



Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA TIPO
KUNITZ DE LA SOYA EN LA DIGESTIÓN DE
PROTEÍNA EN CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus
vannamei***

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

CLAUDIA IVETTE MAYTORENA VERDUGO

La Paz, Baja California Sur, Diciembre 2016.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:15 horas del día 07 del Mes de Noviembre del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Efecto del inhibidor de tripsina tipo Kunitz de la soya en la digestión de proteína en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*"

Presentada por el alumno:

Claudia Ivette Maytorena Verdugo

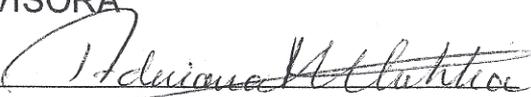
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

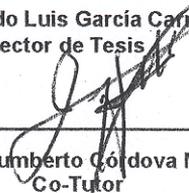
LA COMISIÓN REVISORA



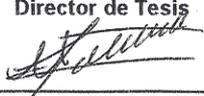
Dr. Fernando Luis García Carreño
Director de Tesis



Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
Director de Tesis



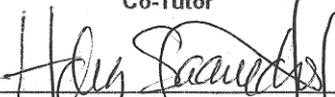
Dr. Julio Humberto Córdova Murueta
Co-Tutor



Dra. Martha Patricia Hernández Cortés
Co-Tutor



Dr. Arturo Sánchez Paz
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

Comité Tutorial

Dr. Fernando Luis García Carreño
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Co-Director de tesis

Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
Co-Directora de tesis

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Tutor

Dra. Martha Patricia Hernández Cortés
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Tutora

Dr. Arturo Sánchez Paz
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Tutor

Comité Revisor de Tesis

Dr. Fernando Luis García Carreño
Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
Dr. Julio Humberto Córdova Murueta
Dra. Martha Patricia Hernández Cortés
Dr. Arturo Sánchez Paz

Jurado de Examen

Dr. Fernando Luis García Carreño
Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
Dr. Julio Humberto Córdova Murueta
Dra. Martha Patricia Hernández Cortés
Dr. Arturo Sánchez Paz

Suplentes

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

Resumen

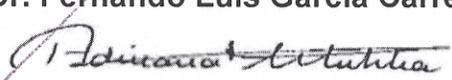
La harina de soya para fabricar alimento para acuicultura contiene moléculas que interfieren con la digestión del alimento conocidas como factores antinutricionales, tales como inhibidores de tripsina. El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto del inhibidor de tripsinas tipo Kunitz (SBTI, por sus siglas en inglés) presente en la soya sobre la actividad de las endopeptidasas digestivas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Se realizaron dos bioensayos en los que se proporcionó un alimento que incluyó 0.1 y 0.2% de SBTI en el alimento y un alimento control. En el primer bioensayo se tomaron muestras de heces de cada individuo por 6 días y al final del bioensayo se disectó la glándula digestiva. En el segundo bioensayo se tomaron muestras de la glándula digestiva a 0, 1, 2, 4, 23 y 24 h. Los resultados del primer bioensayo muestran que no hay diferencias significativas en la actividad proteolítica total de la glándula digestiva de los grupos experimentales y control ($P>0.05$). Los zimogramas mostraron diferencia en la composición de peptidasas digestivas entre los tratamientos y el control, indicando que la glándula digestiva del camarón posee capacidad de compensación. En las heces, la actividad de tripsinas y quimotripsinas disminuyó, mientras que la actividad de serino peptidasas (aún no identificadas) y metalo peptidasas aumentó. Los resultados del segundo bioensayo muestran que la actividad proteolítica total y la específica de tripsina y quimotripsina disminuyó 2 h postprandial en los grupos experimentales y aumenta a las 23 h. En este bioensayo, en individuos con fenotipos con isotripsinas CBA y CB, se observó un aumento de actividad enzimática por efecto del inhibidor, concluyendo que el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* tiene la capacidad de modificar el fenotipo de peptidasas digestivas en respuesta a la presencia de factores anti-nutricionales como el SBTI con un mecanismo de compensación enzimática el cual consiste en el aumento de la actividad de serino y metalo peptidasas.

Palabras clave:

Compensación / Camarón / SBTI

Vo. Bo. Co-Directores de tesis


Dr. Fernando Luis García Carreño


Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazan

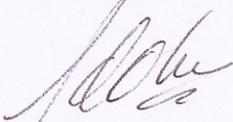
Summary

Soybean meal used to produce aquaculture feeds contains anti-nutritional factors, molecules that interfere with the digestion of food; an example are trypsin inhibitors. The objective of this research was to study the effect of Kunitz soybean trypsin inhibitor (SBTI) on the activity of digestive endopeptidases of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Two bioassays were performed including 0.1 and 0.2% of SBTI in the treatment feeds and control feed. In the first bioassay feces were sampled from each individual for 6 days and at the end of the bioassay the digestive gland was dissected. In the second bioassay, digestive glands were sampled at 0, 1, 2, 4, 23 and 24 h. In the first bioassay results show no significant differences in total proteolytic activity of the digestive gland between the experimental and control groups ($P > 0.05$). Zymograms showed the difference in the composition of digestive peptidases between treatments and control, indicating that the shrimp digestive gland has the capacity of compensation. In feces, trypsin and chymotrypsin activities decreased, whereas the activity of serine peptidases and yet unidentified metallo peptidases increased. Second bioassay results showed that the total proteolytic activity and specific trypsin and chymotrypsin activity decreased 2h postprandial, and increases at 23 h. In the second bioassay, individuals with trypsin phenotypes CBA and CB, showed an increase of activity by effect of the inhibitor, concluding that the white shrimp *Litopenaeus vannamei* has the ability to modify the phenotype of digestive peptidases in response to the presence of anti-nutritional like SBTI as a compensation enzymatic mechanism which consists in increasing the activity of serine peptidases and metallo.

Keywords:

Compensation / Shrimp / SBTI

Vo. Bo. Co-Thesis advisors



Dr. Fernando Luis García Carreño



Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazan

Dedicatoria

A mi hermano Josafat

Agradecimientos

A CONACYT por el apoyo económico recibido (beca 236062) y al proyecto CONACYT clave155119, financiado al Dr. Julio Córdova.

A CIBNOR por la formación académica e institución receptora de mi formación de posgrado.

A la Dirección de Estudios de Posgrado, Dra. Norma Hernández, Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Claudia Olachea, Lic. Leticia Rubio, Tania Nuñez y Horacio Sandoval.

Al comité tutorial Dr. Fernando García, Dra. Adriana Muhlia, Dr. Julio Córdova, Dra. Patricia Hernández y Dr. Arturo Sánchez.

A la Técnico María de los Ángeles Navarrete del Toro por introducirme en el comportamiento en el laboratorio, manejo de técnicas, equipos y mecanismos de seguridad. Por la paciencia y enseñanza de cada día.

A la Ing. Biotecnóloga Catalina Magallanes Domínguez y el estudiante de Ing. Bioquímica Jesús Eduardo Fajardo Domínguez, por compartirme sus protocolos.

A mis compañeros en mi estadía por BQ, Cris, Lili, Maguie, Betsy, Diana, Balam, Nairobi, Iván, Mario, Ana, Rocio y Tito.

A mis compañeros del posgrado desde la maestría y a mis compañeros del doctorado: Daniel, Saul, Paola, Karol, Mario, Ana Ruth, Paty, Tere, Zuamí, Elvia, Federico, Mirella y Fernando.

Contenido

Resumen.....	i
Summary.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de figuras.....	vii
Lista de tablas.....	viii
Abreviaturas.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Digestión de proteína en crustáceos.....	1
1.2 Peptidasas digestivas de peneidos.....	3
1.3 Tripsinas.....	3
1.4 Quimotripsinas.....	5
1.5 Mecanismo de catálisis.....	6
1.6 Inhibidores de peptidasas.....	6
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Alimentos usados para cultivo de organismos acuáticos.....	10
2.2 Efecto de inhibidores de peptidasas presentes en alimento.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVO.....	20
5.1 Objetivos específicos.....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1 Cuantificación de actividad específica en presencia de SBTI.....	21
6.2 Detección de complejos enzima-inhibidor entre SBTI y peptidasas digestivas por electroforesis.....	21
6.3 Preparación de alimento con SBTI.....	22
6.4 Bioensayo 1 – Efecto de 0.1 y 0.2% de SBTI en la hidrólisis de proteína en la glándula digestiva de <i>L. vannamei</i>	23
6.5 Análisis de muestras de glándula digestiva y heces.....	24
6.6 Bioensayo 2 – Efecto de 0.1 y 0.2% de SBTI en el tiempo de compensación en las peptidasas digestivas de <i>L. vannamei</i>	25
6.7 Análisis de muestras de glándula digestiva.....	26
6.8 Análisis estadístico.....	27
7. RESULTADOS.....	28
7.1 Concentración mínima de SBTI en el alimento necesaria para inhibir la actividad de las principales peptidasas digestivas in vitro.....	28
7.2 Actividad enzimática de las peptidasas del sistema digestivo de camarón en presencia de SBTI introducido en el alimento.....	30
7.3 Efecto del SBTI en el tiempo de compensación.....	35
7.4 Peptidasas que compensan la actividad inhibida en la glándula digestiva y las heces.....	37
8. DISCUSIÓN.....	41

9. CONCLUSIONES.....	51
10. BIBLIOGRAFÍA.....	52
11. ANEXOS.....	62

Lista de figuras

Figura 1. Estructura tridimensional de dos tripsinas.....	4
Figura 2. Fenotipos de tripsina del extracto enzimático de la glándula digestiva del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	5
Figura 3. Mecanismo general de catálisis de las serino peptidasas.....	7
Figura 4. Mecanismos de inhibición enzimática	8
Figura 5. Descripción del bioensayo 2	26
Figura 6. Interacción in vitro de las peptidasas de la glándula digestiva de <i>L. vannamei</i> y el inhibidor de tripsinas proveniente de la soya (SBTI).....	29
Figura 7. Presencia y actividad del SBTI en los alimentos.....	30
Figura 8. Efecto del SBTI in vivo en las peptidasas digestivas del camarón.....	31
Figura 9. Zimogramas de los extractos enzimáticos de las glándulas digestivas de camarones alimentados con SBTI	33
Figura 10. Zimogramas de extractos de heces de tres camarones de cada grupo	34
Figura 11. Efecto de SBTI en la actividad enzimática de la glándula digestiva....	35
Figura 12. Efecto de 0.2% SBTI durante el tiempo en la actividad enzimática de la glándula digestiva	36
Figura 13. Perfil de peptidasas de las heces de tres organismos (A, B y C) alimentados con 0.2% de SBTI incubadas con Pefabloc.....	38
Figura 14. Identificación de metalo peptidasas en la glándula digestiva del camarón blanco <i>L. vannamei</i>	38
Figura 15. Identificación de metalo peptidasas en la glándula digestiva de camarones con fenotipo de tripsinas CBA que fueron alimentados con SBTI	39
Figura 16. Identificación de metalo peptidasas en la glándula digestiva con fenotipo de tripsinas CB de camarones que fueron alimentados con SBTI	40

Lista de tablas

Tabla I. Peptidasas presentes en jugo gástrico y glándula digestiva de camarón blanco.	3
Tabla II. Efecto de la harina vegetal en alimentos para organismos acuáticos.....	12

Abreviaturas

anti-IgG – Anticuerpo Inmunoglobulina G
BA_pNA - N-benzoil-arginina-*p*-nitroanilida
BSA – Albúmina sérica bovina
D0 – Día cero
D1 – Día 1
D2 – Día 2
D5 – Día 5
g – Unidades de gravedad
HCl – Ácido clorhídrico
In Hg – Pulgadas de mercurio
kDa - Kilodaltons
K_i – Constante de inhibición
kJ – Kilojoules
K_m – Constante de Michaelis-Menten
mA – Milliamperios
NaCl- Cloruro de sodio
PIASA – Provedora de Ingeniería Alimentaria, S. A.
Q – Quimotripsina
SAA_pNA – Succinil- alanina-fenilalanina-*p*-nitroanilina
SBTI – Soybean trypsin inhibitor
TA – Isotripsina A
TB – Isotripsina B
TBS – Amortiguador 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5
TC – Isotripsina C
TI – Inhibidor de tripsina
TIU – Unidades de inhibidor de tripsina
TNT – Amortiguador 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0
Tris-HCl – Tris(hidroximetil)aminometano en su forma ácida
U – Unknown
V_{max} – Velocidad máxima de reacción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Digestión de proteína en crustáceos

El término digestión se refiere al proceso de fragmentación de moléculas poliméricas en alimentos para dar lugar a la formación de monómeros que el animal utiliza para la síntesis *de novo* de biomoléculas (Hill *et al.*, 2006). La digestión involucra la acción secuencial de más de una enzima y todas ellas son hidrolasas. Las enzimas proteolíticas son secretadas como zimógenos y posteriormente son convertidos a su forma activa en el lumen intestinal lo cual previene la autodigestión de las glándulas secretoras (Vasudevan y Sreekumari, 2012).

El sistema digestivo de los peneidos está dividido en cuatro regiones: 1) aparato estomodeo, 2) glándula digestiva, 3) intestino y 4) recto. El típico aparato digestivo de un decápodo consiste en un esófago corto que conduce a una amplia cámara cardiaca y una cámara pilórica posterior más pequeña, separada de la porción cardiaca por una válvula. El esófago y las cámaras cardiaca y pilórica están revestidos de un exoesqueleto cuticular que se engrosa de distintas formas para proporcionar un refuerzo estructural y puntos externos de inserción muscular. Existen tres dientes que se asientan internamente en la porción posterior de la cámara cardiaca, formando el molino gástrico. El movimiento de las paredes del estómago se controla mediante una compleja serie de músculos que rodean el estómago. La cámara pilórica se divide en una porción dorsal, que conduce directamente al intestino y una glándula filtradora ventral bilobulada, que a su vez conduce a la glándula digestiva a través de dos conductos, uno desde cada lóbulo de la glándula filtradora. La porción dorsal de la cámara pilórica está separada de la ventral por una fila de dentículos pareados que evitan que entren partículas grandes de la glándula filtradora (Ruppert y Barnes, 1996).

La glándula digestiva es un órgano compacto compuesto de túbulos ciegos conectados al epitelio con un polo luminal con microvellosidades y con tejido conectivo. Se comunica con la parte anterior del intestino medio a través de conductos y la principal función de la glándula digestiva es la secreción de enzimas y absorción de nutrientes (Hill *et al.*, 2006).

La glándula digestiva también se conoce como hepatopáncreas; sin embargo, el término es inapropiado en la medida en que exagera la similitud existente con el hígado y el páncreas de los vertebrados (van Weel, 1974). El material del alimento que es demasiado grande para pasar a través de la glándula filtradora y entrar en la glándula digestiva se transporta desde la región dorsal de la cámara pilórica hasta el intestino, donde el epitelio digestivo del extremo anterior del intestino secreta un tubo membranoso, la membrana peritrófica, que envuelve al material que ha de ser eliminado del proctodeo en forma de heces (Ruppert y Barnes, 1996).

En la glándula digestiva se pueden encontrar cinco tipos de células: 1) E (no diferenciadas): se localizan en el extremo distal de los túbulos, 2) R (de resorción): se distribuyen a través de los túbulos y se caracterizan por tener un gran número de vacuolas, 3) F (basofílicas o fibrilares): se encuentran en las regiones distales de los túbulos secretores, y en ellas ocurre la transcripción de enzimas digestivas como tripsina, catepsina L, amilasa y quitinasa, 4) B (vesiculares): están en la parte proximal de los túbulos secretores y contienen una vacuola supranuclear con un ambiente ácido, y en ellas se almacenan las enzimas digestivas y se ha propuesto que éste tipo de células provienen de las células F, y 5) M (basales): se localizan en la región periférica de los túbulos (Dall *et al.*, 1991; Lehnert y Johnson, 2002; Nunes *et al.*, 2014).

1.2 Peptidasas digestivas de peneidos

Durante el desarrollo ontogénico de los crustáceos suceden cambios en la estructura y fisiología del sistema digestivo (Andrés *et al.*, 2010). Incluso se ha reportado que la composición de peptidasas varía entre los diferentes estadios larvales de los crustáceos. En adultos, las serino peptidasas (tripsinas y quimotripsinas) son las principales enzimas que hidrolizan a la proteína del alimento (Lemos *et al.*, 2002). Recientemente se han identificado peptidasas del tipo cisteíno y metalo que también participan en el proceso de digestión (Tabla I).

Tabla I. Peptidasas presentes en jugo gástrico y glándula digestiva de camarón blanco.

Peptidasa	Clase	Masa (KDa)	Cita
Quimotripsina	Serino	33.2	(Hernández-Cortés <i>et al.</i> , 1997)
Quimotripsina	Serino	24.1	(Navarrete del Toro <i>et al.</i> , 2011)
Tripsina C	Serino	23	(Sainz <i>et al.</i> , 2004)
Tripsina B	Serino	22	(Sainz <i>et al.</i> , 2004)
Tripsina A	Serino	21	(Sainz <i>et al.</i> , 2004)
Zinc peptidasa	Metalo	27.8*	(Zhao <i>et al.</i> , 2007)
Catepsina B	Cisteíno	26.9	(Stephens <i>et al.</i> , 2012)
Catepsina L	Cisteíno	35.8	(Le Boulay <i>et al.</i> , 1996)
Colagenasa	Serino	29	(Burgos-Hernández <i>et al.</i> , 2005)

*Masa deducida

1.3 Tripsinas

Las tripsinas (E.C.3.4.21.4) pertenecen a la familia S1 de las endopeptidasas del tipo serino. Estas enzimas tienen una preferencia por residuos de arginina o lisina en la posición P1 para el anclaje del sustrato, los sitios de anclaje secundarios en los extremos contribuyen en la eficiencia catalítica, pero no a la especificidad por el sustrato (Rawlings y Salvesen, 2013). Las tripsinas muestran características especie-específicas ya que su función depende de los hábitos alimenticios del organismo, la composición del alimento y diferencias en el

proceso de digestión de proteína. Estas diferencias se deben a respuestas adaptativas a diferentes estilos de vida, ambiente y a las estrategias de supervivencia de cada especie (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008). La estructura tridimensional de las tripsinas de la familia S1 es conservada tomando en cuenta que la estructura primaria es variada. La estructura de las tripsinas está conformada por una sola cadena polipeptídica y la triada catalítica (His57, Asp102 y Ser195) se localiza entre dos dominios de placas beta.

En comparación con las tripsinas de los mamíferos, las tripsinas de los crustáceos están menos expuestas a la autólisis debido al poco acceso a los sitios de anclaje por parte de otras peptidasas (Hehemann *et al.*, 2008). En la figura 1 se puede observar la estructura tridimensional de una tripsina del cangrejo *Cancer pagurus* (Fig. 1A) la cual tiene menos residuos de Arg/Lys disponibles los cuales son los sitios de hidrólisis en comparación con la tripsina de rata café *Rattus norvegicus* que tiene una mayor cantidad de residuos de Arg/Lys (Fig. 1B). También, se puede observar que la tripsina del cangrejo carece de dos puentes disulfuro en comparación con la tripsina de rata café.

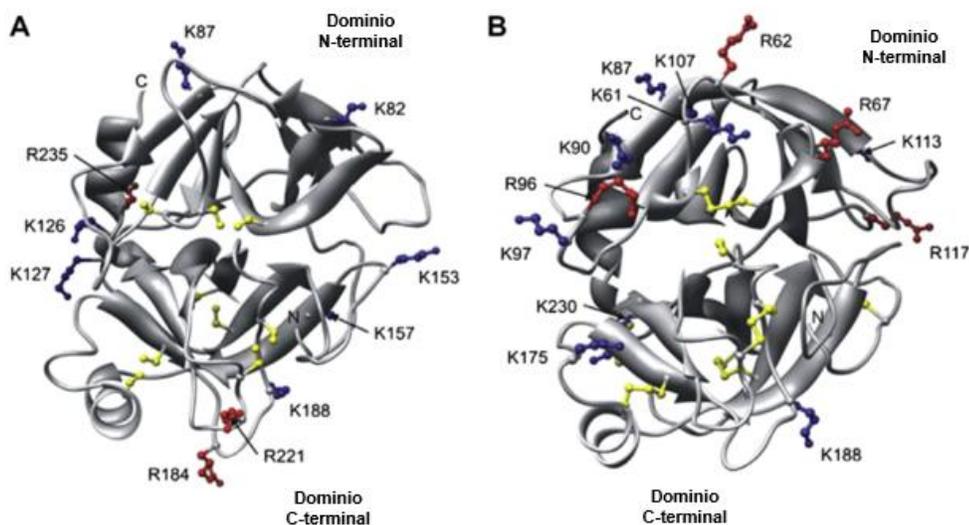


Figura 1. Estructura tridimensional de dos tripsinas. A) Tripsina de *Cancer pagurus*, B) Tripsina de *Rattus norvegicus*. (Hehemann *et al.*, 2008).

Las tripsinas de la glándula digestiva del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) son proteínas con masas de 21 a 23 kDa que son almacenadas como zimógenos en las células B de la glándula digestiva para después ser secretadas y activadas una vez que el camarón se alimenta (Sainz *et al.*, 2004). El camarón blanco puede presentar tres fenotipos de tripsinas (Fig. 2), los especímenes con fenotipo 1 presentan tres isotripsinas: A, B y C, los especímenes con fenotipo 2 poseen las isotripsinas A y C y los especímenes con fenotipo 3 tienen las isotripsinas B y C, siendo la isotripsina C la que tiene mayor eficiencia fisiológica (Sainz *et al.*, 2005).

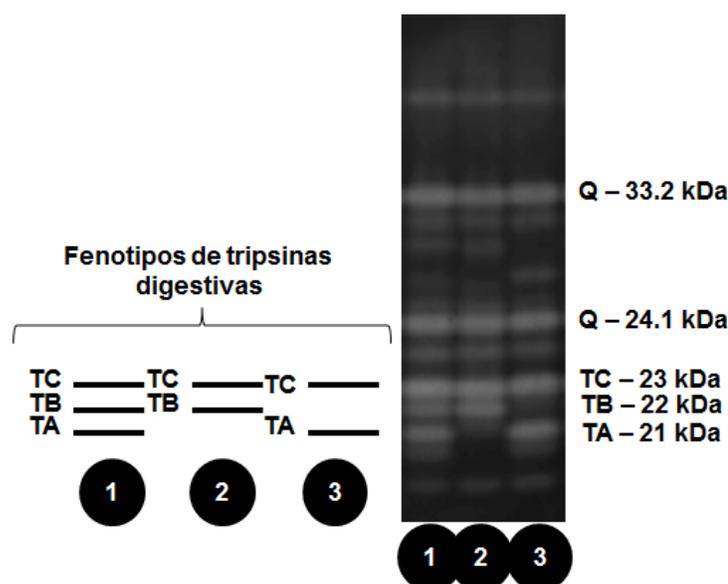


Figura 2. Fenotipos de tripsina del extracto enzimático de la glándula digestiva del camarón blanco *L. vannamei*. 1) Fenotipo con isotripsinas C, B y A; 2) Fenotipo con isotripsinas C y B; 3) Fenotipo con isotripsinas C y A.

1.4 Quimotripsinas

Las quimotripsinas (E.C. 3.4.21.1) son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos formados por grupos carbonilos de tirosina, fenilalanina y triptófano y leucina y pertenecen a la familia S1 de las peptidasas del tipo serino. A pesar de que las tripsinas y las quimotripsinas comparten los residuos de

aminoácidos de la triada catalítica y el mecanismo de catálisis, las quimotripsinas tienen un bolsillo específico (Ser189, Gly216 y Gly/Ala226) que les permite ampliar la variedad de sustratos que pueden hidrolizar. Las quimotripsinas digestivas de peneidos tienen los residuos de aminoácidos Gly189 y Asp226 a diferencia de las tripsinas Asp189 y Gly226 (Navarrete-Del-Toro *et al.*, 2015). En la glándula digestiva del camarón blanco se tiene reporte de dos quimotripsinas, una de 33.2 kDa y otra de 25 kDa (Hernández-Cortés *et al.*, 1997; Van Wormhoudt *et al.*, 1992).

1.5 Mecanismo de catálisis

El mecanismo de catálisis para las serino peptidasas es un ataque nucleofílico del hidroxilo del residuo Ser195 al grupo carbonilo del sustrato asistido por el residuo His57, el cual actúa como una base general para producir un intermediario tetraédrico. El residuo His57-H⁺ es estabilizado formando un puente de hidrógeno con el residuo Asp102. El oxianión del intermediario tetraédrico es estabilizado mediante la interacción con los grupos NH de la cavidad oxianiónica. Posteriormente, el intermediario tetraédrico se colapsa con la expulsión del sustrato cuando el residuo His57-H⁺ actúa como un ácido general y la enzima queda en una forma acilada. La reacción de deacilación comienza cuando una molécula de agua forma un segundo intermediario tetraédrico con la ayuda del residuo His57. Este intermediario se colapsa al expulsar el residuo Ser195 y un ácido carboxílico y la enzima regresa a su conformación original (Fig. 3) (Hedstrom, 2002).

1.6 Inhibidores de peptidasas

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que se unen a enzimas mediante enlaces débiles (inhibición reversible o mediante enlaces covalentes (inhibición irreversible) con el objetivo de disminuir la actividad enzimática

(Campbell y Reece, 2007). Los inhibidores de peptidasas pueden ser proteínas o compuestos químicos (inhibidores sintéticos) que ayudan a prevenir una proteólisis no deseada. Los inhibidores proteicos de serino peptidasas difieren entre sí en tamaño, y pueden variar entre los 29 a 400 residuos de aminoácidos, siendo el mecanismo de inhibición la principal diferencia entre una amplia gama de inhibidores conocidos (Schoofs y Salzet, 2002).

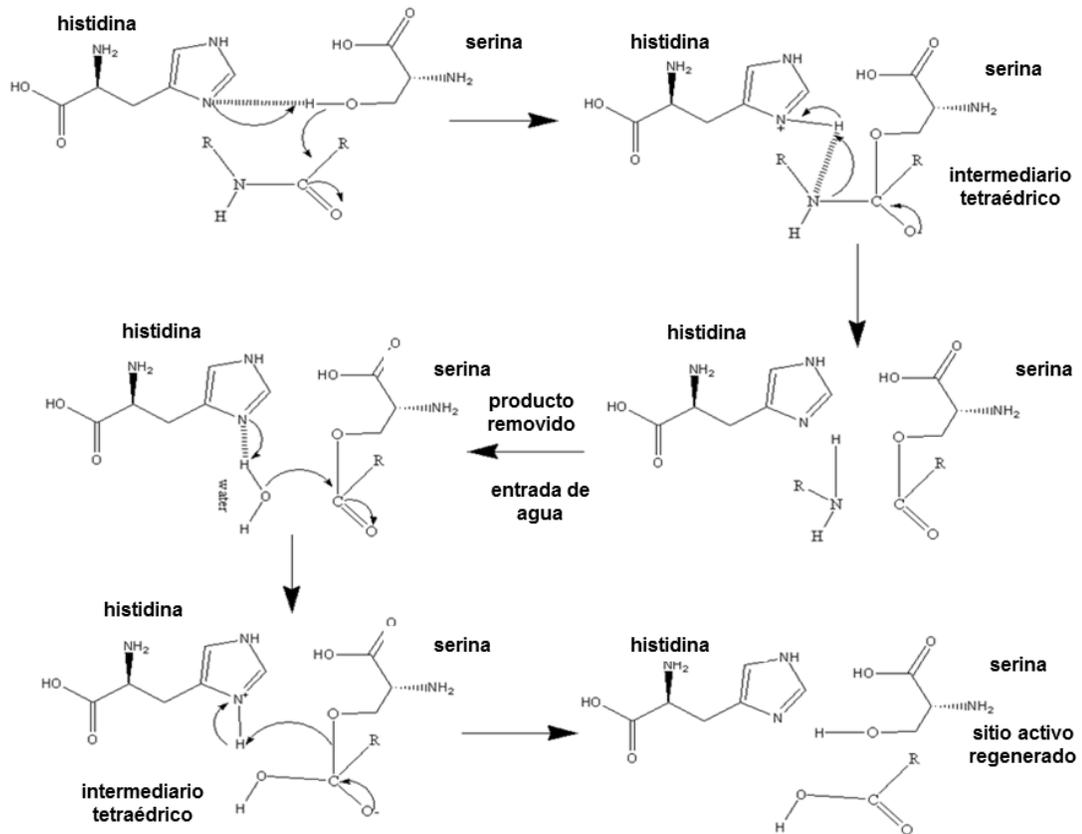


Figura 3. Mecanismo general de catálisis de las serino peptidasas (Modificado de Hedstrom, 2002).

Los mecanismos de inhibición conocidos son tres: 1) inhibición competitiva, el inhibidor tienen similitudes estructurales con el sustrato y ambos compiten por interactuar con el sitio activo de la enzima por lo que se requiere una mayor concentración del sustrato para obtener la mitad de la velocidad máxima de reacción y por consecuencia la constante de Michaelis-Menten (K_m) aumenta. El

aumento de la concentración del sustrato desplaza a las moléculas del inhibidor en el medio por lo que la velocidad máxima de reacción (V_{max}) no se ve afectada; 2) no competitiva, en este tipo de inhibición el inhibidor no interactúa con el sitio activo de la enzima por lo que el K_m no se ve afectado y la V_{max} aumenta al encontrarse más moléculas de la enzima con capacidad catalítica en el medio y 3) inhibición acompetitiva, en este tipo de inhibición el K_m y la V_{max} disminuyen porque el inhibidor puede acoplarse a la enzima cuando ésta está formando un complejo con el sustrato (Fig. 4; Koolman y Röhm, 2005; Nelson y Cox, 2012).

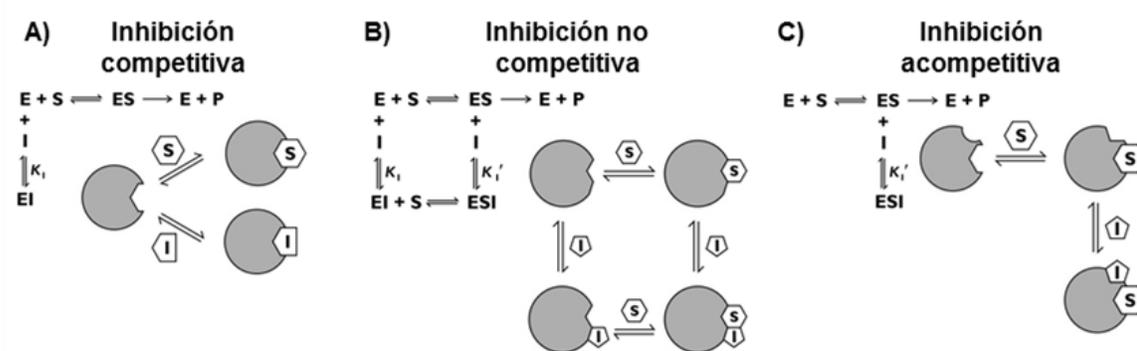


Figura 4. Mecanismos de inhibición enzimática. E= Enzima, S= Sustrato, I= Inhibidor. Figuras circulares representan enzimas (Modificado de Nelson y Cox, 2012).

La estructura de los inhibidores tipo Kunitz está formada por un α -hélice y hasta doce placas β (Oliva *et al.*, 2010). El SBTI es una cadena de 181 aminoácidos con dos puentes disulfuro (DiBella y Liener, 1969), tiene una masa molecular de 20.1 kDa, es termoestable y no se inactiva a pH ácido (3.0) (Beynon y Bond, 2001). El sitio reactivo está conformado por Pro(P_4), Ser(P_3), Tyr(P_2), Arg(P_1), Ile(P'_1), Arg(P'_2), Phe(P'_3), Ile(P'_4), Ala(P'_5) y Glu(P'_6), en donde el sitio P_1 indica la especificidad del inhibidor con la enzima, los sitios P_1 con lisina y arginina son específicos para inhibir tripsina mientras que los sitios P_1 con leucina y metionina inhiben quimotripsina (Laskowski y Kato, 1980). El mecanismo de inhibición del SBTI es del tipo canónico, lo que significa que entre la enzima y el

inhibidor hay una interacción no covalente similar al complejo enzima sustrato. El inhibidor bloquea el sitio activo de la enzima en donde el enlace peptídico entre los aminoácidos en la posición $P_1-P'_1$ interactúa con el sitio S_1 de la enzima (Enzima + Inhibidor, E+I), se forma un complejo no covalente entre la enzima y el inhibidor, en donde finalmente I es modificado en $P_1-P'_1$ (E+I*) (Laskowski y Kato, 1980; Ranasinghe y McManus, 2013).

2. ANTECEDENTES

2.1 Alimentos usados para cultivo de organismos acuáticos

Los ingredientes para preparar alimentos para la acuicultura contienen nutrientes como proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales. Existen algunas consideraciones para la selección de ingredientes, como sus características fisicoquímicas: digestibilidad, palatabilidad y la eficiencia de utilización (Martínez-Córdova *et al.*, 2014). Para cumplir con la demanda de alimentos para la acuicultura, se ha recurrido a materias primas como la harina de pescado, harina de camarón y harina de desechos de calamar, que aportan proteína. Sin embargo, la disponibilidad y precio hacen que se haya recurrido a ingredientes como la harina de soya o trigo, gluten de trigo, aceite de pescado, lecitina de soya y levadura (Molina-Poveda y Villarreal-Colmenares, 2008).

La harina de soya es una fuente de proteína de bajo costo y es usada en la elaboración de alimento para animales; sin embargo su uso en algunos organismos acuáticos ha generado resultados adversos (Yu *et al.*, 2013). La soya contiene inhibidores de peptidasas con la capacidad de disminuir la actividad de las peptidasas digestivas. Además, otras moléculas como lectinas, saponinas, ácido fítico, fitoestrógenos y antivitaminas pueden afectar la digestión y en consecuencia la absorción de nutrientes. En conjunto este tipo de compuestos se conocen como factores antinutricionales (Francis *et al.*, 2001). Los factores antinutricionales pueden clasificarse en cuatro grupos:

- I. Factores que afectan la digestión de proteína (Inhibidores de peptidasas, taninos y lectinas).
- II. Factores que afectan la utilización de minerales (Fitatos, gossipol, oxalatos y glucosinolatos).
- III. Antivitaminas.

- IV. Miscelaneos (Micotoxinas, mimosina, cianógenos, nitrato, alcaloides, agentes fotosensibles, fitoestrógenos y saponinas).

La harina y aceite de pescado son los componentes más usados para la producción de alimentos para peces y crustáceos. Esta preferencia se debe a la proporción entre proteínas y lípidos de estos ingredientes, sin embargo la demanda de estos insumos es alta, en México se producen entre 170,000 y 210,000 toneladas de alimento para camarón, del cual entre el 8 y 40% es harina de pescado y entre el 1 y 4% es aceite de pescado (Tacon y Metian, 2008).

La sustitución de harina de pescado por harina de soya tiene algunas desventajas como el bajo contenido de ácidos grasos *n-3* y la presencia de factores antinutricionales que pueden inhibir a las enzimas digestivas, aun así, en cultivo semi-comercial se ha llegado a reducir la harina de pescado de 30 a 6 g por cada 100 g de alimento con una mezcla compuesta de harina de soya (70%) y harina de canola (30%) (Suárez *et al.*, 2009). En el salmón del Atlántico se ha reportado que la inclusión de 30% de harina de soya puede generar una reducción de peso y cambios morfológicos en el intestino así como cambios en la actividad de tripsina (Krogdahl *et al.*, 2003). En la Tabla II, se muestra el efecto de la inclusión de harina de origen vegetal en alimentos en los consumidores. La presencia de inhibidores de tripsina en los alimentos para camarón ya se sospechaba desde 1990 (Lim y Dominy, 1990).

Tabla II. Efecto de la harina vegetal en alimentos para organismos acuáticos.

Especie – Nombre común	Proporción de harina vegetal	Efecto en el consumidor	Referencia
Peces			
<i>Oncorhynchus mykiss</i> – Trucha arcoiris	Mezcla: Harina de maíz (33.40%) / Harina de trigo (28.74%) / Guisantes extruidos (23.47%) / Harina de colza (14.37%)	Afecta la expresión de proteínas que participan en el metabolismo primario.	(Vilhelmsson <i>et al.</i> , 2004)
<i>Rachycentron canadum</i> – Cobia	De 10 a 60% de harina de soya	A partir de 50% de harina de soya se registró pérdida de peso del 16% y peces alimentados con 60% harina de soya hasta 24% de pérdida de peso. Disminución de la tasa de eficiencia protéica y la proteína utilizada neta.	(Chou <i>et al.</i> , 2004)
<i>Salmo salar</i> L. – Salmón Atlántico	Harina de soya – 20%	Cinco días después de la primera alimentación se observó inflamación en el intestino. La actividad de tripsina y quimotripsina aumentó después de 7 días.	(Chikwati <i>et al.</i> , 2013)
<i>Salmo salar</i> L. – Salmón Atlántico	Harina de soya – 25% (1.07 g/kg de saponinas)	Enteritis severa.	(Silva <i>et al.</i> , 2015)

Tabla II. Continuación

<i>Platichthys stellatus</i> – Lenguado	De 20 a 100% de harina de soya	La actividad de pepsina y tripsina en estómago, glándula digestiva anterior y posterior aumentó con 40% de harina de soya pero decreció cuando se sustituyó el 100% de harina de pescado con harina de soya.	(Li <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sparus aurata</i> – Dorada	Harina de soya (300 g/kg) / Gluten de trigo (164 g/kg) / Trigo (157 g/kg)	La actividad de peptidasa alcalina, α - amilasa, lipasa y capacidad de absorción de nutrientes disminuyeron.	(García-Meilán <i>et al.</i> , 2016)
Crustáceos			
<i>Litopenaeus vannamei</i> – Camarón blanco	Harina de soya – 14, 28, 42, 56 y 70%	Después de 14 días de alimentación, la tasa de crecimiento disminuyó con 42, 56 y 70% de harina de soya en el alimento. El consumo de alimento también disminuyó con 56 y 70% de harina de soya.	(Lim y Dominy, 1990)
<i>Penaeus monodon</i> – Camarón tigre	Harina de soya desgrasada – 15, 25, 35, 45 y 55%	Con 35% de harina de soya desgrasada se obtuvo una mayor ganancia de peso y sobrevivencia.	(Piedad-Pascual <i>et al.</i> , 1990)
<i>Penaeus monodon</i> – Camarón tigre	Harina de frijol de lupino – 71.20%	Después de 42 días de alimentación se obtuvo un 17% de mortalidad y disminución en eficiencia protéica.	(Sudaryono <i>et al.</i> , 1995)
<i>Penaeus monodon</i> – Camarón tigre	Harina de canola – 64%	Menor tasa de crecimiento después de 42 días de alimentación.	(Buchanan <i>et al.</i> , 1997)

Tabla II. Continuación

<i>Penaeus monodon</i> – Camarón tigre	Harina de chícharo – 20, 40, 60, 80 y 100%	El 100% de harina de chícharo generó pérdida de peso.	(Bautista-Teruel <i>et al.</i> , 2003)
<i>Litopenaeus vannamei</i> – Camarón blanco	Harina de soya – 60, 80 y 100. Harina de soya con harina de krill – 100%	Se obtuvieron mejores resultados con la adición de harina de krill.	(Samocha <i>et al.</i> , 2004)
<i>Penaeus monodon</i> – Camarón tigre	Harina de caupí y frijol mungo bajo diferentes tratamientos con concentraciones de 2.1 a 44.7 mg/g de inhibidor de tripsina	Vacuolización anormal en la pared de la glándula digestiva. Necrosis en células epiteliales. Inflamación de hemocitos.	(Kumaraguru Vasagam <i>et al.</i> , 2007)
<i>Litopenaeus vannamei</i> – Camarón blanco	Harina de soya – 46, 59, 75, 88 y 100%	La sustitución del 100% de harina de pescado con harina de soya redujo el peso.	(Alvarez <i>et al.</i> , 2007)
<i>Litopenaeus vannamei</i> – Camarón blanco	Harina de soya - 35, 42, 45.5 y 49%. Harina de canola – 15, 18, 19.5 y 21%	Después de 95 días de alimentación con 45.5% harina de soya y 19.5% harina de canola se obtuvo menor sobrevivencia.	(Suárez <i>et al.</i> , 2009)
<i>Litopenaeus vannamei</i> – Camarón blanco	Harina de soya – 50% + 10% harina de origen animal, + 10% harina de pescado, + 10% harina de chícharo	La combinación de harina de soya con otro tipo de harinas redujo la tasa de mortalidad.	(Sookying y Davis, 2011)

Tabla II. Continuación

<i>Litopenaeus vannamei</i> – Camarón blanco	Proteína de soya – 7.9 y 16.7% en combinación con 40 y 28.3% de harina de pescado, calamar y krill	La inclusión de proteína de soya en una proporción menor al 20% no afectó negativamente la tasa de crecimiento ni ganancia de peso.	(Gong <i>et al.</i> , 2012)
<i>Pacifastacus leniusculus</i> – Langostino del Pacífico	Harina de soya - 25, 35 y 45%	Disminución de peso en organismos alimentados con 35 y 45% de harina de soya.	(Fuertes <i>et al.</i> , 2012)
<i>Marsupenaeus japonicus</i> – Camarón kuruma	Harina de soya – 13.39, 16.33 y 19.29%. Harina de canola – 12.20, 14.91 y 17.59	La tasa de sobrevivencia disminuyó al sustituir el 100% de harina de pescado con la mezcla de harina de soya y canola. La actividad proteolítica total también disminuyó después de 60 días de alimentación.	(Bulbul <i>et al.</i> , 2016)
<i>Litopenaeus vannamei</i> – Camarón blanco	Concentrado de soya – 150, 260 y 345 g/kg	A partir de 26% de concentrado de soya se observó una disminución en peso.	(Sabry-Neto <i>et al.</i> , 2016)

2.2 Efecto de inhibidores de peptidasas presentes en alimento

La importancia de estudiar el efecto de inhibidores de peptidasas en el sistema digestivo del camarón blanco, es que éstas moléculas pueden afectar la digestibilidad de proteína y por consiguiente el metabolismo de nutrientes provenientes de la dieta como se demostró en la Tabla II. Estudios previos han utilizado a los insectos como modelo de estudio debido a los efectos económicos adversos que causan en la agricultura. En la mayoría de los insectos estudiados, las peptidasas digestivas son del tipo serino y cisteíno, y en algunos casos del tipo aspártico. El arroz y la papa sintetizan inhibidores específicos para reducir la actividad de las peptidasas de insectos plaga, pero esta estrategia ha tenido un éxito limitado debido a que los insectos se han adaptado rápidamente a la presencia de inhibidores en su dieta (Zhu-Salzman y Zeng, 2014).

Li *et al.* (2007, 2010) evaluaron el efecto de los inhibidores de tripsina tipos Bowman-Birk y Kunitz de la soya en las rutas asociadas con el metabolismo de carbohidratos y lípidos en larvas de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y se observó un incremento en la concentración de fructosa-6-fosfato, el cual es un intermediario en la glucólisis. Así mismo, se reportó una disminución en la concentración de ácido cítrico y ácido isocítrico, dos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA, por sus siglas en inglés). Otro de los efectos que se encontraron al alimentar a las larvas con este tipo de inhibidores fue en la longitud de las microvellosidades que protegen al lumen en células epiteliales de la glándula digestiva. Se analizó la expresión de proteínas y se encontró una sobreexpresión de quitinasas y de una peptidasa del tipo serino, contrario a lo reportado en otros insectos, no se registró una sobreexpresión con peptidasas del tipo cisteíno.

En 2007, Amirhusin *et al.* probaron el efecto sinérgico de inhibidores de serino, cisteíno y aspártico peptidasas en larvas del gorgojo del garbanzo,

Callosobruchus maculatus encontrando un aumento en el tiempo de desarrollo de la larva hasta alcanzar el estadio adulto, en comparación con el efecto de inhibidores suplementados de manera individual.

En especies de interés para la acuicultura se ha reportado que la sustitución del 40% de harina de pescado con harina de soya (que contiene inhibidores de tripsina) en alimento para el tiburón chino *Myxococyprinus asiaticus*, reduce significativamente la actividad de peptidasas digestivas provocando trastornos fisiológicos como desordenes en las microvellosidades epiteliales lo que provoca daños en las vellosidades intestinales y que se reduzca la actividad de las enzimas digestivas lo que genera la disminución en la digestión y absorción de nutrientes (Yu *et al.*, 2013). En el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) la actividad de tripsina se reduce significativamente cuando se alimenta con concentrados de soya, provocando un estado de enteropatía severa (Baeverfjord y Krogdahl, 1996; Penn *et al.*, 2011).

En los crustáceos existe escasa información sobre el efecto de inhibidores de peptidasas en la digestión. En el camarón tigre (*Penaeus monodon*) se han observado lesiones en la glándula digestiva cuando se les alimenta con germinados de frijol, en donde las concentraciones de inhibidor de tripsina pueden variar de 12 a 44 mg/g, lo que lleva a la vacuolización de las células B que se encuentran en los túbulos de la glándula digestiva, así como la infiltración de hemocitos en el intestino y daños en la pared intestinal (Kumaraguru Vasagam *et al.*, 2007). La pulga de agua dulce *Daphnia magna* puede alimentarse de cianobacterias que contienen inhibidores de tripsinas (cianopeptolinas) e inhibidores de quimotripsinas (nostopeptina BN920 y cianopeptolina 954) como metabolitos secundarios (Von Elert *et al.*, 2005, Weckesser *et al.*, 1996). En procesos de eutrofización la población de cianobacterias aumenta, y se ha sugerido que pudiera ser una de las principales causas de la disminución de la población de *D. magna* en lagos, por lo que se estudió el efecto de inhibidores de

tripsinas y quimotripsinas en diferentes cepas de *D. magna*. Así, se observó que los alimentados con cianobacterias que contenían exclusivamente inhibidores de quimotripsina estimularon la síntesis de tripsinas y dos quimotripsinas diferentes a las que se expresan normalmente en la glándula digestiva (Schwarzenberger *et al.* 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

La inclusión de harina de soya en los alimentos para acuicultura no ha sido exitosa en su totalidad ya que se ha demostrado que sobrepasando ciertas concentraciones, los resultados pueden llegar a ser adversos para el consumidor, lo que resultaría en un impacto económico. Algunos estudios han indicado que las peptidasas digestivas de peces han disminuido su actividad con concentraciones mayores al 40% de harina de soya en el alimento, mientras que en peneidos se han observado daños en el sistema digestivo. El aporte científico de esta investigación radica en conocer si el sistema digestivo del camarón, como en otros artrópodos, tiene la capacidad responder ante la presencia del SBTI, lo que indicaría que se estaría reconociendo al inhibidor y por lo tanto aumentando la actividad de peptidasas digestivas, por lo que se generó una pregunta científica: ¿Posee el camarón blanco la capacidad metabólica de compensación en respuesta a ingesta de inhibidores de peptidasas? Al contestar la pregunta anterior se aportaría conocimiento a la biología general de los peneidos y se daría evidencia de que la compensación enzimática pudiera ser una generalidad en los artrópodos ya que el fenómeno se ha demostrado en diferentes órdenes de insectos y en un crustáceo cladócero, siendo este trabajo el primer ejemplo de un crustáceo decápodo con la capacidad de compensación enzimática.

4. HIPÓTESIS

Si el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), como otros artrópodos, posee diferentes clases de peptidasas digestivas, entonces, es posible que también tenga capacidad para compensar ante la presencia de inhibidores de tripsina.

5. OBJETIVO

Estudiar el efecto de la ingesta de inhibidor de tripsina tipo Kunitz en el sistema digestivo de camarón blanco.

5.1 Objetivos específicos

- 1) Cuantificar la concentración mínima de SBTI en el alimento necesaria para inhibir la actividad de las principales peptidasas digestivas *in vitro*.
- 2) Cuantificar la actividad enzimática de las peptidasas del sistema digestivo de camarón en presencia de SBTI introducido en el alimento.
- 3) Estudiar el efecto del SBTI en el tiempo de compensación.
- 4) Identificar a las peptidasas que compensa la actividad inhibida en la glándula digestiva y las heces.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cuantificación de actividad específica en presencia de SBTI

Para evidenciar que el SBTI tiene la capacidad de inhibir a las serino peptidasas del camarón blanco se incubaron 5 µg de extracto enzimático de la glándula digestiva del camarón con 1 µg de SBTI (#T9003, Sigma-Aldrich) y se tomaron muestras a diferente tiempo de incubación (0, 1, 2, 3 y 4 h). Se cuantificó la actividad proteolítica total con azocaseína al 0.5% (Garcia-Carreño *et al.*, 1994) y la actividad de tripsinas y quimotripsinas utilizando como sustrato 1 mM BA_pNA y 0.1 mM SAA_pNA, respectivamente (Garcia-Carreño *et al.*, 1994).

6.2 Detección de complejos enzima-inhibidor entre SBTI y peptidasas digestivas por electroforesis

Se incubaron 5 µg de extracto enzimático de glándula digestiva de camarón con 1 µg de SBTI a temperatura ambiente y se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación (0, 1, 2, 3 y 4 h). Para detener la reacción en cada muestra, se agregó amortiguador de muestra para electroforesis nativa (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 25% glicerol y 1% azul de bromofenol) en una relación 1:1 (v/v) y se mantuvieron a -20°C hasta su uso. Las proteínas fueron separadas en geles de electroforesis de acrilamida al 12% en condiciones nativas aplicando 15 mA por gel y manteniendo una temperatura de 2°C.

Para evidenciar la actividad de las peptidasas, el gel se lavó con agua destilada y se incubó en una solución de caseína al 3% disuelta en amortiguador 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, durante 90 min a temperatura ambiente, después de la incubación, el gel fue teñido con una solución 0.1% azul de Coomassie (R- 250)

en 7.5% ácido acético y 5% metanol a temperatura ambiente y desteñado con 10% ácido acético y 40% metanol (García-Carreño *et al.*, 1993).

6.3 Preparación de alimento con SBTI

Como base se utilizó alimento comercial PIASA (proteína (%): 36.83 ± 0.18 , lípidos (%): 4.97 ± 0.04 , fibra cruda (%): 1.86 ± 0.09 , humedad (%): 6.89 ± 0.06 , cenizas (%): 1.86 ± 0.09 , energía (kJ/g): 19.4 ± 0.05), el cual fue hidratado con una solución que contenía el SBTI solubilizado. Por cada 100 g de alimento, se adicionaron 40 mL de la solución que contenía el inhibidor. Los porcentajes del inhibidor con respecto al alimento fueron 0.1% y 0.2%. El alimento control se hidrato con agua destilada. Los alimentos se incubaron por 12 h a 4°C para posteriormente secarse en un horno de vacío a 55°C y 20 In Hg. Para evitar la lixiviación del inhibidor en el agua marina, los alimentos fueron recubiertos con una mezcla de aceite de pescado (#F8020, Sigma-Aldrich) y cera carnauba (#243213, Sigma-Aldrich). El alimento se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Con el objetivo de confirmar la presencia del SBTI en los alimentos antes de iniciar los bioensayos se hizo un análisis de dot blot y ensayos de inhibición para confirmar que el SBTI estuviera activo después del secado de los alimentos. Para ello se prepararon extractos de los alimentos experimentales, 1 g de cada alimento fue molido en un mortero y mezclado con 5 mL de agua destilada e incubados por 2 h. Después se centrifugaron por 20 min a $10,000 \times g$ y 4°C, se extrajo el sobrenadante y se cuantificó proteína soluble por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para el análisis de dot blot, 1 μ L de cada extracto de alimento se mezcló con amortiguador de muestra para electroforesis nativa (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 25% glicerol 25% y 1% azul de bromofenol) en una proporción 1:20 (v/v) y cada muestra (alimento PIASA, alimento control, alimento con 0.1% de SBTI y alimento

con 0.2% de SBTI) se inmovilizó en una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue lavada dos veces con 15 mL de amortiguador TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) por 10 min e incubada por 1 h en solución de bloqueo (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 y 5% leche descremada). Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa fue lavada dos veces con 15 mL de amortiguador TNT (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0). La membrana se incubó por 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal específico para SBTI (#PA1-85939, Thermo Fisher) el cual se diluyó 1:2000 (v/v) en amortiguador TNT. La membrana fue lavada dos veces con 15 mL de amortiguador TNT y posteriormente incubada por 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-IgG de conejo con peroxidasa acoplada (#A6154, Sigma-Aldrich) el cual se diluyó 1:2000 (v/v) con amortiguador TNT. La membrana de nitrocelulosa fue lavada 4 veces con 15 mL de amortiguador TNT y finalmente se incubó con 3,3'-Diaminobenzidina 2 mM disuelta en amortiguador TBS hasta el desarrollo de color.

Los extractos de alimentos también se utilizaron para realizar ensayos de inhibición con enzimas comerciales y extractos enzimáticos de glándula digestiva de camarón blanco, para demostrar que el SBTI presente en los alimentos seguía activo después del secado de los alimentos. Se incubó 1 µg de proteína de cada alimento por 1 h con 1 µg de tripsina bovina (#T8003, Sigma-Aldrich), 1 µg de quimotripsina bovina (#C4129, Sigma-Aldrich) y 0.5 µg de extracto enzimático de glándula digestiva de camarón. Posteriormente se cuantificó actividad específica de tripsina y quimotripsina (García-Carreño *et al.*, 1994)

6.4 Bioensayo 1 – Efecto de 0.1 y 0.2% de SBTI en la hidrólisis de proteína en la glándula digestiva de *L. vannamei*

Un total de 18 especímenes del género *L. vannamei* con un peso de ~32 g fueron aclimatados por 14 días con el alimento control en acuarios individuales de

19 L con agua marina y recambio diario de 75% de agua a 27 ± 1.5 °C. Se utilizaron 6 camarones por cada tratamiento, y se alimentaron con 0.6 g diariamente durante 5 días. Se recolectaron muestras de heces por sifoneo todos los días del bioensayo (D1-D5). También, se colectaron muestras de heces antes de la alimentación con el SBTI (D0) para comparaciones entre los perfiles de peptidasas antes y después del tratamiento. Las heces colectadas se enjuagaron con agua destilada para eliminar exceso de sales y se almacenaron a -80°C hasta su uso (Córdova-Murueta *et al.*, 2003). Al final del bioensayo, los camarones fueron disectados para recuperar las glándulas digestivas, y posteriormente se guardaron individualmente a -80°C hasta su uso.

6.5 Análisis de muestras de glándula digestiva y heces

Cada glándula digestiva colectada fue homogenizada con agua destilada en una proporción 1:2 (p/v). Los homogenados fueron centrifugados por 30 min a $10,000 \times g$ y 4°C y el sobrenadante fue separado. Dado el exceso de lípidos y sedimentos los sobrenadantes de la centrifugación anterior fueron centrifugados nuevamente por 10 min a $10,000 \times g$ y 4°C . Los extractos enzimáticos obtenidos fueron utilizados para cuantificación de proteína soluble (Bradford, 1976), actividad proteolítica total, actividad específica de tripsina y quimotripsina, y finalmente analizar los cambios en los perfiles de peptidasas por electroforesis según la metodología descrita por García-Carreño *et al.* (1993, 1994).

Las muestras de heces colectadas diariamente se homogenizaron individualmente con 200 μL de agua destilada y se centrifugaron por 10 min a $10,000 \times g$ y 4°C . El sobrenadante se colectó y se cuantificó proteína soluble (Bradford, 1976). Posteriormente, los extractos enzimáticos de heces fueron analizados por electroforesis (García-Carreño *et al.*, 1993). Después del análisis de los perfiles de peptidasas en los extractos enzimáticos de heces se hicieron ensayos de inhibición para identificar serino peptidasas con Pefabloc (#76307,

Sigma-Aldrich). De cada extracto enzimático de heces colectadas antes iniciar el bioensayo y en el día 2 del bioensayo se incubaron 5 µg de proteína soluble (5 µg/µL) con 2 mM Pefabloc por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se mezclaron con amortiguador de muestra para electroforesis nativa en una proporción 1:1 (v/v) para su separación por electroforesis. Los geles se incubaron con 3% de caseína a pH 8.0 para revelar actividad de peptidasas alcalinas (García-Carreño *et al.*, 1993).

6.6 Bioensayo 2 – Efecto de 0.1 y 0.2% de SBTI en el tiempo de compensación en las peptidasas digestivas de *L. vannamei*

Un total de 450 especímenes de camarón blanco (~ 25 g) fueron distribuidos en nueve acuarios (tres acuarios por tratamiento) con capacidad de 1000 L y recambio diario de agua (27 ± 1.5 °C). Los camarones fueron alimentados con el alimento control por 14 días previos al inicio del experimento. Los camarones se mantuvieron en ayuno un día antes de iniciar el bioensayo y se tomaron muestras de glándula digestiva (0 h). Posteriormente se alimentó a los camarones y se tomaron muestras de glándula digestiva 1, 2 y 4 h después de la alimentación. También, se tomaron muestras de glándula digestiva a las 23 h (antes de re-alimentar) y a 24 h (después de re-alimentar). Los camarones que no ingirieron el alimento a 0 y 24 h se descartaron del bioensayo y el alimento no ingerido se retiró de los acuarios por sifoneo antes de la toma de las muestras para asegurar que el efecto observado en las peptidasas digestivas de camarón es por efecto de la presencia del inhibidor en el alimento (Fig. 5).

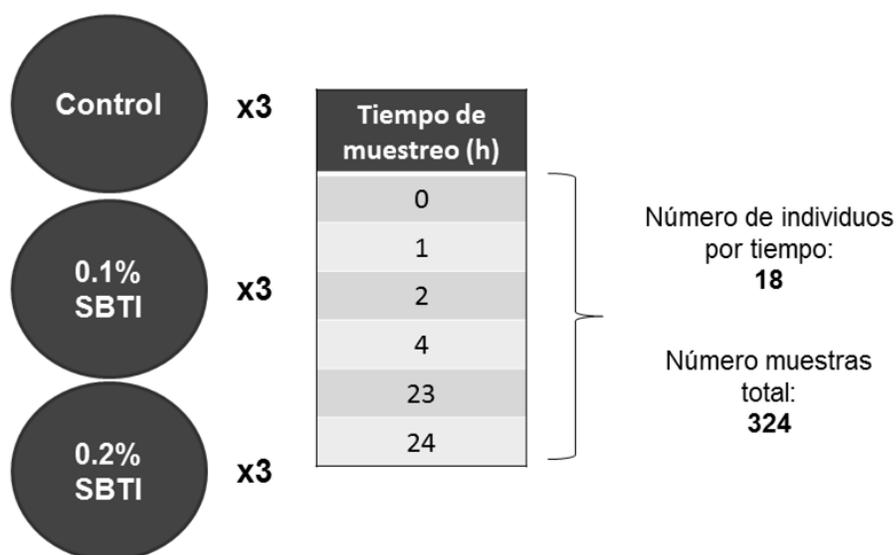


Figura 5. Descripción del bioensayo 2. Cada tratamiento contó con 3 unidades experimentales por lo que en cada tiempo de muestreo se tomaron 18 organismos (seis de cada una).

6.7 Análisis de muestras de glándula digestiva

Cada glándula digestiva colectada fue homogenizada con agua destilada en una proporción 1:2 (p/v) y centrifugadas por 30 min a 10,000 x *g* y 4°C, posteriormente el sobrenadante fue separado. Los extractos enzimáticos obtenidos fueron utilizados para cuantificación de proteína soluble (Bradford, 1976), actividad proteolítica total, actividad específica de tripsina y quimotripsina, y finalmente se analizaron los cambios en los perfiles de peptidasas por electroforesis y zimogramas (García-Carreño *et al.*, 1993, 1994).

Con los resultados obtenidos de la electroforesis se identificaron en los extractos enzimáticos los fenotipos de isotripsinas descritos previamente por (Sainz *et al.*, 2005). Se seleccionaron las glándulas digestivas de camarones con los dos fenotipos de tripsina más abundantes, fenotipo con isotripsinas CBA y fenotipo con isotripsinas CB. Se hicieron ensayos de inhibición utilizando 5 µg de

extracto enzimático de glándula digestiva e incubando con 2 mM 1,10-Fenantrilina a 20°C por 6 días. Después de la incubación, se agregó amortiguador de muestra (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glicerol y 1% azul de bromofenol) en una relación 1:1 (v/v). Las proteínas fueron separadas en geles de electroforesis al 12% de acrilamida en condiciones nativas aplicando 15 mA por gel y manteniendo una temperatura de 2°C. Para evidenciar actividad de peptidasa, el gel se lavó con agua destilada y se incubó en una solución de caseína al 3% disuelta en amortiguador 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 durante 90 min a temperatura ambiente, después de la incubación, el gel fue teñido con una solución 0.1% azul de Coomassie (R- 250) en 7.5% ácido acético y 5% metanol a temperatura ambiente y desteñido con una solución de 10% ácido acético y 40% metanol (García-Carreño *et al.*, 1993).

6.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de actividad proteolítica total, actividad de tripsina y actividad de quimotripsina se analizaron por métodos paramétricos, la normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov y la homocedasticidad por medio de la prueba de Barlett. Posteriormente se realizó un análisis de varianza de una vía y el método de comparaciones múltiples de Tukey con el programa computacional STATISTICA 8.0.

7. RESULTADOS

7.1 Concentración mínima de SBTI en el alimento necesaria para inhibir la actividad de las principales peptidasas digestivas *in vitro*

En la figura 6A se puede observar que mientras la actividad proteolítica total de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de extracto de glándula digestiva es inhibida hasta en un 80% con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de SBTI, a mayor concentración del inhibidor no hay un aumento significativo en el porcentaje de inhibición. La relación 1:5 inhibidor-extracto se utilizó para cuantificar la pérdida de la actividad enzimática durante el tiempo aproximado de residencia del alimento en el tracto digestivo (~ 4 h). Durante 4 h de incubación, la actividad proteolítica total y la actividad de quimotripsina disminuyeron $\sim 65\%$ y la inhibición fue constante. La actividad residual de tripsina fue 60% en el tiempo 0 y a las 4 h de incubación la actividad residual de tripsina fue del 86% (Fig. 6B).

El efecto del inhibidor en la actividad de las peptidasas digestivas de camarón puede observarse en los geles de electroforesis (Fig. 6C-D) en donde se observa que las isotripsinas digestivas de camarón están inhibidas a 0 h, con el tiempo de incubación se observan bandas de actividad indicando que el complejo E-I se desacopla y la peptidasa queda libre y activa.

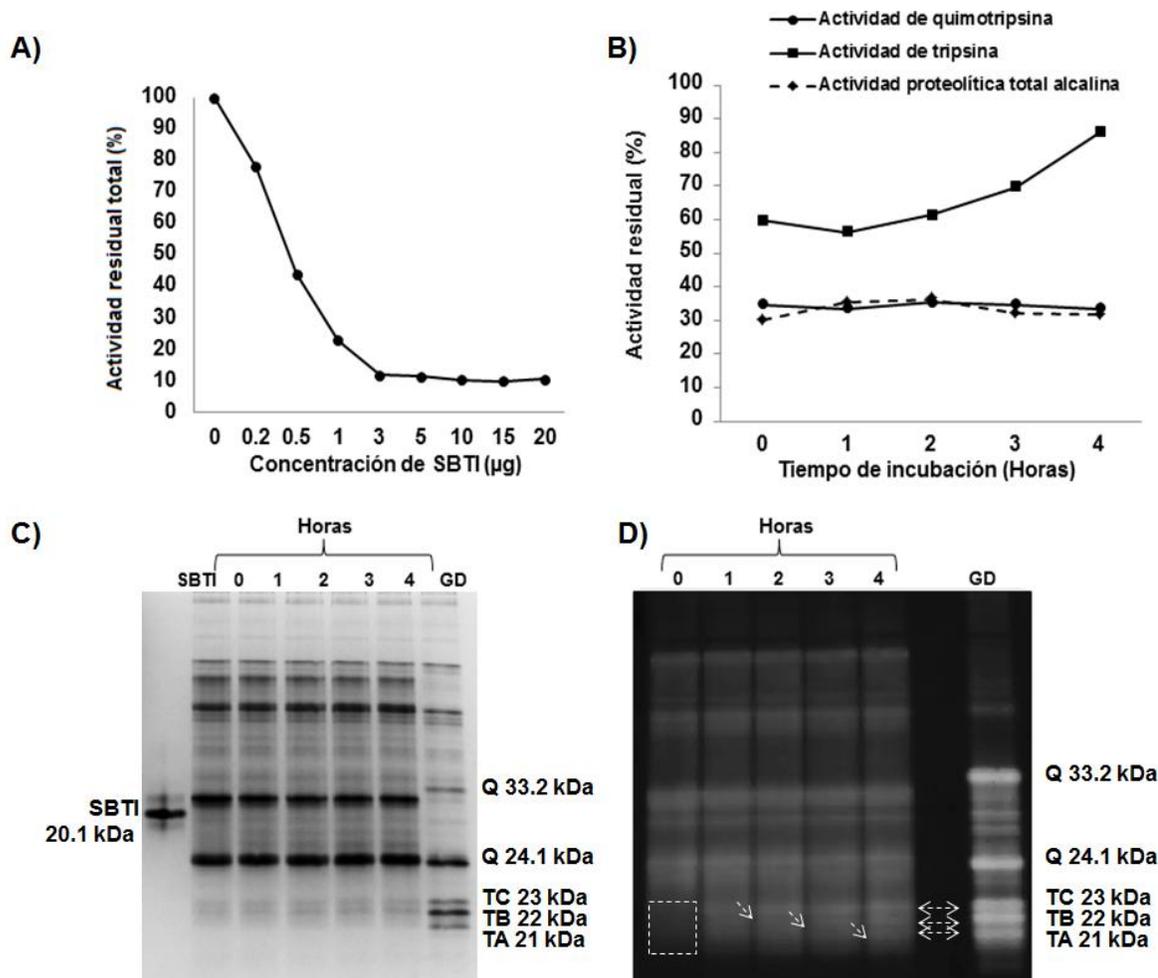


Figura 6. Interacción *in vitro* de las peptidasas de la glándula digestiva de *L. vannamei* y el inhibidor de tripsinas proveniente de la soya (SBTI). A) Ensayo de inhibición para determinar la concentración necesaria para inhibir más del 60% de la actividad proteolítica total alcalina; B) Ensayo de inhibición para tripsinas y quimotripsinas de camarón con el SBTI durante el tiempo de residencia del alimento; C) Estabilidad del complejo enzima-sustrato entre peptidasas digestivas de camarón y el inhibidor de tripsinas proveniente de la soya (SBTI); D) Zimograma para peptidasas. SBTI: Inhibidor de tripsinas proveniente de la soya, GD: Glándula digestiva, Q: Quimotripsina, TC: Isotripsina C, TB: Isotripsina B, TA: Isotripsina A.

7.2 Actividad enzimática de las peptidasas del sistema digestivo de camarón en presencia de SBTI introducido en el alimento

Antes de iniciar el bioensayo, se verificó que el inhibidor estuviera en el alimento y que permaneciera activo después del secado de los alimentos. La figura 7A muestra dot blot confirmando la presencia del SBTI en los alimentos utilizados. Después se prepararon extractos de cada alimento y se hicieron ensayos de inhibición con tripsina bovina, quimotripsina bovina y extracto enzimático de glándula digestiva.

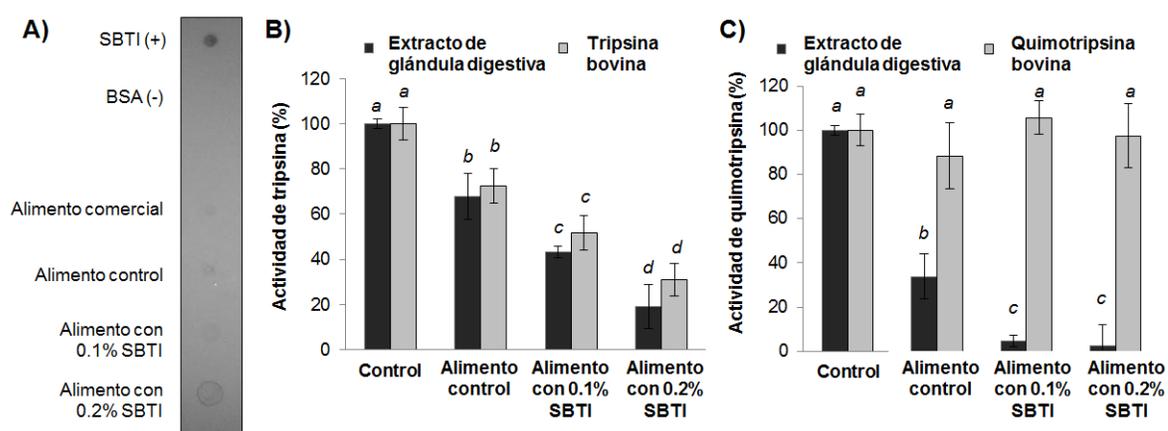


Figura 7. Presencia y actividad del SBTI en los alimentos. A) Membrana de nitrocelulosa en donde se observa la detección del SBTI en los alimentos por medio de un anticuerpo policlonal específico para SBTI. B) Ensayo de actividad de tripsina usando extractos de alimento para inhibir las isotripsinas digestivas del camarón y tripsina bovina. C) Ensayo de actividad de quimotripsina usando extractos de alimentos para inhibir las quimotripsinas digestivas de camarón y quimotripsina bovina. SBTI = Inhibidor de tripsinas proveniente de la soya. BSA = Albúmina de suero bovino.

La figura 7B muestra la inhibición de actividad de tripsina en extractos enzimáticos de glándula digestiva (barras negras) y la inhibición de tripsina bovina (barras grises) y se muestra que el SBTI añadido a los alimentos está activo a pesar del proceso de secado de los alimentos para su elaboración. La actividad de tripsina bovina disminuyó 50% cuando se incubó con el extracto del alimento con

0.1% de SBTI y 70% cuando se incubó con el extracto del alimento con 0.2% de SBTI. La actividad de tripsina en extractos enzimáticos de glándula digestiva de camarón disminuyó 60% cuando se incubó con el extracto del alimento con 0.1% de SBTI y 80% cuando se incubó con el extracto del alimento con 0.2% de SBTI. Por otra parte, más del 80% de la actividad de quimotripsina en los extractos enzimáticos de glándula digestiva (Fig. 7C, barras negras) disminuyó con los extractos de alimentos con SBTI, mientras que la actividad de quimotripsina bovina (Fig. 7C, barras grises) no se vio afectada con los extractos de alimentos.

Se estudió el efecto del SBTI presente en el alimento sobre la actividad de las peptidasas digestivas *in vivo*, mediante la cuantificación de los cambios en la actividad proteolítica total y las actividades específicas de tripsina y quimotripsina. En la figura 8A se observa que los alimentos con 0.1% y 0.2% SBTI redujeron la actividad proteolítica total en glándula digestiva en un 20% y 40%, respectivamente ($P < 0.05$). La actividad de tripsina se redujo significativamente 60% y 70% en los grupos alimentados con 0.1% y 0.2% SBTI, respectivamente ($P < 0.05$; Fig. 8B). La actividad de quimotripsina de la glándula digestiva no se vio afectada con 0.1% SBTI en el alimento a diferencia de cuando se alimentó con 0.2% SBTI en donde se redujo 30% ($P < 0.05$; Fig. 8C).

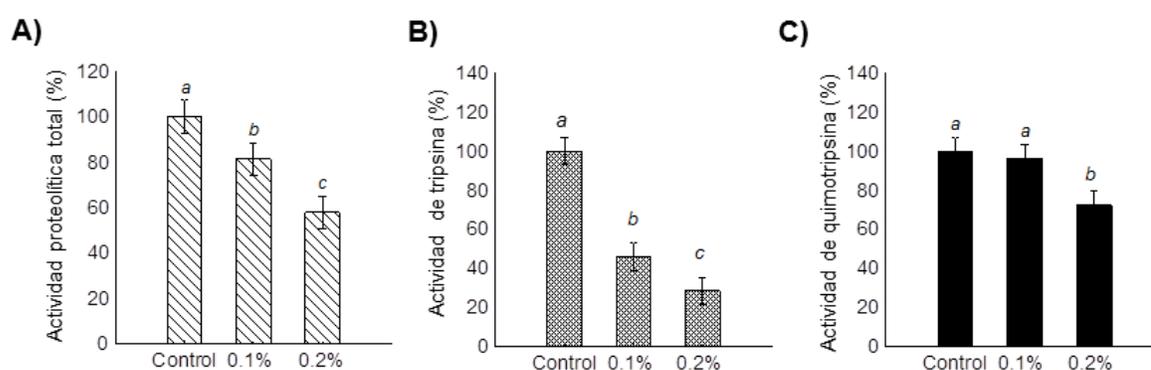


Figura 8. Efecto del SBTI *in vivo* en las peptidasas digestivas del camarón. A) Actividad proteolítica total, B) Actividad de tripsinas, C) Actividad de quimotripsinas. Los datos corresponden a muestras de triplicados de las glándulas digestivas de camarones alimentados con el alimento control y alimento con 0.1 y

0.2% de SBTI. Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Los extractos enzimáticos de la glándula digestiva se analizaron por zimogramas con el objetivo de buscar cambios en la actividad de peptidasas entre el grupo alimentado con el alimento control y los grupos alimentados con 0.1% y 0.2% de SBTI (Fig. 9). La intensidad de las bandas de isotripsinas (TC, TB, y TA) se redujo indicando una inhibición parcial en el grupo alimentado con 0.2% de SBTI. Las isoquimotripsinas (Q) fueron ligeramente inhibidas. Algunas bandas con actividad de peptidasa se observan con mayor intensidad en los grupos alimentados con SBTI y se marcaron con la letra U (Unknown) y un número para su identificación (U1-U7). Las bandas U3, U5 y U6 se observaron en el grupo control. En el grupo alimentado con 0.2% de SBTI, se observan bandas que no están presentes en el grupo control y el grupo alimentado con 0.1% de SBTI (bandas U1 y U2). La banda U3 estuvo presente en todos los tratamientos pero con mayor actividad en el grupo alimentado con 0.2% de SBTI. La banda U4 no se observó en el grupo control pero se observa en los grupos alimentados con SBTI. Las bandas U5 y U6 se observaron en todos los tratamientos, pero con mayor intensidad en el grupo alimentado con 0.2% de SBTI.

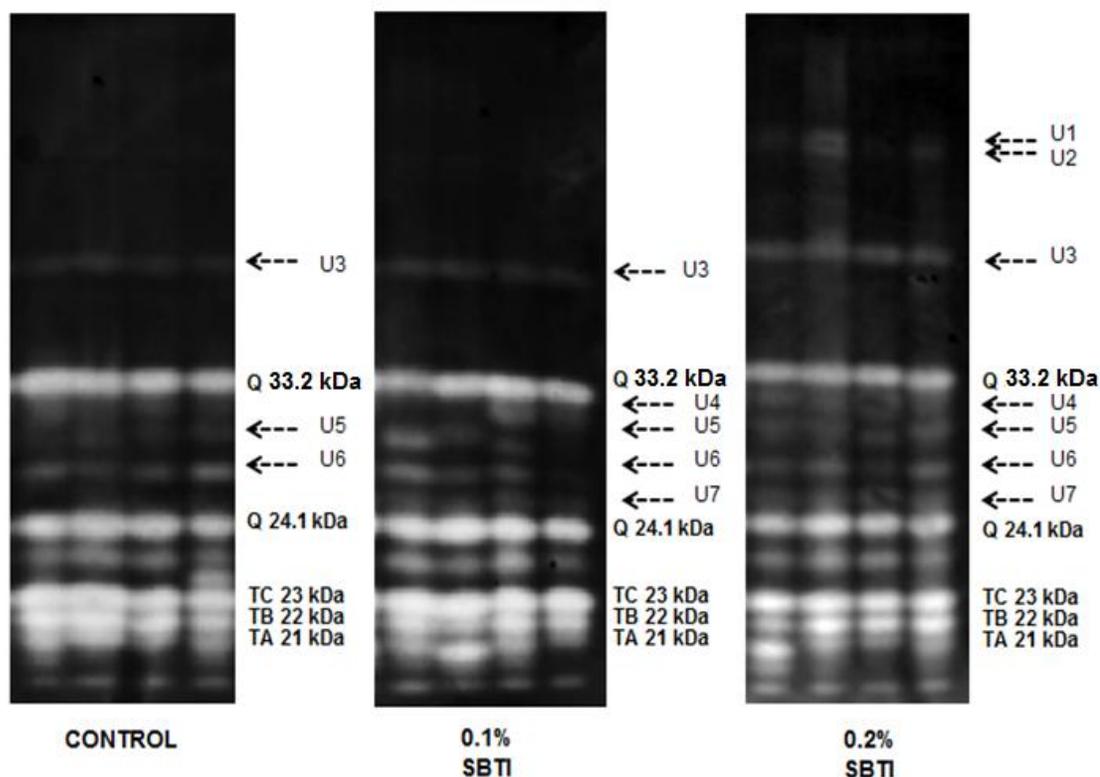


Figura 9. Zimogramas de los extractos enzimáticos de las glándulas digestivas de camarones alimentados con SBTI. Cada gel contiene extractos enzimáticos de cuatro individuos diferentes. Las flechas negras discontinuas indican peptidasas no identificadas (U) en extractos de la glándula digestiva. Q = Quimotripsinas, TC = Isotripsina C, TB = Isotripsina B, TA = Isotripsina A.

Con el objetivo de comparar las peptidasas digestivas de los individuos antes y durante el bioensayo, se tomaron muestras de heces y se prepararon extractos enzimáticos. En la figura 10 se puede observar que la actividad de las peptidasas en los extractos de heces del grupo control se mantuvo constante, dos quimotripsinas (Q), tres isotripsinas (TC, TB, y TA) y cuatro peptidasas que no han sido descritas previamente (U3, U4, U6, y U7). Al segundo día del muestreo (D2) se inhibieron las tripsinas y las quimotripsinas en el grupo alimentado con 0.1% de SBTI por la presencia del SBTI en el alimento, de las peptidasas sin describir en el grupo control, solo se observan las peptidasas U3, U4, y U6. En el grupo

alimentado con 0.2% de SBTI se observa una mayor cantidad de peptidasas en las heces (U1-7) en las muestras del día 2.

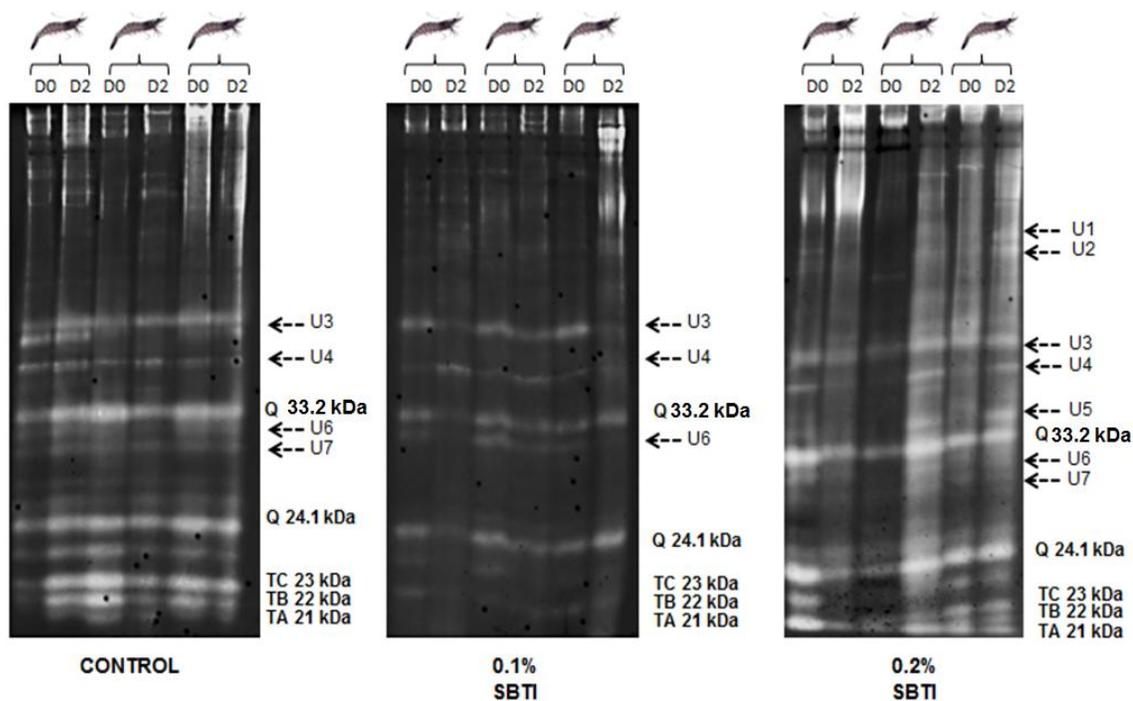


Figura 10. Zimogramas de extractos de heces de tres camarones de cada grupo. Q = Quimotripsinas, TC = Isotripsina C, TB = Isotripsina B, TA = Isotripsina A. Flechas negras discontinuas indican peptidasas no identificadas y señaladas con la letra U. D0 = Extracto enzimático de heces antes del bioensayo, D2 = Extracto enzimático de heces del segundo día del bioensayo.

7.3 Efecto del SBTI en el tiempo de compensación

La actividad proteolítica total y específica de las tripsinas y las quimotripsinas se cuantificó en extractos enzimáticos de cada uno de los individuos del bioensayo a las 0 h (ayuno), 1, 2 y 4 h después que se administró el alimento con el inhibidor, a las 23 h (antes de la realimentación), y a las 24 h (después de la re-alimentación). En la figura 11 se presentan los resultados de la actividad enzimática de las glándulas digestivas colectadas en el bioensayo 2. La actividad proteolítica total disminuye 2 h después de la alimentación y en la re-alimentación (24 h). Por el contrario, a las 23 h, la actividad en los tratamientos aumentó, lo que podría indicar que el efecto del SBTI está relacionado con el tiempo de residencia del alimento en el tracto digestivo de los camarones (Fig. 11A). La actividad específica de tripsina disminuyó 2 h después de la alimentación con SBTI, y la actividad en el grupo alimentado con 0.1% SBTI aumentó a las 23 h (ayuno), mientras que la actividad específica de tripsina disminuyó para el alimentado con 0.2% SBTI (Fig. 11B). La actividad específica de quimotripsina (Fig. 11C) disminuyó 2 h después de la alimentación y a las 24 h (1 h después de la re-alimentación). Antes de la re-alimentación (23 h), la actividad de quimotripsina aumentó sólo en el grupo alimentado con 0.1% SBTI.

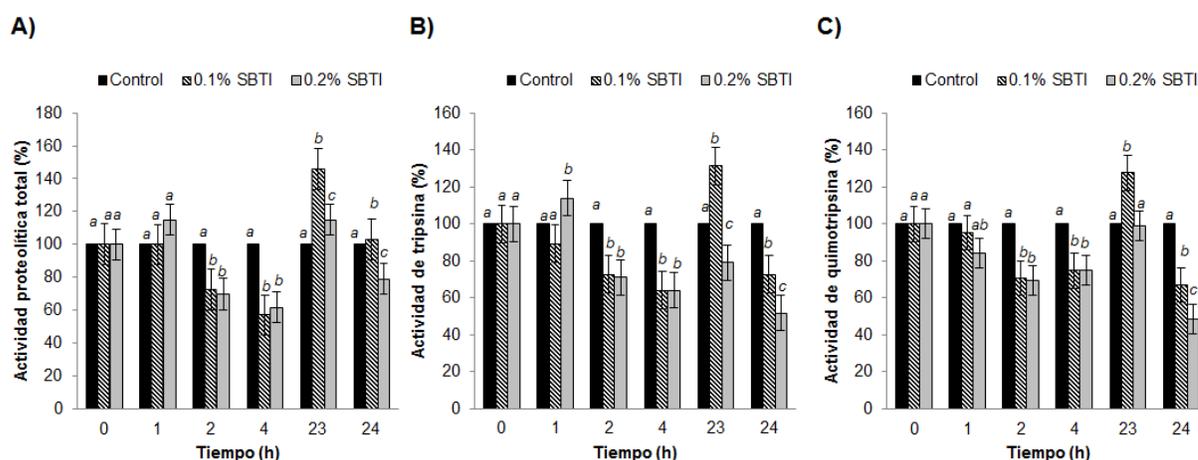


Figura 11. Efecto de SBTI en la actividad enzimática de la glándula digestiva. A) Actividad proteolítica total, B) Actividad específica de tripsina, C) Actividad específica de quimotripsina.

Dado que en el bioensayo se utilizaron especímenes que presentaban fenotipos de tripsina CBA y CB, se analizaron las peptidasas hasta encontrar cambios por efecto del SBTI. En la figura 12, especímenes del fenotipo CBA alimentados con 0.2% SBTI, señalando con flechas las proteínas y peptidasas ya identificadas. También se observa que a las 23 h las peptidasas que habían incrementado su actividad (Ser, U1-U3) a las 4 h por efecto del inhibidor, disminuyeron. A las 24 h (1 h después de la realimentación) las peptidasas aumentaron la actividad.

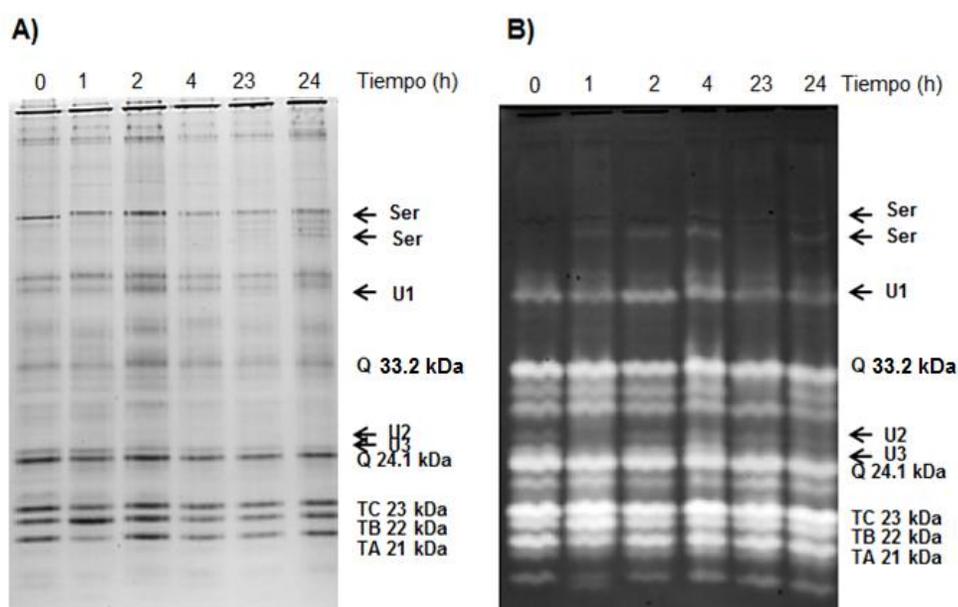


Figura 12. Efecto de 0.2% SBTI durante el tiempo en la actividad enzimática de la glándula digestiva. Ser: Serino peptidasas no identificadas, Q: Quimotripsinas, TC: Isotripsina C, TB: Isotripsina B, TA: Isotripsina A.

7.4 Peptidasas que compensan la actividad inhibida en la glándula digestiva y las heces

En los extractos enzimáticos de heces del bioensayo 1 del grupo alimentado con SBTI se pueden observar peptidasas que no están presentes en el grupo control. La actividad proteolítica total en el camarón blanco está dada principalmente por serino peptidasas y en un menor porcentaje por metalo peptidasas. En el presente estudio se utilizaron inhibidores sintéticos para estas dos clases de peptidasas para elucidar la clase de las enzimas que compensan la inhibición de las serino peptidasas por efecto de SBTI. La figura 13 presenta un zimograma de los extractos enzimáticos de heces de tres individuos, en donde se observa que, en las heces colectadas antes del tratamiento, están presentes isotripsinas y quimotripsinas (carril 1). Al incubar los extractos de heces del control con Pefabloc, se inhiben las serino peptidasas ya caracterizadas. Los extractos enzimáticos de heces colectados dos días después del tratamiento se observa una disminución en la actividad de las serino peptidasas (carril 3), cuando estas muestras son incubadas con Pefabloc (carril 4), se observa que las peptidasas U1 y U2 reducen su actividad, sugiriendo que son serino peptidasas.

Para elucidar la presencia de metalo peptidasas se utilizó un inhibidor sintético específico para esta clase (1,10-Fenantrolina). La figura 14A muestra un zimograma con extractos enzimáticos de glándula digestiva, el carril 1 muestra un extracto enzimático incubado con agua destilada, control, y el carril 2 muestra un extracto enzimático incubado con 2 mM de 1,10-Fenantrolina. Las flechas negras de la figura 14A indican la inhibición de metalo peptidasas en extractos enzimáticos de glándula digestiva camarón y las líneas de punteadas representan serino peptidasas ya identificadas y caracterizadas. En la figura 14B, las proteínas de las peptidasas observadas en el zimograma de la figura 14A, se identifican en la electroforesis, en donde se observa que las metalo peptidasas tienen una masa de ~25 kDa y ~45 kDa.

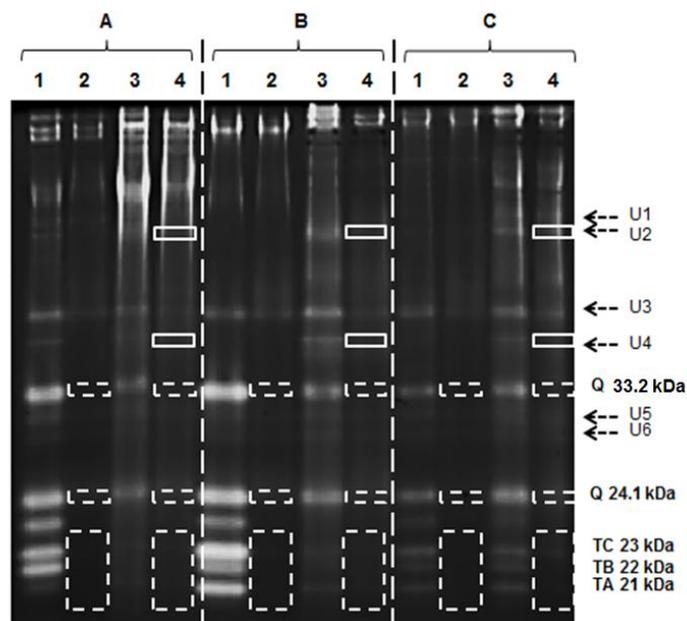


Figura 13. Perfil de peptidasas de las heces de tres organismos (A, B y C) alimentados con 0.2% de SBTI incubadas con Pefabloc. 1= Muestras de heces antes de la alimentación con SBTI (muestra de referencia), 2= Muestras del carril 1 incubadas con Pefabloc, 3= Muestras de heces del día 2 alimentando con SBTI, 4= Muestras del carril 3 incubadas con Pefabloc. Los recuadros punteados señalan inhibición de tripsinas y quimotripsinas.

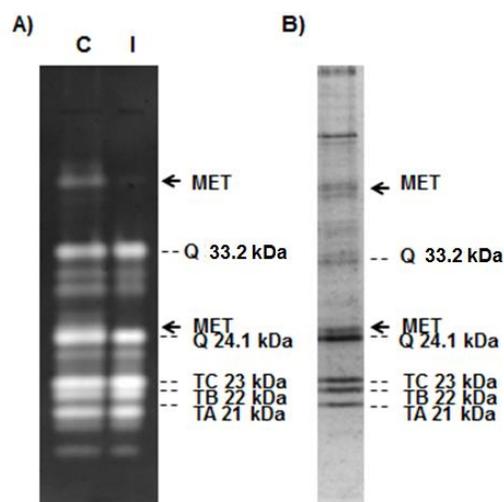


Figura 14. Identificación de metalopeptidasas en la glándula digestiva del camarón blanco *L. vannamei*. A) Zimograma para peptidasas alcalinas, C: Extracto enzimático de la glándula digestiva del camarón incubado con agua destilada como control, I: Extracto enzimático de la glándula digestiva del camarón incubado con 1,10-Fenantrolina. B) Electroforesis nativa con un extracto enzimático de glándula digestiva en donde se señalan a las metalopeptidasas.

En la figura 15 se presentan muestras de la glándula digestiva de especímenes que presentan el fenotipo de tripsina CBA. Las flechas negras indican la inhibición de las metalo peptidasas. Los carriles etiquetados como C contienen extractos enzimáticos que se incubaron con agua destilada y carriles con la etiqueta I contienen el extracto enzimático incubado con 2 mM de 1,10-Fenantrolina. Las dos metalo peptidasas identificadas aumentaron su actividad en los grupos tratados con SBTI, sobre todo a las 4 h después de la alimentación. En la figura 16 se muestran extractos de glándula digestiva de especímenes que presentan el fenotipo de tripsina CB. Dos metalo peptidasas se observan antes del tratamiento. A las 23 y 24 h del tratamiento se observa una metalo peptidasa antes ausente.

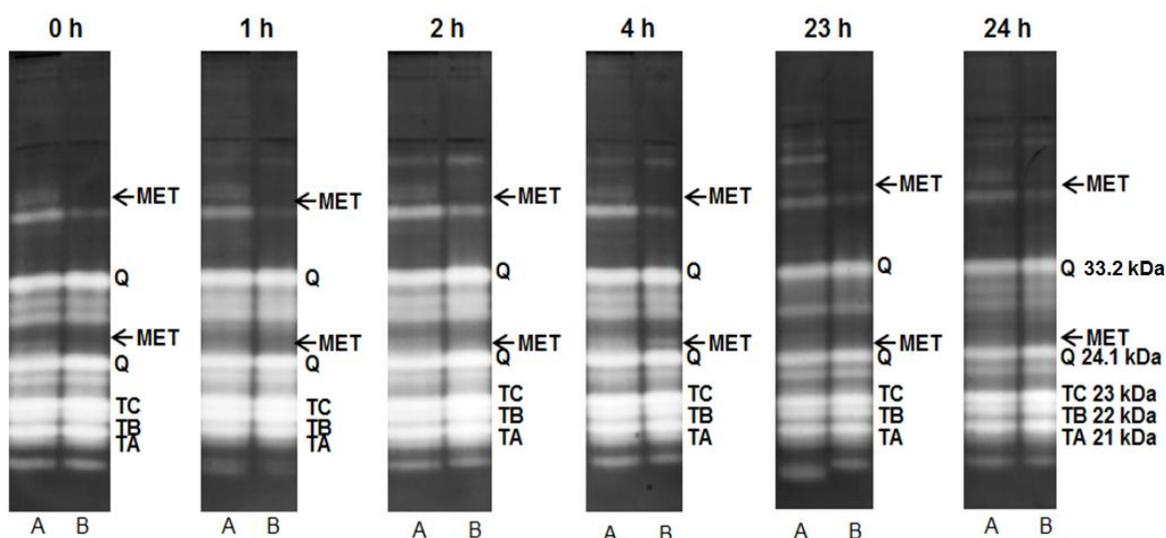


Figura 15. Identificación de metalo peptidasas en la glándula digestiva de camarones con fenotipo de tripsinas CBA que fueron alimentados con SBTI. A: Extractos enzimáticos de la glándula digestiva incubados con agua destilada. B: Extractos enzimáticos de la glándula digestiva incubados con 2 mM de 1,10-Fenantrolina. Las flechas negras indican la presencia de metalo peptidasas. Q: Quimotripsina, TC: Isotripsina C, TB: Isotripsina B, TA: Isotripsina A.

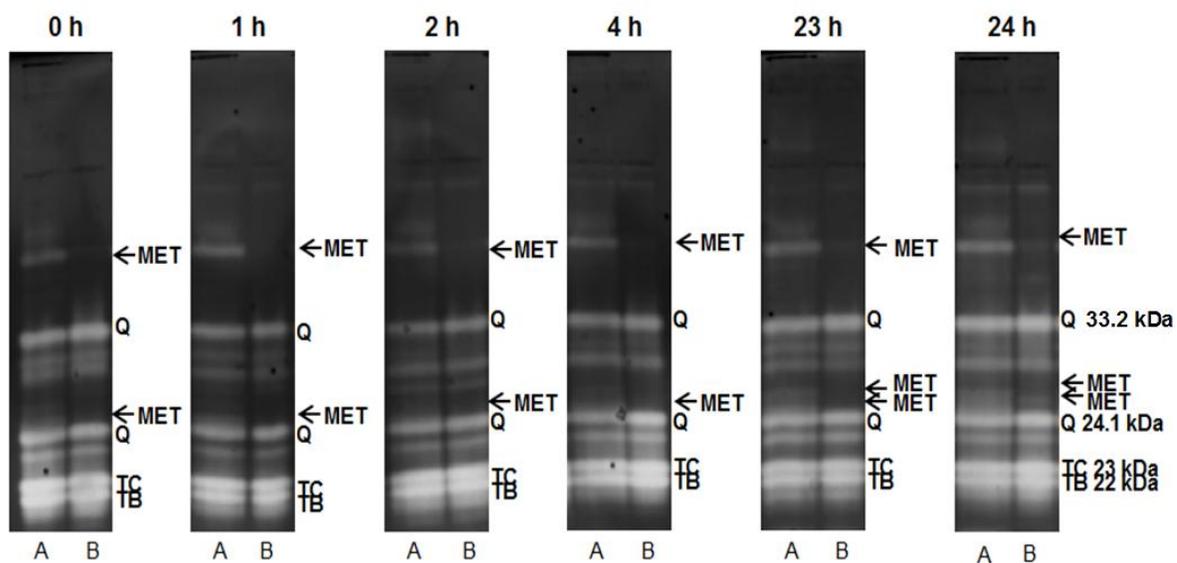


Figura 16. Identificación de metalo peptidasas en la glándula digestiva con fenotipo de tripsinas CB de camarones que fueron alimentados con SBTI. A: Extractos enzimáticos de la glándula digestiva incubados con agua destilada. B: Extractos enzimáticos de la glándula digestiva incubados con 2 mM de 1,10-Fenantrolina. Las flechas negras indican la presencia de metalo peptidasas. Q: Quimotripsina, TC: Isotripsina C, TB: Isotripsina B.

8. DISCUSIÓN

La adición de harinas de origen vegetal en alimentos para peces y camarón es una práctica frecuente. El objetivo es sustituir la proteína de la harina de pescado para disminuir costos de producción. Lo que resulta en la incorporación de moléculas antinutricionales propias de estas harinas. La proporción de harina de soya en los alimentos para acuicultura puede variar de 75 hasta 300 g/kg, por lo que la concentración de las moléculas antinutricionales también varía con la composición del alimento (Collins *et al.*, 2012), interfiriendo con la digestión de proteína y la asimilación de amino ácidos (Francis *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2013).

En el presente estudio, se observó la inhibición de tripsinas y quimotripsinas digestivas de camarón por el SBTI, tanto *in vitro*, como *in vivo*. La interacción *in vitro* entre las tripsinas y el SBTI disminuyó con el transcurso del tiempo, lo cual se comprobó por medio de electroforesis (Fig. 6). Estudios previos han demostrado que las quimotripsinas de *L. vannamei* son capaces de hidrolizar una gran variedad de sustratos, la quimotripsina BI tiene mayor actividad con SAAPA (N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide) que la quimotripsina BII, mientras que con TAME (Tosyl-arginine-methyl-ester) la quimotripsina BI tiene menor actividad que la quimotripsina BII, lo anterior indica que ambas quimotripsinas pueden reconocer residuos de aminoácidos con carga positiva como la arginina (Van Wormhoudt *et al.*, 1992); lo anterior ayuda a explicar porque las quimotripsinas del camarón blanco pueden ser inhibidas por el SBTI el cual tiene en el sitio P₁ un residuo de arginina, a diferencia de la quimotripsina bovina la cual tiene preferencia por residuos de aminoácidos hidrofóbicos como tirosina, triptófano y fenilalanina, y en menor medida por leucina y metionina (Rawlings y Salvesen 2013). En la literatura existen reportes sobre la interacción enzima-inhibidor, en donde el efecto inhibitorio del SBTI sobre las tripsinas digestivas se pierde con el transcurso del tiempo y tiene relación con la composición de las proteínas que interactúan en el medio con el inhibidor. Por ejemplo, en el sistema digestivo del escarabajo

Callosobruchus maculatus, tres clases de peptidasas pueden hidrolizar la proteína proveniente del alimento (serino, cisteíno y aspártico). En un experimento con esta especie, se observó que después de 8 h de interacción entre el SBTI y un extracto enzimático de la glándula digestiva de este escarabajo, el SBTI fue hidrolizado por las peptidasas digestivas (Amirhusin *et al.*, 2007). En ensayos de inhibición *in vitro* entre las peptidasas digestivas de la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* y el SBTI se ha observado una inhibición de hasta el 90%, sin embargo, en zimogramas, el SBTI y las peptidasas digestivas de *C. capitata* forman un complejo en donde se observa una disminución de la actividad y un ligero retraso en la migración de las peptidasas por lo que los autores sugieren una posible hidrólisis del SBTI por parte de aspártico peptidasas (Silva *et al.*, 2006). Lo anterior podría explicar la diferencia observada en la migración de las tripsinas de camarón cuando el extracto de glándula digestiva se incubaba con SBTI, se observa que a tiempo cero las tripsinas pierden su actividad y después de 4 h de incubación con el SBTI (Fig. 6C-D), la actividad de las tripsinas es visible por medio de zimogramas coincidiendo con los resultados encontrados por otros grupos de trabajo en donde se sugiere la hidrólisis del SBTI como mecanismo de defensa (Upadhyay y Chandrashekar, 2012).

Hasta la fecha, en el camarón blanco no se han descrito aspártico peptidasas, ni se han encontrado transcritos de este tipo de enzimas durante el desarrollo ontogénico (Wei *et al.*, 2014). Por el contrario, se han reportado cisteíno y metalo peptidasas (Alarcón *et al.* 2007; Stephens *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2007), enzimas potenciales para la hidrólisis de inhibidores de serino peptidasas, ya que la hidrólisis de inhibidores de peptidasas es un mecanismo para reducir los efectos de factores anti-nutricionales del alimento en la glándula digestiva de los consumidores (Amirhusin *et al.*, 2007). En el camarón blanco no se han purificado ni caracterizado metalo peptidasas pero se tienen reportes de otras metalo peptidasas de crustáceos, conocidas como astacinas, que tienen la capacidad de reconocer e hidrolizar una amplia variedad de sustratos al igual que las

quimotripsinas de camarón. Una metalo peptidasa (22.181 kDa) de la glándula digestiva del cangrejo *Paralithodes camtschatica* es capaz de hidrolizar cadenas peptídicas al lado de residuos de aminoácidos alifáticos pero también algunos residuos de aminoácidos hidrofílicos como la cisteína, el ácido glutámico y la glutamina (Semenova *et al.*, 2006). Una metalo peptidasa del acocil europeo *Astacus astacus* también tiene una amplia preferencia por diversos aminoácidos (Becker-Pauly *et al.*, 2011) por lo que en futuras investigaciones sería ideal purificar a las metalo peptidasas del camarón blanco y probar la hipótesis de que funcionan como mecanismo de respuesta ante inhibidores de serino peptidasas.

Como ya se mencionó anteriormente, la harina de soya es un insumo que está presente en los alimentos para acuicultura. En trabajos anteriores se ha demostrado que hay inhibidores de peptidasas en algunos alimentos para camarón (Lemos *et al.*, 2004); sin embargo muchos productores de alimentos afirman que bajo ciertos tratamientos térmicos se puede reducir la actividad de los inhibidores de peptidasas. La ASA (American Soybean Association), el USSEC (U.S. Soybean Export Council) y la USB (United Soybean Board) de Estados Unidos, uno de los mayores productores de soya, reportan que la soya sin procesar contiene 45-50 mg de inhibidor de tripsina (TI) por gramo, la harina de soya tostada 5-8 mg/g y un concentrado de proteína de soya menos de 4 mg/g (U.S. Soybean Export Council, 2008). Existen presentaciones de concentrados de proteína de soya que pueden contener hasta 2 mg/g de inhibidor de tripsina (concentrado de proteína obtenido por extrudir la harina de soya), que pudieran afectar negativamente la función de las peptidasas digestivas. En estos productos se desconoce el tipo de inhibidores de peptidasas (Kunitz o Bowman-Birk), ya que solo se indica la cantidad de TIU (Trypsin Inhibitory Units, por sus siglas en inglés). En este trabajo se demostró por medio de inmunoquímica la presencia de SBTI en el alimento comercial PIASA, el cual se uso como alimento base para este estudio (Fig. 7A). La detección del SBTI con anticuerpos no permite saber si el inhibidor es

activo, lo que se logra con ensayos enzimáticos, demostrando actividad inhibitoria por SBTI en productos tratados térmicamente (Fig. 7B).

En los resultados del bioensayo 1, la incorporación de SBTI en el alimento inhibió la actividad proteolítica total, así como la actividad de tripsina y quimotripsina provenientes de la glándula digestiva (Fig. 8). Este fenómeno ya se ha observado en otros artrópodos, principalmente en insectos (Spit *et al.*, 2014) y en menor medida en los crustáceos (Schwarzenberger *et al.*, 2010). Las concentraciones de SBTI que son capaces de causar daños en el sistema digestivo de artrópodos puede variar dependiendo de la especie que consume el inhibidor; se sabe que el escarabajo de la harina *Tenebrio molitor* puede consumir hasta 1% de SBTI (Elpidina *et al.*, 2005), mientras que la palomilla bandeada *Plodia interpunctella* puede consumir hasta 0.2% de SBTI (Amorim *et al.*, 2008).

En este estudio, la inhibición de las quimotripsinas de la glándula digestiva fue 30% en el grupo alimentado con 0.2% SBTI, mientras que la actividad proteolítica total y la de tripsina se inhibió hasta en un 60 y 70% con 0.1 y 0.2% de SBTI en el alimento. Estas diferencias se pueden explicar en base a la afinidad de las serino peptidasas a inhibidores tipo Kunitz, por ejemplo, la tripsina bovina tiene una constante de inhibición (K_i) de 1.87 pM con el SBTI y mientras que la quimotripsina bovina un K_i de 2.8 pM con el mismo inhibidor, esto quiere decir que la afinidad química entre el SBTI y la tripsina bovina es mayor porque se necesitan menos moléculas del SBTI para inhibir la actividad enzimática (Patthy *et al.*, 2015). Otro punto a considerar es el paso del alimento por el tracto digestivo, a diferencia de la inhibición de las quimotripsinas digestivas de camarón observada en ensayos *in vitro* (Fig. 7), *in vivo*, la actividad de quimotripsina en la glándula digestiva no se ve afectada con 0.1% de SBTI sino con 0.2% de SBTI (Fig. 8).

El pH del tracto digestivo también influye en la actividad proteolítica. Se sabe que en artrópodos en donde se ha demostrado que existe un proceso de compensación enzimática contra inhibidores de peptidasas hay un cambio de pH

muy marcado entre la cámara anterior y posterior de la glándula digestiva que separa a las peptidasas de la clase cisteíno (pH óptimo ~6.0) de las peptidasas de la clase serino (pH óptimo ~8.0) (Vinokurov *et al.*, 2006). Esto es importante en los casos de compensación de la actividad de serino peptidasas con cisteíno peptidasas; al estar presente el SBTI en el alimento, no solo hay un aumento en la actividad de cisteíno peptidasas sino también un cambio en la sección del tracto digestivo en donde se está dando una mayor hidrólisis de proteína y un menor efecto negativo por parte del SBTI (Oppert *et al.*, 2010; Vinokurov *et al.*, 2009). En el camarón blanco el pH de la glándula digestiva es ~5.7 (Navarrete del Toro *et al.*, 2011), lo cual indica que las serino peptidasas no trabajan en su pH óptimo lo cual también pudiera influir en la interacción *in vivo* de serino peptidasas digestivas y el SBTI que se encuentra en el alimento.

Cambios en la actividad enzimática de peptidasas cuantificada con sustratos sintéticos difícilmente pueden sugerir algún proceso de compensación, es a través de zimogramas en donde pueden observarse cambios en la presencia/ausencia o aumento/disminución de la actividad de peptidasas digestivas. En la glándula digestiva de camarón blanco se tienen identificadas isotripsinas y quimotripsinas (Hernández-Cortés *et al.*, 1997; Sainz *et al.*, 2004), pero también existen otras enzimas con actividad proteolítica (Fig. 9) las cuales no han sido identificadas ni caracterizadas y que se observan en el grupo control. En el grupo alimentado con 0.2% de SBTI se pueden observar dos peptidasas que aumentan su actividad (U1-2) mientras que disminuye ligeramente la actividad de tripsinas. Al igual que en el camarón blanco, existen ejemplos en donde la actividad de peptidasas cambia cuando el sistema digestivo está expuesto a inhibidores, en la pulga de agua dulce *Daphnia magna* se ha demostrado a través de ensayos *in vitro* que 5 µg/mL de un extracto de cianobacteria *Microcystis aeruginosa* (que naturalmente contiene inhibidores de quimotripsina) puede inhibir hasta el 80% de la actividad enzimática mientras que *in vivo*, al alimentar a las pulgas por 6 días puede observarse el aumento de 3 serino peptidasas (Von Elert

et al., 2012). En otros organismos, el tiempo de exposición a inhibidores es menor pero con un efecto similar, por ejemplo al alimentar a larvas del barrenador del maíz *Diatraea saccharalis* con 0.1% de inhibidor de tripsina por 72 h, la actividad de dos peptidasas disminuye mientras que la actividad de otra peptidasa no identificada en las larvas control, aumenta su actividad (da Silva *et al.*, 2014). A diferencia del barrenador del maíz, en el gusano cogollero *Helicoverpa armigera* se tienen identificadas a algunas de las peptidasas de la saliva y glándula digestiva, las cuales al estar en contacto con SBTI adicionado al alimento, se observa, por medio de zimogramas, que la actividad de cuatro serino peptidasas salivares de alrededor de 32, 40, 43 y 64 kDa aumenta y en la glándula digestiva aumenta ligeramente la actividad de una serino peptidasa de 43 kDa (Upadhyay y Chandrashekar, 2012). A pesar de que en camarón blanco se observan cambios en los zimogramas con extractos de glándula digestiva de organismos alimentados con 0.2% de SBTI, en heces, los cambios en la actividad son más evidentes ya que fue posible comparar a las peptidasas antes y después de iniciar el bioensayo (Fig. 10). Al alimentar al salmón arcoíris *Oncorhynchus mykiss* con 1.5% de SBTI se han reportado efectos negativos en la digestibilidad en intestino y heces (Krogdahl y Berg-Lea, 1992), pero no se sabe el efecto que tuvo el STBI tuvo en la actividad de las peptidasas de las heces, de hecho las investigaciones en donde se ha estudiado el efecto del SBTI en el sistema digestivo no se han estudiado las peptidasas de las heces, por lo que no se pueden hacer comparaciones entre lo encontrado en las heces del camarón y otros organismos.

A diferencia del bioensayo 1 en donde se alimentó con SBTI por seis días, en el bioensayo 2, el periodo de alimentación fue más corto (24 h) con el objetivo de cuantificar el periodo de respuesta. De acuerdo a los resultados de este trabajo, el camarón blanco tiene la capacidad de responder ante el SBTI en un periodo menor a 24 h (Fig. 11), lo que se confirma por medio de zimogramas. Se observa que dos serino peptidasas aumenta 4 h después de la alimentación con el inhibidor (Fig. 12). La pulga de agua dulce *D. magna*, al igual que el camarón,

tiene la capacidad de responder ante inhibidores de peptidasas en el alimento en un periodo menor a 24 h, en donde aumenta la actividad de dos tripsinas y tres quimptripsinas (Schwarzenberger *et al.*, 2010). En la pulga de agua dulce, esta característica está ligada a la frecuente floración de cianobacterias que contienen inhibidores de quimotripsinas, por lo que se vuelve importante para su sobrevivencia la rapidez con la que compensan, incluso se ha hipotetizado sobre la posibilidad de que las poblaciones de *Daphnia* estén bajo un proceso de adaptación a cambios ambientales a causa de las altas concentraciones de inhibidores de serino peptidasas que pueden encontrarse en procesos de eutrofización (Kuster *et al.*, 2013). Se ha reportado que aproximadamente el 58% de las floraciones de cianobacterias en agua dulce del género *Microcystis* contienen inhibidores de peptidasas por lo que se ha considerado que la capacidad de compensación enzimática sea una estrategia por parte de la pulga de agua dulce para coexistir con las cianobacterias de su entorno (Agrawal *et al.*, 2001).

El camarón blanco naturalmente no está expuesto al SBTI, lo que no le impide reconocer al inhibidor y compensar, lo que sugiere que, en su medio natural, el camarón blanco está bajo presión ante inhibidores de peptidasas. De acuerdo a sus hábitos alimenticios, el camarón blanco durante el estadio larvario consume microalgas, mientras que en estadio juvenil y adulto es omnívoro. Dentro del área geográfica de distribución del camarón blanco se han reportado especies de las cuales se pudiera alimentar que contienen inhibidores de peptidasas. En las macroalgas marinas de la clase Rhodophyta se han encontrado moléculas capaces de inhibir la actividad de metalo peptidasas como polisacáridos sulfatados (Thomas *et al.*, 2014). También, se han reportado inhibidores para aspártico peptidasas en las algas café *Ecklonia cava* y *Ishige okamurae* (Rengasamy *et al.*, 2014). En la anémona del Mar Caribe *Stichodactyla helianthus* se ha aislado y caracterizado un inhibidor tipo Kunitz de la familia BPTI (Bovine pancreatic trypsin inhibitor, por sus siglas en inglés) que a diferencia de otros inhibidores de la

misma familia, no sólo inhibe serino peptidasas sino también cisteíno y aspártico peptidasas (García-Fernández *et al.*, 2012). En el gusano plumero gigante *Sabellastarte magnifica* también se encuentra un inhibidor del tipo Kunitz que inhibe serino peptidasas y con potencial para inhibir a las tripsinas de camarón blanco ya que en la posición P1 tiene un residuo de aminoácido de lisina (Alonso-del-Rivero *et al.*, 2012).

De acuerdo a las características de los inhibidores de peptidasas de origen marino, el camarón en su medio ambiente natural necesita, además de un tiempo de respuesta rápido, una variedad de peptidasas digestivas con las que pueda compensar. En este trabajo se identificaron dos serino peptidasas que aumentan su actividad cuando se alimenta al camarón con SBTI (Fig. 13), pero también se encontró que metalo peptidasas aumentan su actividad, dos metalo peptidasas en individuos con el fenotipo de tripsina CBA y tres metalo peptidasas en individuos con el fenotipo de tripsina CB (Fig. 15-16). La respuesta que puede tener una especie ante inhibidores de peptidasas en su alimento puede llegar a explicarse en base a fenotipos. El cangrejo de río *Cherax destructor* puede presentar tres fenotipos (AL, D1 y D2) de los cuales destaca el D2 el cual se desarrolla adecuadamente cuando se introduce harina de soya en alimento peletizado, en comparación con fenotipos AL y D1 (Austin *et al.*, 1997). La langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus* presenta tres fenotipos de tripsinas digestivas con el mismo patrón y abundancia que en el camarón blanco, tres isotripsinas en el fenotipo A, y dos isotripsinas en los fenotipos B y C. Al incubarse extractos de glándula digestiva de cada fenotipo de tripsina de la langosta espinosa *P. argus* con harina de soya, se encontró que hay diferencias en los porcentajes de digestibilidad siendo el fenotipo B el menos eficiente para hidrolizar proteína de la harina de soya. También, se encontró que extractos de glándula digestiva con el fenotipo de tripsina A pueden hidrolizar hasta el 40% de la harina de soya, pero no hidroliza al SBTI, cual sigue siendo visible por medio de electroforesis después de 6 h de incubación (Perera *et al.*, 2010). En un estudio anterior ya se había

demostrado que las isotripsinas digestivas de la langosta espinosa *P. argus* son inhibidas por el SBTI y que también hay metalo peptidasas digestivas en esta especie (Perera *et al.*, 2008); sin embargo aún no se han identificado por medio de zimogramas para hacer comparaciones con las metalo peptidasas encontradas en camarón.

Los artrópodos han mostrado diferentes respuestas cuando se enfrentan a inhibidores de peptidasas: (1) hidrólisis del SBTI por parte de aspártico peptidasas en el gorgojo *Callosobruchus maculatus* (Amirhusin *et al.*, 2007), (2) compensación con cisteíno peptidasas digestivas del gorgojo de la harina *Tribolium castaneum* (Oppert *et al.*, 2005) y (3) compensación con el aumento de la expresión génica y actividad de serino peptidasas en la pulga de agua dulce *Daphnia magna* (Schwarzenberger *et al.*, 2010). Los resultados del presente estudio sugieren que el sistema digestivo del camarón blanco responde a la presencia del SBTI en el alimento modificando los perfiles de peptidasas en la glándula digestiva, pues se observa que hay serino peptidasas diferentes a las isotripsinas y quimotripsinas del camarón que aumentan su actividad enzimática, principalmente con 0.2% de SBTI en el alimento. También en este estudio se encontró que metalo peptidasas digestivas aumentan su actividad ante la presencia de SBTI en el alimento. Estudios previos han reportado que la respuesta del sistema digestivo a inhibidores en el alimento depende de la concentración y tiempo de exposición de los inhibidores en el alimento (Schwarzenberger *et al.*, 2010). La mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* al estar expuesta a 0.2% de SBTI en el alimento tiene una mortalidad del 20% (Silva *et al.*, 2006), en camarón una concentración de 0.2% de SBTI en el alimento no tuvo como consecuencia un aumento en la tasa de mortalidad, pero sí una disminución en la actividad enzimática de tripsinas y quimotripsinas.

En general, existe un amplio número de reportes sobre el efecto de la inclusión de harina de soya en alimentos para acuicultura sobre la fisiología de diversos organismos acuáticos, en especial para el cultivo de camarón (Alvarez *et*

al., 2007; Gong *et al.*, 2012; Sabry-Neto *et al.*, 2016; Samocha *et al.*, 2004; Sookying y Davis, 2011). Entre ellos se ha reportado que a partir de la sustitución del 40% de harina de pescado con harina de soya se observó una reducción en la producción de camarones; la mayoría de las investigaciones que estudian la inclusión de harina de soya en alimentos para camarón son de largo periodo (semanas y meses), por lo que no han ayudado a esclarecer el tipo de efecto negativo, solo se observa disminución de la producción. En este estudio la toma de muestras de glándula digestiva en períodos cortos de tiempo permitió estudiar los cambios en la actividad de peptidasas por la presencia de la SBTI, permitiendo conocer el efecto a corto plazo sobre el sistema digestivo y la existencia de un mecanismo de compensación de la síntesis de otra clase de peptidasa, en este caso, metalo peptidasas antes de que se produzcan daños severos en la glándula digestiva.

9. CONCLUSIONES

El camarón blanco *L. vannamei* tiene la capacidad de responder ante la presencia de factores anti-nutricionales como el SBTI con un mecanismo de compensación enzimática el cual consiste en el aumento de la actividad de serino y metalo peptidasas. Esta respuesta de compensación enzimática en el camarón blanco depende del tiempo de exposición y del fenotipo de tripsinas que presente cada individuo, por lo que se rechaza la hipótesis nula.

La capacidad de compensación enzimática ante inhibidores es una generalidad en insectos. Este fenómeno ya se demostró en un crustáceo cladócero y este es el primer ejemplo de compensación enzimática en un crustáceo decápodo. En este trabajo, las peptidasas digestivas de camarón interactúan en una relación artificial con un inhibidor presente en la harina de soya, esto genera nuevas preguntas sobre si los peneidos están bajo presión por parte de inhibidores de peptidasas en su medio natural, ya que el tiempo de respuesta es corto, y sobre cómo los sistemas digestivos detectan la presencia de inhibidores en el alimento.

10. BIBLIOGRAFÍA

Agrawal, M.K., D. Bagchi, S.N. Bagchi. 2001. Acute inhibition of protease and suppression of growth in zooplankton, *Moina macrocopa*, by *Microcystis* blooms collected in Central India. *Hydrobiologia* 464: 37-44.

Alarcón, F.J., C. de Oña, M. Díaz, F.L. García-Carreño, F.J. Moyano, M.A. Navarrete del Toro. 2007. The effect of proteinase inhibitors in food protein hydrolysis by digestive proteinases of white shrimp (*Penaeus vannamei*) larvae. *J. Sci. Food Agric.* 126: 120-126.

Alonso-del-Rivero, M., S.A. Trejo, M.L. Reytor, M. Rodríguez-de-la-Vega, J. Delfín, J. Díaz, Y. González-González, F. Canals, M.A. Chavez, F.X. Aviles. 2012. Tri-domain bifunctional inhibitor of metalloproteases A and serine proteases isolated from marine annelid *Sabellastarte magnifica*. *J. Biol. Chem.* 287: 15427-15438.

Alvarez, J.S., A. Hernández-Llamas, J. Galindo, I. Fraga, T. García, H. Villarreal. 2007. Substitution of fishmeal with soybean meal in practical diets for juvenile white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante & Kensley 1997). *Aquac. Res.* 38: 689-695.

Amirhusin, B., R.E. Shade, H. Koiwa, P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, L.L. Murdock, K. Zhu-Salzman. 2007. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. *J. Insect Physiol.* 53: 734-740.

Amorim, T.M.L., L.L.P. Macedo, A.F. Uchoa, A.S Oliveira, J.C.M. Pitanga, F.P. Macedo, E.A. Santos, M.P. de Sales. 2008. Proteolytic digestive enzymes and peritrophic membranes during the development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): targets for the action of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and chitin-binding vicilin (EvV). *J. Agric. Food Chem.* 56: 7738-7745.

Andrés, M., E. Gisbert, M. Díaz, F.J. Moyano, A. Estévez, G. Rotllant. 2010. Ontogenic changes in digestive enzymatic capacities of the spider crab, *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 389: 75-84.

Austin, C.M. P.L. Jones, F. Stagnitti, B.D. Mitchell. 1997. Response of the yabby, *Cherax destructor* Clark, to natural and artificial diets: phenotypic variation in juvenile growth. *Aquaculture* 149: 39-46.

Baeverfjord, G., Å. Krogh. 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *J. Fish Dis.* 19: 375-387.

- Bautista-Teruel, M.N., P.S. Eusebio, T.P. Welsh. 2003. Utilization of feed pea, *Pisum sativum*, meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 225: 121-131.
- Becker-Pauly, C., O. Barré, O. Schilling, U. auf dem Keller, A. Ohler, C. Broder, A. Schütte, R. Kappelhoff, W. Stöcker, C.M. Overall. 2011. Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol. Cell Proteomics* 10: M111.009233.
- Becker-Pauly, C., B.C. Bruns, O. Damm, A. Schütte, K. Hammouti, T. Burmester, W. Stöcker. 2009. News from an ancient world: two novel astacin metalloproteases from the horseshoe crab. *J. Mol. Biol.* 385: 236-248.
- Beynon, R., J.S. Bond. 2001. *Proteolytic enzymes: A practical approach*. Oxford University Press. Second edition. Oxford. 320p.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buchanan, J., D. Poppi, R.T. Cowan. 1997. Effects of enzyme addition to canola meal in prawn diets. *Aquaculture* 151: 29-35.
- Bulbul, M., M.A. Kader, M. Asaduzzaman, M.A. Ambak, A.J.K. Chowdhury, M.S. Hossain, M. Ishikawa, S. Koshio. 2016. Can canola meal and soybean meal be used as major dietary protein sources for kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicas*?. *Aquaculture* 452: 194-199.
- Burgos-Hernández, A., S.I. Farias, W. Torres-Arreola, J.M. Ezquerro-Brauer. 2005. In vitro studies of the effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on trypsin-like and collagenase-like activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 250: 399-410.
- Campbell, N.A., J.B. Reece. 2007. *Biología*. Editorial Médica Paramericana. Séptima edición. México. 1532p.
- Chikwati, E.M., C. Sahlmann, H. Holm, M.H. Penn, Å. Krogdahl, A.M. Bakke-McKellep. 2013. Alterations in digestive enzyme activities during the development of diet-induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 402-403: 28-37.
- Chou, R.L., B.Y. Her, M.S. Su, G. Hwang, Y.H. Wu, H.Y. Chen. 2004. Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 229: 325-333.

Collins, S.A., A.R. Desai, G.S. Mansfield, J.E. Hill, A.G. Van Kessel, M.D. Drew. 2012. The effect of increasing inclusion rates of soybean, pea and canola meals and their protein concentrates on the growth of rainbow trout: Concepts in diet formulation and experimental design for ingredient evaluation. *Aquaculture* 344-349: 90-99.

Córdova-Murueta, J.H., F.L. García-Carreño. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210: 371-384.

Córdova-Murueta, J.H., F.L. García-Carreño, M.A. Navarrete del Toro. 2003. Digestive enzymes present in crustacean feces as a tool for biochemical, physiological, and ecological studies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 297: 43-56.

da Silva, D.S., C.F.R. de Oliveira, J.R.P. Parra, S. Marangoni, M.L.R. Macedo. 2014. Short and long-term antinutritional effect of the trypsin inhibitor ApTI for biological control of sugarcane borer. *J. Insect Physiol.* 61: 1-7.

Dall, W., B.J. Hill, P.C. Rothlisberg, D.J. Sharples. 1991. *The Biology of the Penaeidae* (Advances in Marine Biology, 27). Academic Press. First edition. London. 504p.

DiBella, F.P., I.E. Liener. 1969. Soybean trypsin inhibitor cleavage and identification of a disulfide bridge not essential for activity. *J. Biol. Chem.* 244: 2824-2829.

Elpidina, E.N., T.A. Tsybina, Y.E. Dunaevsky, M.A. Belozersky, D.P. Zhuzhikov, B. Oppert. 2005. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Biochimie* 87: 771-779.

Francis, G., H.P.S. Makkar, K. Becker. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199: 197-227.

Fuertes, J.B., J.D. Celada, J.M. Carral, M. Sáez-Royuela, A. González-Rodríguez. 2012. Effects of dietary protein and different levels of replacement of fish meal by soybean meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture* 364-365: 338-344.

García-Carreño, F., M.P. Hernández-Cortés, N.F. Haard. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1456-1461.

García-Carreño, F.L., L.E. Dimes, N.F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214: 65-69.

García-Fernández, R., T. Pons, M. Perbandt, P.A. Valiente, A. Talavera, Y. González-González, D. Rehders, M.A. Chávez, C. Betzel, L. Redecke. 2012. Structural insights into serine protease inhibition by a marine invertebrate BPTI Kunitz-type inhibitor. *J. Struct. Biol.* 180: 271-279.

García-Meilán, I., B. Ordóñez-Grande, J.M. Valentín, M.D. Hernández, B. García, R. Fontanillas, M.A. Gallardo. 2016. Modulation of digestive and absorptive processes with age and/or after a dietary change in gilthead sea bream. *Aquaculture* 459: 54-64.

Gong, H., D. Jiang, F. Alig, A.L. Lawrence. 2012. Effects of dietary protein level and source on the growth and survival of two genetic lines of specific-pathogen-free Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 338-341: 118-123.

Hedstrom, L. 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* 102: 4501-4523.

Hehemann, J., L. Redecke, J. Murugaiyan, M. Bergen, C. Von Betzel, R. Saborowski. 2008. Autoproteolytic stability of a trypsin from the marine crab *Cancer pagurus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370: 566-571.

Hernández-Cortés, P., J.R. Whitaker, F.L. García-Carreño. 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *J. Food Chem.* 21: 497-514.

Hill, R.W., G.A. Wyse, M. Anderson. 2006. *Fisiología animal. Médica Paramericana. Tercera edición. Madrid. 655p.*

Koolman J., K.H. Röhm. 2005. *Bioquímica: texto y atlas. Editorial Médica Paramericana. Tercera edición. México. 488p.*

Krogdahl, Å., A.M. Bakke-McKellep, G. Baeverfjord. 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo solar* L.). *Aquac. Nutr.* 9: 361-371.

Krogdahl, Å., T. Berg-Lea. 1992. Effects of a soybean proteinase inhibitor on trypsin activity and digestibilities of amino acids in rainbow trout measured in the proximal and distal intestine and in faeces. *Aquaculture* 100: 232-233.

Kumaraguru Vasagam, K.P., T. Balasubramanian, R. Venkatesan. 2007. Apparent digestibility of differently processed grain legumes, cow pea and mung bean in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius and associated histological anomalies in hepatopancreas and midgut. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132: 250-266.

- Kuster, C.J., A. Schwarzenberger, E. Von Elert. 2013. Seasonal dynamics of sestonic protease inhibition: Impact on *Daphnia* populations. *Hydrobiologia* 715: 37-50.
- Laskowski, M., I. Kato. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 593-626.
- Le Boulay, C., A. Van Wormhoudt, D. Sellos. 1996. Cloning and expression of cathepsin L-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle. *J. Comp. Physiol. B* 166: 310-318.
- Lehnert, S.A., S.E. Johnson. 2002. Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the Black Tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 133: 163-171.
- Lemos, D., F.L. García-Carreño, P. Hernández, M.A. Navarrete del Toro. 2002. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA content of larval and postlarval white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture* 214: 363-380.
- Lemos, D., A. Navarrete del Toro, J.H. Córdova-Murueta, F. García-Carreño. 2004. Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: In vitro determination of protein digestibility and proteinase inhibition. *Aquaculture* 239: 307-321.
- Li, P.Y., J.Y. Wang, Z.D. Song, L.M. Zhang, H. Zhang, X.X. Li, Q. Pan. 2015. Evaluation of soy protein concentrate as a substitute for fishmeal in diets for juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture* 448: 578-585.
- Lim, C., W. Dominy. 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 87: 53-63.
- Martínez-Córdova, L.R., M. Martínez-Porchas, E. Cortés-Jacinto. 2014. Alimentos y estrategias de alimentación para una acuicultura sustentable. AGT Editor. Primera edición. Hermosillo. 163p.
- Molina-Poveda, C., H. Villareal-Colmenares. 2008. Estrategias de alimentación en la etapa de engorda del camarón. CIBNOR. Primera edición. La Paz. 130p.
- Muhlia-Almazán, A., A. Sánchez-Paz, F. García-Carreño. 2008. Invertebrate trypsins: a review. *J. Comp. Physiol. B* 178:655-672.
- Navarrete del Toro, M.A., F.L. García-Carreño, J.H. Córdova-Murueta. 2011. Comparison of digestive proteinases in three peneaids. *Aquaculture* 317: 99-106.

Navarrete del Toro, M.A., F.L. García-Carreño, P. Hernández-Cortés, T. Molnár, L. Gráf. 2015. Biochemical characterisation of chymotrypsin from the midgut gland of yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis*. Food Chem. 173: 147-155.

Nelson, D.L., M.M. Cox. 2012. Lehninger Principles of biochemistry. Worth Publisher. Sixth edition. New York. 1340p.

Nunes, E.T., A.A. Braga, M.I. Camargo-Mathias. 2014. Histochemical study of the hepatopáncreas in adult females of the pink-shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* Latreille, 1817. Acta Histochem. 116: 243-251.

Oliva, M.L.V., M.C.C. Silva, R.C. Sallai, M.V. Brito, M.U. Sampaio. 2010. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. Biochemie 92: 1667-1673.

Oppert, B., E.N. Elpidina, M. Toutges, S. Mazumdar-Leighton. 2010. Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors. Comp. Biochem. Physiol. D 5:280-287.

Oppert, B., T.D. Morgan, K. Hartzler, K.L. Kramer. 2005. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Comp. Biochem. Physiol. C 140: 53-58.

Pathy, A., T. Molnár, P. Porrogi, R. Naudé, L. Gráf. 2015. Isolation and characterization of a protease inhibitor from *Acacia karroo* with a common combining loop and overlapping binding sites for chymotrypsin and trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 565: 9-16.

Penn, M.H., E.Å. Campbell, Å. Krogdahl. 2011. High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 310: 267-273.

Perera, E., F.J. Moyano, M. Díaz, R. Perdomo-Morales, V. Montero-Alejo, L. Rodríguez-Viera, E. Alonso, O. Carrillo, G.S. Galich. 2008. Changes in digestive enzymes through developmental and molt stages in the spiny lobster, *Panulirus argus*. Comp. Biochem. Physiol. B 151: 250-256.

Perera, E., F.J. Moyano, L. Rodríguez-Viera, A. Cervantes, G. Martínez-Rodríguez, J.M. Mancera. 2010. In vitro digestión of protein sources by crude enzyme extracts of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) hepatopancreas with different trypsin isoenzyme patterns. Aquaculture 310: 178-185.

Piedad-Pascual, F., E.M. Cruz, A. Sumalangcay. 1990. Supplemental feeding of *Penaeus monodon* juveniles with diets containing various levels of defatted soybean meal. Aquaculture 89: 183-191.

Ranasinghe, S., D.P. McManus. 2013. Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. *Dev. Comp. Immunol.* 39: 219-227.

Rawlings, N.D., G. Salvesen. 2013. *Handbook of proteolytic enzymes*. Elsevier. Third edition. Amsterdam. 3932p.

Rengasamy, K.R.R., M.G. Kulkarni, W.A. Stirk, J. Van Staden. 2014. Advances in algal drug research with emphasis on enzyme inhibitors. *Biotechnol. Adv.* 32: 1364-1381.

Ruppert, E.E., R.D. Barnes. 1996. *Zoología de invertebrados*. McGraw-Hill Interamericana. Sexta edición. México. 1114p.

Sabry-Neto, H., D. Lemos, T. Raggi, A.J.P. Nunes. 2016. Effects of soy protein ratio, lipid content and minimum level of krill meal in plant-based diets over the growth and digestibility of the White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Nutr.* doi: 10.1111/anu.12392.

Sainz, J.C., F.L. García-Carreño, J.H. Córdova-Murueta, P. Cruz-Hernández. 2005. Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) isotrypsins: Their genotype and modulation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 326: 105-113.

Sainz, J.C., F.L. García-Carreño, P. Hernández-Cortés. 2004. *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. *Biochemistry* 138: 155-162.

Samocha, T.M., D.A. Davis, I.P. Saoud, K. Debault. 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 231: 197-203.

Schoofs, L., M. Salzet. 2002. Trypsin and chymotrypsin inhibitors in insects and gut leeches. *Curr. Pharm. Design* 8: 125-133.

Schwarzenberger, A., A., Zitt, P. Kroth, S. Mueller, E. Von Elert. 2010. Gene expression and activity of digestive proteases in *Daphnia*: effects of cyanobacterial protease inhibitors. *BMC Physiology* 10: 1-15.

Semenova, S.A., G.N. Rudenskaya. 2009. The Astacin family of metalloproteinases. *Biochemistry Moscow* 3: 17-32.

Semenova, S.A., G.N. Rudenskaya, D.V. Rebrikov, V.A. Isaev. 2006. cDNA cloning, purification and properties of *Paralithodes camtschatica* metalloprotease. *Protein Peptide Lett.* 13: 571-575.

Silva, F.C.B.L., A. Alcazar, L.L.P. Macedo, A.S. Oliveira, F.P. Macedo, L.R.D.

Abreu, E.A. Santos, M.P. Sales. 2006. Digestive enzymes during development of *Ceratitits capitata* (Diptera: Tephritidae) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 561-569.

Silva, P.F., C. McGurk, D.L. Knudsen, A. Adams, K.D. Thompson, J.E. Bron. 2015. Histological evaluation of soya bean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Quantitative image analysis vs. semi-quantitative visual scoring. *Aquaculture* 445: 42-56.

Sookying, D., D.A. Davis. 2011. Pond production of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed high levels of soybean meal in various combinations. *Aquaculture* 319: 141-149.

Spit, J., S. Zels, S. Dillen, M. Holtof, N. Wynant, J. Vanden Broeck. 2014. Effects of different dietary conditions on the expression of trypsin- and chymotrypsin-like protease genes in the digestive system of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 48: 100-109.

Stephens, A., L. Rojo, S. Araujo-Bernal, F. García-Carreño, A. Muhlia-Almazan. 2012. Cathepsin B from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence analysis, tissues-specific expression and biological activity. *Comp. Biochem. Physiol. B* 161: 32-40.

Stöcker, W., R.L. Wolz, R. Zwilling, D.J. Strydom, D.S. Auld. 1988. Astacus protease, a zinc metalloenzyme. *Biochemistry* 27: 5026-5032.

Suárez, J.A., G. Gaxiola, R. Mendoza, S. Cadavid, G. Garcia, G. Alanis, A. Suárez, J. Faillace, G. Cuzon. 2009. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy Budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture* 289: 118-123.

Sudaryono, A., M.J. Hoxey, S.G. Kailis, L.H. Evans. 1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 134: 313-323.

Tacon, A.G.J., M. Metian. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285: 146-158.

Thomas, N.V., P. Manivasagan, S.K. Kim. 2014. Potential matrix metalloproteinase inhibitors from edible marine algae: A review. *Environ. Toxicol. Pharm.* 37: 1090-1100.

Tzuc, J.T., D.R. Escalante, R. Rojas Herrera, G. Gaxiola Cortés, M.L.A. Ortiz. 2014. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community

of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). SpringerPlus 3:280

U.S. Soybean Export Council. 2008. Soy protein concentrate for aquaculture feeds. <http://ussec.org/wp-content/uploads/2015/10/Soy-Protein-Concentrate-Aquaculture.pdf>

Upadhyay, S.K., K. Chandrashekar. 2012. Interaction of salivary and midgut proteins of *Helicoverpa armigera* with soybean trypsin inhibitor. Protein J. 31: 259-264.

Van Weel, P.B. 1974. "Hepatopancreas"? Comp. Biochem. Physiol. A 47: 1-9.

Van Wormhoudt, A., P. Le Chevalier, D. Sellos. 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine-protease with chymotrypsic and collagenolytic activities in a tropical shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. B 103: 675-680.

Vasudevan, D.M., S. Sreekumari, K. Vaidyanathan. 2012. Texto de Bioquímica para estudiantes de medicina. Jaypee Highlights Medical Publishers. Sexta edición. India. 657p.

Vilhelmsson, O.T., S.A.M. Martin, F. Médale, S.J. Kaushik, D.F. Houlihan. 2004. Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Brit. J. Nutr. 92: 71-80.

Vinokurov, K.S., E.N. Elpidina, B. Oppert, S. Prabhakar, D.P. Zhuzhikov, Y.E. Dunaevsky, M.A. Belozersky. 2006. Fractionation of digestive proteinases from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae and role in protein digestion. Comp. Biochem. Physiol. B 145: 138-146.

Vinokurov, K.S., E.N. Elpidina, D.P. Zhuzhikov, B. Oppert, D. Kodrik, F. Sehnal. 2009. Digestive proteolysis organization in two closely related tenebrionid beetles: Red flour beetle (*Tribolium castaneum*) and confused flour beetle (*Tribolium confusum*). Insect Biochem. 70: 254-279.

Von Elert, E., A. Zitt, A. Schwarzengerger. 2012. Inducible tolerance to dietary protease inhibitors in *Daphnia magna*. J. Exp. Biol. 215: 2051-2059.

Wei, J., X. Zhang, Y. Yu, F. Li, J. Xiang. 2014. RNA-Seq reveals the dynamic and diverse features of digestive enzymes during early development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. D 11: 37-44.

Yu, D.H., S.Y. Gong, Y.C. Yuan, Y.C. Lin. 2013. Effects of replacing fish meal with soybean meal on growth, body composition and digestive enzyme activities of juvenile Chinese sucker, *Mixocyprinus asiaticus*. Aquacult. Nutr. 19: 84-90.

Zhao, Z.Y., Z.X. Yin, S.P. Weng, H.J. Guan, S.D. Li, K. Xing, S.M. Chan, J.G. He. 2007. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization. *Fish Shellfish Immun.* 22: 520-534.

Zhu-Salzman, K., R. Zeng. 2014. Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annu. Rev. Entomol.* 60:1-20.