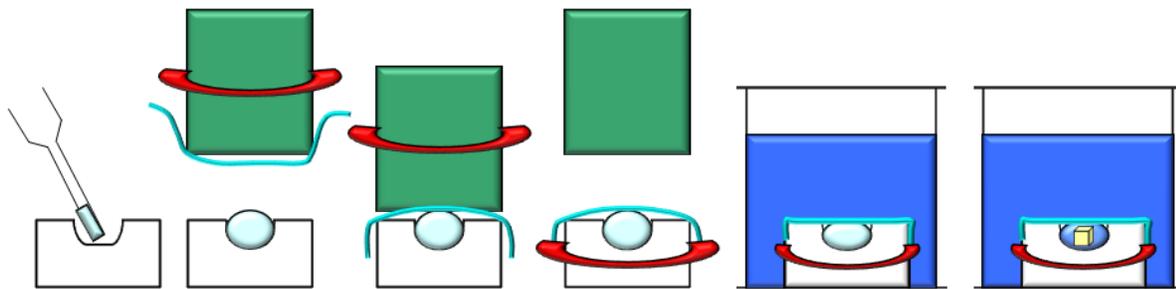


Figura 43. Representación del método de difusión de fase líquida/diálisis.

### Difracción de Rayos X

Hoy en día hay dos métodos fundamentales para determinar la estructura tridimensional de una proteína. Por un lado, está la resonancia magnética nuclear (NMR) y, por el otro, la cristalografía de rayos X. Con el método NMR sólo se pueden estudiar moléculas con un peso molecular aproximado de hasta 25.000 Da (25 kDa, o aproximadamente 220 aminoácidos); la cristalografía de rayos X es más apropiada para determinar la estructura de proteínas más grandes o complejos macromoleculares (Jena, 2015).

En el “Protein Data Bank” (PDB), hasta el año 2017 se encuentran 129, 367 estructuras, de las cuales 115, 858 se han resuelto por medio de difracción de rayos X (PDB, 2017).

La difracción de rayos X es, esencialmente, una técnica de imagen en la cual los rayos X son dispersados por los electrones de los átomos dentro de un cristal. Los rayos X difractados

generan un patrón de interferencia que puede ser adquirida, grabada y, subsecuentemente, transformada matemáticamente para dar una imagen del objeto original a escala de átomos, es decir, una imagen de las moléculas que conforman el cristal. Debido a que son los electrones los que difractan los rayos X, lo que se obtiene finalmente es la densidad electrónica de la muestra; y puesto que los conjuntos de electrones están dispuestos alrededor del núcleo, las regiones de alta densidad electrónica corresponden a posiciones atómicas (Mcpherson y Gavira, 2014).

La investigación cristalográfica y la determinación de la estructura de moléculas biológicas fue uno de los logros más espectaculares científicos del siglo XX en los que la cristalografía de rayos X desempeñó un papel fundamental (Hargittai, 2014).

En el caso de las macromoléculas biológicas se existe un gran interés, ya que esta técnica permite obtener, además de la estructura tridimensional, el plegamiento, la distancias y ángulos de enlace, etc., datos que ayudan a elucidar la función biológica y la relación existente con la estructura de la macromolécula (González Ramírez, 2011; Mcpherson e Gavira, 2014).

Como su nombre lo sugiere, la aplicación de la cristalografía de rayos X es absolutamente dependiente de un cristal de macromolécula, y no simples cristales, si no cristales con un tamaño y calidad que permitan la colección de una intensidad de difracción adecuado. La calidad de la imagen estructural final es directamente determinada por la calidad de la difracción, que es, el tamaño y propiedades físicas del espécimen cristalino, por lo tanto, el cristal se convierte en el eje entero y determinante del proceso (Mcpherson y Gavira, 2014).

La difracción de rayos X se refiere a la dispersión de los rayos X debida a las unidades de un sólido cristalino, gracias a los patrones de dispersión es posible deducir el ordenamiento de las partículas en la red sólida. Dado que los rayos X son una forma de radiación electromagnética, cabe esperar que manifiesten un comportamiento ondulatorio en condiciones adecuadas. Debido a la longitud de onda de los rayos X es comparable con la magnitud de la distancia que hay entre los puntos reticulares de un cristal. Un patrón de difracción es consecuencia de las interferencias en las ondas asociadas a los rayos X (Chang y Goldsby, 2013).

Durante el proceso de difracción el haz de rayos X se enfoca en el cristal montado, los átomos del cristal absorben parte de la radiación recibida y luego la emiten; este proceso se denomina dispersión de rayos X (Figura 14) (Chang y Goldsby, 2013).

La técnica de difracción de rayos X es el método más exacto para determinar las distancias y los ángulos de enlace de las moléculas en estado sólido. Dado que los rayos X son dispersados por los electrones de las moléculas del cristal, de ahí se puede construir un mapa de contorno de densidad electrónica, que indica las densidades relativas en distintas posiciones de una molécula. Las densidades máximas cerca del centro del átomo. De esta forma, es posible

determinar las posiciones de los núcleos y, por consiguiente, los parámetros geométricos de la molécula (Chang y Goldsby, 2013).

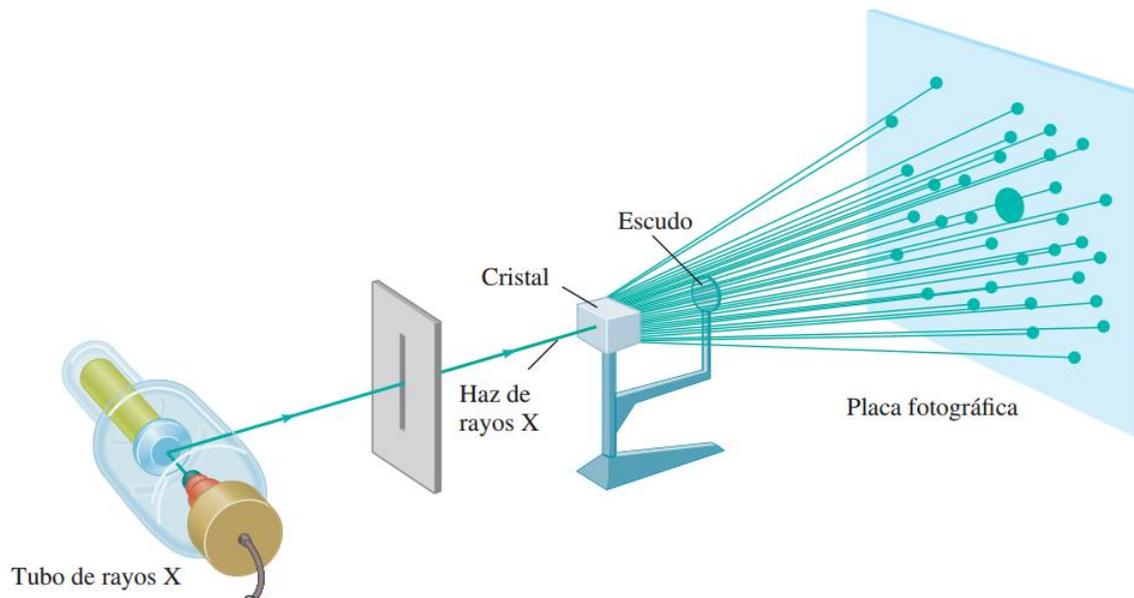


Figura 14. Representación esquemática de los componentes de un difractómetro de rayos X.

El análisis de rayos X es un evento singular confinado al laboratorio de investigación cuyo producto final es conocimiento científico básico. Los cristales, salvo algunas excepciones, no tienen valor farmacéutico o médico, sino que sirven simplemente como intermediarios en el proceso cristalográfico. Los cristales proporcionan los patrones de difracción de rayos X que a su vez sirven como datos crudos que permiten la visualización directa de las macromoléculas de las cuales está formado el cristal (Mcpherson y Gavira, 2014).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de la Muestra**

Aproximadamente 50 kilos de muestra de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) fue proporcionada por la empresa PROPEGUAY S.A. de C.V., los ejemplares se mantuvieron en condiciones de temperatura adecuada para su transporte al laboratorio de investigación en la Universidad de Sonora, campus Cajeme. El lote de sardinas se evisceró a baja temperatura, con precaución de no afectar el tracto digestivo u otros órganos, con el fin de evitar contaminación o pérdida de enzima. Del total de vísceras se separaron los ciegos pilóricos, los cuales se colocaron en bolsas de polietileno con cierre hermético para su congelación inmediata a  $-30^{\circ}\text{C}$  (Castillo y col., 2005).

### **Preparación de la Muestra**

Las porciones de ciego pilórico (50 g aproximadamente) se homogeneizaron en 250 mL de solución amortiguadora de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , NaCl 0.5 M). El homogeneizado se incubó por 8 horas a  $25^{\circ}\text{C}$ , se agregaron 50 mL de  $\text{CCl}_4$  para desengrasar y se centrifugó a  $26,000 \times g$  por 30 minutos a una temperatura de  $2-4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó el extracto crudo de enzimas digestivas (distribuido en el sobrenadante) y el precipitado se descartó. El extracto crudo de enzima se mezcló lentamente con sulfato de amonio colectándose las fracciones entre 30% y 70% de saturación; después de 2 horas en baño de hielo, la muestra se centrifugó a  $20,000 \times g$  por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se descartó y el pellet obtenido se disolvió en 30 mL de amortiguador A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M), a continuación, la muestra se sometió a un proceso de diálisis por 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  con recambios de amortiguador (Castillo y col., 2005).

### **Purificación de Tripsina I por Cromatografía**

Para obtener tripsina I se realizaron tres pasos cromatográficos utilizando cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico (Castillo y col., 2005).

El clarificado de proteína, se cargó en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño Sephadex G-75 con solución amortiguadora A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl 0.5 M) como

fase móvil a una velocidad de flujo de 0.25 ml/min y se colectaron fracciones de 5 ml. Las fracciones con actividad tripsina se utilizaron para realizar una sola fracción la cual se cargó en una columna de cromatografía de afinidad Hi-Trap Benzamide FF, equilibrada con solución amortiguadora A, la tripsina retenida en la columna se eluyó cambiando el pH de la fase móvil de 7.3 a 3.0, utilizando amortiguador 50 mM Gly-HCl, pH 3, a los tubos donde se colectaron las fracciones se les agregó el amortiguador de captura Tris 1 M, pH 9, previo a la colección.

Las fracciones obtenidas se dializaron con amortiguador 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 y posteriormente se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico, donde se cargaron en una columna Hi-Trap DEAE Sepharose FF equilibrada con solución amortiguadora 20 mM Tris HCl, pH 7.5, la proteína no absorbida se lavó con amortiguador de equilibrio 20 mM Tris HCl, pH 7.5 y fue eludida dentro de la columna con 500 ml de amortiguador en gradiente salino, en un rango de 0 a 0.4 M NaCl (Castillo y col., 2005).

### **Ensayo de Actividad Amidasa/Esterasa Específica**

La actividad específica de tripsina se midió utilizando el sustrato cromógeno N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), según el método de Erlanger y col. (1961), con ligeras modificaciones en el volumen de reacción. Este método se basa en el incremento de la absorbancia a 410 nm a 25 °C. Experimentalmente, en una microplaca de 96 pocillos se colocaron 50 µL de muestra con tripsina y se añadieron a una solución de 150 µL de BAPNA 1 mM. Posteriormente, se monitoreó la absorbancia en un lector de microplaca con un filtro de 415 nm (Arvizu y col., 2012)

### **Electroforesis SDS-PAGE**

La electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras se realizó con las muestras que presentaron actividad específica ante el sustrato BAPNA, con el fin de verificar la pureza de la tripsina posterior a los pasos de purificación por cromatografía. Durante el ensayo se utilizaron geles de poliacrilamida al 15% con SDS ; las muestras se prepararon tomando 30 µL de muestra y 20 µL de solución amortiguadora 2X (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, glicerol, SDS 20%, azul de bromofenol 0.5%), se calentaron a 90°C por 5 minutos, y se cargaron 18 µL de la mezcla por pozo. Se utilizó el marcador molecular de amplio rango de la marca comercial Bio Rad. El ensayo se ejecutó a pH 8.3 a 25° C y posteriormente se procedió a realizar una tinción con azul de Comassie, donde se buscó una banda característica de 25 kDa correspondiente a Tripsina I.

## Ensayos de Cristalización de Tripsina

Una vez evidenciada la presencia de tripsina I con un aproximado 90% de pureza por medio de electroforesis, se inició con la determinación de condiciones experimentales para la generación de cristales utilizando los Kits comerciales para cristalización de Jena Bioscience, WIZARD I y II ambos suman un total de 96 condiciones distintas, las cuales poseen un rango de pH entre 4.5 y 10.5, diferentes precipitantes, soluciones amortiguadoras y sales. Las composiciones de cada condición se muestran en las Tablas 2 y 3.

Pozo	Precipitante	Amortiguador [100 mM]	Aditivo [200 mM]
A1	PEG 8,000, 20 % p/v	CHES pH 9.5	
A2	2-Propanol 10 % v/v	HEPES pH 7.5	Cloruro de sodio
A3	Etanol, 15 % v/v	CHES pH 9.5	
A4	2-Metill-2,4-pentanediol, 35 % v/v	HEPES pH 8	Cloruro de magnesio
A5	PEG 400, 30 % v/v	CAPS pH 10.5	
A6	PEG 3,000, 20 % p/v	Citrato de sodio pH 5.5	
A7	PEG 8,000, 10 % p/v	MES pH 6.0	Acetato de zinc
A8	Sulfato de amonio 2 M	Citrato de sodio pH 5.5	
A9	Fosfato monoamónico 1M	Acetato de sodio pH 4.5	
A10	PEG monometileter 2,000, 20 % p/v	Tris pH 7.0	
A11	1,4-Butanediol 20% v/v	MES pH 6.0	Sulfato de litio
A12	PEG 1,000, 20 %p/v	Imidazol pH 8	Acetato de calcio
B1	Sulfato de amonio 1.26 M	MES pH 6.5	
B2	Citrato de sodio 1 M	MES pH 6.5	
B3	PEG 3,000, 10 % p/v	Imidazol pH 8	Sulfato de litio
B4	Cloruro de sodio 2.5 M	Fosfato sodio/ potasio pH 6.2	
B5	PEG 8,000, 30 % p/v	Acetato de sodio pH 4.5	Sulfato de litio
B6	Tartrato mixto de potasio y sodio 1 M	Imidazol pH 8	Cloruro de sodio
B7	PEG 1,000, 20% p/v	Tris pH 7	

B8	Bifosfato de sodio 400 mM, fosfato dipotasico 1.6 M	Imidazol pH 8	Cloruro de sodio
B9	PEG 8,000, 20 %p/v	HEPES pH 7.5	
B10	2-Propanol 10% v/v	Tris pH 8.5	
B11	Etanol 15 % v/v	Imidazol pH 8	Cloruro de magnesio
B12	2-Metil-2,4-pentanediol 35% v/v	Tris pH 7.0	Cloruro de sodio
C1	PEG 400, 30 % v/v	Tris pH 8.5	Cloruro de magnesio
C2	PEG 3,000, 10 % p/v	CHES pH 9.5	
C3	Bifosfato de sodio 1.2 M, fosfato dipotasico 1.6 M	CAPS; pH 10.5	Sulfato de litio
C4	PEG 3,000, 20% p/v	HEPES pH 7.5	Cloruro de sodio
C5	PEG 8,000, 10 % p/v	CHES pH 9.5	Cloruro de sodio
C6	Sulfato de amonio 1.26 M	Acetato de sodio pH 4.5	Cloruro de sodio
C7	PEG 8,000, 20 % p/v	Citrato de sodio pH 4.2	Cloruro de sodio
C8	PEG 3,000, 10% p/v	Fosfato sodio/ potasio pH 6.2	
C9	Sulfato de amonio 2 M	CAPS pH 10.5	
C10	Fosfato monoamónico 1 M	Imidazol pH 8	
C11	1,4-Butanediol 20 % v/v	Acetato de sodio pH 4.5	
C12	Citrato de sodio 1 M	Imidazol pH 8	
D1	Cloruro de sodio 2.5 M	Imidazol pH 8	
D2	Tartrato mixto de potasio y sodio 1 M	CHES pH 9.5	Sulfato de litio
D3	PEG 1,000, 20 % p/v	Citrato de sodio pH 4.2	Sulfato de litio
D4	2-Propanol, 10 % v/v	MES pH 6.5	Acetato de calcio
D5	PEG 3,000, 30 % p/v	CHES pH 9.5	
D6	Etanol 15 % p/v	Tris pH 7.0	
D7	2-Metil-2,4-pentanediol, 35 %v/v	Fosfato sodio/ potasio pH 6.2	

D8	PEG 400, 35 % v/v	Acetato de sodio pH 4.5	Acetato de calcio
D9	PEG 3,000, 20 % p/v	Acetato de sodio pH 4.5	
D10	PEG 8,000, 10 % p/v	Imidazol pH 8	Acetato de calcio
D11	Sulfato de amonio 1.26 M	Tris pH 8.0	Sulfato de litio
D12	PEG 1,000, 20 % p/v	Acetato de sodio pH 4.5	Acetato de zinc

Tabla 2. Condiciones del kit WIZARD I de Jena Bioscience.

Pozo	Precipitante	Amortiguador [100 Mm]	Aditivo [200 Mm]
E1	PEG 3,000, 10 % p/v	Acetato de sodio pH 4.5	Acetato de zinc
E2	2-Metil-2,4-pentanediol 35 % v/v	MES pH 6	Sulfato de litio
E3	PEG 8,000, 20 % p/v	Tris pH 8.5	Cloruro de magnesio
E4	Sulfato de amonio 2 M	MES pH 6	Cloruro de sodio
E5	1,4-Butanediol 20% v/v	HEPES pH 7.5	Cloruro de sodio
E6	2-Propanol 10 % p/p	Citrato de sodio pH 4.2	Sulfato de litio
E7	PEG 3,000, 30 % p/v	Tris pH 7.0	Cloruro de sodio
E8	PEG 8,000, 30 % p/v	Fosfato sodio/ potasio pH 6.2	Cloruro de sodio
E9	Sulfato de amonio 2 M	Citrato de sodio pH 4.2	
E10	Fosfato monoamónico 1M	Tris pH 8.5	
E11	2-Propanol 10 % v/v	MES pH 6.5	Acetato de zinc
E12	PEG 400, 30 % v/v	MES pH 6.5	Sulfato de litio
F1	Etanol	Citrato de sodio pH 5.5	Sulfato de litio
F2	PEG 1,000, 20 %v/v	Fosfato sodio/ potasio pH 6.2	Cloruro de sodio
F3	Sulfato de amonio 1.26 M	HEPES pH 7.5	
F4	Citrato de sodio 1 M	CHES pH 9.5	
F5	Cloruro de sodio 2.5 M	Tris pH 7	Cloruro de magnesio
F6	PEG 3,000, 20 % p/v	Tris pH 7	Acetato de calcio
F7	Bifosfato de sodio 1.6 M, Fosfato dipotásico 400 mM	Citrato de sodio pH 4.2	
F8	Etanol 15 % v/v	MES pH 6.0	
F9	2-Metil-2,4-pentanediol 35% v/v	Acetato de sodio pH 4.5	

F10	2-Propanol 10% v/v	Imidazol pH 8	
F11	Etanol 15 % v/v	HEPES pH 7	Cloruro de magnesio
F12	PEG 8,000, 30 % v/v	Imidazol pH 8	Cloruro de sodio
G1	2-Metil-2,4-pentanediol 35% v/v	HEPES pH 7	Cloruro de sodio
G2	PEG 400, 30 % v/v	CHES pH 9.5	
G3	PEG 3,000, 10 % p/v	MES pH 6.5	Cloruro de magnesio
G4	PEG 8,000, 20% p/v	MES pH 6.5	Acetato de calcio
G5	Sulfato de amonio 1.26 M	CHES pH 9.5	Cloruro de sodio
G6	1,4-Butanediol 20% v/v	Imidazol pH 8	Acetato de zinc
G7	Citrato de sodio 1 M	Tris pH 7.0	Cloruro de sodio
G8	PEG 1,000, 20% p/v	Fosfato sodio/ potasio pH 6.2	
G9	Fosfato monoamónico 1 M	Citrato de sodio pH 5.5	Cloruro de sodio
G10	PEG 8,000, 10% p/v	Imidazol pH 8	
G11	Bifosfato de sodio 800 mM, Fosfato dipotásico 1.2 M	Acetato de sodio pH 4.5	
G12	PEG 3,000, 10 % p/v	Citrato de sodio pH 4.2	Cloruro de sodio
H1	Tartrato mixto de potasio y sodio 1 M	Tris pH 7.0	Sulfato de litio
H2	Cloruro de sodio 2.5 M	Acetato de sodio pH 4.5	Sulfato de litio
H3	PEG 8,000, 20 % p/v	CAPS pH 10.5	Cloruro de sodio
H4	PEG 3,000, 20 % p/v	Imidazol pH 8	Acetato de zinc
H5	Sulfato de amonio 2 M	CHES pH 9.5	
H6	Etanol 15 % p/v	Tris pH 7.0	Sulfato de litio
H7	PEG 8,000, 10 % p/v	Tris pH 7.0	Cloruro de magnesio
H8	PEG 1,000, 20 % p/v	Acetato de sodio pH 6.5	Cloruro de magnesio
H9	Sulfato de amonio 1.26 M	MES pH 6.0	
H10	Sulfato monoamónico 1 M	Imidazol pH 8	Cloruro de sodio
H11	Cloruro de sodio 2.5 M	Imidazol pH 8	Acetato de zinc
H12	Tartrato mixto de potasio y sodio 1 M	MES pH 6	

Tabla 3. Condiciones del kit WIZARD II de Jena Bioscience.

Cada una de las condiciones incluidas en los Kits se probaron utilizando dos técnicas de cristalización diferentes: microbatch y difusión de vapor por gota colgante.

Para la técnica por microbatch se pipetearon volúmenes iguales de la condición de cristalización y de proteína concentrada a 20 mg/mL, utilizando 1  $\mu$ L de proteína más 1  $\mu$ L de solución de cristalización.

Para realizar los ensayos en difusión de vapor, se utilizaron 100 nL de enzima y 100 nL de solución de cristalización; los volúmenes fueron distribuidos en las placas por el robot Mosquito (TTP LabTech). En total se probaron 96 condiciones en cada caso, variando parámetros de pH, fuerza iónica y tipo de precipitante. Las placas fueron colocadas en un cuarto frío el cual tiene una temperatura constante de 18°C.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Purificación de Tripsina I a Partir del Ciego Pilórico de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*)

Se purificó tripsina a partir de 51.98 g de ciego pilórico, obteniéndose un volumen de extracto crudo de 300 mL, posteriormente se centrifugó, el sobrenadante fue descartado y se recuperaron 19.8542 g de pellet. El pellet se disolvió en amortiguador A (Tris·HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M), obteniéndose un clarificado con volumen de 99.271 mL. La enzima fue separada del resto de las moléculas del clarificado mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna sephadex G-75, obteniéndose un total de 65 fracciones de 1 mL cada una, las fracciones con mayor actividad específica para tripsina fueron colectadas para generar una sola fracción que se cargó en una columna Hi-Trap Benzamidine FF (cromatografía de afinidad). Del segundo paso cromatográfico se obtuvieron 50 fracciones de 1 mL cada una, de ellas, 11 presentaron actividad específica para tripsina, con las que generó una sola fracción que se dializó y se cargó en una columna Hi-Trap DEAE Sepharose FF; de este último paso de purificación se obtuvo una fracción de 1 mL con una concentración de proteína de 421.55 µg/mL y actividad amidasa específica para tripsina, identificada utilizando el cromógeno BAPNA 1 mM como sustrato.

En la Figura 15 se ilustra la electroforesis SDS-PAGE, realizada en condiciones desnaturalizantes y reductoras, con geles de poliacrilamida al 15%, donde se cargaron 18 µL de la muestra obtenida después de ejecutar los tres pasos de separación por cromatografía de intercambio iónico, afinidad y exclusión molecular. Según el orden de la imagen, en el carril número 1 se encuentra el marcador molecular de amplio rango (BIORAD) y en el carril 2, se cargó la muestra. El gel se reveló con una tinción de azul de Comassie, la cual permitió la identificación de una banda de 25 kDa, que corresponde a tripsina I, por lo tanto, los métodos de purificación empleados fueron suficientes para el aislamiento de la enzima con alta pureza.

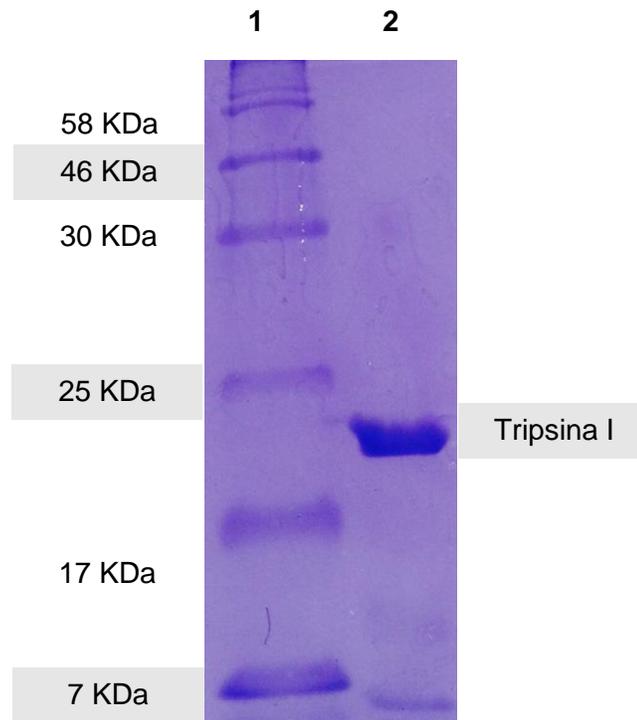


Figura 15. Perfil electroforético de tripsina I en gel de poliacrilamida al 15%, teñido con azul de Comassie.

### Tamizaje con WIZARD I y II

De manera inicial, parte de la muestra purificada se empleó para llevar a cabo los ensayos con la técnica de microbatch, en los cuales se incluyó aceite como barrera a la deshidratación de la solución. La concentración de proteína utilizada fue de 20 mg/mL, esta se distribuyó en volúmenes iguales con cada una de las condiciones de precipitación incluidas en los Kits WIZARD I y II, de los cuales se obtuvieron cristales en cuatro condiciones distintas después de 7 meses, su presencia se corroboró con un microscopio óptico. Estas condiciones consistían en: A7 (Amortiguador MES 100 mM, pH 6.0, PEG 8,000 al 10% p/v y acetato de zinc 200 mM) (Figura 16), B2 (Amortiguador MES 100 mM pH 6.5 con Citrato de sodio 1 M) (Figura 17), B3 (Amortiguador Imidazol 100 mM pH 8 con PEG 3,000 al 10% p/v y sulfato de litio 200 Mm) (Figura 18), y B4 (Amortiguador de fosfato 100 mM pH 6.2 con Cloruro de sodio 2.5 M) (Figura 19). Cada una de estas soluciones de cristalización pertenecían exclusivamente al kit WIZARD I. Los cristales presentes en los pocillos A7, B2, B3 y B4 mostraron morfologías distintas entre ellos, pero puede mencionarse que eran de características irregulares a diferencia de cristales de tripsina reportados en otros trabajos, por ejemplo, el de *Streptomyces erythraeus* generado por Blankenship y col. (2014).

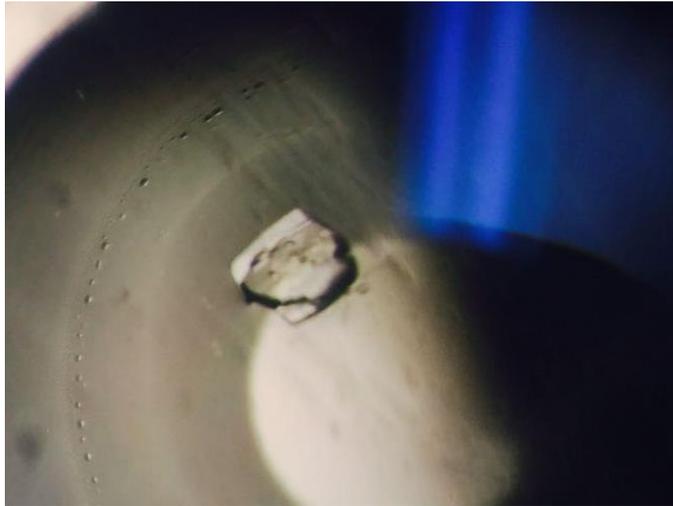


Figura 16. Cristal observado por el método de microbatch, bajo la siguiente condición: solución amortiguadora MES 100 mM, pH 6.0, PEG 8,000 al 10% p/v y acetato de zinc 200 mM. Ubicado en el pocillo A7.



Figura 17. Cristal observado por el método de microbatch en solución amortiguadora MES 100 mM pH 6.5 con Citrato de sodio 1 M; ubicado en el pocillo B2.

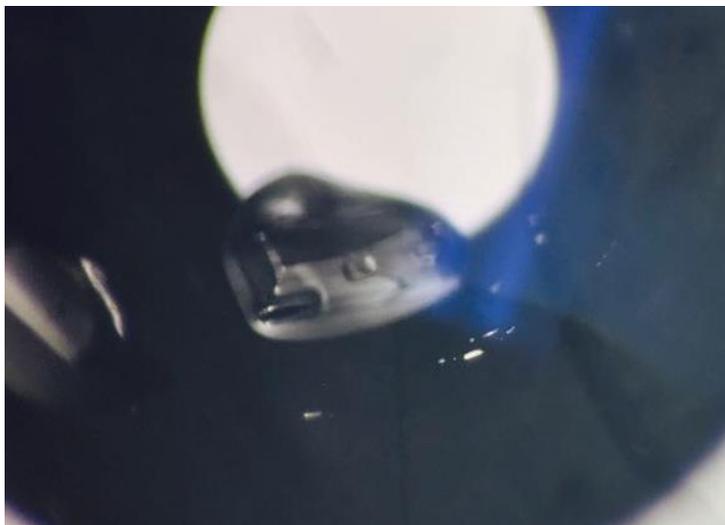


Figura 58. Cristal observado por el método de microbatch el cual se encuentra en solución amortiguadora imidazol 100 mM pH 8 con PEG 3,000 al 10% p/v y sulfato de litio 200 mM; el cual se encuentra ubicado en el pocillo B3.



Figura 19. Cristal observado por el método de microbatch con solución amortiguadora de fosfato 100 mM pH 6.2 con cloruro de sodio 2.5 M; ubicado en el pocillo B4.

En un estudio comparativo entre los métodos de difusión de vapor y microbatch realizado por Baldock y col. se utilizaron varias proteínas entre las que se incluía tripsina de bovino, y se observó que, utilizando las mismas condiciones, bajo técnicas distintas, aparecen cristales de proteína que eran exclusivas de cada método, indicando que ningún método de detección

individual se puedan encontrar todas las condiciones de cristalización de la proteína (Baldock y col., 1996).

Por ello se decidió llevar a cabo un ensayo con la técnica de difusión de vapor por gota colgante. Dado a la poca disponibilidad de muestra (8  $\mu$ L totales) y con el objetivo de optimizar el volumen disponible durante el proceso de distribución, se optó por utilizar el robot Mosquito (TTP LabTech) como herramienta, el cual trabaja en volúmenes de nanolitros, para probar las mismas 96 condiciones ensayadas por microbatch, solo que en este ensayo se aumentó la concentración de proteína agregada en cada condición. La muestra con tripsina I purificada, se concentró a 38 mg/mL con un centricon a 8  $\mu$ l. Al ejecutar la revisión de los pocillos con las condiciones ensayadas por medio de microscopio óptico, se observó el crecimiento de un sólido cristalino en una sola condición (Figura 20), la cual consistía en PEG 8,000 al 20% p/v con amortiguador HEPES 100 mM, pH 7.5, sin aditivo adicional.



Figura 206. Cristal observado por el método de difusión de vapor (gota colgante) con la condición PEG 8, 000 al 20% p/v con amortiguador HEPES 100 mM, pH 7.5; ubicado en el pocillo B9

La condición en la cual hubo crecimiento cristalino por difusión de vapor ejecutada por mosquito, fue una diferente a las observadas en los ensayos por microbatch. Es apropiado señalar que los métodos experimentales por tamizaje, diseñados para promover la sobresaturación en soluciones de proteínas, pueden generar con frecuencia sobresaturación de sus componentes inorgánicos y crecimiento de cristales de otros componentes del sistema experimental. La producción de cristales de sal es endémica en experimentos de cristalización de proteínas, esto se debe a las pequeñas constantes de solubilidad para algunas sales y a sus fuertes interacciones, que

consolidan la formación del cristal, sobre todo cuando las condiciones de pH aumentan la repulsión proteína-proteína (Navarro y col., 2009; Raghunathan y col., 2010)

Pozo	Precipitante	Amortiguador [100 Mm]	Aditivo [200 Mm]
<b>Microbatch</b>			
A7	PEG 8,000, 10 % p/v	MES pH 6.0	Acetato de zinc
B2	Citrato de sodio 1 M	MES pH 6.5	
B3	PEG 3,000, 10 % p/v	Imidazol pH 8	Sulfato de litio
B4	Cloruro de sodio 2.5 M	Fosfato sodio/ potasio pH 6.2	
<b>Difusión de Vapor</b>			
B9	PEG 8,000, 20 %p/v	HEPES pH 7.5	

Tabla 4. Resumen de condiciones experimentales con precipitados cristalinos

Según los resultados arrojados por los ensayos tanto de difusión de vapor como por microbatch (Figura 4) no se observó crecimiento de ningún sólido cristalino o precipitación amorfa bajo las condiciones incluidas en el kit WIZARD II, es decir, que tales condiciones no favorecieron la formación de núcleos, esto puede deberse a múltiples factores, por ejemplo, concentración de enzima insuficiente, tipo de precipitante equivocado (sales, polímeros), las características propias de la proteína, la temperatura o el pH.

En la práctica, es imposible resolver a simple vista si los cristales que aparecen en el desarrollo experimental son de origen proteico o salino, ya que morfológicamente son muy similares.

### Tinción Diferencial IZIT

Para determinar el origen de los cristales obtenidos en las condiciones A7, B2, B3 y B4 observadas en microbatch y B9 por difusión de vapor del kit WIZARD I, se agregó la tinción diferencial IZIT, la cual está compuesta de azul de metileno. A cada cristal se le agregó una gota, y no se observó penetración de color en la estructura cristalina, la razón de este comportamiento se atribuye a que los cristales de moléculas biológicas, al poseer una composición promedio de 25 a 90% de agua, son permeables porque cuentan con largos espacios intersticiales entre cada

una de las moléculas geoméricamente ordenadas, esto permite el paso de partículas pequeñas de forma libre; por lo tanto, si los cristales observados adquieren un tono azul al agregar la tinción IZIT, se trata de proteínas; en este caso las estructuras cristalinas obtenidas no integraron el color a su estructura, ya que los cristales de sal se caracterizan por mantener interacciones firmes en la red cristalina y son altamente ordenados, por lo que la tinción difícilmente puede penetrar (Raghunathan y col., 2010)

En la Figura 22 se observa del lado izquierdo la presencia de un cristal de sal, el cual no absorbió la tinción IZIT; del lado derecho se observan cristales de lisozima, al ser de origen proteico, estos integraron el color azul de la tinción dentro de su estructura (HR1, HR2, 2017)



Figura 21. Comparación de cristales teñidos con la tinción diferencial IZIT.

En la literatura es ampliamente citado el hecho que el proceso de cristalización de proteínas es complicado ya que es influenciado por muchos factores de manera simultánea incluyendo parámetros químicos, físicos y bioquímicos. La proteína en sí misma, más que el agente precipitante, debe considerarse como el elemento más importante en los ensayos por tamizaje, variar la concentración de proteína es uno de los factores más importantes, pues se ha logrado cristalizar proteínas en un amplio rango de 2 a 100 mg/mL (Mcperson e Gavira, 2014). En los experimentos realizados en este trabajo se emplearon concentraciones de 20 mg/mL y 37.88 mg/mL, por ello es posible que la concentración haya sido insuficiente para cristalizar tripsina bajo las condiciones ensayadas. En el caso particular de Tripsina I, existe una complicación importante, al igual que en otras serina proteasas, la búsqueda de generar cristales podría verse severamente limitada por su inestabilidad a pH fisiológico, pues poseen una fuerte

actividad de autólisis, lo que resulta en inactivación o digestión completa de la enzima (Dale y col., 2003; Blankenship y col., 2014). Esta alta capacidad de autocorte ha sido atacada en varias investigaciones mediante la inclusión de aditivos como clorohidrato de benzamidina, SBTI, ácido bórico, inhibidores sintéticos específicos, entre otros (Page y col., 2003; Rypniewski y col., 2001)

Aunque en este trabajo no se encontraron cristales de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) en las condiciones ensayadas, debe tomarse en cuenta que los experimentos basados en tamizaje de cristalización han sido exitosos en la obtención de los cristales de las dos tripsinas adaptadas al frío de organismos marinos conocidos hasta el momento salmón del atlántico norte (*Salmo salar*) y el salmón (*Oncorhynchus keta*), gracias a lo cual ha sido posible conocer sus características estructurales.

El caso de la tripsina de salmón del atlántico norte (*Salmo salar*), donde solo después de una numerosa cantidad de ensayos por gota colgante, utilizando 15 mg/mL de proteína, variando las condiciones de pH, de 2 a 10, y la concentración de sulfato de amonio como precipitante, se encontraron condiciones diversas donde se presentaba crecimiento de microcristales en periodos máximos de una semana. Entre los tipos de cristales encontrados se incluyeron formas de aguja, bote y precipitados amorfos; en cuanto al tamaño de estos, existía una variación de 0.2 x 0.3 x 0.05 mm a 0.7 x 0.6 x 0.2 mm en las diversas condiciones, donde algunos mostraron la capacidad de difractar rayos X a 1.6 Å, 1.82 Å y 2 Å (As y col., 1990)

Para tripsina la especie de salmón (*Oncorhynchus keta*), también se identificaron las características de la solución cristalizaste por medio de ensayos de variación aleatoria. Los cristales obtenidos para esta proteína con la técnica de difusión de vapor, se encontraron después de cuatro días e incluyeron distintas concentraciones de enzima, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, amortiguador Tris.HCl 3 mM, pH 8.1 y benzamidina, siendo este último un inhibidor específico de tripsina. Los cristales encontrados bajo esas condiciones adoptaron principalmente forma de prisma rectangular con dimensiones de 0.15 mm x 0.15 mm x 0.3 mm y lograron difractar rayos X a 1.54 Å (Toyota y col., 2002).

Para tripsinas mesófilas esta tendencia a cristalizar bajo condiciones incluidas en sistemas de tamizaje se repite en numerosos trabajos, ejemplos de ello son la tripsina de bovino, la tripsina de la bacteria *Streptomyces erythraeus*, la tripsina de porcino y del hongo *Fusarium oxysporum* (Blankenship y col., 2014; Stroud, 1974; Tomar y col., 2009)

Si bien el proceso de tamizaje puede estar muy limitado por la cantidad de enzima disponible es la mejor opción para identificar las variables específicas más importantes para cada enzima y para obtener cristales óptimos para determinar el patrón de difracción de la enzima por cristalografía de rayos X.

## CONCLUSIONES

Se obtuvo una banda de 25 kDa característica de tripsina I.

Bajo las 96 condiciones de cristalización evaluadas por dos técnicas distintas: microbatch y difusión de vapor por gota colgante no se observó crecimiento de cristales de proteína. Sin embargo 4 mostraron el crecimiento de sólidos cristalinos por el método de microbatch y 1 por difusión de vapor, todos ellos de origen salino según los datos arrojados por la tinción diferencial IZIT.

El tiempo necesario para establecer las condiciones por tamizaje puede ser muy prolongado, ya que es afectado por condiciones como el tipo de precipitante usado, la temperatura, el pH, la adición de aditivos y la concentración de proteína, entre otros. A pesar de las limitantes, las evaluaciones por ensayo y error, como las incluidas en este trabajo son necesarias para determinar las condiciones a las cuales la enzima pueda cristalizar, cabe destacar que en los ensayos por tamizaje es importante tomar en cuenta a aquellos precipitados amorfos que puedan llegar a formarse, pues para cada proteína la trayectoria a través del diagrama de fases será única y no todos los métodos tendrán un punto final definido.

Algunos de los blancos que pueden atacarse para aumentar la probabilidad de obtener cristales enzimáticos son aumentar la concentración de proteína por condición en las soluciones ya ensayadas en este trabajo con el fin de promover la nucleación y añadir aditivos con capacidad de inhibir la actividad autolítica de la tripsina I, lo cual ha mostrado tener éxito en la cristalización de otras tripsinas de animales marinos como el salmón (*Oncorhynchus keta*) y el salmón del atlántico norte (*Salmo salar*), ambos organismos adaptados al frío.

## RECOMENDACIONES

Para futuros experimentos, aumentar la concentración de proteína en los ensayos de tamizaje utilizando las mismas condiciones ensayadas en este trabajo incluidas en los Kits WIZARD I y II de Jena Bioscience, además realizar la evaluación de otras condiciones reportadas para tripsina de distintas especies, si es posible, agregar inhibidores específicos de tripsina, con el fin de evitar su autólisis y homogeneizar la estructura proteica en la red cristalina, así como generar la incubación a diferentes temperaturas.

## REFERENCIAS

Arvizu AA, Quintero IE, Félix M, Islas MA, Yépiz G, Pacheco R, Navare A, Fernández FM, Velázquez EF, Sotelo RR, Castillo FJ. 2012. Thermodynamic activation and structural analysis of trypsin I from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). Food Chemistry 133(3):889-904.

Ås OS, Hordvik A, Hansen LK., Hough E, Jynge, K. 1990. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of benzamidine-inhibited trypsin from the North Atlantic salmon (*Salmo Salar*). Journal of molecular biology 214(2): 355-358.

Baird T. 2013. Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2nd edition. San Francisco (CA): Elsevier. 219-219 p.

Baldock P, Mills V, Stewart PS. 1996. A comparison of microbatch and vapour diffusion for initial screening of crystallization conditions. Journal of crystal growth 168(1-4):170-174.

Blankenship E, Vukoti K, Miyagi M, Lodowski DT. 2014. Conformational flexibility in the catalytic triad revealed by the high-resolution crystal structure of *Streptomyces erythraeus* trypsin in an unliganded state. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 70(3):833-840.

Brackney DE, Isoe J, Black WC, Zamora J, Foy BD, Miesfeld RL, Olson KE. 2010. Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Journal of insect physiology 56(7): 736-744.

Brumshtein B, Greenblatt HM, Futerman AH, Silman I, Sussman JL. 2008. Control of the rate of evaporation in protein crystallization by the microbatch under oil method. Journal of applied crystallography 41(5):969-971.

Canosa EF. 2014. Bioquímica: Conceptos esenciales. Editorial Médica Panamericana S.A. 75 p.

Castillo FJ, Pacheco R, García FL, Navarrete MDL. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). Food chemistry 140(1): 91-98.

Castillo FJ, Pacheco R, Lugo ME, García G, Quintero IE. 2009. Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin. *Food chemistry* 112(3): 634-639.

Castro AB, Sánchez MDP, Márquez FJ. 2012. Characterisation and partial purification of proteolytic enzymes from sardine by-products to obtain concentrated hydrolysates. *Food chemistry* 135(2): 583-589.

Chang R y Goldsby K. 2013. *Química*. 11a. ed. McGraw-Hill. 478-486 p.

Chen RQ, Cheng QD, Chen JJ, Sun DS, Ao LB, Li DW, Lu QQ, Yin DC. 2017. An investigation of the effects of varying pH on protein crystallization screening. *The Royal Society of Chemistry* 1(3): 2-7.

Collins T, Roulling F, Piette F, Marx JC, Feller G, Gerday C, D'Amico S. 2008. Fundamentals of cold-adapted enzymes In: (Ed.). *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer. 211-227 p.

D'Amico S, Claverie P, Collins T, Georlette D, Gratia E, Hoyoux A, Meuwi MA, Feller G, Gerday C. 2002. Molecular basis of cold adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 357(1423): 917-925 p.

Dale GE, Oefner C, D'Arcy A. 2003. The protein as a variable in protein crystallization. *Journal of structural biology*. 142(1):88-97 p.

De Vecchi S, Coppes Z. 1996. Marine fish digestive proteases—relevance to food industry and the south-west atlantic region—a review. *Journal of food biochemistry* 20(1): 193-214.

Devlin TM. 2004. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4ta ed. Hoboken (NJ) Reverté. 383-385 p.

Doode S. 1999. Los claro-oscuros de la pesquería de la sardina en Sonora. *El Colegio de Michoacán, CIESAS, CIAD*. 45-78 p.

[FAO] Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura, Roma, 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf> (Fecha de acceso: 20 de enero de 2017).

Georlette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Hoyoux A, Marx JC, Sonan G, Feller G. 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperaturas. FEMS Microbiology Reviews. 28(1): 25-38.

Gerday C. 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperaturas. FEMS Microbiology Reviews. 28(1): 25 p.

GEH, GE Healthcare. (2017). Ion Exchange Chromatography Principles and Methods. Disponible en: [http://www.gelifesciences.com/file\\_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Ion%20Exchange%20Chromatography.pdf](http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Ion%20Exchange%20Chromatography.pdf) (Fecha de acceso: 3 de mayo de 2017).

GEH1, GE Healthcare. (2017). Healthcare Affinity Chromatography Vol. 3: Specific Groups of Biomolecules. Disponible en: [http://www.gelifesciences.com/file\\_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Affinity%20Chromatography%20Handbook%20-%20Specific%20Groups%20of%20Biomolecules.pdf](http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Affinity%20Chromatography%20Handbook%20-%20Specific%20Groups%20of%20Biomolecules.pdf). (Fecha de acceso: 3 de mayo de 2017).

GEH2, GE Healthcare. (2017). Size Exclusion Chromatography, Principles and Methods 2017. Disponible en: [http://www.gelifesciences.com/file\\_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Size%20Exclusion%20Chromatography.pdf](http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Size%20Exclusion%20Chromatography.pdf) (Fecha de acceso: 3 de mayo de 2017).

González LA. 2011. Cristalización de macromoléculas biológicas en condiciones terrestres y de microgravedad: la técnica de contradifusión. Tesis doctoral. Granada: Universidad de Granada. 6-15 p.

Haard NF, Simpson BK. 2000. Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality. CRC Press. New York. 215-271 p.

Hargittai I. 2014. Crystallography in Structural Chemistry. Journal of Structural Chemistry 1321–1326 p.

Horcasitas MDC, Plaza I. 2002. Enzimas con aplicación industrial. Avance y Perspectiva. 21: 279-282 p.

Hoyos N. 2017. Sobreexpresión recombinante de mutantes de tripsina III de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*). Tesis de licenciatura. Departamento de ciencias químico biológicas. Universidad de Sonora. 18-20 p.

HR, Hampton Research Solutions for Crystal Growth (2017). Crystal Growth 101. disponible en: [https://hamptonresearch.com/documents/growth\\_101/39.pdf](https://hamptonresearch.com/documents/growth_101/39.pdf) (Fecha de acceso: 15 de febrero de 2017).

HR1, Hampton Research Solutions for Crystal Growth (2017). Salt or Protein Crystals?. Disponible en: [https://hamptonresearch.com/documents/growth\\_101/20.pdf](https://hamptonresearch.com/documents/growth_101/20.pdf) (Fecha de acceso: 10 de marzo de 2017).

HR2, Hampton Research Solutions for Crystal Growth (2017). Izit Crystal Dye. Disponible en: [https://www.hamptonresearch.com/documents/product/hr008690\\_4-710\\_izit\\_user\\_guide.pdf](https://www.hamptonresearch.com/documents/product/hr008690_4-710_izit_user_guide.pdf) (Fecha de acceso: 10 de marzo de 2017).

Isaksen GV, Åqvist J, Brandsdal BO. 2014. Protein surface softness is the origin of enzyme cold-adaptation of trypsin. PLoS Comput Biol. 10(8): e1003813.

Kishimura H, Hayashi K, Miyashita Y, Nonami Y. 2006. Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). Food Chemistry 97(1): 65-70 p.

Koolman J, Röhm KH. 2005. Bioquímica: texto y atlas. 3ra ed. Madrid (E). Médica Panamericana. 168-268 p.

Liebschner D, Dauter M, Brzuszkiewicz A, Dauter Z. 2013. On the reproducibility of protein crystal structures: five atomic resolution structures of trypsin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 69(8): 1447-1462.

Luft JR, Newman J, Snell EH. 2014. Crystallization screening: the influence of history on current practice. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* 70(7): 835-853.

Mansilla AY. 2012. Estudio Estructural y Funcional del Inhibidor de Serina – Proteasas tipo Germina presente en plantas de Trigo. Tesis doctoral. Universidad nacional de mar de plata. 3-7 p.

Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. 2002. *Bioquímica*. 3ra Ed. Madrid (E). Pearson Educación. 416-419 p.

McPherson A, Gavira JA. 2014. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* 70(1): 2-20.

Müller-Esterl, W. 2008. *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Barcelona (E). Editorial Reverté. 105-107 p.

Nasri R, Younes I, Lassoued I, Ghorbel S, Ghorbel-Bellaaj O, Nasri M. 2011. Digestive alkaline proteases from *Zosterisessor ophiocephalus*, *Raja clavata*, and *Scorpaena scrofa*: characteristics and application in chitin extraction. *Journal of amino acids* 47 (1): 1957–1964.

Navarro A, Wu HS, Wang SS. 2009. Engineering problems in protein crystallization. *Separation and Purification Technology* 68(2): 129-137 p.

Page MJ, Wong SL, Hewitt J, Strynadka NCJ, MacGillivray TA. 2003. Engineering the primary substrate specificity of *Streptomyces griseus trypsin*. *Biochemistry* 42(30): 9060-9066.

Salazar AJ, Lizardi J, Ramírez JC, Valenzuela EM, Ezquerro MJ, Castillo-Yáñez FJ, Pacheco R. 2013. Acidic Proteases from Monterey Sardine (*Sardinops sagax caerulea*) Immobilized on

Shrimp Waste Chitin and Chitosan Supports: Searching for a By-product Catalytic System. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171(3):795-805.

PDB, protein data bank (2017). Yearly Growth of Structures Solved By X-ray. Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/statistics/contentGrowthChart.do?content=explMethod-xray&seqid=100> (Fecha de acceso: 10 de abril de 2017).

Raghunathan K, Harris PT, Arvidson DN. 2010. Trial by fire: are the crystals macromolecules?. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 66(5): 615-620.

Rayment I. 2002. Small-scale batch crystallization of proteins revisited: an underutilized way to grow large protein crystals. *Structure* 10(2): 147-151.

Rypniewski W, Oestergaard P, Nørregaard-Madsen M, Dauter M, Wilson KS. 2001. *Fusarium oxysporum* trypsin at atomic resolution at 100 and 283 K: a study of ligand binding. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 57(1): 8-19.

Russo I, Merlino A, Vergara A, Sica Filomena. 2013. An overview of biological macromolecule crystallization. *International journal of molecular sciences* 14(6): 11643-11691.

[SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, 2013. ANUARIO ESTADÍSTICO DE ACUACULTURA Y PESCA 2013 Disponible en: <http://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuacultura-y-pesca> (Fecha de acceso: 22 de enero de 2017).

Sanatan PT, Lomate PR, Giri AP, Hivrale VK. 2013. Characterization of a chemostable serine alkaline protease from *Periplaneta americana*. *BMC biochemistry* 14 (1): 32 p.

Siddiqui KS, Cavicchioli R. 2006. Cold-adapted enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 75(1): 403-433.

[SMC] Sociedad mexicana de cristalografía. 2001. *Cristalografía*. 3er congreso nacional. Sociedad mexicana de cristalografía. Hermosillo, S.

Stroud RM, Kay LM, Dickerson, RE. 1974). The structure of bovine trypsin: electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and at 2· 7 Å resolution. Journal of molecular biology 83(2), 185IN11193-192IN14208.

Toyota E, Kenneth KS, Kuninaga S, Sekizaki H, Itoh K, Tanizawa K, James MNG. 2002. Crystal Structure and Nucleotide Sequence of an Anionic Trypsin from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in Comparison with Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Bovine Trypsin. Journal of Molecular Biology. 324(3): 391-397.

Vandermarliere E, Mueller M, Martens L. 2013. Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. Mass spectrometry reviews. 32(6): 453-465.

Vázquez-Rowe I, Villanueva-Rey P, Hospido A, Moreira MT, Feijoo G. 2014. Life cycle assessment of European pilchard (*Sardina pilchardus*) consumption. A case study for Galicia (NW Spain). Science of the Total Environment. 476(1): 48-60.

Villalba AG, Pacheco R, Ramirez JC, Valenzuela EM, Castillo FJ, Marquez E. 2011. Partial characterization of alkaline proteases from viscera of vermiculated sailfin catfish *Pterygoplichthys disjunctivus* Weber, 1991. Fisheries Science 77(4):697-705 p.

Voet D, Voet JG. 2006. Bioquímica. 3ra Ed. Montevideo (U). Médica panamericana. 473, 533-546 p.

Whitehead PJP. 1995. Clupeidae: Sardinas, sardinetas, machuelos, sábalos, piquitinga. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. 647-656.