



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

IMPORTANCIA RELATIVA DE LA TRIPSINA DIGESTIVA EN EL
CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Penaeus vannamei*.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

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

P r e s e n t a

Mónica Buendía Padilla

La Paz, Baja California Sur, septiembre de 2024.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:00 horas del día 29 del Mes de agosto del 2024, 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:

"IMPORTANCIA RELATIVA DE LA TRIPSINA DIGESTIVA EN EL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Penaeus vannamei*"

Presentada por la alumna:

Mónica Buendía Padilla

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.



Dra. Liliana C. Rojo Arreola
Co-Directora de Tesis



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Co-Tutora

LA COMISIÓN REVISORA

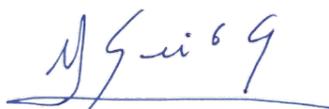
Dr. Julio H. Córdova Murueta
Co-Director de Tesis



Dra. Adriana T. Muhlia Almazán
Co-Tutora



Dr. Anthony J. O'Donohue
Co-Tutor

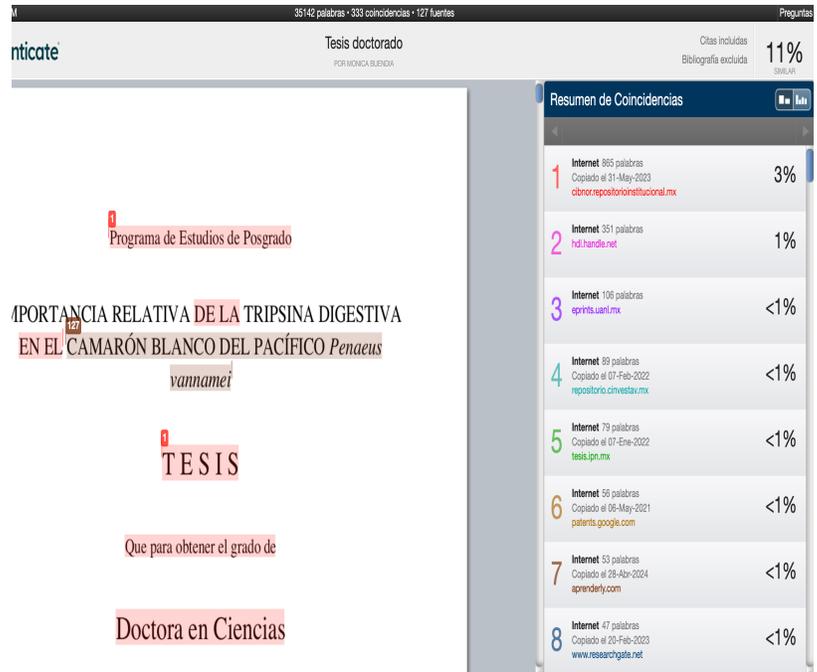


Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 22 de Agosto de 2024.

Los miembros del comité de tesis del (Ia) estudiante Mónica Buendía Padilla- del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio: iThenticate
- Filtros utilizados:
Excluir bibliografía
Excluir Materiales y Métodos
- Porcentajes de similitud: 11%
Se muestra captura de pantalla



Resumen de Coincidencias	
1	Internet 865 palabras Copiado el 31-May-2023 cibnor.repositorioinstitucional.mx 3%
2	Internet 331 palabras hdl.handle.net 1%
3	Internet 106 palabras eprints.uaem.mx <1%
4	Internet 89 palabras Copiado el 07-Feb-2022 repositorio.cinvestav.mx <1%
5	Internet 79 palabras Copiado el 07-Ene-2022 tesis.pn.mx <1%
6	Internet 56 palabras Copiado el 06-May-2021 patents.google.com <1%
7	Internet 53 palabras Copiado el 28-Abr-2024 aprendierly.com <1%
8	Internet 47 palabras Copiado el 20-Feb-2023 www.researchgate.net <1%

Firmas del Comité



Dra. Liliana Rojo Arreola



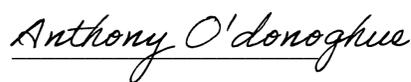
Dr. Julio Córdova Murueta



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez



Dra. Adriana Muhlia Almazán



Dr. Anthony J. O'Donoghue

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.
Co-Director de Tesis

Dr. Fernando Luis García Carreño
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.
Co-Director de Tesis†

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.
Co-Tutora de Tesis

Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.
Co-Tutora de Tesis

PhD. Anthony J. O'Donoghue
University of California, San Diego
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Dr. Julio Humberto Córdova Murueta
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
Dr. Anthony J. O'Donoghue

Jurado de Examen

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Dr. Julio Humberto Córdova Murueta
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
Dr. Anthony J. O'Donoghue

Suplentes

Dra. Martha Patricia Hernández Cortés
Dr. Alberto Peña Rodríguez

Resumen

Las peptidasas digestivas son enzimas que hidrolizan las proteínas del alimento, su abundancia e importancia varía entre organismos. En los camarones peneidos el 60% de la hidrólisis es efectuada por las serino peptidasas tripsina y quimotripsina. En la glándula digestiva (GD) del camarón blanco del Pacífico, *Penaeus vannamei*, se hallan al menos una docena de endopeptidasas; se tienen identificadas al menos tres tripsinas, dos quimotripsinas, y una metalopeptidasa (Mpc1). Una pregunta que surge es por qué hay tal cantidad de peptidasas, y cuál es su importancia relativa en la digestión de la proteína del alimento. Se ha sugerido que, ante la inhibición de la actividad de la tripsina, otras peptidasas del repertorio (especialmente Mpc1) compensan la función. El objetivo general de este trabajo es conocer la importancia relativa de la tripsina digestiva en *P. vannamei*. Para ello, se utilizó RNAi para silenciar tripsina y se evaluó el efecto tanto en la expresión como en la actividad de tripsinas y otras peptidasas digestivas para determinar si hay compensación a nivel transcripcional, también se midió el efecto en el perfil de aminoácidos (aa) del músculo. La interferencia se produjo mediante inyección de dsRNA de tripsina-2 (dsRNA-Try2) en GD. Los controles negativos incluyeron especímenes no inyectados, inyectados en GD con NaCl 0.9% o con dsRNA-GFP. Se realizaron dos bioensayos (B1-B2), en ambos se cuantificó la expresión génica en GD de las peptidasas tripsina-1, -2, -3, quimotripsina-B1, y Mpc1, mediante RT-qPCR; también se cuantificaron las actividades proteolíticas total y específica (tripsina y quimotripsina), así como la evaluación del perfil de proteínas y bandas de actividad (zimografía). Los resultados de expresión génica del B1, muestran que la tripsina-2 disminuyó, aunque no significativamente, a partir de las 48 horas post-inyección (hpi) del dsRNA-Try2, y hasta las 120 hpi. Este mismo patrón se observó en la expresión génica de la tripsina-1, la quimotripsina-B1, y la Mpc1, e incluso en las actividades proteolíticas. La zimografía de GD de los especímenes experimentales evidenció una disminución en la intensidad de las bandas de actividad correspondientes a las tripsinas, pero principalmente a las correspondientes a la Mpc1. Los resultados fueron similares para el B2, que duró 17 días y consistió en tres inyecciones del tratamiento espaciadas seis días, y tres muestreos (120 h después de cada inyección). Con tres inyecciones, el dsRNA-Try2 disminuyó significativamente la actividad específica de la tripsina respecto a los inyectados con dsRNA-GFP ($p < 0.01$) o NaCl ($p < 0.05$); también disminuyeron significativamente la actividad proteolítica total ($p < 0.05$) y la específica de quimotripsina ($p < 0.05$), respecto al dsRNA-GFP. Al igual que en el B1, las bandas de actividad de las tripsinas y de la Mpc1 fueron menos intensas. El silenciamiento también afectó la abundancia de los aa en músculo, la histomorfología de la GD y la ganancia de peso. Los datos obtenidos sugieren que la expresión de la tripsina podría regular la expresión génica de otras peptidasas digestivas (como la Mpc1), no obstante, aún falta explorar el mecanismo. Por otro lado, no hubo evidencia de una compensación a la disminución de los transcritos de tripsina.

Palabras clave: Crustacea, hepatopáncreas, proteasa, RNAi, silenciamiento génico.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8570-379X>



Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Summary

Digestive peptidases are enzymes that hydrolyze dietary proteins, and their abundance and importance vary among organisms. In penaeid shrimps, 60% of protein hydrolysis is carried out by the serine peptidases trypsin and chymotrypsin. In the digestive gland (DG) of the Pacific whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*, at least a dozen endopeptidases have been identified, including three trypsins, two chymotrypsins, and one metallopeptidase (Mpc1). A fundamental question is why there is such a variety of peptidases and what their relative importance is in the digestion of dietary proteins. It has been suggested that when trypsin activity is inhibited, other peptidases in the repertoire (especially Mpc1) compensate for this function. The general objective of this work is to understand the relative importance of digestive trypsin in *P. vannamei*. To address it, trypsin was silenced through RNAi, the effect on the expression and activity of trypsins and other digestive peptidases was evaluated to determine if there is transcriptional compensation. The effect on the amino acids (AA) profile of the muscle was also determined. Interference was induced by injecting trypsin-2 dsRNA (dsRNA-Try2) into the DG. Negative controls included non-injected specimens, specimens injected with 0.9% NaCl in the DG, or with dsRNA-GFP. Two bioassays (B1-B2) were conducted; in both, gene expression of the peptidases trypsin-1, -2, -3, chymotrypsin-B1, and Mpc1 in the DG was quantified by RT-qPCR. Total and specific proteolytic activities (trypsin and chymotrypsin) were also quantified, as well as the protein profile and activity bands (zymography). Gene expression results from B1 show that trypsin-2 decreased, although not significantly, at 48 hours post-injection (hpi) of dsRNA-Try2 and maintained up to 120 hpi. The same pattern was observed in the gene expression of trypsin-1, chymotrypsin-B1, and Mpc1, as well as in proteolytic activities. Zymography of the DG from experimental specimens showed a decrease in the intensity of the activity bands corresponding to trypsins, but mainly those corresponding to Mpc1. The results were similar for B2, which lasted 17 days and consisted of three injections spaced six days apart, and three samplings (120 hours after each injection). With three injections, dsRNA-Try2 significantly decreased specific trypsin activity compared to those injected with dsRNA-GFP ($p < 0.01$) or NaCl ($p < 0.05$); total proteolytic activity ($p < 0.05$) and specific chymotrypsin activity ($p < 0.05$) also decreased significantly compared to dsRNA-GFP. As in B1, the activity bands of trypsins and Mpc1 were less intense. Silencing also affected AA abundance in muscle, DG histomorphology, and weight gain. The data obtained suggest that trypsin expression may regulate the gene expression of other digestive peptidases (such as Mpc1); however, the mechanism still needs to be explored. On the other hand, there was no evidence of compensation for the reduction in trypsin transcripts.

Keywords: Crustacea, hepatopancreas, protease, RNAi, gene silencing.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8570-379X>

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola



Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Dedicatoria

*A mi mamá
Concepción P. Vázquez
y a Pastecita (coautora de esta tesis)*

Agradecimientos

Al CONAHCYT por la beca otorgada No. 382926, así como por el financiamiento de la investigación a través del proyecto Descifrando el sistema digestivo de decápodos No. 60120.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) S. C. por permitirme realizar el Doctorado. A la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos y a su personal, a Tania Verónica Núñez Valdez, Lic. Raquel Emilia Herrera y Lic. Horacio Sandoval Gómez. A Ana María Talamantes Cota y a Susana Luna de la Biblioteca. A los conductores de los autobuses, especialmente a Heraclio, y a los vigilantes CIBNOR por las facilidades otorgadas para llevar a cabo mis estudios de manera adecuada.

Al Laboratorio de Bioquímica del CIBNOR. Tanto a los ex integrantes como a los miembros actuales, porque gracias al trabajo de todos ustedes el Instituto tiene uno de los mejores laboratorios de investigación.

A la Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola, el enorme motorcito de esta investigación. Gracias de corazón por toda la confianza depositada en mí y el gran apoyo. Con tu ánimo y paciencia fui avanzando.

Al Dr. Julio Humberto Córdova Murueta por su apoyo y comentarios acerca de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a María de los Ángeles Navarrete del Toro (mejor conocida como Ann), Técnico del Laboratorio de Bioquímica. Porque siempre estuviste al pendiente (en todos los aspectos) para que pudiera llevar a cabo mi trabajo en las mejores condiciones. Por los consejos e instrucción en el uso de los reactivos y equipo, y organización del Lab. Y por tu infinita paciencia cuando te pregunté varias veces lo mismo.

Al Dr. Fernando Luis García Carreño, por aceptarme sin dudar como parte del Laboratorio de Bioquímica y motivarme con su inquebrantable entusiasmo a explorar el mundo de las proteasas. Por el conocimiento compartido y porque siempre tuvo el tiempo e interés por discutir acerca de este trabajo. Gracias Doc a donde quiera que esté.

Al Comité Tutorial: Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola, Dr. Julio Humberto Córdova Murueta, Dr. Fernando Luis García Carreño, Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán, Dr. Anthony J. O'Donoghue, Dra. Crisalejandra Rivera Pérez. Por su tiempo y valiosas aportaciones a lo largo de este trabajo.

A quienes participaron en uno o más muestreos durante los bioensayos: Dra. Liliana Rojo, Dr. Julio Córdova, Ann (María de los Ángeles Navarrete), Paty Olgúin, Alejandro Palomares y Dani Gutiérrez.

A la Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo por sus comentarios acerca de las imágenes histológicas, y a María Eulalia Meza Chávez por la preparación de las laminillas, del Laboratorio de Histología e Histoquímica.

A Sindi Areli Juan Antúnez del Laboratorio de Análisis Químico Proximal y a Daniel Octavio Ceseña Ojeda del Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos, ambos del CIBNOR, por la determinación de aminoácidos en músculo de camarón.

A Larvas Gran mar S.A. de C.V., al Dr. Eduardo Quiroz Guzmán y al Dr. Alberto Peña Rodríguez, por la donación de los camarones utilizados en el presente estudio. Al M.C. Pablo Monsalvo Spencer por sus consejos para la desinfección del agua marina.

Al doc Edouard y a Maru por la confianza depositada en mí al compartir su morada. A Judith. Y a mis michi hermanos Potich y Lola, por los grandes momentos compartidos junto con Natalia, y por tanto cariño.

A Cinthya, Paos y Silvia que desde siempre y aún en la distancia me han acompañado y escuchado constantemente. A Gisele, Natalia, Sandy, Sarahy y Wenn, por su amistad y compañía durante mi estancia en La Paz.

A Lu, Pao, Dani y Efra, a Ríos Tarango A.C., por las oportunidades que me han dado y me han permitido continuar.

A mamá, papá, hermanas, sobrin@s, prim@s y tías, gracias por todo el apoyo.

A mi hermana la más pequeña, Pastecita etJAJ por escribir conmigo este documento.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
Nomenclatura y unidades	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Biología del camarón blanco del Pacífico	3
2.1.1 Posición taxonómica	3
2.1.2 Distribución geográfica y hábitat	5
2.1.3 Ciclo de vida	5
2.1.4 Hábitos alimenticios.....	6
2.1.5 Crecimiento y muda	7
2.1.6 Sistema digestivo	8
2.1.6.1 Glándula digestiva (GD) o hepatopáncreas.....	10
2.2 Peptidasas digestivas: de su síntesis a su activación catalítica	12
2.3 Clasificación de las peptidasas.....	14
2.3.1 Peptidasas de acuerdo con la reacción catalizada	14
2.3.2 Peptidasas de acuerdo con la naturaleza química del sitio catalítico	15
2.3.3 Peptidasas de acuerdo con sus relaciones evolutivas	18
2.4 Serinoendopeptidasas: Tripsinas y quimotripsinas.....	19
2.5 Metaloendopeptidasas: Astacinas	20
2.6 Colagenasas: unas endopeptidasas especiales	21
2.7 Peptidasas de la glándula digestiva de decápodos (Decapoda).....	22
2.7.1 Peptidasas de la glándula digestiva (GD) del camarón blanco del Pacífico (Penaeidae)	23
2.7.1.1 Regulación de las peptidasas digestivas en el camarón blanco del Pacífico e insectos	26
2.7.1.2 Tripsinas y quimotripsinas del camarón blanco del Pacífico	29
2.8 La compensación enzimática como respuesta a inhibidores de peptidasas.....	32
2.9 Silenciamiento génico mediado por RNA de interferencia (RNAi).....	33
2.9.1 Técnicas de suministro de moléculas de RNAi	34
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. HIPÓTESIS	37
5. OBJETIVOS	38
5.1 Objetivo general	38
5.2 Objetivos particulares.....	38
6. MATERIAL Y MÉTODOS	39
6.1 Identificación de las tripsinas de <i>P. vannamei</i> en bases de datos de genes y proteínas.....	39
6.2 Síntesis de dsRNA	39

6.2.1 Adición del promotor de la RNA polimerasa T7 a los genes de interés	39
6.2.2 Purificación del templado	41
6.2.3 Síntesis de RNA e hibridación de dsRNA.....	42
6.2.4 Purificación del dsRNA.....	42
6.3 Bioensayos para el silenciamiento de tripsina	42
6.3.1 Mantenimiento de los especímenes.....	43
6.3.2 Bioensayo-1 (corto): Una inyección de dsRNA-Try2.....	44
6.3.3 Bioensayo-2 (largo): Una a tres inyecciones de dsRNA-Try2.....	45
6.4 Cuantificación de la expresión relativa de mRNA	46
6.4.1 Extracción de RNA.....	46
6.4.2 Tratamiento del RNA con DNasa	46
6.4.3 Síntesis de cDNA	47
6.4.4 Cuantificación mediante qPCR.....	47
6.5 Medición de la actividad proteolítica total, de tripsina y quimotripsina	49
6.6 Separación de proteínas en gel y zimografía.....	50
6.6.1 Electroforesis	50
6.6.2 Zimogramas.....	51
6.7 Histología de la glándula digestiva	51
6.8 Aminoácidos libres en músculo	51
6.9 Análisis estadístico.....	52
7. RESULTADOS.....	53
7.1 Identificación de las tripsinas de <i>P. vannamei</i> en bases de datos de genes y proteínas.....	53
7.2 Bioensayo-1 (corto). Evaluación del efecto de una inyección de dsRNA-Try2 en las peptidasas de la GD	59
7.2.1 Efecto del dsRNA-Try2 en la expresión relativa de genes de peptidasas en GD (Bioensayo-1)	59
7.2.2 Efecto del dsRNA-Try2 en la actividad proteolítica en GD (Bioensayo-1)	62
7.2.3 Efecto del dsRNA-Try2 en el perfil de proteínas y peptidasas en GD (Bioensayo-1)	62
7.3 Bioensayo-2 (largo). Evaluación del efecto de una a tres inyecciones de dsRNA-Try2 en las peptidasas de la GD	63
7.3.1 Efecto del dsRNA-Try2 en la actividad proteolítica en GD (Bioensayo-2)	63
7.3.2 Perfil de aminoácidos de músculo (Bioensayo-2).....	65
7.3.3 Efecto del dsRNA-Try2 en el perfil de proteínas y peptidasas en GD (Bioensayo-2)	65
7.3.4 Efecto del dsRNA-Try2 en la histomorfología de la GD (Bioensayo-2).....	67
8. DISCUSIÓN	68
8.1 Tripsinas de la GD de <i>P. vannamei</i>	68
8.2 Efecto del dsRNA-Try2 en la expresión relativa de genes de peptidasas en GD.....	70
8.3 Efecto del dsRNA-Try2 en la actividad proteolítica y en el perfil de peptidasas de la GD ...	73
8.4 Efecto del dsRNA-Try2 en el perfil de aminoácidos de músculo.....	74
9. CONCLUSIONES	78
10. LITERATURA CITADA.....	79
11. ANEXOS	93
Anexo A. dsRNA utilizado para los bioensayos de silenciamiento	93
Anexo B. Análisis de las secuencias de tripsina en <i>P. vannamei</i>	93
Anexo C. Tripsinas putativas en el genoma de <i>P. vannamei</i>	96

Anexo D. Expresión génica absoluta de peptidasas de la GD	101
Anexo E. Prebioensayo-2.....	102
Anexo F. Pesos de especímenes de camarón (Bioensayo-2)	102
Anexo G. Aminoácidos en músculo de <i>P. vannamei</i>	103
Anexo H. Perfil de proteínas y peptidasas en GD (Bioensayo-2)	103
Anexo I. Artículo publicado.-DNA double-strand break repair machinery in Penaeid crustaceans: A focus on the Non-Homologous End-Joining pathway.....	104
Anexo J. Artículo sometido.- dsRNA mediated silencing of trypsin affects the digestive capacity in the Pacific whiteleg shrimp (<i>Penaeus vannamei</i>).....	113

Lista de figuras

Figura 1. Morfología y ciclo de vida del camarón blanco del Pacífico.	3
Figura 2. Sistema digestivo de los camarones peneidos.	9
Figura 3. Clases de peptidasas de acuerdo con su mecanismo catalítico	16
Figura 4. Sitio activo e interacción de las peptidasas con su sustrato.....	17
Figura 5. Síntesis de dsRNA.	40
Figura 6. Bioensayos para la disminución de la expresión génica de la tripsina digestiva en <i>P. vannamei</i>	43
Figura 7. Alineamiento de tres genes de tripsina de <i>P. vannamei</i>	55
Figura 8. Expresión génica y actividad peptidasa en GD de <i>P. vannamei</i> (Bioensayo-1).	61
Figura 9. Perfil de proteínas y peptidasas con una inyección de tratamiento en GD de <i>P. vannamei</i> (Bioensayo-1).....	63
Figura 10. Actividad peptidasa en GD y perfil de aminoácidos en músculo, con más de una inyección de tratamiento en <i>P. vannamei</i> (Bioensayo-2).....	64
Figura 11. Perfil de proteínas y peptidasas con tres inyecciones de tratamiento en GD de <i>P. vannamei</i> (Bioensayo-2).....	66
Figura 12. Histomorfología de la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> (Bioensayo-2).	67
Figura 13. dsRNA que se utilizó para el bioensayo-3.....	93
Figura 14. Matriz de porcentaje de identidad de tres genes de tripsina de <i>P. vannamei</i>	93
Figura 15. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las tripsinas de <i>P. vannamei</i>	94
Figura 16. Matriz de porcentaje de identidad de las proteínas de tripsina de <i>P. vannamei</i>	95
Figura 17. Matriz de porcentaje de identidad de las tripsinas putativas de <i>P. vannamei</i>	98
Figura 18. Expresión génica absoluta de peptidasas de la GD. Camarones controles sin inyectar del Bioensayo-1.	101
Figura 19. Actividad de la tripsina con una o dos dosis del tratamiento (Prebioensayo-2).....	102
Figura 20. Perfil de peptidasas con tres inyecciones de tratamiento en GD de <i>P. vannamei</i> (Bioensayo-2).....	103

Lista de tablas

Tabla 1. Peptidasas digestivas en <i>P. vannamei</i> de acuerdo con evidencia experimental.....	24
Tabla 2. Correlación isoformas-cDNA de tripsina en <i>P. vannamei</i>	30
Tabla 3. Quimotripsinas en <i>P. vannamei</i>	32
Tabla 4. Oligonucleótidos para las síntesis de dsRNA.	41
Tabla 5. Oligonucleótidos para qPCR.	48
Tabla 6. Genes, transcritos y proteínas de tripsina en <i>P. vannamei</i> de acuerdo con varias referencias.....	53
Tabla 7. BLASTn de los genes de tripsina en <i>P. vannamei</i> descritos por Klein <i>et al.</i> (1998)	95
Tabla 8. BLASTx de los genes de tripsina en <i>P. vannamei</i> descritos por Klein <i>et al.</i> (1998).....	96
Tabla 9. <i>Scaffolds</i> , genes, transcritos, y proteínas de tripsina en <i>P. vannamei</i> de acuerdo a las anotaciones del NCBI en el genoma de referencia (ASM378908v1)	96
Tabla 10. Porcentajes de identidad* entre el gen 3 (Y15041.1) y tres genes putativos de tripsina	96
Tabla 11. Sitios importantes en las tripsinas putativas de <i>P. vannamei</i> (Tabla 9) de acuerdo con InterPro 100.0	97
Tabla 12. Resultado del tBLASTn de H6WSS5 (tripsina C putativa) contra el transcriptoma de GD de <i>P. vannamei</i> (Tinwongger <i>et al.</i> , 2019) en CrustyBase.	99
Tabla 13. Resultado del tBLASTn de H6WSS5 (tripsina C putativa) contra el transcriptoma de branquias de <i>P. vannamei</i> (Zhang <i>et al.</i> , 2016) en CrustyBase.....	100
Tabla 14. Resultado del tBLASTn de las tripsinas halladas en proteoma de GD de <i>P. vannamei</i> (Estrella-Soliz, 2022).....	101
Tabla 15. Diferencias de peso de los especímenes de <i>P. vannamei</i> del Bioensayo-2	102
Tabla 16. Aminoácidos* no esenciales en músculo de <i>P. vannamei</i>	103
Tabla 17. Aminoácidos* esenciales en músculo de <i>P. vannamei</i>	103

Nomenclatura y unidades

A	Absorbancia
aa	Aminoácido(s)
aaE	aa Esenciales
aaNE	aa No Esenciales
BA _p NA	N α -Benzoil-DL-Arginina- <i>p</i> -Nitroanilida
cDNA	DNA complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
g	Gramos
GD	Glándula Digestiva o hepatopancreas
GFP	Proteína verde fluorescente
H&E	Hematoxilina y Eosina
H/h	Hora(s)
IHS	Índice hepatosomático
kDa	KiloDaltons
L	Litros
min	Minuto(s)
μ L	Microlitros
μ m	Micrómetros
μ M	Micromolar
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
Mpc 1	Metalopeptidasa o metaloproteasa 1
RNA _m	RNA mensajero
RNA _{pol}	RNA polimerasa
nm	Nanómetros
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases nucleotídicas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PL	Post-larva o decapodito
p.i.	Post-inyección
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
s	Segundos
SAAPF _p NA	N-Succinil-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe- <i>p</i> -Nitroanilida
SBTI	Inhibidor de tripsina de harina de soya
t.a.	Temperatura ambiente
UPS	Unidades prácticas de salinidad
xg	fuerza G o fuerza centrífuga relativa (RCF por sus siglas en inglés)

1. INTRODUCCIÓN

El camarón blanco del Pacífico, *Penaeus vannamei*, es una especie de gran importancia económica en la acuicultura global. Su capacidad para crecer rápidamente y su alta resistencia a condiciones ambientales adversas lo convierten en un recurso valioso. Una característica notable de *P. vannamei* es su complejo sistema digestivo, que incluye una amplia variedad de peptidasas, principalmente de la clase serino. Estas peptidasas juegan un papel crucial en la digestión de las proteínas del alimento, un proceso vital para el crecimiento y la salud del camarón.

El repertorio de peptidasas en *P. vannamei* es excepcionalmente diverso, caracterizado por la presencia de múltiples isoformas de peptidasas tripsinas y quimotripsinas. Esta diversidad plantea varias preguntas fundamentales: ¿Por qué el camarón blanco del Pacífico necesita tantas peptidasas? ¿Cuál es la importancia relativa de cada una de ellas? ¿Existe redundancia funcional entre estas enzimas? Una posible explicación es que esta diversidad permite al camarón adaptarse a variaciones en su dieta y a la presencia de moléculas antinutricionales, optimizando así su capacidad digestiva bajo diferentes condiciones ambientales.

Entre las peptidasas presentes en el camarón blanco del Pacífico, la tripsina ocupa un lugar destacado debido a su papel putativo en la iniciación de la cascada de activación de las peptidasas digestivas. La importancia de la tripsina se evidencia en su capacidad para desencadenar la activación de otras peptidasas, como la quimotripsina, facilitando así la degradación de proteínas complejas en componentes más simples que pueden ser fácilmente absorbidos por el organismo.

La pregunta central de esta tesis es: ¿Cuál es la importancia relativa de la tripsina en la digestión de la proteína en *P. vannamei*? Estudios previos han sugerido que la inhibición de la tripsina en la glándula digestiva puede ser compensada por la síntesis de otras peptidasas, particularmente aquellas de la clase metalo. Esta capacidad compensatoria sugiere un nivel de redundancia funcional y flexibilidad adaptativa en el sistema digestivo del camarón blanco.

Entender la importancia relativa de la tripsina y su interacción con otras peptidasas es crucial para optimizar la nutrición y el manejo de *P. vannamei* en la acuicultura. Por ejemplo, si se confirma

que la inhibición de la tripsina puede ser compensada por otras peptidasas, se podrían desarrollar estrategias alimenticias y tratamientos que potencien esta capacidad adaptativa, mejorando así la eficiencia de la conversión alimenticia y la salud general de los camarones.

Además, esta investigación puede proporcionar indicios valiosos sobre la evolución de los sistemas digestivos en crustáceos y otros organismos marinos. La presencia de múltiples isoformas de peptidasas y la capacidad de compensación observada en *P. vannamei*, pueden reflejar adaptaciones evolutivas a una dieta variada y a la presencia de inhibidores de proteasas en el medio ambiente.

En esta tesis se abordaron estas preguntas a través de una serie de experimentos diseñados para manipular la expresión de la tripsina y observar los efectos en el perfil de peptidasas y el estado nutricional de *P. vannamei*. Los resultados obtenidos abonan a la comprensión más profunda del papel de la tripsina y la dinámica de las peptidasas digestivas en este importante crustáceo, con implicaciones tanto para la ciencia básica como para la práctica acuícola.

2. ANTECEDENTES

2.1 Biología del camarón blanco del Pacífico

2.1.1 Posición taxonómica

El camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* Boone, 1931 (sinonimia no aceptada *Litopenaeus vannamei*), es un crustáceo de la superclase Multicrustacea: clase Malacostraca: subclase Eumalacostraca: superorden Eucarida: orden Decapoda: suborden Dendrobranchiata: superfamilia Penaeoidea: familia Penaeidae (Horton *et al.*, 2020; Figueredo *et al.*, 2023; National Center for Biotechnology Information, 2023).

El plan corporal de la clase Malacostraca consiste en: 1) cabeza fusionada al tórax (pereión) o cefalotórax (cubierto por un caparazón), 2) abdomen (pleón) y, 3) frecuentemente, cola. La cabeza, tórax y abdomen están segmentados en seis, ocho y seis somitas, respectivamente. (Rabet, 2021). Los apéndices del tórax se denominan pereiópodos. Cinco pares de pereiópodos son el epónimo (diez patas) del orden Decapoda: los tres primeros pares participan en la alimentación mientras que los otros dos pares auxilian en la locomoción. Los apéndices del abdomen se conocen como pleópodos e intervienen en el nado o locomoción (Boyd y Jescovitch, 2021) (Fig. 1a).

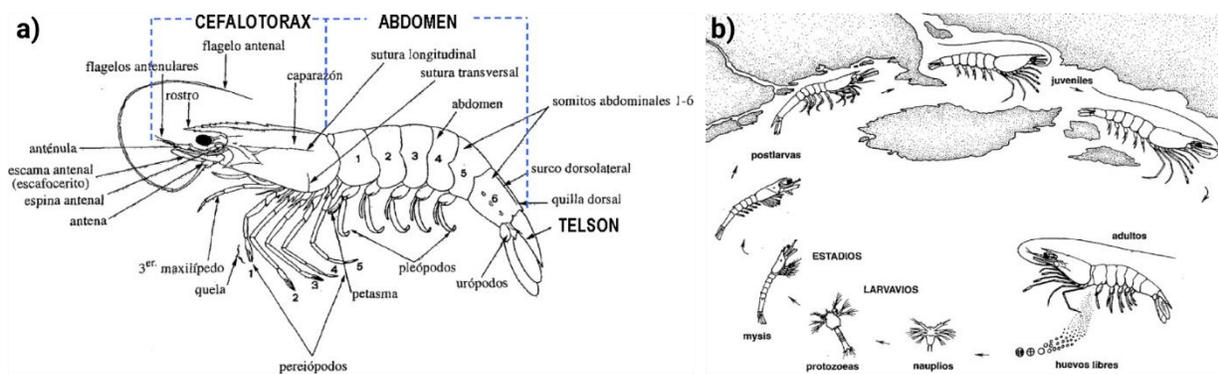


Figura 1. Morfología y ciclo de vida del camarón blanco del Pacífico. a) Morfología externa. b) El ciclo de vida de los camarones peneidos presenta alternancia entre una fase pelágica (en la que ocurre la fecundación) con otra bentónica (de postlarva o decapodito hasta adulto). Fuente: (Hendrickx, 1995).

Los decápodos son de los crustáceos más diversos en cuanto a variaciones del plan corporal (Schram, 2009), el taxón incluye varias especies de importancia económica (Anger, 2001). El orden Decapoda engloba a Dendrobranchiata con el suborden Pleocyemata. Dendrobranchiata contiene tanto camarones peneidos (Penaeoidea) como sergestoideos (Sergestoidea). Por otro lado, Pleocyemata comprende langostas espinosas (infraorden Achelata), cangrejos ermitaños (Anomura), langostas o cangrejos de río (Astacidea), cangrejos verdaderos (Brachyura), y camarones, langostinos o gambas (Caridea y Stenopodidea), entre otros (Horton *et al.*, 2020; National Center for Biotechnology Information, 2023).

La familia Penaeidae está conformada por 33 géneros que agrupan 229 especies de camarones o langostinos de agua marinas-salobres (Horton *et al.*, 2020; Figueredo *et al.*, 2023). Cabe mencionar que la clasificación taxonómica de los organismos de esta familia ha sido controversial, debido a que los datos moleculares (marcadores nucleares o mitocondriales o genoma mitocondrial completo) no soportan la clasificación basada en datos morfológicos (Figueredo *et al.*, 2023).

Los peneidos son los crustáceos económicamente más importantes. El aumento de su demanda (como alimento) actualmente no se satisface mediante la captura en su hábitat natural. Consecuentemente, el cultivo de camarón se ha intensificado. Esto ha posicionando a *P. vannamei* como el camarón mundialmente más cultivado, seguido por el camarón tigre gigante *Penaeus monodon* (Boyd y Jescovitch, 2021; Figueredo *et al.*, 2023).

Dada la importancia económica de los Penaeidae, existe un gran interés por el estudio de varios aspectos tanto de su fisiología como de su genética. A la fecha, se conocen los genomas de cinco especies: *Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus*, *P. monodon*, *P. vannamei*, y *Penaeus chinensis* (Sayers *et al.*, 2023; Zhang, 2023). En general, los peneidos son diploides (2n) con 88-92 cromosomas (Zhang *et al.*, 2023). En lo que respecta al número de pares de cromosomas del camarón blanco del Pacífico, los reportes no son consistentes. Dos estudios determinaron que *P. vannamei* tiene 44 pares de cromosomas, 2n= 88 cromosomas (Chow *et al.*, 1990; Campos-Ramos, 1997), mientras que en otro se reportó que tiene 46 pares (Mayorga, 1982). Los estudios

del cariotipo de los peneidos son limitados, posiblemente debido a que poseen un gran número de cromosomas (varios de tamaño parecido). Por lo que la aplicación de técnicas modernas podría impulsar nuevos descubrimientos acerca de los cromosomas de los peneidos (Zhang *et al.*, 2023).

2.1.2 Distribución geográfica y hábitat

Penaeus vannamei es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico que va desde México hasta el norte de Perú. En esta región (tropical-subtropical) las aguas tienen una temperatura promedio anual superior a 20°C (FAO, 2009; Ramos-Cruz, 2011; Boyd y Jescovitch, 2021). Los adultos se encuentran en aguas marinas, donde se capturan a 5-72 m de profundidad, aunque frecuentemente se hallan en aguas costeras marinas a 1-4 m (Hendrickx, 1995). Dada su historia de vida (ver apartado 2.1.3), la distribución del camarón incluye sistemas lagunares y estuarinos (salobres-dulces) para su crecimiento (Fig. 1b), por lo que suele estar expuesto a amplias variaciones en temperatura y salinidad (Hendrickx, 1995; Ponce-Palafox *et al.*, 1997).

P. vannamei tolera 1-40 unidades prácticas de salinidad (UPS), por lo que se considera una especie eurihalina (Ramos-Cruz, 2011). Ésta amplia tolerancia a la salinidad es una de las características que lo convierten en la especie de camarón más cultivada a nivel mundial (Boyd y Jescovitch, 2021). En condiciones de laboratorio, la temperatura y la salinidad relacionadas con una mejor sobrevivencia y crecimiento son de 28-30°C y 33-40 UPS, respectivamente (Ponce-Palafox *et al.*, 1997).

2.1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de los camarones peneidos presenta dos fases: pelágica y bentónica (Fig. 1b). En la fase pelágica ocurre la fecundación (simultánea al desove) y el subsiguiente desarrollo larvario, que se divide en los estadios de: nauplio (subestadios N1-N5 o N1-N6), (proto) zoea (Z1-Z3), mysis (M1-M3), y postlarva (PL) o decapodito. Algunos autores reemplazan el término “postlarva” por “decapodito”, restringiendo el primero (PL) a cuando no hay una distinción clara entre larva tardía y juvenil temprano (Anger, 2001; Rojo-Arreola *et al.*, 2020). Las PLs migran hacia las costas, donde adquieren hábitos bentónicos en estuarios, lagunas costeras o manglares, pasando de la etapa

juvenil a la adulta. Los adultos regresan a la zona oceánica, donde los machos adhieren un espermatóforo al tónico de las hembras, que nadan en la columna de agua para liberar ~100,000-250,000 huevos al cabo de unas horas (FAO, 2009).

2.1.4 Hábitos alimenticios

La dieta del camarón blanco cambia a lo largo de su ciclo de vida, lo que está relacionado con el hábitat (pelágico de huevo a postlarva o bentónico de juvenil a adulto, Fig. 1b), así como con el desarrollo del sistema digestivo (Fig. 2, apartado 2.1.6) (Lovett y Felder, 1989, 1990; Anger, 2001; Hernández-Cortes *et al.*, 2017; Rojo-Arreola *et al.*, 2020). Los nauplios carecen de un sistema digestivo formado pues se nutren de las reservas internas o vitelo (lecitotrofia), compuesto principalmente por vitelina (lipo-glico-caroteno-proteína multimérica). Durante la etapa de nauplio las cisteíno peptidasas (catepsina-C y -L, calpaína-B) destacan tanto en expresión como actividad, lo que sugiere que son la clase de peptidasas (Fig. 3, apartado 2.3.2) que hidrolizan las proteínas del vitelo como fuente de aminoácidos (AA) (Rojo-Arreola *et al.*, 2020).

Las larvas zoea se alimentan de microalgas. Durante esta etapa, la digestión es principalmente enzimática (en vez de mecánica) y las proteínas son digeridas por peptidasas de la clase serino, que se liberan de un ciego anterior, pues las zoea no tienen un sistema digestivo completamente formado. Durante el estadio mysis, las larvas se alimentan de microzooplancton (el sistema digestivo anterior se ha conectado con el medio), en este estadio se expresan y son activas tanto serino peptidasas como la aspártico peptidasa catepsina-D (Lovett y Felder, 1989; Hernández-Cortes *et al.*, 2017; Rojo-Arreola *et al.*, 2020). En el estadio post-larva o decapodito migran al bentos de zonas costeras, donde se alimentan de manera lenta pero frecuente de detritos u organismos bentónicos (Lim, 1998), durante esta etapa es considerado como carroñero (oportunista) omnívoro. La evaluación del contenido estomacal de los peneidos evidencia restos de bivalvos, gusanos poliquetos, nemátodos, ofiuridos, otros camarones, y detritos de plantas (Cuzon *et al.*, 2019). Durante esta etapa, al repertorio de enzimas se le unen las metalopeptidasas como la Mpc1 y carboxipeptidasa B (Hernández-Cortes *et al.*, 2017; Rojo-Arreola *et al.*, 2020). El camarón blanco del Pacífico es característico de fondos lodosos o arenosos (Hendrickx, 1995).

2.1.5 Crecimiento y muda

En su etapa juvenil, los camarones pesan 1-20 g (Cuzon *et al.*, 2004) y miden ≥ 80 mm de longitud total (Ramos-Cruz, 2011). El camarón alcanza una longitud total máxima de 23 cm (Hendrickx, 1995), y la maduración a los 6-7 meses, edad a la que los machos pesan ≥ 20 g y las hembras pesan ≥ 28 g (FAO, 2009). Al igual que otros artrópodos, el cuerpo de los crustáceos está protegido por un exosqueleto. Por lo cual el camarón presenta un crecimiento discontinuo, pues necesita deshacerse del exoesqueleto (muda o ecdisis) periódicamente para poder desarrollarse (Anger, 2001; Zhang *et al.*, 2019). Los camarones peneidos mudan más frecuentemente que otros artrópodos (Zhang *et al.*, 2019) y durante sus estadios larvarios mudan hasta 12 veces más que en estadios más avanzados (Gao *et al.*, 2015).

En adultos el ciclo de la muda se puede dividir en: 1) premuda (D0-D4), 2) muda o ecdisis, 3) postmuda (A-B o P1-P2) e 4) intermuda (C) (Gao *et al.*, 2015). Es pertinente mencionar que es común encontrarse con variaciones de las subdivisiones (denotadas con una letra seguida de un número) de los cuatro estadios del ciclo de la muda (Corteel *et al.*, 2012). El ciclo de la muda está regulado por hormonas neuropeptídicas (como la inhibidora de la muda o MIH), ecdisteroides y el ambiente externo. Durante el ciclo se presentan cambios en la expresión de genes de quitinasas, serino peptidasas (Fig. 3, apartados 2.3.2 y 2.7.1.1), hemocianinas (proteínas con dos átomos de Cu transportadora de O₂ en la hemolinfa), y relacionados con el citoesqueleto y respuesta inmune (Gao *et al.*, 2015).

En la **premuda** (comprende hasta dos tercios del ciclo) la cutícula vieja se desprende de las células epidérmicas (Gao *et al.*, 2015). La cutícula es degradada tanto por quitinasas como peptidasas secretadas en el espacio subcuticular. En la premuda el músculo se atrofia (por la degradación de la actina-miosina) lo que permite la retracción de las extremidades (de Oliveira Cesar *et al.*, 2006; Rojo-Arreola *et al.*, 2020). Durante la **ecdisis** el camarón se libera del exoesqueleto (en minutos). En la **postmuda** el cuerpo del camarón aumenta de tamaño (aunado a la absorción de agua) e inicia la formación de un nuevo exoesqueleto. En esta etapa los niveles de las proteínas actina-miosina aumentan (así como otras del citoesqueleto de actina de acuerdo con RNA-seq) hasta

alcanzar un *plateau* en la intermuda. En la **intermuda** el músculo se regenera (de Oliveira Cesar *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2015).

2.1.6 Sistema digestivo

El sistema digestivo (Fig. 2) de los camarones Penaeidae se puede dividir en tres partes (desarrolladas a partir de primordios separados durante la etapa naupliar): anterior, medio y posterior (Vogt, 2019). Tanto la región anterior como posterior surgen a partir del ectodermo (una de las tres capas germinales embrionarias), por lo que están recubiertas de una cutícula que se libera durante la muda conocida como membrana peritrófica; a diferencia de la parte media, que es de origen endodérmico (Anger, 2001; Córdova-Murueta *et al.*, 2003; Vogt, 2021).

La parte anterior consta del esófago junto con dos cámaras separadas por una válvula cardiopilórica: las cámaras cardíaca y pilórica (Fig. 2a-b). En la cámara cardíaca (= estómago cardíaco) se macera el alimento y en ella ocurre una primera filtración de éste. La cámara cardíaca tiene pliegues de cutícula longitudinales en su superficie interna, así como proyecciones en forma de dientes conocidas como huesecillos (calcificados en etapas avanzadas de desarrollo) que conforman un molino gástrico en el extremo posterior de la cámara. Estas estructuras junto con los movimientos peristálticos permiten la maceración mecánica de los alimentos, que pasan a la cámara pilórica. La cámara pilórica (= estómago pilórico) filtra el alimento y compacta los sólidos, puede clasificarse en subcámaras dorsal y ventral (Fig. 2c). La subcámara pilórica dorsal tiene surcos laterales y conduce directamente al intestino medio, mientras que la subcámara ventral contiene el filtro de glándula (= filtros pilóricos= ampolla). El filtro de la glándula está armado con setas que constituyen una fina pantalla que clasifica las partículas de alimento y transfiere las más finas ($\leq 1 \mu\text{m}$, 100 nm en el cangrejo de río europeo *Astacus astacus*) en suspensión a la glándula digestiva (GD); al mismo tiempo permiten el movimiento de las enzimas digestivas desde la GD al estómago (Anger, 2001; Davie, 2015; Vogt, 2019).

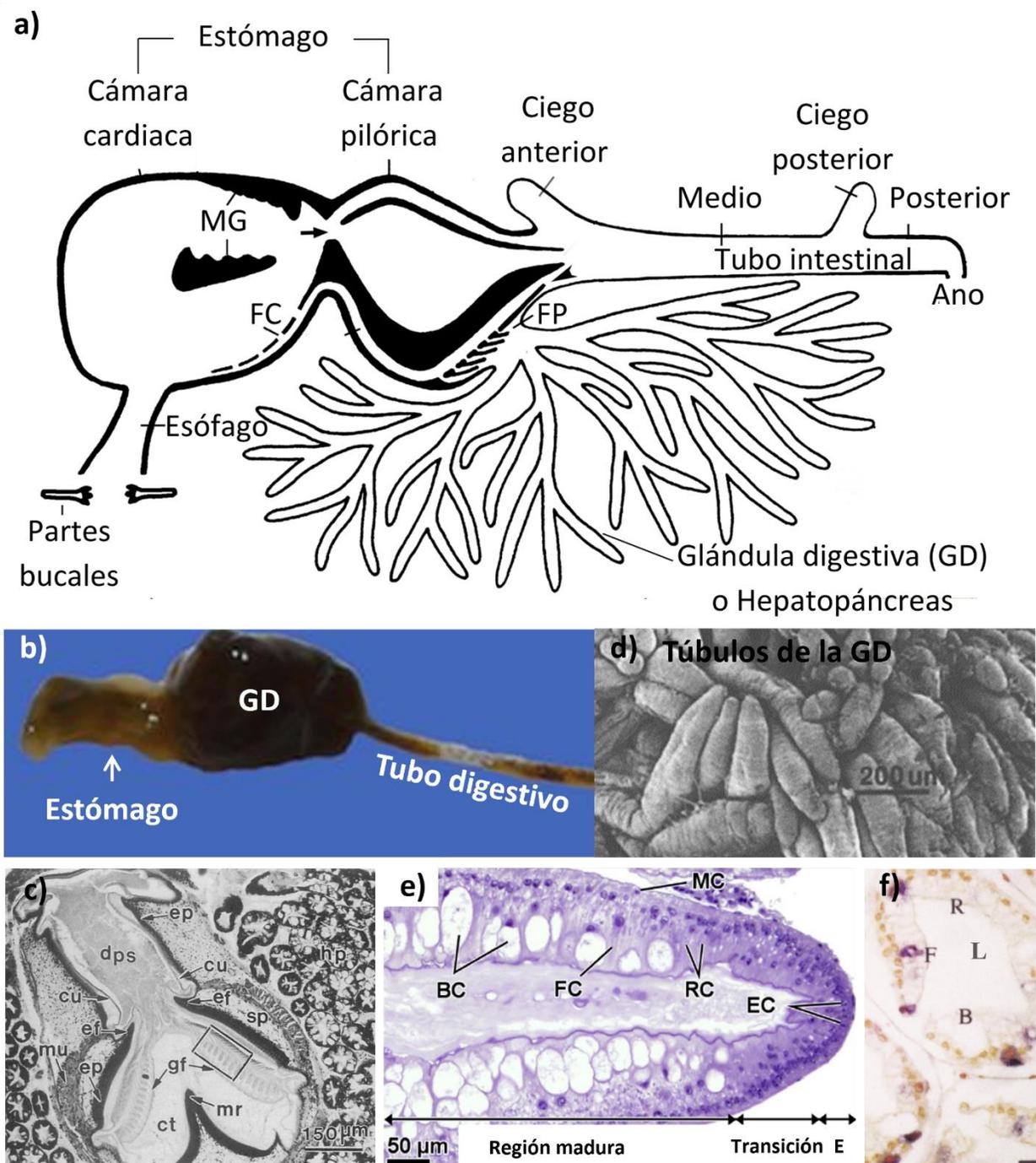


Figura 2. Sistema digestivo de los camarones peneidos. a) Esquema del sistema digestivo de los decápodos. MG: molino gástrico. FC: Filtros de la cámara cardiaca. FP: filtros pilóricos. b) Foto del tracto digestivo de *P. vannamei*. c) Sección transversal de la cámara pilórica de *Penaeus japonicus* cubierta por los túbulos de la GD o hepatopáncreas (hp). La imagen muestra la subcámara pilórica dorsal (dps) y el filtro de la glándula (gf), este último es parte de la subcámara pilórica ventral. El recuadro indica canales del filtro (están recubiertos de setas filtradoras) que conducen a la GD. Tejido conectivo (ct), cutícula (cu), pliegues epiteliales laterales (ef), epitelio (ep), reborde o cresta medioventral (mr), músculo (mu), tejido conjuntivo esponjoso (sp). Microscopía electrónica de transmisión. d) Túbulos de GD de *P. vannamei*. Microscopía electrónica de barrido. e) Corte

histológico longitudinal de un túbulo de GD de centollo *Maja brachydactyla* (Infraorden: Brachyura) adulto, muestra los diferentes tipos de células (E, R, F, B y M). Tinción de Hematoxilina-Eosina. f) Corte histológico transversal de un túbulo de la GD de *P. monodon*. Catepsina-L (mRNA) localizada en las células F (violeta) mediante hibridación *in situ*. Contratinción con Bismarck Brown. GD: glándula digestiva. L: Luz del túbulo. Imágenes modificadas de: a (Vogt, 2021), b (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015), c (Lin, 1996), d (Caceci *et al.*, 1988), e (Castejón *et al.*, 2019), f (Lehnert y Johnson, 2002).

El sistema digestivo medio (epitelio simple con microvellosidades) lo conforman el tubo digestivo asociado, los ciegos (también referidos como divertículos) anterior y posterior, y la GD (Fig. 2a). En las zoeas tempranas, lo componen el tubo digestivo, y los ciegos anterior y lateral. Se ha sugerido que el ciego anterior podría ser el responsable de la secreción de enzimas y absorción de nutrientes en las zoeas (apartado 2.1.4), dado que en esta etapa ni el molino gástrico ni la GD se han desarrollado. La GD se origina a partir de la ramificación del ciego lateral del primordio del sistema digestivo medio. El ciego lateral aparece en el último subestadio naupliar. Por otro lado, el ciego posterior aparece en la postlarva PL21, y el ciego anterior termina por degenerar (Lovett y Felder, 1989; Vogt, 2019, 2021). El sistema digestivo posterior es la parte final del tubo digestivo. Está revestido internamente por un epitelio columnar simple sin microvellosidades cubierto con cutícula. Tiene glándulas mucosas que facilitan la expulsión de las heces. Parece participar en la regulación osmótica e iónica (Vogt, 2021).

2.1.6.1 Glándula digestiva (GD) o hepatopáncreas

La GD (= hepatopáncreas= glándula del tubo digestivo medio) es un órgano que ocupa gran parte del espacio dentro del cefalotórax. Está formada por múltiples túbulos huecos ciegos, delineados internamente por un epitelio simple (Fig. 2d-f). El extremo apical del epitelio está orientado hacia el lumen del túbulo, mientras que el extremo basal contacta el espacio de la hemolinfa. Los túbulos desembocan en conductos colectores que a su vez comunican con el estómago pilórico (Fig. 2a). La GD es ampliamente conocida como hepatopáncreas debido a que realiza funciones típicamente asociadas al páncreas (síntesis de enzimas digestivas) e hígado (destoxificación de compuestos extraños o xenobióticos). No obstante, también es el sitio de absorción de nutrientes y síntesis de la hemocianina. Se ha propuesto que regulación de la GD es principalmente

hormonal, pues los túbulos no están inervados por nervios (Anger, 2001; Lehnert y Johnson, 2002; Hu y Leung, 2007; Vogt, 2021).

El epitelio de cada túbulo de la GD tiene cinco tipos celulares: E (embrionarias), M (enanas), R (reabsorbentes), F (fibrilares) y B (en forma de ampolla). Cada túbulo de la GD se puede dividir longitudinalmente en tres zonas: distal, media y proximal. La **zona distal** es el extremo ciego del túbulo y es donde están las células indiferenciadas conocidas como **células E**. Algunos autores definen una zona de transición donde se hallan células E en diferenciación. Las células E se diferencian conforme migran hacia el otro extremo (proximal) del túbulo reemplazando directa o indirectamente las células más viejas del epitelio. Es así como se establece un gradiente de edad de las células a lo largo del túbulo. En la **zona media** (también conocida como zona B) el tipo prominente son las células B maduras, también se hallan células R, F y M. En la **zona proximal** las células B son escasas debido a que son “descargadas” al final de la zona B proximal del epitelio (Loizzi, 1971; Vogt, 2021).

A continuación, se describen brevemente las principales probables funciones de los tipos celulares, de acuerdo con estudios en camarones peneidos o decápodos en general. Las **células R** son las más abundantes de la GD, absorben los nutrientes del lumen, y almacenan glicógeno y lípidos (Al-Mohanna y Nott, 1987; Hu y Leung, 2007). Las **células F** sintetizan las enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina, catepsina-L, astacina, amilasa, quitinasa) y la hemocianina (Loizzi, 1971; Van Wormhoudt *et al.*, 1995; Lehnert y Johnson, 2002). A las **células B** se les ha atribuido una función secretora y digestiva. Son las más voluminosas del epitelio debido a que contienen una gran vacuola (Loizzi, 1971) en la que se ha inmunolocalizado tanto tripsina como tripsinógeno (su forma inactiva) en *P. vannamei* (Sainz *et al.*, 2004a) y catepsina-L en *Metapenaeus ensis* (Hu y Leung, 2007). Las pruebas que favorecen a las células F como las responsables de la síntesis de las enzimas digestivas son: hibridación de sondas antisentido para amilasa (también mediante anticuerpos), quitinasa, catepsina-L (Fig. 2f), y tripsina en *P. monodon* (Lehnert y Johnson, 2002), hibridación e inmunohistoquímica para quimotripsina en *P. vannamei* (Van Wormhoudt *et al.*, 1995), e inmunohistoquímica de la pro-astacina y astacina en *A. astacus* (Möhrlen *et al.*, 2001). Los autores de los estudios declararon que la hibridación de las sondas

sólo fue positiva en las células F. Dado que las enzimas digestivas (mRNA y proteína) se han localizado tanto en las células F como las B, cabe la posibilidad de que las células F y B no sean linajes independientes, sin embargo, tomando en cuenta también los estudios ultraestructurales es difícil determinarlo.

2.2 Peptidasas digestivas: de su síntesis a su activación catalítica

Las enzimas digestivas son: peptidasas, carbohidrasas, lipasas (Wei *et al.*, 2014), y hay quienes también consideran a las nucleasas (Vogt, 2021). Debido a que la presente investigación se centra en las peptidasas, solamente se detallará acerca de estas enzimas.

Las **peptidasas** (= proteasas) son proteínas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que unen a los AA que conforman a la proteína sustrato. Son enzimas hidrolasas que rompen los enlaces químicos mediante la adición (consumo) de una molécula de agua (Erez *et al.*, 2009; Rawlings, 2020). En general, “peptidasa”, “proteasa” y “proteínasa” se utilizan indistintamente. Se ha propuesto que peptidasa (= proteasas) es el término más adecuado, ya que denota la hidrólisis de (enlaces) peptidos; en tanto que la enzima que muestra especificidad para proteínas intactas es la proteinasa (= endopeptidasa, apartado 2.3.1) (Barrett y McDonald, 1986). Otros autores indican que las proteinasas (= endopeptidasas) hidrolizan los enlaces peptídicos internos mientras que las peptidasas hidrolizan los de los extremos de las proteínas (= exopeptidasas) (García-Carreno y Navarrete Del Toro, 1997). Dado que no existe un consenso, en este escrito se utilizará el término peptidasa indistintamente.

Las peptidasas están codificadas en los genomas como **pre-pro-proteínas** (Vogt, 2021), es decir, la cadena polipeptídica contiene un **péptido señal** N-terminal ("pre") y un **propéptido o péptido de activación** ("pro") además de la secuencia de la **peptidasa**. Como cualquier otra proteína, tan pronto como se sintetiza el péptido señal (codificado en el extremo 5' del mRNA), éste dirige al complejo ribosoma-mRNA-peptidasa a la membrana del retículo endoplásmico, a través de la cual la peptidasa ingresa al lumen del RE al mismo tiempo que es sintetizada. El péptido señal es hidrolizado de la pro-peptidasa en el lumen.

Dada la escisión del péptido señal, el nuevo extremo N-terminal (generalmente) es el propéptido, esta **pro-peptidasa** que no es capaz de hidrolizar enlaces peptídicos se conoce como **zimógeno**, el cual se almacena en vesículas (Sainz *et al.*, 2004a). El propéptido del zimógeno bloquea estéricamente el acceso del sustrato al sitio activo, por lo que para que el zimógeno se convierta en una peptidasa activa se requiere que el propéptido sea hidrolizado. La hidrólisis del propéptido puede llevarse a cabo por otras peptidasas diferentes o por autocatálisis desencadenada por un simple cambio de pH. Esta hidrólisis ocurre en algún compartimento celular o en el medio extracelular como es el caso de las peptidasas digestivas (Khan y James, 1998).

La activación de las peptidasas digestivas ocurre en cascadas o redes, que varían en las enzimas que participan y órgano en que se sintetizan y actúan, de acuerdo con el grupo de animales. Un par de ejemplos es el de los decápodos y vertebrados. En decápodos, las enzimas digestivas se producen en la GD y son de los únicos organismos en los que se hallan las braquiurinas, quimotripsinas que hidrolizan colágeno (apartado 2.6) (Hernandez-Cortes, 2021; Vogt, 2021). En vertebrados, las enzimas digestivas se sintetizan en diferentes órganos y se expresan peptidasas únicas como la pepsina (Fig. 3), que se sintetiza y secreta en el estómago (pH < 4), o la enteropeptidasa (= enterocinasa), que se sintetiza en el intestino, donde permanece como proteína transmembranal del epitelio (Chen *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2014; Feher, 2017; Vogt, 2021).

En humanos, la enteropeptidasa inicia la cascada de activación de los zimógenos (secretados por el páncreas en el duodeno) al hidrolizar el zimógeno de la tripsina (**tripsinógeno**). La tripsina activa otras moléculas de tripsinógeno y otros zimógenos, como el de la quimotripsina (quimotripsinógeno), elastasa (proelastasa) y carboxipeptidasa (procarboxipeptidasa) (Feher, 2017). En invertebrados (generalmente no tienen enteropeptidasa), se ha propuesto que la tripsina se activa a sí misma (autoactivación) desencadenando la cascada de activación de otros zimógenos (Sainz *et al.*, 2004a). Esto se relaciona con que el propéptido de los tripsinógenos de los vertebrados, el cual es reconocido por la enteropeptidasa, tiende a tener más residuos de Asp (hasta cuatro D consecutivos) que el de los tripsinógenos de invertebrados (Chen *et al.*, 2003; Muhlia-Almazán *et al.*, 2008). Excepciones de invertebrados que expresan proteínas parecidas a

la enteropeptidasa son el anélido marino *Platynereis dumerilii* (Williams *et al.*, 2015) y el erizo *Strongylocentrotus purpuratus* (Hildebrand *et al.*, 2023), no obstante, faltan estudios de enzimología que revelen su función en la activación de zimógenos.

En general, las maneras de regulación de función de las peptidasas son: el control de la síntesis del zimógeno (el mRNA o la proteína) o su activación, o la inactivación de la enzima madura (Sánchez-Paz *et al.*, 2003). La inactivación puede resultar de las diferentes condiciones bioquímicas mantenidas por la compartimentalización (inactivación de la pepsina en el duodeno debido a la alcalinidad) (Feher, 2017) o por la unión de inhibidores de la enzima (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008).

2.3 Clasificación de las peptidasas

Las peptidasas se pueden clasificar de acuerdo con: 1) la reacción catalizada, 2) la naturaleza química del sitio catalítico, o 3) las relaciones evolutivas reveladas por su estructura (Barrett, 1994).

2.3.1 Peptidasas de acuerdo con la reacción catalizada

En relación con la reacción catalizada, el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) clasifica las enzimas tipo hidrolasa en la clase 3, y todas las peptidasas (hidrolasas de péptidos) dentro de la subclase 3.4. Dependiendo de dónde se localice el enlace peptídico hidrolizable dentro del sustrato, las peptidasas se dividen además en subclases de exopeptidasas y endopeptidasas.

Las **exopeptidasas** (3.4.11-19) actúan cerca de los extremos, en el último, penúltimo o antepenúltimo AA de la cadena peptídica, ya sea en el extremo NH₂- o COOH-terminal. Las exopeptidasas que actúan en el extremo NH₂-terminal se nombran **aminopeptidasas** (3.4.11), dipeptidil-peptidasas o tripeptidil-peptidasas (3.4.14) (Barrett, 1994). Las aminopeptidasas también se clasifican de acuerdo a la eficiencia relativa con la que remueven los residuos AA. Ejemplos son la Leu-aminopeptidasa (Leucina aminopeptidasa o LAP, E.C. 3.4.11.1) y la

aminopeptidasa-N (APN, es transmembranal, E.C. 3.4.11.2), que hidrolizan más eficientemente la Leu y Ala, respectivamente, aunque también pueden remover otros AA (Taylor, 1993; Michiels *et al.*, 2015). Las exopeptidasas que actúan en el extremo COOH-terminal se llaman **carboxipeptidasas** (3.4.16-18) o peptidil-dipeptidasas (3.4.15). Tanto las peptidasas de dipéptidos o dipeptidasas (3.4.13) como las omegapeptidasas (3.4.19) remueven residuos AA terminales (sustituidos o modificados) se consideran exopeptidasas. Mientras tanto, las **endopeptidasas** (3.4.21-24 y 99) actúan en las regiones internas de las cadenas peptídicas (Barrett, 1994). Cabe mencionar que, algunas peptidasas tienen actividad tanto de endopeptidasas como de exopeptidasas (por ejemplo la catepsina-B), en este caso se clasifican como endopeptidasas (Barrett y McDonald, 1986).

2.3.2 Peptidasas de acuerdo con la naturaleza química del sitio catalítico

De acuerdo con el mecanismo catalítico (nucleófilo) se reconocen seis clases o tipos catalíticos de peptidasas (Fig. 3). El mecanismo implica un ataque nucleofílico efectuado por la peptidasa sobre el enlace escindible (hidrolizable) del sustrato. En las cisteíno, serino y treonino peptidasas, el grupo funcional que realiza el ataque nucleofílico es el hidroxilo (-OH de las serino o treonino peptidasas) o sulfhidrilo (-SH de las cisteíno peptidasas) de la cadena lateral del AA epónimo. En las aspártico, glutámico y metalopeptidasas, el nucleófilo es una molécula de agua activada (Erez *et al.*, 2009; Rawlings, 2020). Cabe recordar que un nucleófilo dona un par de electrones (si los dona a un H^+ se llama base) a un electrófilo (aceptor del par de electrones) con lo que se forma un enlace covalente. Por lo que el mecanismo catalítico requiere de residuos AA adicionales al nucleófilo, que en conjunto conforman el sitio activo de la peptidasa (Rawlings, 2020). La presente tesis estudia los efectos del silenciamiento de la tripsina, por lo que en las siguientes líneas se describen las serino peptidasas, exponiendo someramente otras clases.

Mecanismo	Nucleófilo	Clase	Ejemplos de peptidasas	Sustratos comunes	Compuestos que inhiben su actividad
Intermediario covalente	Serina	Serino	Tripsina ¹ . Quimotripsina ² . Elastasa ³	BAPNA ¹ . SAAPFpNA ² . SAAA-pNA ³	TLCK ¹ , SBTI ¹² , PMSF*
	Cisteína	Cisteíno	Catepsina B, -C, -L. Calpaína B. Papaína		E64*
	Treonina	Treonino	HsIV	Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC	Vinil sulfonas (NLVS)
H ₂ O activada ataca a grupo carbonil	1H ₂ O	Aspártico	Catepsina-D, -E. Pepsina	-	Pepstatina A*
		Glutámico	Eqolisina. SGP	-	-
		Metallo 1 (Zn,Ni) 2 (Co,Mn,Zn)	Mpc1 (astacina). Carboxipeptidasa-A ⁴ , -B ⁵ . Amino peptidasa N ⁶	HPLA ⁴ , BzGA ⁵ . L-AA-pNA ⁶	EDTA*, Fenantrolina*, Bestatina ⁶

Figura 3. Clases de peptidasas de acuerdo con su mecanismo catalítico (Barrett, 1994; Rawlings, 2020). pNA: para-nitroanilina. AMC: 7-amino-4-metilcumarina. La pNA/AMC es la molécula cromogénica/fluorogénica liberada por la actividad de la enzima sobre el sustrato. HsIV: heat shock locus V (Li *et al.*, 2008). Todas las treonino peptidasas son hidrolasas con nucleófilo N-terminal (Rawlings y Barrett, 2013). NLVS: 4-yodo-3-nitrofenilo acetil-Leu-Leu-Leu-vinilsulfona (Sousa *et al.*, 2002). SGP: scytilidoglutámico peptidasa (Kondo *et al.*, 2010). HPLA: hipuril-DL-ácido-fenil-láctico. BzGA: hipuril-L-arginina. AA puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, si se trata de una Leu-amino peptidasa entonces el sustrato sería L-Leu-pNA (Fernández *et al.*, 1997). El asterisco (*) indica el inhibidor (o quelante) común para el conjunto de peptidasas de la clase correspondiente. Los números indican el sustrato o inhibidor de la peptidasa indicada con el mismo número. Por ejemplo, el PMSF inhibe las serino peptidasas en general, mientras que BAPNA/TLCK son sustrato/inhibidor específicos de las tripsinas.

Las **serino peptidasas** utilizan una diada (His-Ser), triada (His-Ser-Asp) o tétrada (Glu-Asp-Asp-Ser o Ser-His-Ser-Glu) catalítica localizada en el sitio activo. En la triada (Fig. 4a), la His (actúa como base, aumenta la nucleofilicidad de la Ser) junto con el Asp (orienta/polariza el anillo de imidazol de la His) desprotonan el -OH de la Ser (nucleófilo) (Khan y James, 1998; Erez *et al.*, 2009; Rawlings y Barrett, 2013; Rawlings, 2020). Primero se forma un intermediario tetrahédrico, en el que el carbono del carbonilo del sustrato acepta un electrón del nucleófilo (-OH de la Ser). El intermediario tetrahédrico colapsa liberando el primer producto de la reacción (con frecuencia con un electrón donado por la His). Posteriormente se forma un intermediario acil-enzima con la parte del sustrato que quedó unida a la peptidasa. Este segundo intermediario es resuelto por una molécula de agua que actúa como un segundo nucleófilo, liberándose un segundo producto

y la peptidasa (Rawlings, 2020). Otro componente esencial del sitio activo son un par de donadores de enlaces de hidrógeno (agujero oxianión, apartado 2.4) que estabiliza la carga negativa del oxígeno del carbonilo del intermediario tetrahédrico (Khan y James, 1998).

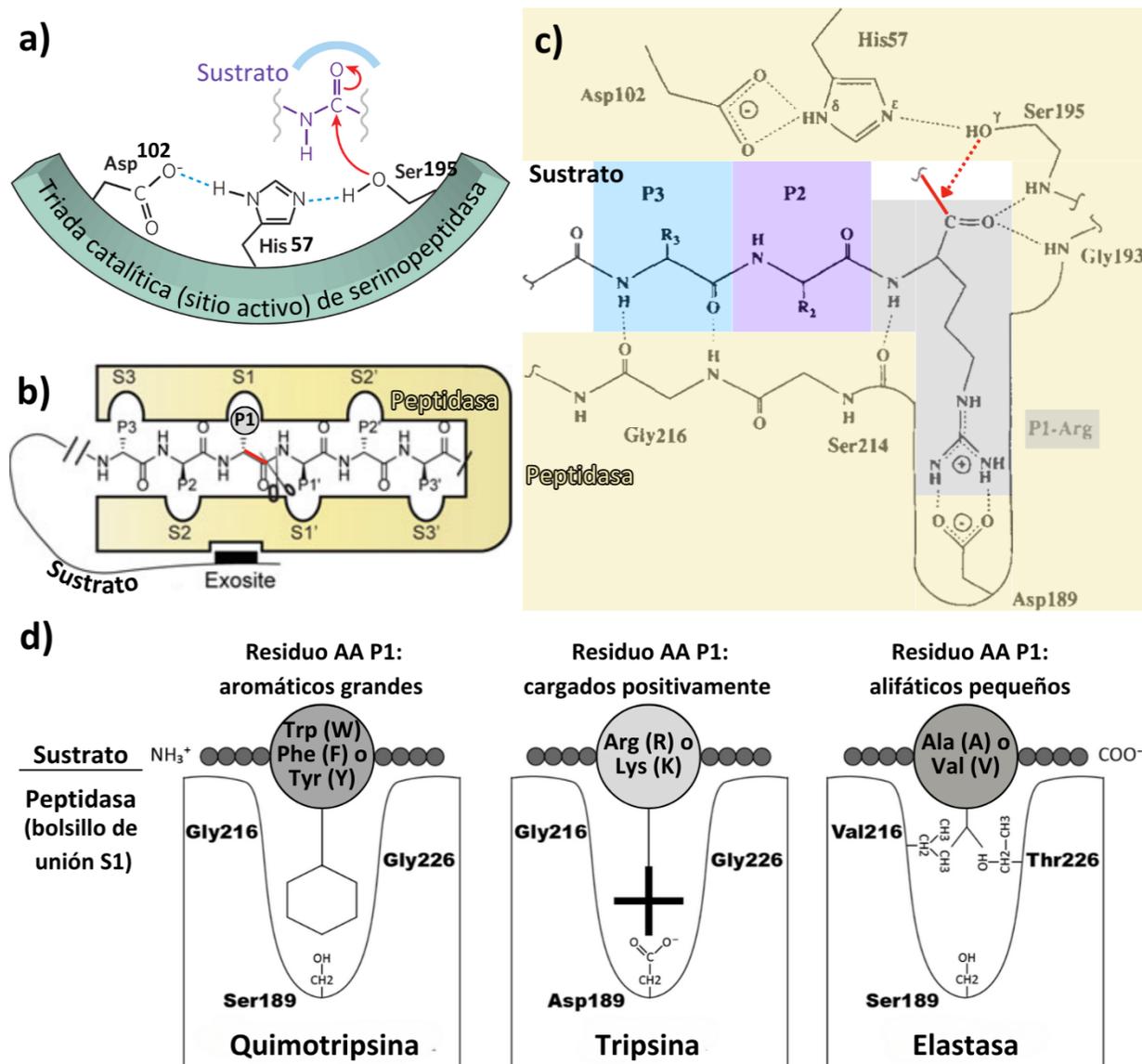


Figura 4. Sitio activo e interacción de las peptidasas con su sustrato. a) Triada catalítica de las serino peptidasas en el sitio activo (Erez *et al.*, 2009). b) Representación de la nomenclatura de las peptidasas según Schechter y Berger. Las cadenas laterales de los residuos de AA del sustrato se denominan P1 ... Pn a partir del enlace escindible o hidrolizable (tijeras) hacia el NH₂-terminal, y P1' ... Pn' hacia el COOH-terminal. Los "bolsillos" (pockets) de la proteasa (amarillo) que unen las cadenas laterales correspondientes se denominan S1 ... Sn y S1' ... Sn' (Chakrabarty *et al.*, 2019). c) Sitio de interacción de la tripsina con un sustrato (-P1-P3-) cuyo enlace escindible (P1-P1') queda próximo a Ser-His. Enlace escindible en rojo; la flecha roja indica el ataque nucleofílico (Perona y Craik, 1995). d) Interacción del bolsillo de unión S1 de las peptidasas de la familia de las

quimotripsinas (se indican los residuos AA importantes para la especificidad) con su sustrato (Akula *et al.*, 2021).

Sólo se forman intermediarios acil-enzima durante las reacciones de las cisteíno, serino y treonino peptidasas (Rawlings y Barrett, 2013). El mecanismo catalítico de las peptidasas que tienen por nucleófilo a una molécula (Fig. 3) de agua es diferente. En las **metalopeptidasas**, la molécula de agua se une a un ión metálico que a su vez se une a tres residuos AA de la peptidasa. En tanto que, en las aspártico y glutámico peptidasas la molécula de agua se une a dos residuos AA de ácido aspártico o glutámico, respectivamente (Rawlings, 2020).

Las serino peptidasas se encuentran en todos los reinos de la vida así como en varios genomas virales (Page y Di Cera, 2008). Las treonino peptidasas se hallan en eubacterias y eucariontes parásitos como *Trypanosoma brucei* y *Plasmodium falciparum*, un ejemplo es la HslV (heat shock locus V) que forma parte de su proteasoma (Li *et al.*, 2008). Las serino, metalo y cisteíno, son las peptidasas con mayor número de secuencias y especies conocidas (Rawlings, 2020). Las glutámico peptidasas son peptidasas ácidas (inicialmente se clasificaron como aspártico peptidasas insensibles al inhibidor pepstatina) aparentemente únicas de los hongos filamentosos (Kondo *et al.*, 2010). Después de las aspártico y treonino, las glutámico peptidasas son las más raras en el sentido de que no representan ni el 1% del total de secuencias ni de especies de peptidasas conocidas. Las endopeptidasas son las más abundantes y se encuentran ejemplos para cada clase, en cambio, no se conoce de exopeptidasas de clase aspártico o glutámico (Rawlings, 2020).

2.3.3 Peptidasas de acuerdo con sus relaciones evolutivas

La base de datos de peptidasas MEROPS <https://www.ebi.ac.uk/merops/> proporciona los siguientes niveles de clasificación jerárquica: clan >> subclan >> familia >> subfamilia >> especie de peptidasa (Rawlings, 2020). Cada clan agrupa familias de peptidasas con estructura terciaria relacionada, a su vez, cada familia contiene peptidasas con secuencias homólogas. El análisis de secuencia se restringe a los sitios de unión primarios (no necesariamente los sitios de unión secundarios o exositos) junto con los residuos catalíticos. Cada nivel tiene denominado un

ejemplo tipo (u holotipo) con el que todos los miembros del clan o familia están relacionados significativamente (estadísticamente) (Rawlings *et al.*, 2016).

A cada clan, familia, peptidasa holotipo e inhibidor holotipo se le asigna un identificador. El identificador de cada clan se forma con dos letras, la primera letra (“A” de aspártico, “C” de cisteíno, “G” de glutámico, “M” de metalo, “S” de serino o “T” de treonino peptidasas) indica el tipo catalítico de las peptidasas que contiene; por ejemplo, el primer clan de cisteíno peptidasas es el clan CA. Las letras P, U, e I corresponden a peptidasas de múltiples tipos catalíticos, de tipo desconocido, e inhibidores, respectivamente (Rawlings *et al.*, 2016).

2.4 Serinoendopeptidasas: Tripsinas y quimotripsinas

Tanto la tripsina como la quimotripsina son serino endopeptidasas (3.4.21, en apartado 2.3.1). MEROPS (apartado 2.3.3) las clasifica en el clan PA >> subclan PA(S) >> familia S1 >> subfamilia S1A (Rawlings, 2020).

El clan PA contiene serino (subclan PA(S)) y cisteíno (subclan PA(C)) endopeptidasas, cuya estructura es la de dos dominios (cada uno contiene un barril- β de seis cadenas) que forman un espacio en el que convergen los residuos del sitio activo. El subclan PA(S) contiene serino peptidasas con la triada catalítica en el orden His (H), Asp (D) y Ser (S). La S1 es la familia más grande de peptidasas, en cuanto al número de proteínas secuenciadas como al número de actividades diferentes. La quimotripsina A (o α) de *Bos taurus* de 245 AA (clasificación S01.001 e identificador MER0000002 MEROPS; UniProt P00766) es la peptidasa tipo del clan PA a la subfamilia S1A (Rawlings y Barrett, 2013; MEROPS, 2024). Las peptidasas tipo quimotripsinas (como las tripsinas o elastasas) tienen un bolsillo de unión S1 (nomenclatura de Schechter y Berger en la Fig. 4b) conformado por los residuos 189-192, 214-216 y 224-228, y en parte, su especificidad está determinada por los residuos 189, 216 y 226 (Hedstrom, 2002; MEROPS, 2024).

Aunque la tripsina y quimotripsina comparten un gran porcentaje de identidad de AA (que se refleja en la superposición de sus estructuras), difieren en su especificidad por el sustrato. La **quimotripsina** (3.4.21.1) tiene un bolsillo S1 hidrofóbico con una Ser¹⁸⁹ (AA polar) al fondo junto

con las Gly²¹⁶ y Gly²²⁶ en las “paredes”, lo que explica su especificidad por residuos hidrofóbicos grandes; hidroliza enlaces peptídicos formados por el extremo carboxilo de los residuos de Trp (W), Phe (F), Tyr (Y) o Leu (L). La triada catalítica de la quimotripsina está conformada por la His⁵⁷, Asp¹⁰² y Ser¹⁹⁵, y el agujero oxianión por Gly¹⁹³ y Ser¹⁹⁵. La **tripsina** (3.4.21.4) tiene un Asp¹⁸⁹ (carga negativa) al fondo del bolsillo S1 (Fig. 4c-d) e igual que la quimotripsina tiene a las Gly²¹⁶ y Gly²²⁶ en las “paredes”, lo que se relaciona con su especificidad por residuos básicos; hidroliza enlaces peptídicos formados por el extremo carboxilo de los residuos (P1) Arg (R) o Lys (K) en la proteína sustrato. La **elastasa** (EC 3.4.21.36 y EC 3.4.21.37) tiene una Ser¹⁸⁹ al fondo del bolsillo S1 y, a diferencia de la tripsina y quimotripsina, las “paredes” están conformadas por Val²¹⁶ y Thr²²⁶ que reducen espacio del bolsillo haciendo que sea pequeño y específico para residuos alifáticos pequeños; hidroliza enlaces peptídicos formados por Ala en la proteína sustrato (Hedstrom *et al.*, 1992; Hedstrom, 2002).

La especificidad no sólo está determinada por el bolsillo de unión al sustrato S1. La mutación del Asp¹⁸⁹ a Ser¹⁸⁹ (D189S) en la tripsina no cambia su especificidad por la de la quimotripsina. El intercambio del bolsillo S1 entero (en el que la tripsina y quimotripsina sólo difieren tres AA) tampoco transfiere la especificidad de una peptidasa a otra. Por ello, se han propuesto otros determinantes de la especificidad que, aunque no tienen contacto directo con el sustrato, podrían producir cambios en la estructura terciaria o proveer la flexibilidad requerida por la dinámica de reacción: loop 1 (residuos AA 185-188) y loop 2 (AA 221-225) (Hedstrom *et al.*, 1992).

2.5 Metaloendopeptidasas: Astacinas

Las astacinas son metalo endopeptidasas (3.4.24.21 en apartado 2.3.1). MEROPS (apartado 2.3.3) las clasifica en el clan MA >> subclan MA(M) >> familia M12 >> subfamilia A (MEROPS, 2024). Su nombre deriva del cangrejo de río de agua dulce *A. astacus*; no se hallan en plantas ni virus (Guevara *et al.*, 2022). La astacina de *A. astacus* de 251 AA (clasificación M12.001 e identificador MER0001104 MEROPS; UniProt P07584) es la peptidasa tipo tanto de la familia M12 como la subfamilia A. Las metalopeptidasas del clan MA tienen el motivo HEXXH en el que las dos His (H) son ligandos de zinc (Zn) y el Glu (E) tiene función catalítica. (MEROPS, 2024).

Las astacinas son peptidasas extracelulares dependientes de Zn que comparten la secuencia consenso HEXXHXXGXXH seguida por el motivo EXXRDRD, donde X puede ser cualquier AA (Gomis-Rüth y Stöcker, 2023). Las tres His (H) de esta secuencia interactúan con el Zn que se halla en el espacio del sitio activo en la astacina tipo (de *A. astacus*); el Zn también une una molécula de agua y una Tyr (Y) remota. Tienen un péptido señal seguido de un propéptido más un dominio de unión a Zn, no obstante, la mayoría son multidominio (Bode *et al.*, 1992; Gomis-Rüth y Stöcker, 2023). En *A. astacus*, la proastacina sólo se encuentra en las células F de la GD (apartado 2.1.6.1) y la astacina madura (se activa autocatalíticamente) se halla en el jugo gástrico colectado de la cámara cardiaca (Möhrlen *et al.*, 2001).

2.6 Colagenasas: unas endopeptidasas especiales

Es oportuno mencionar a las enzimas que actúan sobre el colágeno (único de los Metazoarios) nativo: las colagenasas. La degradación del colágeno permite a los organismos sintetizadores de colagenasas (entre otros ejemplos): invadir los tejidos del hospedero por parte de los microorganismos patógenos (Duarte *et al.*, 2016) o digerir el colágeno de los animales que forman parte de su dieta (Eizen y Jeffrey, 1969; Yuh-Ling Chen *et al.*, 1991). Realmente pocas peptidasas hidrolizan el colágeno (Hernandez-Cortes, 2021), pues está conformado por una triple hélice de tres cadenas polipeptídicas entrelazadas (tropocolágeno); las triples hélices pueden agruparse en fibrillas (o formar redes de colágeno no fibrilar), que a su vez se empaquetan en fibras de colágeno (Shoulders y Raines, 2009; Duarte *et al.*, 2016). El nivel de compactación de la triple hélice es tal que cada tercer residuo es una glicina, el AA más pequeño (Shoulders y Raines, 2009).

Las colagenasas generalmente son metalopeptidasas de Zn (muchas funcionan en la matriz extracelular), no obstante, también las hay de la clase serino. Un ejemplo de éstas últimas son las quimotripsinas de los crustáceos que, a diferencia de las de mamíferos, sí presentan actividad colagenasa (Yuh-Ling Chen *et al.*, 1991; Navarrete del Toro y García-Carreño, 2019). Debido a que los primeros estudios se realizaron en el cangrejo violinista de arena del Atlántico *Leptuca pugilator* (infraorden Brachyura), a las serino endopeptidasas con actividad colagenasa (3.4.21.32) se les ha llamado braquiurinas (Hernandez-Cortes, 2021).

2.7 Peptidasas de la glándula digestiva de decápodos (Decapoda)

Se dice que las serino peptidasas son probablemente las enzimas proteolíticas más importantes en los decápodos (Vogt, 2021). No obstante, es pertinente destacar que no es una regla general, pues en algunas especies la hidrólisis de la proteína del alimento es mayoritariamente efectuada por peptidasas diferentes de la clase serino. Ejemplos conocidos son los camarones carideos del género *Crangon* (suborden Pleocyemata: infraorden Caridea) y la langosta americana *Homarus americanus* (Pleocyemata: infraorden Astacidea), en los que las principales efectoras son cisteíno peptidasas como la catepsina-L (Teschke y Saborowski, 2005; Saborowski *et al.*, 2012; Bibo-Verdugo *et al.*, 2016; Rodríguez-Siordia *et al.*, 2016).

Crangon crangon y *Crangon allmani* son particulares (aparentemente son el único ejemplo reportado) en que las actividades peptidasa son extremadamente variables entre organismos de la misma especie. Mientras que la mayoría de los especímenes de una misma especie pareciera no expresar tripsina alguna en GD (relacionado con una actividad específica de tripsina baja o nula), algunos individuos ($\leq 13\%$) presentan bandas de actividad y actividad específica de tripsina. Tal variabilidad no parece estar relacionada con el tamaño, sexo, alimentación (con mejillones o microalgas o en inanición) o estadio de muda de los especímenes, por lo que podría reflejar la adaptación a un ambiente cambiante (Teschke y Saborowski, 2005; Saborowski *et al.*, 2012). En el caso de *H. americanus*, la hidrólisis de proteína es llevada a cabo por las catepsinas-L denominadas L1 (la más abundante), L2 y L3, y complementada por las aspártico peptidasas denominadas catepsinas-D1 y -D2, de acuerdo con estudios en jugo gástrico (Bibo-Verdugo *et al.*, 2016; Rodríguez-Siordia *et al.*, 2016).

El repertorio de peptidasas de la GD de decápodos es completado por otras endopeptidasas, como las colagenasas (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2019; Hernandez-Cortes, 2021) y las astacinas (Möhrlen *et al.*, 2001), y exopeptidasas, como la aminopeptidasa-N (apartado 2.3.1) en el cangrejo *Neohelice granulata* (infraorden Brachyura) (Michiels *et al.*, 2015), y la Leu-aminopeptidasa (LAP) y carboxipeptidasas -A y -B en la langosta marina *Pleuroncodes (Grimothea*, de acuerdo con WoRMS) *planipes* (infraorden Anomura) y en un astacídeo de agua dulce (García-Carreño *et al.*, 1994).

2.7.1 Peptidasas de la glándula digestiva (GD) del camarón blanco del Pacífico (Penaeidae)

Aunque los camarones Penaeidae no son organismos modelo, debido a su importancia económica son de los decápodos más estudiados. Dado que el alimento representa más de la mitad de los costos de producción y la proteína es el ingrediente más caro (Lemos *et al.*, 2000), la digestión de la proteína de la dieta por peptidasas (en camarón) ha sido de especial interés. En la Tabla 1 se enlistan las peptidasas digestivas halladas en peneidos.

De acuerdo con **técnicas clásicas de enzimología** (Rojo-Arreola *et al.*, 2019b), las peptidasas más abundantes en la GD de los peneidos son las **serino** endopeptidasas tripsina (Klein *et al.*, 1996, 1998) y quimotripsina (Sellos y Van Wormhoudt, 1992; Van Wormhoudt *et al.*, 1992; Hernández-Cortés *et al.*, 1997). Ambas presentan su actividad máxima a pH neutro o ligeramente alcalino (pH 8), y en conjunto hidrolizan *in vitro* el 60% de la proteína del alimento (Galgani *et al.*, 1985; Tsai *et al.*, 1986; Navarrete del Toro *et al.*, 2011). Cabe recordar que las quimotripsinas de los peneidos hidrolizan colágeno nativo (Yuh-Ling Chen *et al.*, 1991), por lo que también se les reporta como colagenasas de serina (Van Wormhoudt *et al.*, 1992; Burgos-Hernández *et al.*, 2005; Navarrete del Toro y García-Carreño, 2019) o braquiurinas (Hernandez-Cortes, 2021). Finalmente en cuanto a las serino endopeptidasas, se ha reportado la ausencia de actividad de la elastasa en GD junto con estómago de *P. japonicus* y *P. kerathurus* (Galgani *et al.*, 1984), y en la GD de tres especies de peneidos (Tsai *et al.*, 1991). De acuerdo con Tsai *et al.* (1991), esta ausencia concuerda con el hecho de que la elastina (sustrato natural de la elastasa) no se halla en invertebrados, alimento natural de los camarones. No obstante, Wei *et al.* (2014) revelaron a través de transcriptómica la expresión de elastasa en la GD de *P. vannamei*.

Tabla 1. Peptidasas digestivas en *P. vannamei* de acuerdo con evidencia experimental*

Clase de peptidasas	Peptidasa	Evidencia					Referencias	
		Actividad	Inhibición	Zimografía	RNA ¹	Unigenes ²		Unigenes ³
Serino	Tripsinas					29	16	Klein <i>et al.</i> , 1996, 1998; Navarrete del Toro <i>et al.</i> , 2011; Sainz <i>et al.</i> , 2004b; Wei <i>et al.</i> , 2014; Gao <i>et al.</i> , 2015
	Quimotripsinas					17	5	Sellos y Van Wormhoudt, 1992; Van Wormhoudt <i>et al.</i> , 1992; Hernández Cortés <i>et al.</i> , 1997; Wei <i>et al.</i> , 2014; Gao <i>et al.</i> , 2015
	Colagenasa							Van Wormhoudt <i>et al.</i> , 1992; Burgos-Hernández <i>et al.</i> , 2005
	Elastasa					3		Wei <i>et al.</i> , 2014
Metalo	Mpc1 (Zn)							Hernández Cortés <i>et al.</i> , 1997; Zhao <i>et al.</i> , 2007
	Aminopeptidasa-N					67		Wei <i>et al.</i> , 2014
	Leu-aminopeptidasa ⁴							Ezquerro <i>et al.</i> , 1999
	Carboxipeptidasa-A					14		Lee <i>et al.</i> , 1984; Wei <i>et al.</i> , 2014
	Carboxipeptidasa-B					14		Lee <i>et al.</i> , 1984; Zhao <i>et al.</i> , 2007; Wei <i>et al.</i> , 2014; Rojo-Arreola <i>et al.</i> , 2020
Aspártico	Catepsina-D							Rojo-Arreola <i>et al.</i> , 2020
	Catepsina-B							Stephens <i>et al.</i> , 2012; Rojo-Arreola <i>et al.</i> , 2020
	Catepsina-L							Le Boulay <i>et al.</i> , 1996; Zhao <i>et al.</i> , 2007; Rojo-Arreola <i>et al.</i> , 2020
Cisteíno	Catepsina-C (dipeptidil-peptidasa I)							Rojo-Arreola <i>et al.</i> , 2020
	Calpaína-B							Rojo-Arreola <i>et al.</i> , 2020

* La evidencia generalmente proviene de estudios (no se incluye proteómica) en glándula digestiva; no obstante, Wei *et al.* (2014) y Rojo-Arreola *et al.* (2020) utilizaron camarones enteros dado su tamaño (de μm a mm) durante los estadios larvarios.

¹ RNA engloba evidencia de expresión por cDNA e hibridación.

^{2,3} Unigenes se refiere a la evidencia por transcriptómica en larvas (Wei *et al.*, 2014)² o adultos (Gao *et al.*, 2015)³ de cuerpo entero de *P. vannamei*, y se citan tal cual el análisis de los autores (en esta tesis no se analizaron estos transcriptomas).

⁴ Ezquerro *et al.* (1999) no sólo hallaron actividad con el sustrato Leu-*p*-NA, sino que también con Met-, Arg-, Lys-, Glu-, Ala-, Val-, Pro- y Gly-*p*-NA (no hubo actividad con Phe-*p*-NA).

Aunque en menor proporción (y menos estudiadas), también se hallan las aspártico y cisteíno peptidasas, de acuerdo con la inhibición de actividad dada por la pepstatina-A y E-64, respectivamente (Fig. 3), así como la actividad presentada a pH ácido (2.0-5.0) en extractos de GD (Navarrete del Toro *et al.*, 2011). Rojo-Arreola *et al.* (2020) hallaron tanto expresión (qPCR) como actividad (sustratos fluorogénicos) de serino, metalo, aspártico y cisteíno peptidasas en larvas de *P. vannamei*; si bien el estudio utilizó camarones de cuerpo entero, los resultados podrían reflejar lo que sucede en la GD. En cuanto a las **aspártico peptidasas**, los autores (Rojo-Arreola *et al.*, 2020) detectaron la expresión de la catepsina-D, y la actividad de las catepsinas -D y -E, principalmente en la etapa de mysis. En la GD se expresan las **cisteíno peptidasas** lisosomales catepsina-L en *P. vannamei* (Le Boulay *et al.*, 1996) y catepsina-C (dipeptidil-peptidasa I) en *P. monodon* (Qiu *et al.*, 2008), de acuerdo con la secuenciación del cDNA. La expresión de las cisteíno

peptidasas catepsina-L y -C, y calpaína-B, es predominante en las larvas nauplio I-II de *P. vannamei* (lecitotróficos) (Rojo-Arreola *et al.*, 2020).

En lo que se refiere a **metalopeptidasas**, en *P. vannamei* la expresión (RT-qPCR y zimografías de especímenes completos) de la astacina (apartado 2.5) Mpc1 aumenta a partir del estadio de postlarva. En camarones adultos, la Mpc1 se expresa (RT-PCR) principalmente en GD > intestino y branquias, en pleópodos no se observó (Hernandez-Cortes *et al.*, 2017). Varias de las metalo son exopeptidasas. En la GD de *P. vannamei*, se ha detectado actividad con sustratos para aminopeptidasas de Met, Arg, Leu, Lys, Ala, Glu, Val, Pro y Gly, no así de la aminopeptidasa de Phe (Ezquerro *et al.*, 1999). La Leu-aminopeptidasa también se halló en GD y estómago de *P. japonicus*, *P. kerathurus* (Galgani *et al.*, 1984) y *Penaeus notialis* (Fernández *et al.*, 1997), y en GD de *Farfantepenaeus paulensis* (*Penaeus paulensis*, de acuerdo con WoRMS) (Buarque *et al.*, 2009). Por otro lado, también se ha hallado actividad de las carboxipeptidasas -A y -B en la GD de *P. vannamei* (Lee *et al.*, 1984), *Penaeus setiferus* (Gates y Travis, 1973), *P. monodon*, *P. japonicus* y *Penaeus penicillatus* (Tsai *et al.*, 1991), y en GD y estómago de *P. japonicus*, *P. kerathurus* (Galgani *et al.*, 1984) y *P. notialis* (Fernández *et al.*, 1997).

Gracias a la aplicación de los avances de las **ómicas** en invertebrados marinos, actualmente se cuenta con un genoma de referencia de *P. vannamei* (Zhang *et al.*, 2019), así como diversos transcriptomas (Ghaffari *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019) y proteomas (Xu *et al.*, 2017; Ning *et al.*, 2019; Estrella-Soliz, 2022) de diferentes tejidos o del camarón bajo distintos tratamientos. En un estudio de RNAseq del camarón blanco del Pacífico (Wei *et al.*, 2014) se hallaron siete de las peptidasas previamente identificadas por técnicas clásicas: tripsina, quimotripsina y elastasa (serino endopeptidasas), y las exopeptidasas carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, aminopeptidasa-N y una dipeptidasa (de ésta última no se detalla clase características). Los autores declararon que no se identificaron aspártico peptidasas digestivas como pepsina o quimosina. Estos datos son complementados por Rojo-Arreola *et al.* (2020), que sí detectaron expresión y actividad tanto de aspártico como de cisteíno peptidasas.

Dado el repertorio de peptidasas digestivas, una de las grandes preguntas que han surgido es: cuál es la secuencia de su participación en la digestión. Estrella-Soliz (2022) y colaboradores sugirieron, a partir de resultados de proteómica de la GD de *P. vannamei* complementados con zimografía, que la actividad de la Mpc1 es inducida por la ingesta de alimento 1h postprandia, y que las quimotripsinas junto con la catepsina-L actúan a las 3h postprandia. Cabe mencionar que en la preprandia (30 min antes de la ingesta) la catepsina-D1 fue la más activa, y las tripsinas presentaron actividad en las tres las fases estudiadas (Estrella-Soliz, 2022).

2.7.1.1 Regulación de las peptidasas digestivas en el camarón blanco del Pacífico e insectos

La síntesis y actividad de las peptidasas digestivas de los organismos dependen de sus diferentes estilos de vida, resultado de las respuestas adaptativas de las especies a su ambiente, y se regulan a diferentes niveles por factores externos e internos (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008). En *P. vannamei*, las peptidasas digestivas se regulan de acuerdo con: la etapa de desarrollo (Wei *et al.*, 2014; Hernandez-Cortes *et al.*, 2017; Rojo-Arreola *et al.*, 2020) (apartado 2.1.4), el alimento (Sánchez-Paz *et al.*, 2003) o su composición como, por ejemplo, el contenido de proteína (Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002; Córdova-Murueta *et al.*, 2003; Muhlia-Almazán *et al.*, 2003) o la presencia de compuestos antinutricionales (Maytorena-Verdugo *et al.*, 2017b; a). Además, su expresión está correlacionada con la de ciertos elementos del sistema inmune del camarón (Li *et al.*, 2018) y el ciclo de la muda (Sánchez-Paz *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2015).

De acuerdo con resultados de Sanchez-Paz *et al.* (2003), de hibridación DNA-RNA o *dot blot*, en camarones *P. vannamei* con 24h de inanición la abundancia mRNA de tripsina en GD aumentó (excepto en premuda tardía), siendo intermuda el estadio en que la tripsina alcanzó la expresión máxima, decreciendo a niveles más bajos a las 72 y 120 h, tiempo que duró el seguimiento. En cuanto al contenido proteínico, Muhlia-Almazán *et al.* (2003) reportaron que la expresión (evaluada a través de RT-PCR) y actividad de la tripsina de la GD, alcanzan picos más altos en camarones provistos con un 30% de proteína en el alimento que con 15 o 50%.

La digestión y el ciclo de la muda (apartado 2.1.5) están estrechamente ligados, por el hecho de que durante la ecdisis los crustáceos no se pueden alimentar. Esto se refleja en el patrón de

expresión similar entre los genes de tripsina y quimotripsina, y los de quitina (y hemocianina). Acorde con un estudio de RNA-seq en camarones completos de 6 meses de edad (14-16 cm de longitud), ambas serino peptidasas tienen un máximo de expresión durante la muda temprana (D0 para tripsina y D1 para quimotripsina), mientras que el mínimo acontece en la muda temprana (A/P1), estadio en que los niveles de expresión de tripsina, quimotripsina, quitinasa y hemocianina coinciden (Gao *et al.*, 2015). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Klein *et al.* (1996) para tripsinas y Van Wormhoudt *et al.* (1995) para quimotripsinas, en GD mediante *dot blot*, en cuyos trabajos se observa cómo la expresión génica corresponde con la actividad específica. Aunque tripsina y quimotripsina comparten el mismo patrón, las diferencias en sus niveles de expresión van de prácticamente nulas (muda P1) al triple (D0), siendo la tripsina la de mayor expresión (Gao *et al.*, 2015).

Li *et al.* (2018) confirmaron las observaciones previas que correlacionaban positivamente la expresión de tripsina y hemocianina, y sugirieron que la tripsina de GD participa en la generación de péptidos antimicrobianos a partir de la proteína transportadora de oxígeno. Puesto que la tripsina colabora en la respuesta inmunológica de los invertebrados se expresa, entre otros tejidos (apartado 2.7.1.2), en hemocitos. En los hemocitos de *Marsupenaeus japonicus* (*Penaeus japonicus*, de acuerdo con WoRMS), la tripsina se regula post-transcripcionalmente a través de microRNAs. El mRNA de tripsina es blanco de miR-100, un microRNA anti-apoptótico (Yang *et al.*, 2014b). Los microRNAs son RNAs endógenos no codificantes de 21-25 nucleótidos, que hibridan con mRNA complementario, desencadenando la hidrólisis del transcrito e impidiendo su traducción.

Se ha sugerido que en crustáceos las enzimas digestivas son reguladas por ecdiesteroides y neuropéptidos (Klein *et al.*, 1996). La ecdisona es una hormona esteroidea (en crustáceos se sintetiza en el órgano-Y), que al unirse a su receptor en el citoplasma de las células diana forma un complejo, el cual migra al núcleo e incorpora ciertos elementos nucleares. El complejo se une a las secuencias “elementos de respuesta a hormona” en los genes blanco, activándolos, con lo que regula varios genes, y con ello procesos como el ciclo de la muda en los artrópodos (Hyde *et al.*, 2019). El promotor de la catepsina D de *Bombyx mori* contiene “elementos de respuesta a

ecdisona” (Yu *et al.*, 2012). No obstante, hasta donde tenemos conocimiento, no se ha estudiado la relación específica entre ecdisteroides y la peptidasas de *P. vannamei*.

La investigación de la regulación de las peptidasas digestivas está más adelantada en insectos, pues son importantes vectores de parásitos y constituyen plagas. En *Helicoverpa armigera*, por ejemplo, se han identificado elementos reguladores putativos (YY1, C/EBP, Ind, HLF, GATA-1 y CAP) en promotores de una tripsinas (Liu *et al.*, 2014). Un ejemplo bien estudiado de regulación hormonal de las tripsinas es el del mosquito *A. aegypti*. Las tripsinas de la GD de hembras adultas, se dividen en tempranas y tardías, de acuerdo al orden de aparición tras la alimentación con sangre. La larva, pupa y hembra del mosquito adulto recién emergido, no expresan tripsina temprana (Noriega *et al.*, 1997; Noriega y Wells, 1999), mas se sabe que la larva expresa una tripsina en GD que los adultos (alimentados o no) no presentan (Soares *et al.*, 2011).

En la hembra adulta de *A. aegypti*, es bajo la influencia de la hormona juvenil (que aumenta durante los dos días post-emergencia) que los niveles de mRNA-tripsina temprana en GD suben, siendo detectables a las 24h y alcanzando su máximo a los 2-3 días post-emergencia. Este modelo indica que la ingesta de alimento alto en proteína aumenta el *pool* de AA, lo que desencadena la traducción. La proteína tripsina temprana se detecta en GD a 1h post-ingesta de sangre (hpis), actúa como sensora pues los productos de la proteólisis promueven la transcripción de la tripsina tardía, desaparece a las 6-8 hpis. El mRNA-tripsina tardía se detecta a las 8 hpis mas alcanza su máximo a las 24 hpis, la proteína de la tripsina tardía se produce a las 8-10 pids. De modo que, si no hay proteína en el alimento, el gen de la tripsina tardía no se transcribe. Por tanto, las tripsinas tempranas son reguladas en su traducción, mientras que las tardías transcripcionalmente (Noriega *et al.*, 1997; Noriega y Wells, 1999).

Con los avances genómicos, posteriormente se identificaron seis nuevos genes (se mencionan siete mas en futuros trabajos no distinguen entre Aa5G1 y AaSPVI), adicionales a cinco previamente conocidos, de serino peptidasas de GD en *A. aegypti* (Brackney *et al.*, 2010). Así, *A. aegypti* expresa 11 genes de serino peptidasas en GD, que de acuerdo a un análisis filogenético podrían ser: seis quimotripsinas (AaSP II-V o grupo I, AaJA15 y AaCHYMO), tres tripsinas

(temprana/AaET, Aa5G1/AaSPVI y AaSPVII) y dos colagenasas de serina (AaSP I y AaLT). Como las quimotripsinas se expresan constitutivamente tanto antes como después de la alimentación, se piensa que participan moderadamente en la digestión. Interesantemente antes se pensaba que AaLT era la tripsina tardía, sin embargo, su silenciamiento no redujo la actividad específica de tripsina en la fase tardía de la digestión, no contiene el Asp¹⁸⁹ y se agrupa en el clado de las colagenasas de serina (Brackney *et al.*, 2010). Después, se confirmó mediante ensayos de actividad *in vitro* que AaET, Aa5G1/AaSPVI y AaSPVII son tripsinas, y aunque AaLT no hidrolizó el BApNA, sí es catalíticamente activa con albúmina y hemoglobina como sustratos. Por lo que AaLT efectivamente podría tratarse de una colagenasa de serina, de acuerdo con el análisis filogenético y modelado estructural (Rascón *et al.*, 2011). Gracias a este progreso y estudios ulteriores, surgen nuevas interrogantes acerca de la digestión bifásica en el mosquito, pues se ha propuesto que la tripsina temprana (AaET) no se requiere para la expresión de las serino peptidasas de la fase tardía (AaLT, 5G1/AaSPVI, y AaSPVII) (Isoe *et al.*, 2009).

2.7.1.2 Tripsinas y quimotripsinas del camarón blanco del Pacífico

Las tripsinas no sólo participan en la digestión, por tanto, no sólo se expresan en el sistema digestivo. Sin embargo, poco se sabe de su función en tejidos no digestivos, incluso en mamíferos (Koshikawa *et al.*, 1998). Hernandez-Cortes *et al.* (2017) reportaron que en *P. vannamei* la tripsina (variante 21 JQ304272.1 que codifica para la isoforma C) se expresa en GD, branquias e intestino, sin llegar a detectarse en pleópodos, de acuerdo con la intensidad de banda de los productos de PCR. Por otro lado, según Li *et al.* (2018) en *P. vannamei* la tripsina (X86369.1) se expresa, de mayor a menor, en: hemocitos, estómago, GD, branquias e intestino, y en menor medida en músculo y corazón, de acuerdo con el método de la $2^{-\Delta\Delta CT}$.

El número de genes de tripsina es variable incluso entre especies filogenéticamente cercanas y, en al menos los siguientes organismos, están organizados en uno o más clusters en los genomas: El piojo del salmón *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda) tiene al menos 22 (cuatro son pseudogenes), y los insectos *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster* y *D. erecta* tienen 7, 11 y ocho, respectivamente (Kvamme *et al.*, 2005). En insectos, también se ha documentado la agrupación de varias serino peptidasas en clusters (Yang *et al.*, 2017, 2023).

De acuerdo con Klein *et al.* (1998) *P. vannamei* tiene al menos 14 genes de tripsina, que los autores agruparon en tres familias: 5 en TryPv I (Y15039.1), 4 en TryPv II (Y15040.1), y 5 en TryPv III (Y15041.1). Las familias I y II, es decir, nueve genes se expresan en GD. Los autores no encontraron expresión de la familia III en dicho órgano, mas indican que pudo deberse a que es de baja expresión, o se expresa en otros tejidos o estadios del ciclo de vida del camarón, o es regulada por factores externos como el alimento (Klein *et al.*, 1998). Previamente Klein *et al.* (1996) habían encontrado cinco cDNAs (30, 39, 40, 21 y 42) en GD (Tabla 2), y la enzima purificada (de GD) mostraba tres principales isoformas de tripsina y 3 componentes menores (uno estaba presente en poca cantidad, pero era altamente activo con el sustrato BANA).

Tabla 2. Correlación isoformas-cDNA de tripsina en *P. vannamei**

Variante de cDNA	Isoforma % de tripsina	PM (kDa) R. N.R.	PI	K _m (mM)	K _{cat} (S ⁻¹)	K _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	Secuencia NH2-terminal															
							2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
21	28	C	23	30.2	4.5	0.000272	0.583	2142.3	I	V	G	G	T	E	V	T	P	G	E	L	P	Y
39/40	11/32	B	22	32.9	3.0	0.000342	0.370	1081.8	I	V	G	G	T	D	A	K	P	G	E	L	P	Y
30	21	A	21	32.9	3.5	0.000304	0.433	1424.0	I	V	G	G	T	D	A	T	P	G	E	L	P	Y
42	7	-	-	-	-	-	-	-	E	V	T											
TryPv III	-	-	-	-	-	-	-	-	I	V	G	G	S	D	A	T	P	G	E	L	P	Y

*Tabla basada en resultados Sainz *et al.* (2004b) y Klein *et al.* (1996). En la primera columna se indica el porcentaje en que cada variante se halló en la librería de cDNA por Klein *et al.* (1996).

El perfil de peptidasas de la GD de *P. vannamei* es constante en que cuenta con, al menos, tres tripsinas (C, B y A) con posibilidad de una cuarta, dos quimotripsinas (BII, BI), y la metalopeptidasas Mpc1 (Navarrete del Toro *et al.*, 2011; Hernandez-Cortes *et al.*, 2017). La purificación de las tres principales isoformas de tripsina madura le permitió a Sainz *et al.* (2004b) cuantificar sus propiedades bioquímicas, y su secuenciación N-terminal, relacionarlas con su respectivo cDNA codificante (Tabla 2). Las tres tripsinas del camarón blanco son aniónicas, conservan $\geq 80\%$ de su actividad a 40-70°C o pH 6-11, y hay indicios de que son glicosiladas (Sainz *et al.*, 2004b).

La isoforma C es la de menor K_m (Tabla 2) y la más eficiente catalíticamente (K_{cat}/K_m) (Sainz *et al.*, 2004b). La isotripsina C siempre aparece en los zimogramas (sean de GD o heces), lo que se debe a que el gen (en locus β) que lo codifica sólo tiene un alelo (C), por lo que es homocigoto (CC). En cambio, las isotripsinas B y A se presentan juntas o sólo una de ellas, sugiriendo que son

codificadas por un gen que tiene dos alelos (B y A), por lo que puede ser homo- (BB, AA) o heterocigoto (AB). De esta manera, cada camarón puede presentar uno de tres fenotipos de tripsinas: CBA, CB o CA (Sainz *et al.*, 2005).

Los genes de tripsina de *P. vannamei* contienen tres exones separados por dos intrones. Los intrones comparten tan sólo el 54-59% de identidad, mientras que las secuencias nucleotídicas sin intrones comparten más del 91% de identidad. El exón 1 codifica parte del péptido señal (apartado 2.2); el exón 2 codifica el resto del péptido señal, el propéptido y parte de la peptidasa madura, incluyendo la His de la triada catalítica; el exón 3 codifica el resto de la peptidasa incluyendo el Asp y la Ser de la triada (Klein *et al.*, 1998).

Los propéptidos de los tripsinógenos de vertebrados e invertebrados no son similares en secuencia. Esto indica posibles diferencias en el mecanismo de activación (Klein *et al.*, 1996). El propéptido de los tripsinógenos de mamíferos tiene la secuencia consenso Val-(Asp)₄-Lys, que es reconocida por la enteropeptidasa (Chen *et al.*, 2003). El propéptido de las tripsinas del camarón blanco (A-P-S-R-K-P-T-F-R-R-G-L-N-K) no contiene dicha secuencia (Klein *et al.*, 1996). Esto aunado a la prácticamente nula evidencia de la funcionalidad de la enteropeptidasa en los invertebrados, sugiere la autoactivación de los tripsinógenos de *P. vannamei* (Sainz *et al.*, 2004a).

Al igual que las tripsinas, las quimotripsinas son altamente polimórficas. Sellos y Van Wormhoudt (1999) reportaron entre 46 copias de genes que codificaban para serino peptidasas con actividad colagenolítica, y propusieron dos familias: ChyA Pv (Y10664.1) con siete genes y ChyB Pv (Y10665.1) con 5 genes, Tabla 3 (Sellos y Van Wormhoudt, 1999).

Tabla 3. Quimotripsinas en *P. vannamei**

Gen*	NCBI ID	Tamaño (pb)	Proteína	UniProt ID	Tamaño (AA)	PM (kDa)	Estatus	Sustituciones
Quimotripsina A	Y10664.1	1522	Quimotripsina BI	O18487	271 (fragmento)	28.743	Predicción	2 (L ₄₀ V, E ₂₆₄ Q)
				Q00871	271 (completa)	28.685	Revisada	
Quimotripsina B	Y10665.1	1526	Quimotripsina BII	O18488	265 (fragmento)	27.895	Predicción	36 AA
				P36178	271 (completa)	28.723	Revisada	
Quimotripsina C	Y10666.1	397	Quimotripsina	O18489	58 (fragmento)	6.047	Predicción	-

*Sellos y Van Wormhoudt, 1999. Las sustituciones se refieren a las diferencias entre AA de la quimotripsina predicha con la revisada.

2.8 La compensación enzimática como respuesta a inhibidores de peptidasas

Estudios en insectos han develado que el repertorio de peptidasas digestivas que poseen, son parte de los mecanismos adaptativos que les permiten mantener una homeostasis proteolítica. Un claro ejemplo se observa cuando *Tribolium castaneum*, el escarabajo rojo de la harina ingiere inhibidores de peptidasas en el alimento, que el organismo contrarresta mediante la modificación en la expresión génica y un aumento en la actividad de peptidasas no inhibidas. Estos cambios permiten que el escarabajo mantenga una digestión proteica eficiente a pesar de la presencia de compuestos antinutritivos. Ésta capacidad de compensación sugiere una vía evolutiva que podría haber sido favorecida en ambientes donde las plantas producen inhibidores de proteasas como defensa natural (Oppert *et al.*, 2005).

P. vannamei ha mostrado respuestas compensatorias comparables a las conocidas en insectos. Maytorena-Verdugo *et al.* (2017a) reportaron que ante la inhibición *in vivo* de las tripsinas, a través de la ingesta del inhibidor de tripsina de la harina de soya (SBTI, de *soybean trypsin inhibitor*) embebido en el alimento, hay un ajuste del perfil de proteolítico en la GD mediante la síntesis de otras peptidasas diferentes. Maytorena-Verdugo *et al.* (2017b) observaron que en camarones alimentados con SBTI, la actividad proteolítica total y específica de tripsina y quimotripsina disminuyó a las 2-4 h postprandia, y 1 h después de realimentar. Sin embargo, a las 23 h postprandia, las actividades aumentaron más allá del nivel de los controles. Los zimogramas revelaron un aumento en la intensidad de bandas, que de acuerdo con el inhibidor fenantrolina corresponden a metalopeptidasas. Por lo que los autores sugirieron que las metalopeptidasas compensan la inhibición de la función de las tripsinas. Aunque esta relación SBTI-camarón es artificial, la habilidad de *P. vannamei* de compensar el efecto de compuestos anti-nutricionales

como el SBTI, podría explicar el por qué la presencia de todo un repertorio de peptidasas en su GD.

Estos hallazgos subrayan la notable plasticidad fisiológica de estos organismos y su capacidad para adaptarse a condiciones adversas. La comprensión de estas respuestas compensatorias no solo aporta información valiosa sobre la biología y ecología de estos organismos, sino que también tiene implicaciones importantes para el manejo de plagas agrícolas y la producción sostenible en acuicultura. En el contexto agrícola, conocer las respuestas compensatorias puede guiar el desarrollo de estrategias de control de plagas basadas en inhibidores de proteasas. En acuicultura, esta comprensión puede ayudar en el diseño de dietas optimizadas que consideren la capacidad adaptativa de los organismos para superar los efectos de los inhibidores antinutricionales.

2.9 Silenciamiento génico mediado por RNA de interferencia (RNAi)

El silenciamiento génico mediado por RNA de interferencia (RNAi) se refiere a la inhibición de la síntesis de proteínas por medio de la hidrólisis específica del mRNA. Originalmente se observó en plantas más está altamente conservado en los eucariontes, y se considera que protege contra virus o transposones. El RNAi se ha utilizado para interferir o “silenciar” de manera transitoria la función de genes específicos y estudiar los efectos asociados. El proceso ocurre en el citoplasma y se desencadena al introducir moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA, de *double-stranded RNA*) complementarias al mRNA del gen que se pretende silenciar; aunque también se puede manipular al sistema para que sintetice RNAi de manera endógena en el núcleo y sea exportado al citoplasma (Fire *et al.*, 1998; Kurreck, 2009).

El silenciamiento es efectuado por las endonucleasas endógenas Dicer y Argonata, ésta última forma parte de RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*). Dicer corta el dsRNA exógeno en pequeños RNAs interferentes (siRNAs, de *small or short interfering RNAs*) de ~21 nucleótidos, los cuales activan a RISC. RISC separa ambas cadenas del siRNA quedándose unido a la cadena antisentido, que guía al complejo hacia el RNAm blanco. Tras la hibridación RNA guía-RNAm Argonata hace

un corte en el RNAm, el cual termina siendo degradado por RNAasas, con lo que la proteína para la cual codificaba ese RNAm no es sintetizada (Fire *et al.*, 1998; Kurreck, 2009).

La maquinaria del RNAi está ampliamente conservada y los crustáceos no son la excepción, pues ya se han descrito DICER y Argonauta de camarón (Yao *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014a). Por ser un crustáceo de importancia económica, la mayoría de las investigaciones se enfocan en la exploración del RNAi como terapia contra infecciones virales y bacterianas (Alam *et al.*, 2023). Son pocas las investigaciones en que se utiliza esta tecnología como una herramienta para la descripción de la función genética en camarón (Sagi *et al.*, 2013), organismo tan importante para la ecología, pesquerías y acuicultura en nuestro país.

Por otro lado, esta herramienta está siendo ampliamente utilizada en otros artrópodos principalmente insectos y arácnidos. Por ejemplo, en coleópteros y lepidópteros se ha demostrado la viabilidad del RNAi para elucidar el papel esencial en la muda y el desarrollo ontogénico de proteasas como la quimotripsina y la catepsina D (Broehan *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2017). Así como describir las enzimas modulatorias de las cascadas digestivas en la garrapata *Haemaphysalis longicornis* (Yamaji *et al.*, 2013).

2.9.1 Técnicas de suministro de moléculas de RNAi

Uno de los mayores retos en el silenciamiento de genes por RNAi exógeno es conseguir una transfección eficiente, es decir, la introducción de las moléculas de dsRNA al sistema (células, órganos u organismos) para activar la respuesta RNAi, siendo el dsRNA quizá la molécula más usada en investigaciones de genética reversa por silenciamiento de genes, las técnicas descritas a continuación se refieren esta molécula.

Para estudios *in vivo*, la introducción del dsRNA puede ser lograda por difusión pasiva, agregándolo al medio de cultivo para embeber al organismo, con la desventaja de que sólo puede ser utilizado en especies que pueden ser mantenidas en medios líquidos como *C. elegans* o *Schistosoma mansoni* (Hull y Timmons, 2004; Rojo-Arreola *et al.*, 2014). Este método, aunque relativamente sencillo, no se ha utilizado en ninguna especie de camarón debido a los grandes

volúmenes de agua que se requieren para el cultivo. En camarones, se ha probado que el método más efectivo en el silenciamiento de genes es la inyección de dsRNA sintetizado *in vitro* (Sagi *et al.*, 2013), aunque tiene la desventaja de ser laborioso debido a la necesidad de manejo individual de organismos adultos y, por lo tanto, la imposibilidad de escalamiento. Otros métodos probados, aunque menos recurridos, son la electroporación, probada sólo en cigotos, con la cual se reporta una baja eficiencia y sobrevivencia (Sun *et al.*, 2005); y la administración oral, recubriendo alimento comercial con dsRNA derivado de bacterias o con *pellet* bacteriano inactivado (Sarathi *et al.*, 2008; Attasart *et al.*, 2013) y más recientemente de microalgas (Charoonnart *et al.*, 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco expresa una gran cantidad de peptidasas en la glándula digestiva (GD), principalmente de la clase serino, a las que se les atribuye la mayor parte de la digestión de las proteínas del alimento. La diversidad del repertorio de peptidasas digestivas es mayor a lo esperado debido a que se presentan en múltiples isoformas. No obstante, la importancia y función específica de estas peptidasas en la digestión de la proteína del alimento se desconoce. En el supuesto de que todas estas peptidasas tengan una función digestiva surgen preguntas como: ¿De qué sirve al camarón blanco del Pacífico tener tantas peptidasas? ¿Cuál es la importancia relativa de cada una? ¿Existe redundancia? Se presume que tal repertorio de peptidasas le permitiría al organismo responder a factores como la presencia de moléculas antinutricionales en el alimento.

Una de las maneras de responder estas preguntas es impidiendo que cada peptidasa lleve a cabo su función, ya sea interfiriendo y disminuyendo su expresión o mediante el uso de ciertos inhibidores. De acuerdo con resultados de inhibición de las tripsinas y quimotripsinas en *Penaeus vannamei* con SBTI (inhibidor de tripsina, de la harina de soya), se ha sugerido que la metalopeptidasa compensa la actividad proteolítica no efectuada por ambas serino peptidasas impedidas en su función. El estudio de las peptidasas digestivas mediante RNA de interferencia permitiría la disminución específica de la expresión de una peptidasa en particular. En este trabajo se silenció la tripsina-2, la cual al ser la iniciadora putativa de la cascada de activación de las peptidasas digestivas y codificar la presunta isoforma más eficiente catalíticamente, se considera la peptidasa digestiva más importante en camarón. Aunado a esto, la cuantificación de la expresión de otras cuatro peptidasas digestivas permitirá un análisis más profundo de la dinámica del repertorio, incluyendo la compensación enzimática.

Esta investigación podría aportar conocimiento esencial para la optimización la nutrición del camarón blanco en la acuicultura, así como para la comprensión de la evolución del sistema digestivo en crustáceos.

4. HIPÓTESIS

Las peptidasas digestivas de la clase serino son la más importantes en los camarones peneidos. El camarón blanco del Pacífico puede compensar la inhibición de la serino peptidasa tripsina mediante un aumento en la transcripción y actividad de otras peptidasas. Si se reduce la expresión de la tripsina, entonces la expresión y actividad de otras peptidasas digestivas se alterará (evidentemente la Mpc1 aumentará), y afectará el estado nutricional.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Revelar la importancia relativa de la tripsina en relación con otras peptidasas digestivas de *P. vannamei*.

5.2 Objetivos particulares

1. Conocer cómo la reducción en la expresión de la tripsina afecta la expresión y actividad de otras peptidasas digestivas.
2. Saber si ocurre una respuesta compensatoria a la “inhibición” de la tripsina a nivel transcripcional
3. Evaluar si la reducción en la expresión de la tripsina afecta el estado nutricional de los especímenes.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Identificación de las tripsinas de *P. vannamei* en bases de datos de genes y proteínas

Los genes de las tripsinas de *Penaeus vannamei* reportadas por Klein *et al.* (1998) y analizadas en este trabajo, se obtuvieron de las bases de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/blast>). Las secuencias obtenidas se analizaron para confirmar su identidad y función. Se realizó un alineamiento de las secuencias de nucleótidos utilizando el programa MAFFT WS en Jalview 2.11.3.3, para identificar regiones conservadas y dominios funcionales característicos de las tripsinas. Los oligonucleótidos para la síntesis de RNAi (Tabla 4) y el análisis de expresión (Tabla 5), se diseñaron en regiones específicas utilizando las herramientas Primer3Plus y Oligo Analyzer.

6.2 Síntesis de dsRNA

Para disminuir la expresión (silenciar) de la tripsina se utilizó dsRNA (RNAi). Como el blanco es la tripsina C, los oligonucleótidos para sintetizar dsRNA se diseñaron en base a la secuencia del gen de la tripsina-2 (Y15040.1). En términos generales, para la síntesis *in vitro* del dsRNA, se añadió el promotor de la RNA polimerasa T7 (RNAPol T7) a un fragmento de la tripsina (obtenido del cDNA de GD de *P. vannamei*) o de la GFP (obtenido a partir de un plásmido comercial), se realizó la transcripción con la RNAPol T7 y los transcritos complementarios se mezclaron para su alineamiento dando como resultado la formación de dsRNA. La síntesis de dsRNA se hizo unas semanas previas al inicio de cada bioensayo. El proceso (Fig. 5) se describe a detalle en las siguientes secciones (6.2.1.-6.2.4).

6.2.1 Adición del promotor de la RNA polimerasa T7 a los genes de interés

Por medio de PCRs se obtuvieron amplicones a partir del templado de tripsina o GFP, obtenido a partir de cDNA de GD de *P. vannamei* o del plásmido pKGWFS7, respectivamente. Se utilizaron oligonucleótidos que incluyen en tandem el promotor mínimo de la RNAPol T7 en el extremo 5'. Para cada gen de interés se hicieron 2 amplificaciones con diferentes pares de oligonucleótidos (Fig. 5, Tabla 4). Una amplificación con el oligo-F que contiene la secuencia del promotor de la ribonucleasa T7 (oligo-FT7), mientras que el oligo-R no cuenta con dicha secuencia extra. La otra

amplificación el oligo-F no contiene la secuencia del promotor mientras que el oligo-R sí la contiene (oligo-RT7).

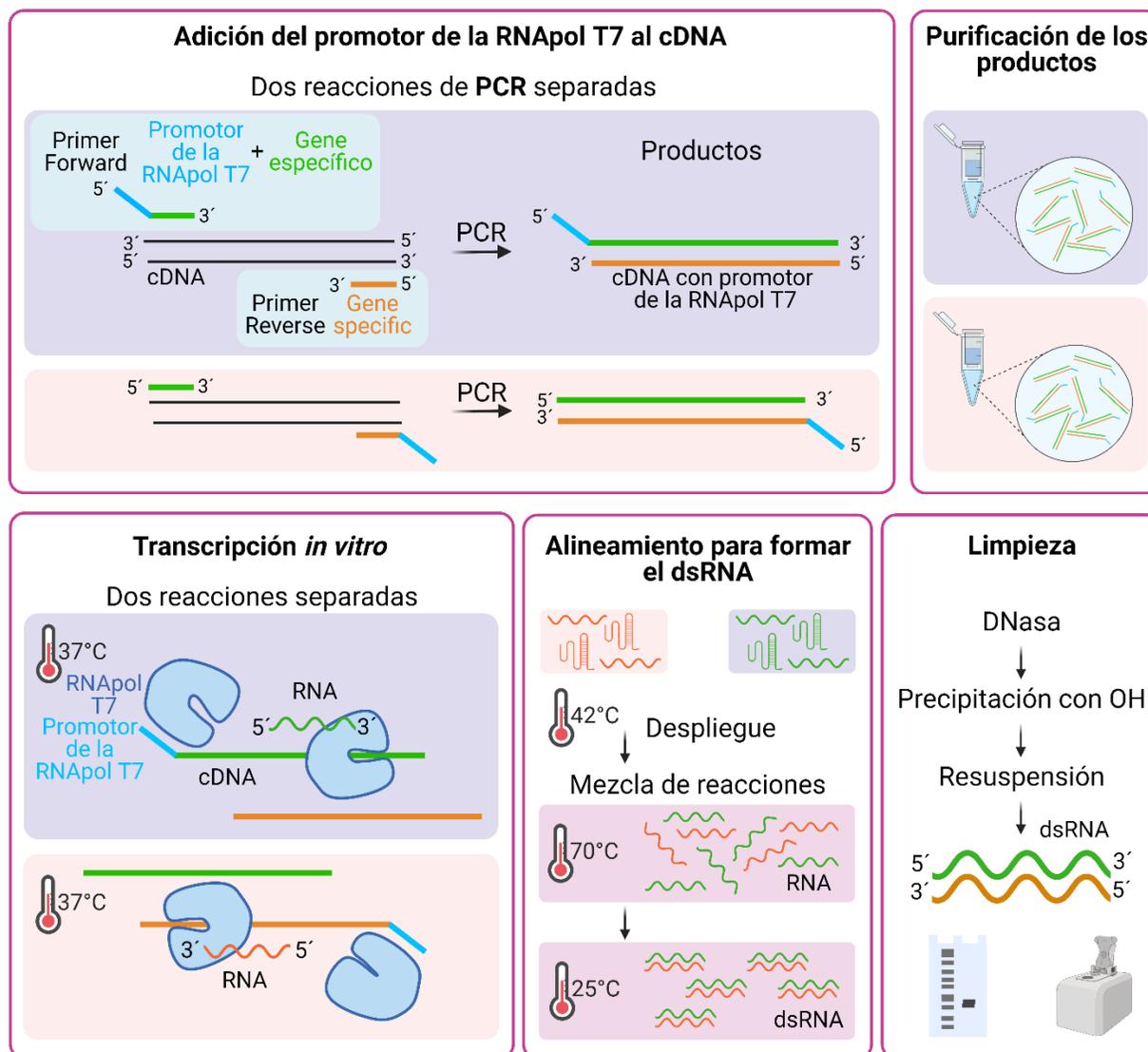


Figura 5. Síntesis de dsRNA. Para sintetizar RNA a partir de DNA (producto de PCR) se requiere que la RNA polimerasa (RNAPol T7) reconozca la secuencia promotora. Para añadir un promotor a una secuencia de DNA, se utilizan oligonucleótidos específicos para el gen de interés que además contienen en tandem la secuencia del promotor (Tabla 4). Para la síntesis de dsRNA se hacen dos reacciones de PCR con dos combinaciones diferentes de oligonucleótidos. Los productos de las dos reacciones de PCR se purifican y se transcriben por separado. Las dos reacciones que contienen RNA complementario se mezclan para que hibriden, formando el RNA de doble cadena o dsRNA. Para eliminar los posibles restos de DNA o RNA de una cadena, se hace un tratamiento con DNasa y RNasa, el dsRNA se purifica mediante precipitación con isopropanol, y se resuspende en agua. Finalmente, se verifica la pureza e integridad del dsRNA y se cuantifica.

La mezcla de cada reacción de PCR (50 μ L) consistió de 25 μ L de GoTaq Green Master Mix 2x, con una concentración final de 200 μ M de cada dNTP y 1.5 mM de MgCl₂ en un buffer pH 8.5 (M7122 Promega), 2 μ L de oligo-F (u oligo-R) 5 μ M (concentración final 0.2 μ M), 2 μ L de oligo-R-T7 (u oligo-F-T7) 5 μ M (concentración final 0.2 μ M), 3 μ L de templado y 18 μ L de agua libre de nucleasas. La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Biorad C1000) y consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguida de 40 ciclos de amplificación, una extensión final a 72°C por 5 min, y el enfriamiento de la reacción a 12°C. Cada ciclo consistió en: desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento con temperatura específica para cada par de oligonucleótidos (Tabla 4) por 30 s, y extensión a 72°C por 30 s.

Tabla 4. Oligonucleótidos para las síntesis de dsRNA.

Gen	Par	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Ta (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
GFP	1	GFP-dsRNA-F	AGGACGACGGCAACTACAAG	55	359
		GFP-dsRNA-T7-R	TAATACGACTCACTATAGGG TCTCGTTGGGGTCTTTGCTC		
	2	GFP-dsRNA-T7-F	TAATACGACTCACTATAGGG AGGACGACGGCAACTACAAG	55	359
		GFP-dsRNA-R	TCTCGTTGGGGTCTTTGCTC Reverso complemento (3'-5'): GAGCAAAGACCCCAACGAGA		
Tripsina 2	1	PvTry2-dsRNA-F	TCGGAGGAAGTGAGGTCAC	55-60	345
		PvTry2-dsRNA-T7-R	TAATACGACTCACTATAGGG TCTCGTTGAAGCTCAGAGGCT		
	2	PvTry2-dsRNA-T7-F	TAATACGACTCACTATAGGG TCGGAGGAAGTGAGGTCAC	55-60	345
		PvTry2-dsRNA-R	TCGTTGAAGCTCAGAGGCT Reverso complemento (3'-5'): AGCCTCTGAGCTTCAACGA		

La secuencia del promotor mínimo de la RNA polimerasa T7 está indicada en negritas. La **G** subrayada indica sitio +1, la primera base incorporada en el RNA. Ta: temperatura de alineamiento. El tamaño del amplicón incluye al promotor.

6.2.2 Purificación del templado

Los productos de PCR se purificaron (del exceso de oligonucleótidos, nucleótidos, DNA polimerasa, grasas y sales) por columnas de afinidad, mediante el kit GenElute™ PCR clean-up (NA1020 Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución se hizo con 35 μ L de agua libre de nucleasas. La integridad se visualizó a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, para la cual se utilizó 1 μ L de la elución de cada reacción. La concentración y pureza se determinaron espectrofotométricamente usando un Nanodrop 2000.

6.2.3 Síntesis de RNA e hibridación de dsRNA

La transcripción del RNA para la síntesis de dsRNA se realizó a partir de los productos de las 2 amplificaciones por PCR para cada gen. Para la síntesis de RNA se tomaron 8 μL de templado (productos de PCR), se añadieron 2 μL de la RNapol T7 (E2050S NEB) y 10 μL de NTPs 2x (final 10 mM cada NTP). Se incubó en termoblock a 37°C durante la noche y a 42°C por 1 hr. Ambas reacciones (iguales volúmenes) se mezclaron y se incubaron a 70°C durante 10 min, posteriormente la reacción se dejó atemperar a temperatura ambiente (t.a.) durante 20 min, permitiendo el alineamiento e hibridación del RNA para la formación del RNA de doble cadena (dsRNA). El RNA monocatenario (ssRNA) y el templado de DNA se eliminaron incubando con RNasa (1 μL de RNasa 1:200 por cada 20 μL) y DNasa libre de RNasa RQ1 (1 μL por cada 20 μL), respectivamente (del T7 RiboMAX™ Express RNAi kit, P1700 Promega), a 37°C por 30 min.

6.2.4 Purificación del dsRNA

El dsRNA se purificó mediante precipitación, se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5.2) más 1 volumen de isopropanol (o 2.5 volúmenes etanol al 95%). Se mezcló e incubó en hielo por 5 min (la reacción se pone turbia). Se centrifugó a 12 000 xg (fuerza G o RCF de *Relative Centrifugal Force*) durante 10 min. El sobrenadante se desechó, el *pellet* se lavó con 500 μL de etanol al 70%, el sobrenadante se desechó y el *pellet* se secó a t.a. El dsRNA se resuspendió en ~20 μL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C. El dsRNA se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 13 del Anexo A) y se cuantificó en Nanodrop. El mismo día en que inició el bioensayo respectivo, el dsRNA se diluyó a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

6.3 Bioensayos para el silenciamiento de tripsina

Para determinar la dosis, sitio de inyección, duración y efecto del silenciamiento se realizaron tres bioensayos, los cuales se referirán como bioensayo-1, prebioensayo-2, y bioensayo-2, en los que se aplicaron una, dos y tres dosis del tratamiento, respectivamente. El dsRNA se suministró inyectando directamente en la GD, por lo que los algunos especímenes recibieron hasta tres inyecciones (Fig. 6). Los resultados del Prebioensayo-2 se muestran en el Anexo E (Fig. 19).

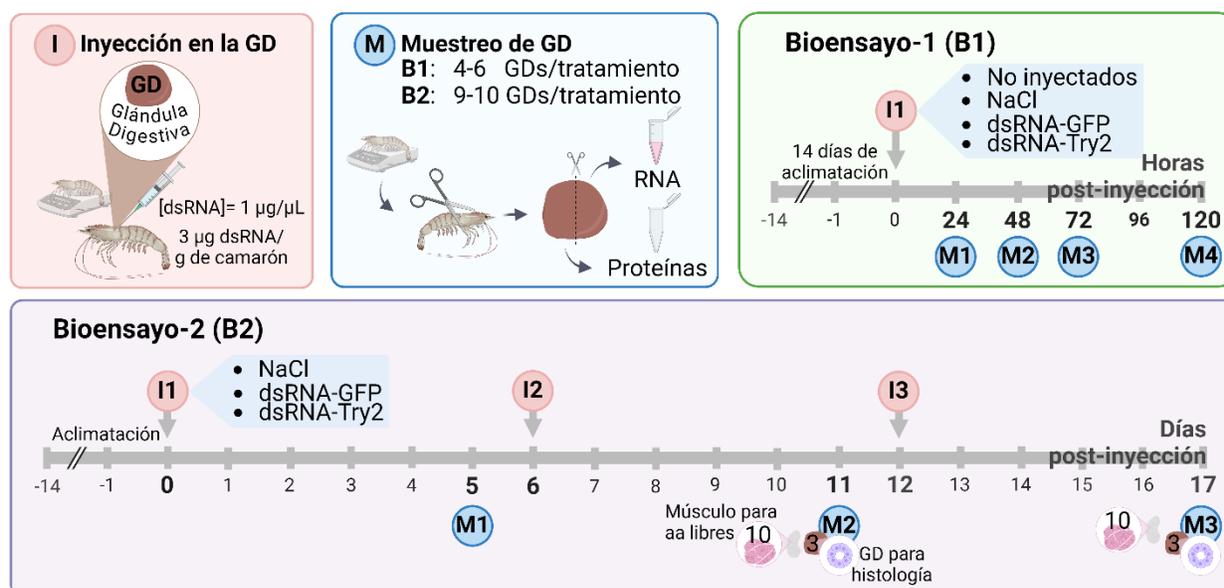


Figura 6. Bioensayos para la disminución de la expresión génica de la tripsina digestiva en *P. vannamei*. Se llevaron a cabo dos bioensayos (B1/B2) en los que los tratamientos se inyectaron (I) en la glándula digestiva (GD). Los tratamientos consistieron en tres (B1) o dos (B2) controles negativos, especímenes: 1) No inyectados, 2) inyectados con NaCl 0.9%, o 3) inyectados con dsRNA-GFP. El tratamiento experimental fue inyección con dsRNA-Try2. Los muestreos (M) consistieron en la disección y colecta de submuestras de GDs individuales en dos microtubos, uno para cuantificar expresión de genes (con *RNA/ater*) y otro para actividades proteolíticas. En el B2 (M2 y M3) también se colectaron 3 cefalotórax por tratamiento para la evaluación histomorfológica de la GD, y 10 músculos en *pool* de los dsRNA-GFP y dsRNA-Try2 para la cuantificación de aa libres.

6.3.1 Mantenimiento de los especímenes

Los ejemplares de camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* fueron proporcionados por Larvas Gran mar S.A. de C.V. Los bioensayos se llevaron a cabo en laboratorio en instalaciones del CIBNOR, La Paz B.C.S. Antes de cada bioensayo, los camarones se aclimataron de una a dos semanas en sus respectivos acuarios (de acuerdo con el tratamiento), con capacidad de 250 L circulares y blancos de fondo plano. Los organismos se mantuvieron en agua marina desinfectada, a 28°C con oxigenación a saturación. Cada día los desechos (heces y restos de alimento) se retiraron del fondo del acuario mediante un sifón, se hizo recambio del 50% del volumen, y se les proporcionó alimento dos veces al día. La composición del alimento (tamaño de partícula 2.4 mm) fue: 35% de proteína cruda mínimo, 7% de lípidos mínimo, 3.8% de fibra cruda máximo, 12% de humedad máxima, 12% de ceniza máximo (Piasa, European Laboratory of Nutrients, Netherlands).

La desinfección del agua marina consistió en su filtración, cloración y neutralización del cloro. El agua se pasó por un filtro de arena y por una bolsa de filtro de 1 μm . Posteriormente, se añadieron 250 mL de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex sin aroma) por cada 1000 L, y se dejó aireando y reposando. Al día siguiente o antes de utilizar el agua para los recambios, el cloro se neutralizó con 5 g de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, S1648 Sigma-Aldrich). La inactivación del cloro se confirmó añadiendo dos gotas de ortotolidina a una muestra de 10 mL del agua (prueba colorimétrica).

Estas condiciones se mantuvieron durante los bioensayos. Un día antes del inicio de cada bioensayo, se retiraron las heces de los acuarios, así como también el alimento. Por lo que el día de inicio del bioensayo, no se sifoneó el fondo de los acuarios ni se hizo recambio de agua, esto con el objetivo de estresar lo menos posible a los especímenes.

6.3.2 Bioensayo-1 (corto): Una inyección de dsRNA-Try2

El primer bioensayo (B1) se llevó a cabo para evaluar el silenciamiento de la tripsina en función del tiempo y el sitio de inyección, así como su posible efecto en la expresión y actividad de otras peptidasas digestivas. El B1 consistió en cuatro tratamientos (Fig. 6), tres controles negativos y el tratamiento experimental. Ochenta juveniles de *P. vannamei* de 6.0 ± 1 g se repartieron en cuatro acuarios (20 por acuario). Un acuario se designó para especímenes no inyectados (control de no inyección); el segundo para los inyectados con NaCl 0.9% (control de inyección); el tercero para los inyectados con dsRNA-GFP (control de dsRNA); y el cuarto para los inyectados con dsRNA-Try2 (tratamiento experimental).

Cada camarón se pesó antes de ser inyectado (jeringa de insulina 30 G X 13 mm) en la GD con 3 μg de dsRNA/g de camarón o el equivalente de volumen de NaCl 0.9%. Por lo que, en promedio se inyectaron 18 μL de dsRNA o NaCl 0.9% por individuo. Los especímenes que no se recuperaron de la inyección a las 2 h, se retiraron del acuario. Se muestrearon (M) de cuatro a seis especímenes por tratamiento a las 24 (M1), 48 (M2), 72 (M3) y 120 (M4) h post-inyección (p.i.). Cada espécimen fue aletargado sobre una cama de hielo para reducir la sensibilidad, se pesó y se le extrajo la GD, que también se pesó. La GD se dividió en dos submuestras que se colocaron en 300 μL de RNA $later$

Solution (AM7024 Ambion) para la posterior extracción de RNA; el resto de la GD se colocó en un microtubo, para la extracción de proteínas. Las muestras se mantuvieron en hielo durante el muestreo, y posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

6.3.3 Bioensayo-2 (largo): Una a tres inyecciones de dsRNA-Try2

El segundo bioensayo (B2) se llevó a cabo con el objetivo de prolongar el silenciamiento de la tripsina y conocer sus efectos en el estado nutricional de los ejemplares. Duró 17 días (Fig. 6) y consistió en la inyección del respectivo tratamiento en la GD. Se aplicaron de una a tres inyecciones (I1-I3 los días 0, 6, 12), y se muestreó cinco días después de cada inyección (M1-M3 los días 5, 11 y 17). Como algunos camarones se inyectaron más de una vez (I2 e I3), el costado de la GD a inyectar se alternó. Para el B2 se utilizaron ciento ocho juveniles de *P. vannamei* de 6.0 ± 1 g que se repartieron en tres acuarios (36 por acuario), un acuario por tratamiento (inyectados con NaCl 0.9%, dsRNA-GFP o dsRNA-Try2). Al igual que en el B1, se obtuvo el peso de cada camarón antes de ser inyectado (jeringa de insulina 30 G X 13 mm) en la GD, se utilizaron 3 µg de dsRNA/g de camarón o el equivalente de volumen de NaCl 0.9%; los especímenes que no se recuperaron de la inyección a las 2 h, se retiraron del acuario.

En el B2 se muestrearon 9-10 especímenes por tratamiento por muestreo. Los ejemplares se adormecieron en hielo, se pesaron y se les extrajo la GD que, al igual que en el B1, se dividió en submuestras para la posterior extracción de RNA y proteínas. Adicionalmente, en los M2 y M3 se muestrearon tres camarones a los que se inyectó 1 mL de solución de Davidson (Howard *et al.*, 2004) en la GD; los cefalotórax se mantuvieron embebidas en solución de Davidson a t.a., hasta su procesamiento para la evaluación histológica de la GD. En los M2 y M3, también se muestreó el músculo de 10 camarones de los tratamientos con dsRNA-GFP y dsRNA-Try2. Las muestras de GD y músculo se mantuvieron en hielo durante el muestreo, y posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

6.4 Cuantificación de la expresión relativa de mRNA

6.4.1 Extracción de RNA

Las muestras preservadas en RNA $later$ se descongelaron en hielo y se procesaron individualmente. A un fragmento de tejido de ~20 mg se le escurrió el exceso de RNA $later$ y se transfirió a 250 μ L de TRIzol (15596-026 Invitrogen). El tejido se homogeneizó con pistilo, y se añadieron 250 μ L más de Trizol (500 μ L de volumen final de Trizol). A partir de aquí, se siguió el protocolo de TRIzol del fabricante. Las muestras se mezclaron con vórtex e incubaron a t.a. durante 5 min. Se añadieron 100 μ L de cloroformo, se mezcló con vórtex durante 15 s, e incubó a t.a. por 3 min. Las muestras se centrifugaron a 12 000 $\times g$ por 15 min a 4°C. Se recuperaron entre 70-100 μ L de la fase acuosa superior y se transfirieron a un microtubo nuevo. Se añadieron 500 μ L de isopropanol a la fase recuperada, se incubó a t.a. durante 10 min y se centrifugó a 12 000 $\times g$ por 10 min a 4°C, el sobrenadante se desechó. El *pellet* resultante se lavó con 500 μ L de etanol al 75%, se agitó con vórtex, se centrifugó 5 min a 7 500 $\times g$ a 4°C. El sobrenadante se desechó, el *pellet* de RNA se dejó secar y se resuspendió en agua libre de RNasas.

6.4.2 Tratamiento del RNA con DNasa

Para eliminar el DNA genómico residual, el RNA total se trató con DNasa I (AMPD1-1KT Sigma-Aldrich). A 16 μ L de RNA se le añadieron 2 μ L de buffer de reacción 10x y 2 μ L de DNasa I (1 U/ μ L). Se incubó a 37°C por 15 min. Se añadieron 2 μ L de solución Stop, se incubó a 70°C por 10 min para desnaturalizar la DNasa y el RNA, se colocó en hielo 1 min. Se llevó a un volumen de 50 μ L. El RNA se recuperó mediante la extracción con fenol-cloroformo (fenol P4682 Sigma-Aldrich). Se añadieron 50 μ L de agua más 200 μ L de fenol:cloroformo 2:1, se agitó con vórtex, centrifugó a 12 000 $\times g$ por 10 min a 4°C, la fase acuosa se transfirió a un microtubo nuevo. Se precipitó con 0.1 volúmenes acetato de sodio y 2 de etanol absoluto frío. Se lavó con etanol al 75%. Se cuantificó la concentración (absorbancia a 260 nm o A_{260}) junto con la pureza ($A_{260/280}$) con espectrofotómetro. La calidad e integridad del RNA se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6.4.3 Síntesis de cDNA

A partir del RNA total se sintetizó DNA complementario (cDNA) utilizando el kit GoScript Reverse Transcription System (A5000 Promega). Se mezclaron 11 μL de RNA (equivalente a 508 ng) con 1 μL de oligo(dT)₁₅, se incubó a 70°C por 5 min, y se colocó en hielo. Se añadieron 8 μL del mix de reacción preparado con 4 μL de buffer de reacción GoScript 5X, 2 μL de MgCl₂ 25 mM, 1 μL de mix de nucleótidos, 0.5 μL de inhibidor de ribonucleasas RNasin y 0.5 μL de transcriptasa reversa GoScript, en un volumen final de 20 μL . En un termociclador se hicieron las siguientes incubaciones: 5 min a 25°C, 90 min a 42°C (retrotranscripción) y 15 min a 70°C (inactivación de la enzima). El cDNA se conservó a -20°C.

6.4.4 Cuantificación mediante qPCR

Los genes de interés (genes blanco) fueron: tripsina-1, -2 y -3, quimotripsina B1 y Mpc1. Como genes de referencia (controles internos) se utilizaron ubiquitina y RPL8 (*Ribosomal Protein L8*).

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real StepOne (Applied Biosystems), utilizando Power SYBR Green Master Mix 2x (4367659 Applied Biosystems/K0221 Thermo Scientific). Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado. La mezcla de reacción se hizo con Power SYBR Green Master Mix 1X, 0,5 mM de cada oligonucleótido, 508 ng de cDNA en un volumen total de 10 μL . Los parámetros de reacción fueron los siguientes: 1 ciclo de 95°C por 10 min, 40 ciclos a 95°C por 15 s, seguidos de 30 s a la temperatura de alineamiento (T_a: 52-60°C) específica para cada par de oligonucleótidos (Tabla 5), a 72°C por 30 s. Se incluyó paso de 95°C por 15 s, y un análisis de curva de disociación de 60°C a 95°C con incrementos de 0.5°C. Para cada grupo de reacción se incluyó un control sin templado. Los datos se obtuvieron mediante el software StepOne Real-Time System.

Tabla 5. Oligonucleótidos para qPCR.

Gen (No. ID relacionado)	Oligo-nucleótido	Secuencia (5'-3')	Ta (°C)	Tamaño del amplicón (pb)	Eficiencia (%)	Pendiente	R ²
Tripsina 1 Y15039.1	PvTry1-F	CATGAACAACCCCGATTACC	52	187	86.4	-3.6984	0.999
	PvTry1-R	GCGAACGTTGTTCATTGAAGC					
		Rc (3'-5'): GCTTCAATGACAACGTTTCGC					
Tripsina 2 Y15040.1	PvTry2-F	CGACGACTTTGATAATCCCAGC	58	275	91.0	-3.5573	0.999
	PvTry2-R	AGCTGCCTCCTTCAGTGAGAGC					
		Rc (3'-5'): GCTCTCACTGAAGGAGGCAGCT					
Tripsina 3 Y15041.1	PvTry3-F	CAGAACGACATTGACGACTCC	56	174	100.5	-3.3093	0.996
	PvTry3-R	GTACACGCCAGGGTAGTTGG					
		Rc (3'-5'): CCAACTACCCTGGCGTGTAC					
Quimotripsina 1 X66415	PvChy1-F	CGCCCTTCCGACTCTGCCAGC	57	142	90.3	-3.5785	0.999
	PvChy1-R	TGCTCTTGCCGCCGGTGCCGTCG					
		Rc (3'-5'): CGACGGCACCCGGCGCAAGAGCA					
Mpc1 (Astacina) DQ398567	PvMpc1-F	ACCATCGGAGGCAAGCAGA	57	197	98.8	-3.3502	0.995
	PvMpc1-R	TGCCAGTAGGTGTCTTGTGA					
		Rc (3'-5'): TCAACAAGGACACCTACTGGCA					
Ubiquitina AOA023H494	PvUbi-F	GGGAAGACCATCACCCCTTG	60	146	109.5	-3.1135	0.995
	PvUbi-R	TCAGACAGAGTGCAGCCATC					
		Rc (3'-5'): GATGGTCGCACTCTGTCTGA					
L8 DQ316258.1	PvL8-F	GCCTAAGGTGCGTGGTGT	55	181	90.0	-3.5865	0.999
	PvL8-R	ATTCTGCCTTGGGTCTTCT					
		Rc (3'-5'): AGAAGGACCCAAGGCAGAAT					

Ta: Temperatura de alineamiento

Rc: reverso complemento

La eficiencia de la reacción de PCR con cada par de oligonucleótidos (Tabla 5) se calculó con la ecuación $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$. La expresión relativa de cada gen se estimó con el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Como factor normalizador de los niveles de expresión se utilizó la media geométrica de dos controles internos, los cuales pertenecen a distintas clases funcionales (Vandesompele *et al.*, 2002). La ubiquitina participa en la degradación de proteínas, y se ha usado en algunos estudios como control interno en camarón (Ulaje *et al.*, 2019; Rojo-Arreola *et al.*, 2020). La RPL8 (*Ribosomal Protein L8*) es un componente estructural de la subunidad ribosomal 60S.

Para cada gen (sea de interés o de referencia), el ΔCt de cada muestra se calculó con el promedio de los Ct_{mean} (promedio de dos réplicas técnicas) de los especímenes tratados con dsRNA-GFP (controles) por muestreo (n réplicas biológicas), y al promedio se le restó individualmente el Ct_{mean} de cada muestra del muestreo correspondiente. Por ejemplo, los cinco Ct_{mean} de ubiquitina de especímenes dsRNA-GFP 120 hpi (B1) se promediaron. Al Ct promedio control resultante se le restó individualmente el Ct_{mean} de cada muestra obtenida a las 120 hpi (cualquier tratamiento). El ΔCt resultante es el exponente al que se elevó la eficiencia de amplificación (E) del par de

oligonucleótidos ($E^{\Delta Ct}$) para cada muestra. Al resultado de $E^{\Delta Ct}$ de los dos genes de referencia se les calculó la media geométrica. Para calcular la expresión relativa del gen de interés en cada muestra, se dividió la $E^{\Delta Ct}$ del gen de interés entre la media aritmética de los genes de referencia, ecuación 1:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{\text{gen de interés}})^{\Delta Ct \text{ gen de interés (GFP-muestra)}}}{\sqrt{(E_{\text{ubiquitina}})^{\Delta Ct \text{ ubiquitina (GFP-muestra)}} \times (E_{\text{L8}})^{\Delta Ct \text{ L8 (GFP-muestra)}}}} \quad (1)$$

Finalmente, a los datos de expresión relativa se les sacó logaritmo base 2 (Log_2).

6.5 Medición de la actividad proteolítica total, de tripsina y quimotripsina

Las GDs almacenadas a -20°C se descongelaron en hielo y trataron individualmente. Se homogenizaron en agua destilada fría por 20 s con un sonicador de punta. El homogenado se centrifugó durante 20 min a 4°C a $10\,000 \times g$ para eliminar los detritos tisulares y lípidos. Se recuperó el sobrenadante y se congeló a -20°C hasta su uso. La proteína se cuantificó mediante el método de Bradford, utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA).

Para medir la actividad proteolítica total se utilizó como sustrato azocaseína al 0.5 % en TrisHCl 50 mM pH 8, la reacción se incubó a t.a. a 25°C por 10 min. Para medir la actividad de las tripsinas se utilizó el sustrato BApNA (N-Benzoil-Arginina-*p*-Nitroanilida) en Tris-HCl 50 mM pH 8 con 20 mM CaCl_2 . Para medir la actividad de las quimotripsinas se utilizó N-Succinil-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-Nitroanilida o SAAPFpNA (S7388 Sigma-Aldrich) en Tris-HCl 50 mM pH 8 con 20 mM CaCl_2 .

La actividad proteolítica de las muestras individuales se midió por triplicado en microplaca con un espectrofotómetro (Synergy H1 BioTek) a 410 nm de absorbancia durante 3 min, monitoreando el curso de la reacción cada 30 s. En cada lectura se puso un blanco de 0.305 mL de agua. Se colocaron 5 μL del extracto de GD (muestra con enzimas) por pozo, la placa se colocó en el espectrofotómetro, se añadieron 300 μL de sustrato (BApNA para tripsinas o SAAPFpNA para quimotripsinas) por pozo e inmediatamente se monitoreó la reacción. La actividad se calculó

como $(A_{410}/\text{min} \times 1000 \times 0.305) / (8800 \times \text{mg de proteína en la reacción})$, donde 0.305 es el vol. en mL de la mezcla de reacción y 8800 es el coeficiente de extinción molar (ϵ) de la paranitroanilina.

6.6 Separación de proteínas en gel y zimografía

Los protocolos de separación de proteínas por electroforesis y la posterior evaluación de actividad por zimografía, se llevaron a cabo acuerdo con los protocolos descritos en Navarrete del Toro *et al.* (2011), detalles a continuación.

6.6.1 Electroforesis

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Se prepararon dos geles de 0.75 mm de grosor con 2 placas de vidrio de 80 x 100 mm. La mezcla para preparar dos geles separadores fue: 4.18 mL de agua destilada, 3.13 mL de Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, 5 mL de acrilamida, 0.125 mL de SDS (dodecilsulfato sódico) al 10%, 0.063 mL de APS (persulfato de amonio) al 10% y 0.006 mL de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina). La mezcla para preparar dos geles concentradores fue 2.73 mL de agua destilada, 1.121 mL de Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, 0.583 mL de acrilamida, 0.045 mL de SDS 10%, 0.022 mL de APS 10%, 0.006 mL de TEMED. Se ensambló la cámara de electroforesis, se añadió buffer de electrodo 1X (0.005 M Tris, 0.0384 M glicina, 0.02 % de SDS, pH 8.3).

Las muestras se diluyeron 1:2 en buffer de tratamiento 2X (0.125 M Tris-Hcl, 4% SDS, 20% de glicerol v/v, 0.02% de azul bromofenol, pH 6.8). Se cargaron 5 ug de muestra por pozo con una jeringa Hamilton (de 25 μ L), y 4 μ L de pesos moleculares estándar (Precision Plus Protein Dual Color 1610374 Biorad). La electroforesis se realizó a 15 mA por gel en una unidad de electroforesis (modelo SE-260, Hoefer, San Francisco) conectada a un baño refrigerado a 4°C. Una vez terminada la electroforesis, el gel se tiñó con azul Commassie R-250 al 0.5% w/v en 40% de metanol v/v y 7% de ácido acético v/v. El exceso de colorante se lavó en una solución de 40% de metanol v/v y 7% de ácido acético v/v (solución de desteñido).

6.6.2 Zimogramas

De manera paralela se realizó una electroforesis de las mismas muestras de acuerdo al protocolo de la sección anterior, al terminar, el gel se lavó con agua destilada y se embebió por 30 min en 60 mL de caseína 3% w/v en buffer pH 8 (pH monitoreado continuamente) en frío (hielo), con agitación circular para permitir que el sustrato difundiera dentro del gel. Pasados los 30 min el gel se mantuvo a t.a. en agitación circular durante 90 min. El gel se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de sustrato, se tiñó con azul Commassie y se lavó con solución de desteñido. Las bandas claras en el fondo azul muestran la actividad proteolítica.

6.7 Histología de la glándula digestiva

Para la evaluación histomorfológica de la GD, se inyectó 1 mL de solución de Davidson (Howard *et al.*, 2004) en la GD de camarones completos, y las cabezas se mantuvieron embebidas en solución de Davidson a t.a., hasta su procesamiento por el laboratorio de Laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR. Las muestras se deshidrataron gradualmente en una serie de alcoholes de concentración creciente (etílico 70% - 100%), aclararon en xilol e incluyeron en parafina (Paraplast X-Tra, McCormick Scientific, USA). Se hicieron cortes de 4 μm de grosor (microtomo Leica RM2155) de la parte media de la GD, que se desparafinaron y tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E). Las muestras se observaron en un microscopio óptico (OLYMPUS BX45) con cámara integrada (NIKON *Digital Sight DS-Ri1*), y se tomaron fotos utilizando una lente con magnificación 40x.

6.8 Aminoácidos libres en músculo

Las muestras de músculo se deslipidizaron por el Laboratorio de Análisis Químico Proximal del CIBNOR, y los aa libres de las mismas fueron cuantificados por el Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos, ambos laboratorios del CIBNOR. Brevemente, las muestras (*pool* de músculo de 10 especímenes por tratamiento) se descongelaron, se secaron en horno a 70°C durante 19 h, y se almacenaron en presencia de desecante. Se molieron en mortero e incineraron a 600°C por 5 h en un horno de mufla (F30438CM Thermo Scientific). Los análisis se realizaron por triplicado. La

deslipidización se hizo en un equipo de autoextracción de grasa (Soxtec Avanti 2050) con éter de petróleo como solvente extractor.

Posteriormente, se llevó a cabo una hidrólisis ácida de las muestras de acuerdo con el método 994.12-1997 de la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), en que la cantidad equivalente a 10 mg de nitrógeno se trata con HCl 6M, que hidroliza las proteínas y libera los aa. Los hidrolizados se diluyeron con buffer de citrato de sodio o se neutralizaron, el pH se ajustó a 2.2, y los aa individuales se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico. Este método detecta todos los aa excepto metionina (Met/M) y cistina, que son parcialmente oxidadas, y triptófano (Trp/W), que se destruye totalmente.

6.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron para conocer la normalidad mediante gráficas cuantil-cuantil (*QQ plot*) y la prueba de Shapiro–Wilk. Los datos se graficaron como diagramas de caja y bigotes, que muestran la mediana (línea que divide la caja), el valor mínimo y máximo (bigotes superior e inferior), además de la media (símbolo +). Para el bioensayo-1, las diferencias estadísticas entre diferentes grupos se determinaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, y el análisis post-hoc comparación múltiple de Dunn. Para el bioensayo-2, las diferencias estadísticas entre diferentes grupos se determinaron mediante ANOVA de una vía, y el análisis post-hoc comparación múltiple de Tukey. Se consideró estadísticamente diferente cuando $p < 0.05$. Los datos se graficaron mediante GraphPad Prism 10.2.0, mismo que se utilizó para los análisis estadísticos.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de las tripsinas de *P. vannamei* en bases de datos de genes y proteínas

Previamente varios autores han identificado los genes de tripsina de *P. vannamei* o sus productos, no obstante, dado que existe redundancia de secuencias en las bases de datos y en la literatura científica, se hizo una revisión de secuencias y sus números de identificación.

En la Tabla 6, se muestran los números de identificación de los transcritos (RefSeq) y proteínas (RefSeq y UniProt) correspondientes a cada gen, asociados por: el NCBI, ciertos autores, y la secuencia N-terminal proporcionada por Sainz *et al.* (2004b).

Tabla 6. Genes, transcritos y proteínas de tripsina en *P. vannamei* de acuerdo con varias referencias.

Familia de genes ^{1,2}	Variante de cDNA ^{1,2}	Isoforma ³	Gen en NCBI	ARNm en NCBI	Proteína en NCBI	Proteína en UniProt	Notas acerca de los productos asociados a los genes de tripsina
TryPv I 5 genes	30	A	Gen 1 Y15039.1	X86369.1 ¹ 854 nt	WVH45071.1 266 aa		<ul style="list-style-type: none"> • X86369.1¹ codifica WVH45071.1 • WVH45071.1 (tres aa más)= CAA75309.1= Q9TY16 tienen IVGGTDAT (tripsina A) • X86369.1 se expresa en hemocitos > estómago > GD > branquias⁴ • Q9TY16 anotada como tripsina-1 por Rojo-Arreola <i>et al.</i> (2020) • XP_027223422.1= A0A423SXN9 tienen IVGGTDAK (tripsina B) • A0A423SXN9 anotada como tripsinógeno A por Estrella-Soliz (2022) • Las isoformas A y B son alelos de un mismo gen (Sainz <i>et al.</i>, 2005)
	30v	-	LOC113815561 1219 pb		CAA75309.1 263 aa	Q9TY16 263 aa	
	39	B		XM_027367621.1	XP_027223422.1 266 aa	A0A423SXN9 266 aa	
	40	B		940 nt			
40v	-						
TryPv II 4 genes	21	C	Gen 2 Y15040.1	XM_027367616.1 ⁸ 1894 nt	XP_027223417.1 300 aa		<ul style="list-style-type: none"> • Las proteínas (6 IDs) tienen IVGGSEVT (IVGGEVET en tripsina C) • H6WSS5= AEZ68613.1 y O62561= CAA75310.1 difieren en un aa • JQ304272.1 anotada como variante 21/tripsinógeno-2 que codifica a la tripsina C, se expresa en GD > branquias e intestino, excepto en pleópodos⁵. • H6WSS5 anotada como tripsina-2 por Rojo-Arreola <i>et al.</i> (2020) • A0A3R7M136 anotada como tripsinógeno C por Estrella-Soliz (2022) • La expresión de Y15040.1 en GD es influenciada por el porcentaje de proteína en la dieta (Muhlia-Almazán <i>et al.</i>, 2003) y por la inanición (Sánchez-Paz <i>et al.</i>, 2003)
	42	-	LOC113815556 1328 pb	JQ304272.1 887 nt	H6WSS5 266 aa	AEZ68613.1 266 aa	
	42v	-			CAA75310.1 264 aa	O62561 264 aa	
	42v	-				A0A3R7M136 270 aa	
TryPv III 5 genes	1	-	Gen 3 Y15041.1	XM_027376457.1 ^{X5} 914 nt	XP_027232258.1 266 aa	A0A423TSA5 266 aa	<ul style="list-style-type: none"> • La familia III no se expresa GD y contiene IVGGSDAT² • CAA75311.1= O62562 tiene IVGGSDAT y fue anotada como tripsina-3, la cual se expresa más en la mysis y zoea (Rojo-Arreola <i>et al.</i>, 2020) • XP_027232258.1= XP_027232251.1= A0A423TSA5, tienen IVGGSDVT • XP_027232231.1, XP_027232237.1 y XP_027232244.1 tienen IVGGSEVT • A0A423TSA5 anotada como tripsinógeno B por Estrella-Soliz (2022).
	2	-	LOC113823738 1206 pb	XM_027376450.1 ^{X4} 887 nt	XP_027232251.1 266 aa		
	3	-		XM_027376443.1 ^{X3} 921 nt	XP_027232244.1 266 aa		
	4	-		XM_027376436.1 ^{X2} 851 nt	XP_027232237.1 266 aa		
	5	-		XM_027376430.1 ^{X1} 942 nt	XP_027232231.1 266 aa		
					CAA75311.1 263 aa	O62562 263 aa	

¹ Klein *et al.*, 1996

² Klein *et al.*, 1998

³ Sainz *et al.*, 2004

⁴ Li *et al.*, 2018

⁵ Hernández-Cortés *et al.*, 2017

⁸ XM_027367616.1 no está asociado a Y15040.1 por NCBI, pero CAA75310.1 y O62561 sí. El tBLASTn de estas proteínas indica que el RNAm de Y15040.1 es XM_027367616.1

X1-X5 son variantes anotadas por NCBI.

En las columnas de proteínas, en negritas se señalan las secuencias que se alinearon para las Fig. 14 y 15.

En la base de datos de nucleótidos del NCBI, los genes de tripsina de *P. vannamei* reportados por Klein *et al.* (1998) están anotados como: gen 1 (Y15039.1), 2 (Y15040.1) y 3 (Y15041.1). El alineamiento de los tres genes (Fig. 7) muestra que los genes 1 y 2 son los más similares entre sí, y comparten una identidad 94% (Fig. 14 del Anexo B). Sin embargo, comparando las secuencias de aa (Fig. 15), las tripsinas más similares son codificadas por los genes 2 y 3 (Fig. 16).

La página correspondiente para cada gen contiene información como el número de identificación del gen y de la secuencia de referencia (RefSeq) de RNAm o proteína (formato NCBI/UniProt) correspondiente. Esta información es la que se muestra en la Tabla 6. De manera complementaria se realizó el BLASTn/BLASTx de los tres genes (Tablas B1 y B2 del Anexo B). Los resultados del BLASTx son coincidentes con los de la Tabla 6 en lo que respecta al número ID de gen asociado; a los genes 1, 2 y 3 les corresponden los genes con ID 113815561, 113815556, 113823738. Sin embargo, los resultados del BLASTn no coinciden con los de la Tabla 6 para los Genes 2 y 3, a los cuales les corresponden los genes con ID 113815565 y 113823795. Esto llevó a buscar los genes de tripsina presentes en el genoma de referencia de *P. vannamei* ASM378908v1 (Zhang *et al.*, 2019), esta parte se retoma más adelante, pues primero se describe lo que respecta a los genes descritos por Klein *et al.* (1998).

El gen 1 Y15039.1 y los transcritos X86369.1 (Klein *et al.*, 1996) y XM_027367621.1 están asociados al gen con ID 113815561 (en el *scaffold* NW_020870094.1). X86369.1 codifica la tripsina WVH45071.1 cuyo N-terminal IVGGTDAT se asocia a la tripsina A. XM_027367621.1 produce la tripsina XP_027223422.1 con N-terminal IVGGTDAK que se relaciona con la tripsina B (Sainz *et al.*, 2004b). Las isotripsinas A y B provienen de alelos de un mismo gen, por lo que puede que un individuo de camarón exprese una o ambas isoformas, homocigoto y heterocigoto, respectivamente (Sainz *et al.*, 2005). De acuerdo con esto y la expresión cuantificada por Li *et al.* (2018), la tripsina A (X86369.1) se expresaría mayoritariamente en hemocitos, pero también en estómago, GD y branquias. Las tripsinas del gen 1 (Tabla 6), las isoformas A (XP_027223422.1) y B (WVH45071.1), están conformadas por 266 aa (Fig. 15) y comparten un 99.25% de identidad (Fig. 16), es decir, difieren en tan sólo dos aa.

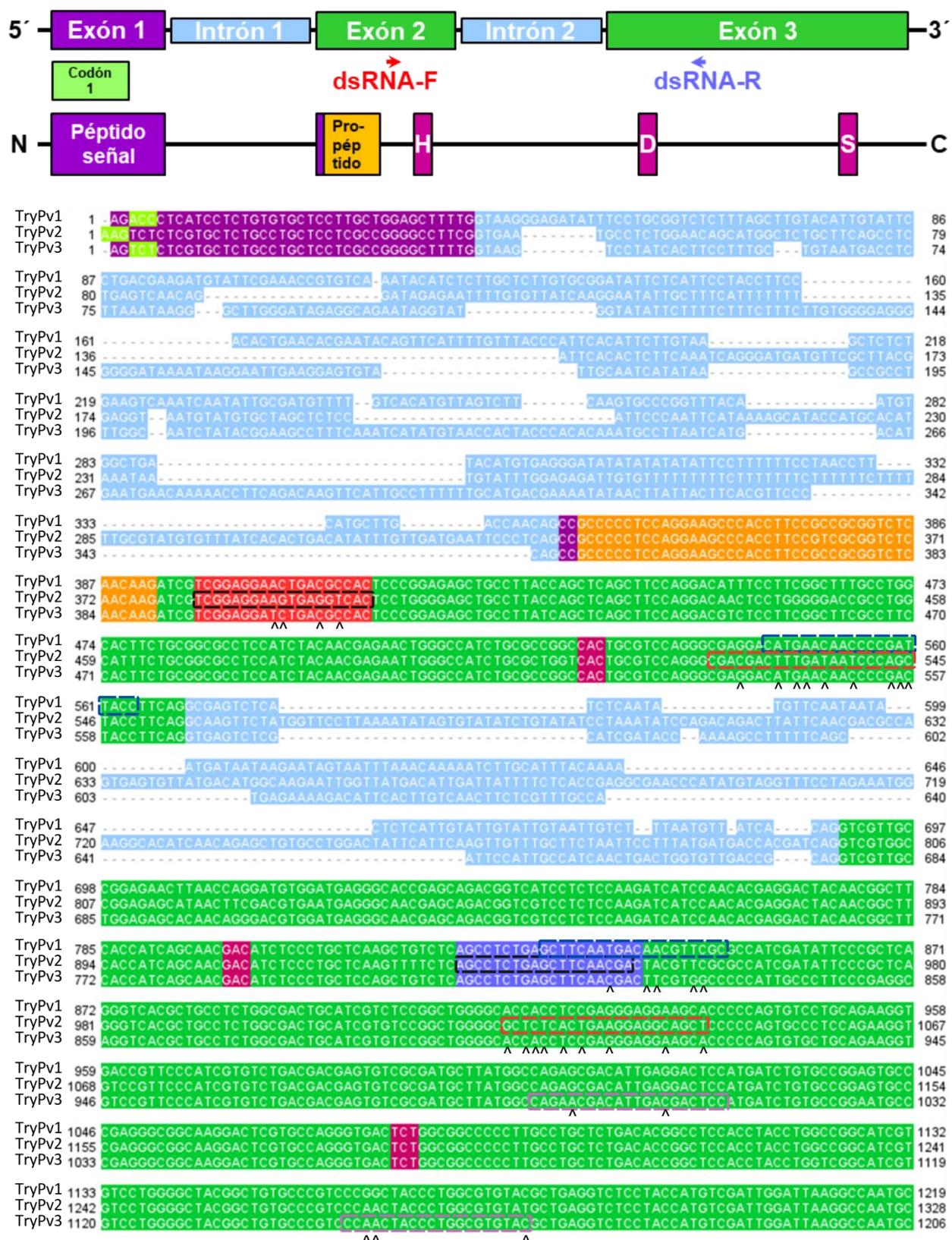


Figura 7. Alineamiento de tres genes de tripsina de *P. vannamei*. Gen 1 (Y15039.1), gen 2 (Y15040.1) y gen 3 (Y15041.1). Cada gen tiene tres exones (exón 1 en púrpura, exones 2-3 en verde) separados por dos intrones (azul cielo). El primer codón (ATG no mostrado) está resaltado

en verde limón. El péptido señal (púrpura) es codificado por todo el exón 1, así como un par de nucleótidos del exón 2. El péptido de activación (naranja) se localiza en el exón 2, en el que también se encuentra parte de la peptidasa madura, incluyendo el codón para la His de la triada catalítica (CAC en magenta). El exón 3 contiene el resto de la peptidasa, abarcando el Asp (GAC en magenta) y la Ser (TCT en magenta) de la triada. Las regiones en las que se diseñaron los oligonucleótidos para el silenciamiento, se indican en rojo (PvTry2-dsRNA-F) y azul oscuro (PvTry2-dsRNA-R), los oligonucleótidos (Tabla 4) están diseñados en base al gen 2 (rectángulos punteados negros), dando un amplicón de 326 pb a partir de cDNA. La secuencia de los oligonucleótidos para qPCR del gen 1, 2 y 3 (Tabla 5) se indican en rectángulos punteados azul marino, rojo y rosa, respectivamente. Los acentos circunflejos indican los nucleótidos en los que difieren las tres tripsinas donde se unen los oligonucleótidos.

El gen 2 Y15040.1 no tiene información asociada por el NCBI a algún gen, transcrito o proteína. El BLASTn dió como mejor resultado (99.8% de identidad y 60% de cobertura) el transcrito XM_027367624.1 asociado al gen 113815565 (Tabla 7 del Anexo B). Sin embargo, el BLASTn del transcrito JQ304272.1 (Hernandez-Cortes *et al.*, 2017) dió como mejor resultado (99.5% de identidad y 96% de cobertura) al transcrito XM_027367616.1, y ambos están relacionados al gen 113815556 (*scaffold* NW_020870094.1). JQ304272.1 da el producto H6WSS5 de 266 aa, mientras que XM_027367616.1 codifica a XP_027223417.1 de 300 aa. El BLASTx de Y15040.1 dió como mejor resultado la proteína XP_027223417.1 (Tabla 8 del Anexo B). XP_027223417.1 es una isoforma más grande de H6WSS5, difiriendo en un único aa en la región en que ambas secuencias se alinean, la G₁₉₆ de H6WSS5 es el D₂₃₀ de XP_027223417.1 (Fig. 15). Todos los productos relacionados al gen 2 codifican tripsinas con el N-terminal IVGGSEVT, que es la secuencia más parecida a la que Sainz *et al.* (2004b) relaciona con la tripsina C (IVGGTEVT), que es la isotripsina que se expresa principalmente en GD (Hernandez-Cortes *et al.*, 2017) y su expresión es influenciada por el alimento (Muhlia-Almazán *et al.*, 2003; Sánchez-Paz *et al.*, 2003).

El gen 3 Y15041.1 está asociado por el NCBI al gen con ID 113823738 (*scaffold* NW_020868573.1) y, de acuerdo con la base de datos, podría sufrir *splicing* o empalme alternativo, originando cinco variantes de transcritos de diferentes longitudes (Tabla 6); no obstante, el tamaño de los productos es el mismo (266 aa). El BLASTx del gen 3 Y15041.1 da la proteína CAA75311.1 ligada al gen 113823738 (aunque el BLASTn da el transcrito XM_027376486.1 asociado a un gen con ID 113823795). Aunque el gen 3 codifica isotripsinas del mismo tamaño, estas comparten del 85.71% al 95.82% de identidad, y sus N-terminal empiezan con IVGGSDAT, IVGGSDVT e IVGGSEVT (Fig. 15

y 16). Las tripsinas que menos identidad de secuencia de aa comparten (85.71%), comparando incluso entre las codificadas por los tres genes, son productos del gen 3, XP_027232258.1 y XP_027232244.1, por ejemplo.

En resumen, en *P. vannamei* se han descrito tres genes de tripsina (Klein *et al.*, 1998). Los genes de tripsina 1 (Y15039.1) y 2 (Y15040.1) son equivalentes a los genes con ID 113815561 y 113815556, respectivamente. El gen 3 (Y15040.1) podría ser el gen 113823738 o 113823795. Como se precisó anteriormente, los resultados de BLASTn (Tabla 7) no coincidieron (en cuanto al ID de los genes) con los de la Tabla 6 para los Genes 2 y 3, indicando la presencia de más de tres genes de tripsina en camarón.

El BLAST de cualquiera de los tres genes (Y15039.1, Y15040.1 y Y15041.1) contra (secuencias altamente similares por defecto) el genoma de referencia de *P. vannamei* (ASM378908v1) permitió identificar dos *scaffolds* (NW_020868573.1 y NW_020870094.1), los cuales contienen 11 genes anotados como *trypsin-1-like*, dos de los cuales corresponderían a pseudogenes (Tabla 9 del Anexo C). Cabe mencionar que, el BLAST de cualquiera de los tres genes de tripsina contra (secuencias altamente similares por defecto) el ensamblaje del genoma de *P. vannamei* a nivel de cromosomas (CIBNOR_Pvan_1v2), indicó que hay tripsinas en los cromosomas 26 (CM075153.1) y 10 (CM075137.1); por cuestiones de comparabilidad y practicidad se continuó trabajando con el genoma ASM378908v1.

De los nueve genes de tripsina putativos, el más largo es el 113823738 (con 20 840 nt que incluyen nueve exones) (Tabla 6 y C1). El alineamiento de Y15041.1 con los tres genes de tripsina del *scaffold* NW_020868573.1, apoya que el gen 3 se relaciona a 113823738, puesto que comparten una identidad del 97.71% con una cobertura del 100% (Tabla 10 del Anexo C). Sin embargo, Y15041.1 sólo es una parte de 113823738, alineándose a su extremo final (3'). Las demás secuencias genómicas de tripsinas se le alinean a 113823738 en distintas regiones (alineamiento no mostrado por ser demasiado largo). Por ejemplo, el gen 113815562 se alinea con los primeros 1 411 nt de 113823738. Por lo que aún queda incertidumbre de si el gen 113823738 corresponde con el gen 3 Y15041.1, además de que Y15041.1 contiene tres exones, mientras que 113823738

tiene nueve. El análisis de las secuencias de aa indica que las nueve tripsinas podrían ser funcionales, pues todas contienen el dominio tripsina, la triada catalítica, el sitio de corte y los sitios de unión del sustrato (Tabla 11 del Anexo C).

Dada la variedad de genes de tripsinas en el genoma de *P. vannamei* se buscó cuáles se expresan en GD, para lo cual se realizó un tBLASTn con la presunta tripsina C (cuya banda de actividad siempre aparece en los zimogramas de GD) H6WSS5 en un transcriptoma de GD (Tinwongger *et al.*, 2019). Se encontró que en la GD se expresaron dos (113815560 y 113815561/Y15039.1) de los nueve genes de tripsina, los cuales codifican las proteínas XP_027223421.1 y XP_027223422.1. La tripsina más expresada en GD fue la que se asocia a la tripsina B (XP_027223422.1). Sin embargo, no se hallaron resultados con la secuencia N-terminal IVGGSEVT/IVGGTEVT de la tripsina C madura (Tabla 12 del Anexo C), tampoco en un transcriptoma de branquias (Zhang *et al.*, 2016) (Tabla 13 del Anexo C).

Por último, se analizaron las tripsinas halladas mediante proteómica en GD de *P. vannamei* por Estrella-Soliz (2002). Dicho estudio encontró la expresión de cuatro tripsinas (A0A3R7ME08, A0A423SXG7, A0A3R7M136 y A0A3R7NWS2). Es oportuno mencionar que entre las cuatro tripsinas no se halló ni la isoforma A ni la B, pero tomando en cuenta los datos de Klein *et al.* (1996) y Sainz *et al.* (2004b), se sugirió que en la GD se expresan al menos seis isotripsinas (Estrella-Soliz, 2022). Para homologar los números de identificación (IDs) de las proteínas dados por los autores (IDs del proteoma UP000283509 en UniProt) con los utilizados en esta investigación (IDs RefSeq), y así saber qué genes de tripsina se expresaron, se realizó un tBLASTn (Tabla 14 del Anexo C). La homologación permitió saber que las seis tripsinas halladas en el proteoma son parte de las que hay en los dos *scaffolds* del genoma analizado (Tabla 11). La tripsina (proteína) que más se expresó (6-32 veces más) en GD es la XP_027232287.1 (= A0A3R7ME08), la cual no está asociada a ninguna de las isotripsinas conocidas (C, B, A). Sin embargo, la tripsina cuya expresión (proteína) aumentó significativamente con la ingesta de alimento (3h postprandial) fue la tripsina A0A3R7M136 (270 aa), que es similar a XP_027223417.1 (300 aa), que corresponde a la isotripsina C (Tabla 6). Si bien los datos de expresión de tripsinas

de diferentes fuentes no son concordantes, es claro que en la GD del camarón se expresan más de tres isotripsinas no reveladas mediante zimografía.

En este estudio, se evaluó el efecto de la disminución de la expresión del gen que codifica la isotripsina C (tripsina-2 Y15040.1) en la expresión de otras cuatro peptidasas digestivas: la tripsina-1 (Y15039.1 codifica para las isoformas A/B), tripsina-3 (Y15041.1), quimotripsina B1 y metalopeptidasa Mpc1.

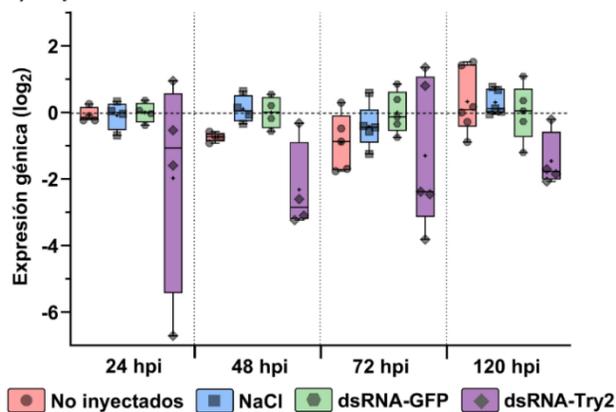
7.2 Bioensayo-1 (corto). Evaluación del efecto de una inyección de dsRNA-Try2 en las peptidasas de la GD

Los grupos o tratamientos evaluados en expresión génica (Fig. 8a-e) fueron cuatro (experimental más tres controles negativos) y en actividad proteolítica (Fig. 8f-h) tres (experimental más dos controles negativos). Los tres grupos control negativo fueron de camarones: sin inyectar, e inyectados con NaCl 0.9% (control de inyección) o dsRNA-GFP (control de dsRNA). El grupo experimental se inyectó con dsRNA-Try2.

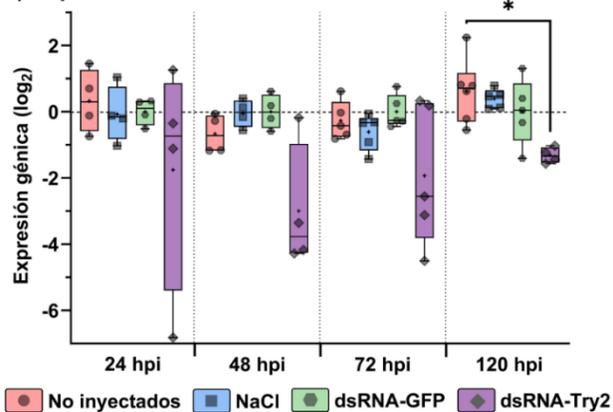
7.2.1 Efecto del dsRNA-Try2 en la expresión relativa de genes de peptidasas en GD (Bioensayo-1)

Los datos de expresión génica de las peptidasas (Fig. 8a-e) mostraron gran variabilidad, principalmente los correspondientes al tratamiento experimental (dsRNA-Try2). Todos los genes evaluados (5) se expresaron en GD bajo condiciones normales (no inyección), y su expresión no cambió significativamente entre ninguno de los tres grupos control.

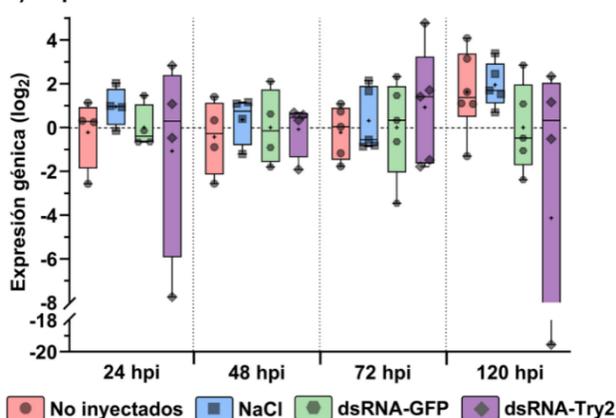
a) Tripsina-1



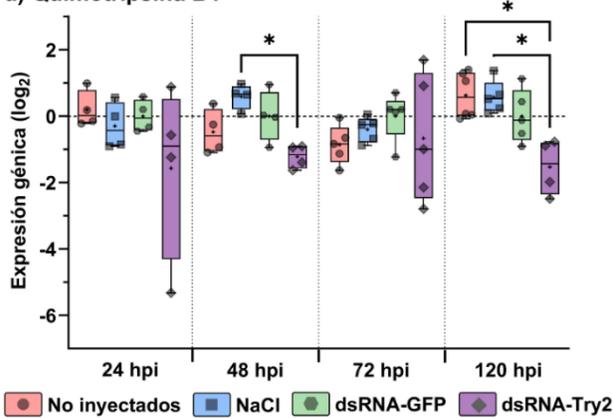
b) Tripsina-2



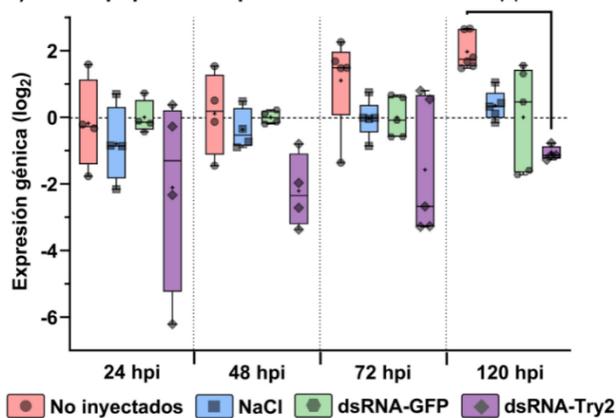
c) Tripsina-3



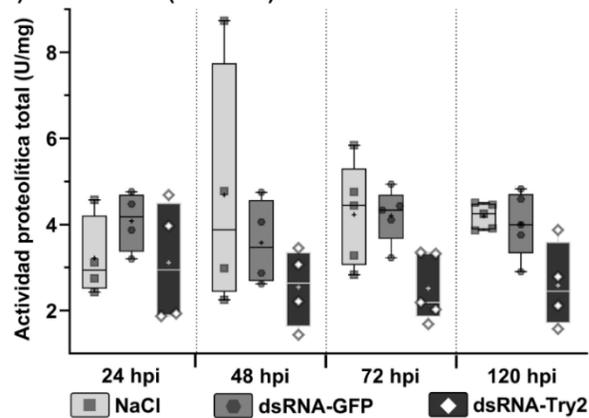
d) Quimotripsina B1



e) Metalopeptidasa Mpc1



f) Azocaseína (sustrato)



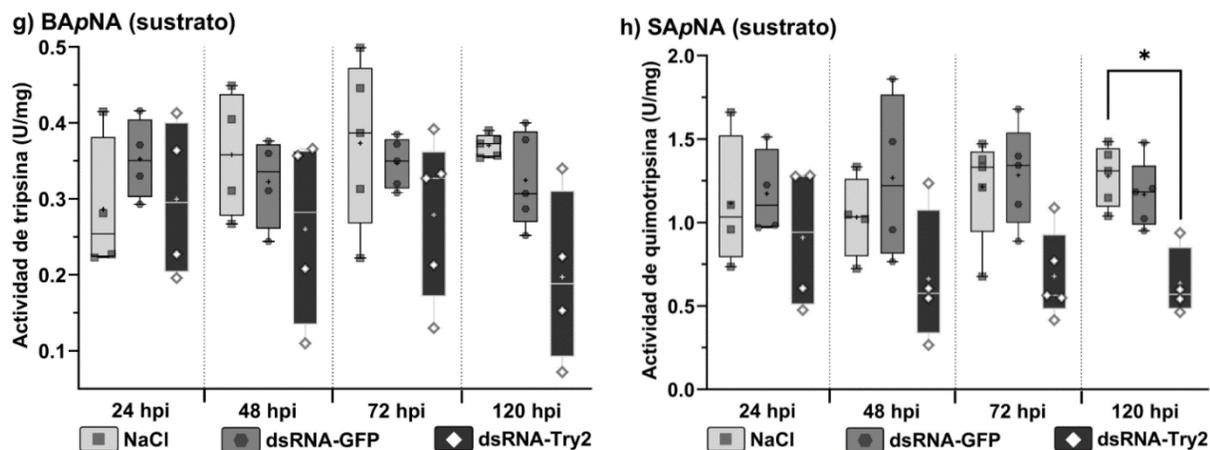


Figura 8. Expresión génica y actividad peptidasa en GD de *P. vannamei* (Bioensayo-1). Expresión relativa de **a)** tripsina 1, **b)** tripsina 2, **c)** tripsina 3, **d)** quimotripsina B1, y **e)** metalopeptidasa Mpc1. Actividad proteolítica **f)** total (sustrato: azocaseína al 0.5%), **g)** específica de la tripsina (sustrato: BApNA 1 mM), y **h)** específica de la quimotripsina (sustrato: SAAPFpNA 0.1 mM). Todas las actividades se midieron a pH 8. Los asteriscos indican la significancia (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) de la diferencia estadística entre tratamientos, determinada mediante la prueba post hoc de comparación múltiple de Dunn ($n = 4-6$).

La expresión de la tripsina-2 (Fig. 8b), blanco específico del dsRNA-Try2, disminuyó, aunque no significativamente, en el grupo experimental (dsRNA-Try2) a partir de las 48 horas post-inyección (hpi). Esta disminución se mantuvo hasta las 120 hpi, tiempo en que resultó estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en comparación con el grupo no inyectado. A pesar de no ser el blanco específico del dsRNA-Try2, el patrón de expresión de la tripsina-1 (Fig. 8a) fue bastante similar al de la tripsina-2, pues se observó una disminución no significativa a las 48 y 120 hpi. La expresión de la tripsina-3 (Fig. 8c) no mostró ningún cambio o tendencia clara; la disminución de su expresión promedio (e incremento en el tamaño de la caja) con el tratamiento experimental a las 120 hpi se debe a un dato posiblemente atípico.

De manera inesperada se observó una disminución de la expresión génica tanto de la quimotripsina B1 (Fig. 8d) como de la metalopeptidasa Mpc1 (Fig. 8e). La expresión de la quimotripsina B1 se redujo significativamente ($p < 0.05$) en el grupo experimental a las 48 (comparando con el grupo NaCl) y 120 hpi (comparando con los no inyectados e inyectados con NaCl). La expresión de la metalopeptidasa Mpc1 (Fig. 8e) presentó el mismo patrón de las serino

peptidasas, disminuyó no significativamente con el dsRNA-Try2 a partir de las 48 hpi y significativamente a las 120 hpi ($p < 0.005$).

7.2.2 Efecto del dsRNA-Try2 en la actividad proteolítica en GD (Bioensayo-1)

La disminución en la expresión génica se reflejó en una disminución de la actividad proteolítica, la cual fue evaluada con un sustrato general para obtener la actividad total (Fig. 8f), y con sustratos específicos para tripsina (Fig. 8g) y quimotripsina (Fig. 8h) para la actividad específica. No se encontraron cambios significativos en la actividad proteolítica total. El dsRNA-Try2 redujo no significativamente la actividad específica de la tripsina a las 72 y 120 hpi, y de la quimotripsina a 72 hpi. La reducción de la actividad de la quimotripsina con dsRNA-Try2 fue significativa a 120 hpi comparando con el grupo de NaCl.

7.2.3 Efecto del dsRNA-Try2 en el perfil de proteínas y peptidasas en GD (Bioensayo-1)

En virtud de que la actividad de la tripsina se redujo a las 120 hpi (5d) del dsRNA-Try2, para evaluar por electroforesis los perfiles de proteínas y peptidasas, se procesaron individualmente sólo las GDs muestreadas en este punto de tiempo del bioensayo-1. El gel de proteínas (Fig. 9a) mostró una disminución en la intensidad de las bandas de proteína de los carriles correspondientes a los especímenes inyectados con dsRNA-Try2 (más obvio para el organismo 2), en comparación con los inyectados con NaCl. Este mismo patrón se encontró para las peptidasas en el zimograma (Fig. 9b) analizando las mismas muestras. Destaca que para todos (cuatro) los organismos tratados con dsRNA-Try2, se redujo la intensidad de la banda correspondiente a la metalopeptidasa Mpc1. En el espécimen 2 (dsRNA-Try2) las bandas de actividad correspondientes a las tripsinas A y B estuvieron claramente ausentes, y la intensidad de la correspondiente a la tripsina C disminuyó.

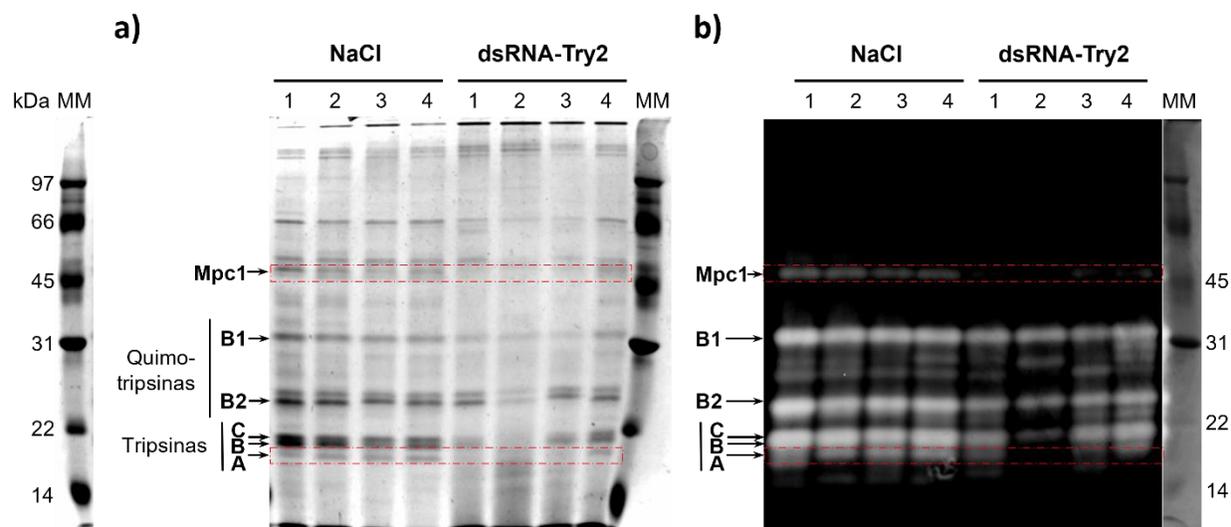


Figura 9. Perfil de proteínas y peptidasas con una inyección de tratamiento en GD de *P. vannamei* (Bioensayo-1) a) Perfil de proteínas de GD de cuatro especímenes de *P. vannamei* inyectados con NaCl (carriles NaCl 1-4) o dsRNA-Try2 (carriles dsRNA-Try2 1-4) b) Zimograma con las mismas muestras que a) con caseína al 3% pH 8 como sustrato. Se cargaron 5 ug de proteína por carril en ambos geles (poliacrilamida al 12%). MM: Marcador de peso Molecular.

7.3 Bioensayo-2 (largo). Evaluación del efecto de una a tres inyecciones de dsRNA-Try2 en las peptidasas de la GD

Dado que con el bioensayo-1 la actividad de la tripsina se redujo a las 120 hpi (5d), se realizó un segundo bioensayo (Fig. 6) con muestreos a los 5 días post-inyección (dpi) de tratamiento. El bioensayo-2 consistió en hasta tres inyecciones de tratamiento (días 0, 6 y 12) y tres muestreos (días 5, 11 y 17). El peso inicial de los especímenes fue de 5.5 ± 1.5 g. El peso promedio de los camarones de los tres tratamientos aumentó a los 5 dpi (una inyección) y 11 dpi (dos inyecciones). El aumento a los 5 dpi fue mayor en los controles (Tabla 15 del Anexo F), los especímenes inyectados con NaCl o dsRNA-GFP subieron 1.6 y 1.1 g, respectivamente, mientras que los inyectados con dsRNA-Try2 aumentaron 0.6 g. A los 17 dpi (tres inyecciones) los pesos promedio no aumentaron, y en el caso de los inyectados con dsRNA (GFP o Try2) incluso disminuyeron (-1.2 g).

7.3.1 Efecto del dsRNA-Try2 en la actividad proteolítica en GD (Bioensayo-2)

En general, en el bioensayo-2 (Fig. 10) se replicaron los resultados observados con el bioensayo-1 (Fig. 8): el tiempo de respuesta (5 dpi) e incluso el efecto del dsRNA-Try2 sobre la actividad

específica de la quimotripsina (la cual no es blanco del dsRNA-Try2). La actividad total (Fig. 10a) y la específica de tripsina (Fig. 10b) se redujeron significativamente a los 5 dpi tanto con el tratamiento dsRNA-Try2 ($p < 0.001$) como dsRNA-GFP ($p < 0.01$). La actividad específica de quimotripsina (Fig. 10c) mostró la misma tendencia mas no fue significativo. No obstante, con dos inyecciones (dosis) de tratamiento espaciadas, no se observaron cambios significativos ni tendencia evidente (Fig. 10).

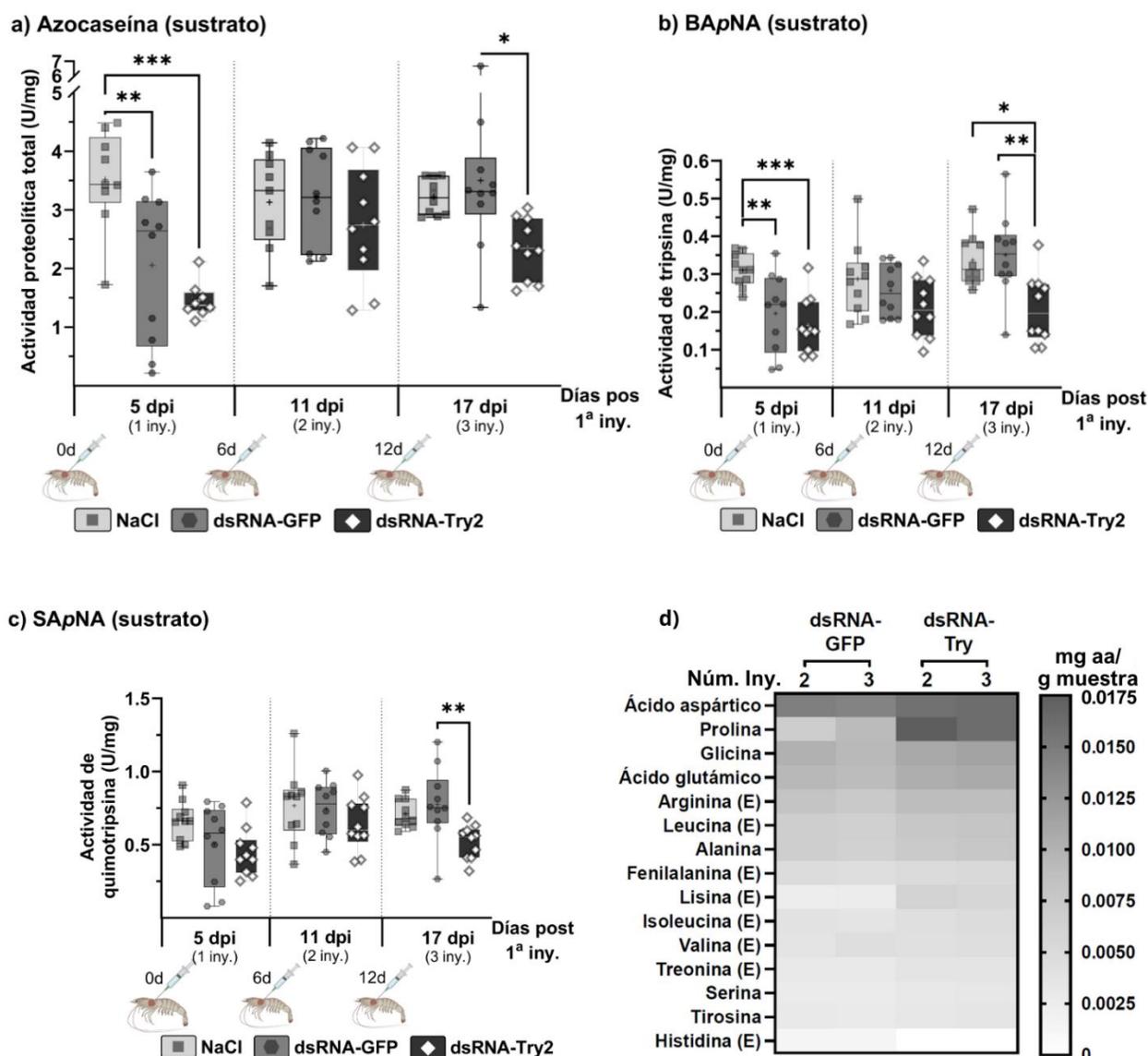


Figura 10. Actividad peptidasa en GD y perfil de aminoácidos en músculo, con más de una inyección de tratamiento en *P. vannamei* (Bioensayo-2). a) Actividad total. Sustrato: azocaseína al 0.5%. b) Actividad específica de la tripsina. Sustrato: BApNA 1 mM. c) Actividad específica de la quimotripsina. Sustrato: SApNA 0.1 mM. d) Perfil de aminoácidos en músculo (pool de 10 especímenes). Todas las actividades se midieron a pH 8. Se presenta la actividad 5 días (d) después

de una, dos y tres inyecciones de tratamiento (una dosis por inyección). Cada muestreo (días 5, 11 y 17) se espació 1 día de la siguiente inyección (días 6 y 12). Los asteriscos indican la significancia (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) de la diferencia estadística entre tratamientos, determinada mediante la prueba post hoc de comparación múltiple de Tukey ($n = 8-10$).

Con tres inyecciones espaciadas, el dsRNA-Try2 redujo significativamente la actividad total ($p < 0.05$) y específica de tripsina ($p < 0.01$) y quimotripsina ($p < 0.01$), respecto al tratamiento con dsRNA-GFP. La disminución de la actividad de la tripsina también fue significativa ($p < 0.05$) respecto al tratamiento con NaCl. Cabe destacar que con tres dosis las actividades del grupo tratado con dsRNA-GFP no disminuyeron con respecto al grupo inyectado con NaCl, por lo que los efectos observados en el grupo dsRNA-Try2 se deben a la disminución de la expresión (“silenciamiento”) de la tripsina-2.

7.3.2 Perfil de aminoácidos de músculo (Bioensayo-2)

El perfil de aa de músculo se cuantificó en especímenes con dos o tres inyecciones en GD de dsRNA-GFP o dsRNA-Try2. Los perfiles de aa de los controles y experimentales fueron ligeramente diferentes, a excepción de prolina (Pro), lisina (Lys) e histidina (His) (Fig. 10d, Tablas 16 y 17 del Anexo G).

En especímenes controles (dsRNA-GFP), el aa más abundante fue el ácido aspártico (Asp) tanto con dos como con tres inyecciones (14.75 ± 0.12 y 14.35 ± 0.33 mg aa/g muestra, respectivamente), y el menos abundante fue la His (1.37 ± 0.03 mg aa/g muestra independientemente del número de inyecciones). Con el dsRNA-Try2, independientemente del número de inyecciones del tratamiento, el aa más abundante fue la Pro (seguida del Asp) y, al contrario, la His disminuyó a una concentración no cuantificable. En estos últimos organismos, la concentración de todos los aa (excepto la His) cuantificados tendió a aumentar no significativamente. Los aa que más aumentaron fueron Pro (1.75-2.5 veces) y Lys (2.2 veces).

7.3.3 Efecto del dsRNA-Try2 en el perfil de proteínas y peptidasas en GD (Bioensayo-2)

Al igual que en el bioensayo-1, en general, la intensidad de las bandas de proteína de los carriles correspondientes a los organismos experimentales (dsRNA-Try2 1-3 en Fig. 11a) fue menor

respecto a los controles. Las bandas de las tripsinas C y B del espécimen 1 de dsRNA-Try2 fueron notablemente menos intensas. Asimismo, las bandas de actividad de las tripsinas C, B y A disminuyeron en intensidad, aunque permanecieron distinguibles (Fig. 11b). Las diferencias más notables entre tratamientos se encontraron en la banda de actividad de la proteína ligeramente más pesada que la tripsina C (posible cuarta tripsina de acuerdo con estudios anteriores), así como en la correspondiente a la Mpc1, pues el dsRNA-Try2 disminuyó su intensidad. Estos resultados se relacionan con la menor actividad proteolítica total y específica (de tripsina y quimotripsina) que presentaron estos mismos especímenes respecto a los controles (Fig. 11c). Cabe resaltar que en cada carril de los geles de proteína y zimograma se cargó exactamente la misma cantidad de proteína; cuando los volúmenes de carga fueron calculados de acuerdo con unidades de actividad, se observaron los mismos resultados (Fig. 20 del Anexo H).

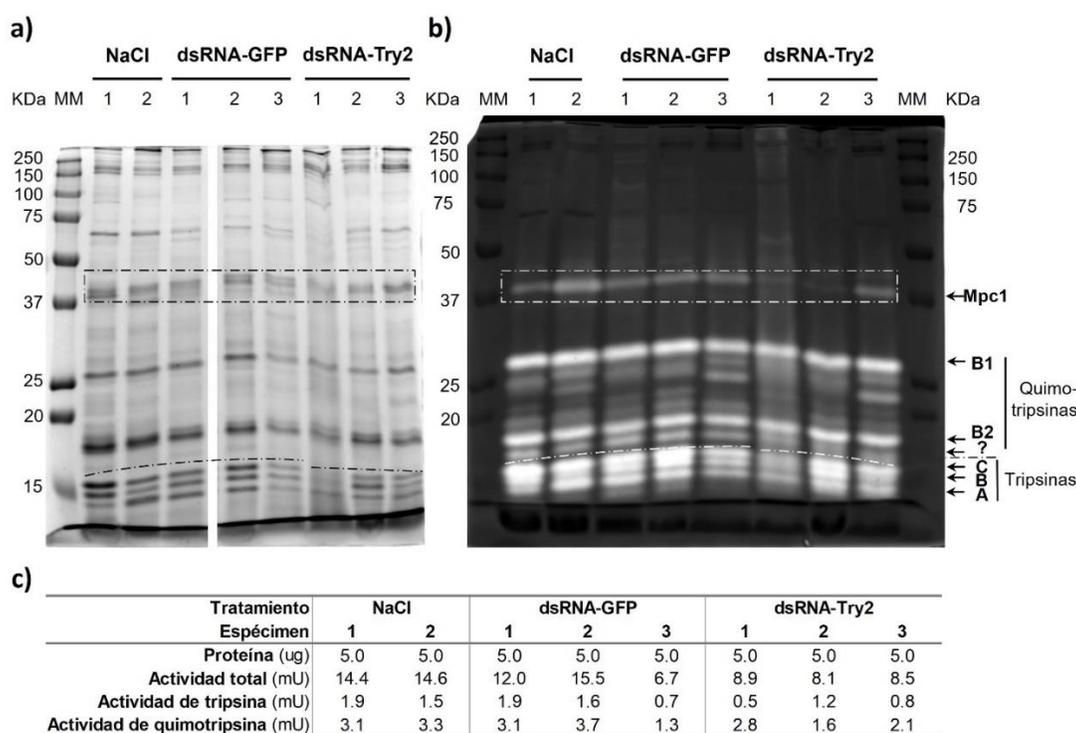


Figura 11. Perfil de proteínas y peptidasas con tres inyecciones de tratamiento en GD de *P. vannamei* (Bioensayo-2) a) Perfil de proteínas de GD de ocho especímenes de *P. vannamei* inyectados con NaCl (carriles NaCl 1-2), dsRNA-GFP (carriles dsRNA-GFP 1-3) o dsRNA-Try2 (carriles dsRNA-Try2 1-3). b) Zimograma con las mismas muestras que a) usando caseína al 3% pH 8 como sustrato. Se cargaron 5 ug de proteína por carril en ambos geles (poliacrilamida al 12%.) MM: Marcador de peso Molecular. c) Tabla de las actividades proteolíticas en cada espécimen (carril) del zimograma b), de acuerdo con la cantidad de proteína cargada y las actividades previamente cuantificadas (Fig. 10a-c).

7.3.4 Efecto del dsRNA-Try2 en la histomorfología de la GD (Bioensayo-2)

Las imágenes histológicas de GD con dos (M2) o tres (M3) inyecciones de los tratamientos controles (NaCl o dsRNA-GFP), o con tres inyecciones (M3) del tratamiento experimental (dsRNA-Try2) mostraron la citomorfología característica de la GD de camarón. En la Fig. 12 se presentan las imágenes representativas de cada muestreo y tratamiento. El corte transversal permite ver el lumen radial o en cruz de los túbulos de la GD, y distinguir el típico epitelio formado por células sin vacuolas o con vacuolas (células B). Cabe resaltar que una de las tres GDs tratadas con dos inyecciones (M2) de dsRNA-Try2 presentó un epitelio totalmente aplanado, de manera que el diámetro del lumen y de los túbulos enteros, es significativamente mayor.

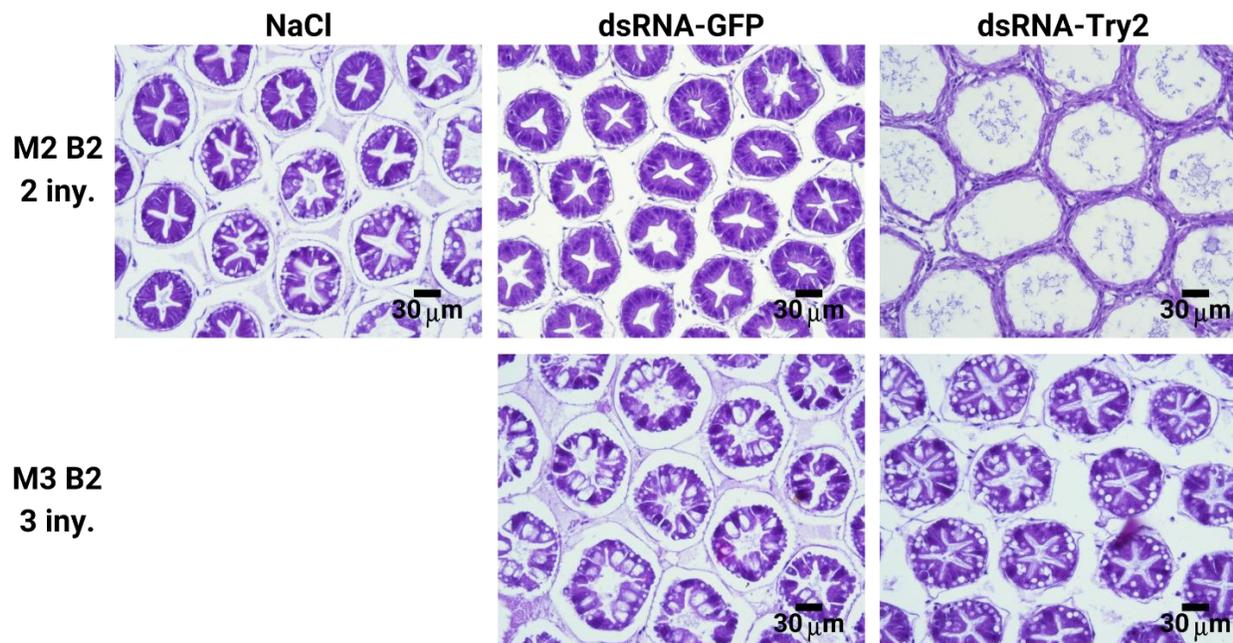


Figura 12. Histomorfología de la glándula digestiva de *P. vannamei* (Bioensayo-2). Imágenes representativas de la morfología de los túbulos de la GD (corte transversal) de *P. vannamei*. Tinción H&E.

8. DISCUSIÓN

8.1 Tripsinas de la GD de *P. vannamei*

Las evidencias presentadas por este y otros estudios sobre la caracterización de los genes, transcritos y proteínas de tripsinas en *Penaeus vannamei*, han revelado que éstas representan una gran proporción de las serino peptidasas. Su diversidad refleja una compleja red de mecanismos moleculares que subyacen al proceso digestivo, así como a su respuesta adaptativa a diversas condiciones ambientales.

P. vannamei tiene tres genes de tripsina descritos, los genes 1 y 2 se expresan en la GD, mientras que el gen 3 (mosaico de los genes 1 y 2) no. Klein *et al.* (1998) no detectaron expresión del gen 3, pero hipotetizaron que pudo deberse a su baja expresión o a que sólo lo hace bajo ciertas condiciones. De acuerdo con el análisis bioinformático realizado en este trabajo, los genes 1 y 2 son los que comparten un mayor porcentaje de identidad (94%) entre sí (Fig. 14 del Anexo B), y se hallan en un mismo *scaffold* (NW_020870094.1) del genoma de referencia ASM378908v1. Por otro lado, el gen 3 se ubica en un *scaffold* (NW_020868573.1) diferente. Adicionalmente, en ambos *scaffolds* hay otros genes anotados como *trypsin-1-like* que no han sido caracterizados (Tabla 9 del Anexo C). Esta organización de genes de tripsina en *clusters* dentro de los genomas, ha sido evidenciada previamente en copépodos (Kvamme *et al.*, 2005) e insectos (Wang *et al.*, 1999, 2020; Borges-Veloso *et al.*, 2015).

Si bien, la expresión de estos *clusters* de tripsinas no se ha evaluado, sí se ha observado la coexpresión de genes (diferentes de tripsina) agrupados en *clusters* (Mijalski *et al.*, 2005). De acuerdo con los análisis realizados en esta investigación, la organización genética (Tabla 9) y los niveles de expresión basal de los genes 1 y 2 de tripsina (Fig. 18 del Anexo D) son similares entre sí, lo que indica que posiblemente su expresión se encuentra sujeta un mismo mecanismo de regulación por estar en el mismo *cluster*. La expresión de estos dos genes de tripsina podría suceder de manera diferencial a los localizados en otros *clusters*, como el gen 3, cuya expresión es significativamente menor (Fig. 18). Es de notar que, a diferencia de Klein *et al.* (1998) este estudio sí encontró expresión del gen 3 de tripsina en GD.

A nivel proteínica, es ampliamente aceptado que el camarón blanco del Pacífico expresa tres isotripsinas en la GD. Sin embargo, la dificultad para discernir qué gen codifica qué isotripsina es un reflejo del alto porcentaje de identidad que comparten las tripsinas, aunado al gran polimorfismo y variabilidad, puesto que diferentes estudios reportan secuencias similares, mas no idénticas, a las reportadas por otros autores, tanto a nivel de ácidos nucleicos como de proteínas (Tabla 6). Por ejemplo, Klein *et al.* (1998) originalmente mencionaron al menos 14 genes diferentes en *P. vannamei*, los cuales agruparon en tres familias; Wei *et al.* (2014) encontraron 29 transcritos codificantes de tripsinas; y, Estrella-Soliz (2022) y colaboradores identificaron mediante proteómica, 3 isoformas con secuencia diferente a las 3 reconocidas actualmente (C, B y A), es decir, 6 en total. El repertorio de tripsinas digestivas podría ser más diverso, sin embargo, una caracterización detallada permanece aún pendiente. Klein *et al.* (1996) informaron la presencia de tres tripsinas principales en la GD, pero también precisaron que existían al menos tres isoformas adicionales, que consideraron secundarias al presentar menor actividad. Esta particularidad es observable en los zimogramas de las Fig. 9b y 11b, en donde se observan varias bandas de actividad alrededor de los 25 kDa. Como se mencionó, la evaluación proteómica sugiere que en la GD del camarón blanco del Pacífico se expresan al menos seis isotripsinas (Estrella-Soliz, 2022).

La presencia de múltiples genes y transcritos de tripsina puede reflejar uno o varios eventos de duplicación génica, esta multiplicidad representó un desafío para este trabajo de caracterización funcional de tripsinas, pues, al día de hoy, no hay un análisis formal de la asociación entre los genes de tripsina y productos (RNAs y proteínas), a excepción del realizado por Sainz *et al.* (2004b), dando como resultado incertidumbre a diferentes niveles, como se describe en los siguientes párrafos.

Es de notar que las isotripsinas son resueltas (distinguibles una de otra) en las zimografías (en condiciones no reductoras) aún cuando generalmente están conformadas por la misma cantidad de aa (266 aa). Las diferencias en peso molecular podrían deberse a cambios postraduccionales como la glicosilación, pues hay indicios de que las isotripsinas son glicoproteínas, aunque se desconocen las diferencias en tipo/cantidad de glicosilación (Sainz *et al.*, 2004b). Otra causa de

las diferencias en pesos moleculares podría ser la expresión de tripsinas de distintos tamaños. Por ejemplo, la revisión bioinformática realizada apunta que los productos de los genes (Tabla 6) de las tripsinas A0A3R7M136 y XP_027223417.1 (asociadas al gen 2) están conformadas por 270 y 300 aa, respectivamente. Dado el peso molecular, cabe la posibilidad de que A0A3R7M136 o XP_027223417.1 sea una cuarta isotripsina, cuya banda de actividad se revela con ligeramente mayor peso molecular que la correspondiente a la tripsina C, reportada por Hernández-Cortes *et al.* (2017).

Según la secuencia N-terminal, el transcrito X86369.1 codificaría la isotripsina A y JQ304272.1 (similar a XM_027367616.1) para la isotripsina C. De ser verdadero, los genes de tripsina se expresarían diferencialmente en los distintos tejidos del camarón. El gen 1 (Y15039.1= isotripsinas A/B) se expresaría principalmente en hemocitos, en tanto que el gen 2 (Y15040.1= isotripsina C) se expresaría mayoritariamente en GD. En tanto que el gen 3 (Y15041.1) no se expresaría en GD de acuerdo con Klein *et al.* (1998), aunque según resultados de esta tesis sí ocurre (Fig. 18 del Anexo D). No obstante, esta información proviene de estudios que llevaron a cabo una evaluación técnicamente diferente. Por lo que sería de interés determinar la expresión de diferentes variantes/isoformas de tripsinas en los diferentes tejidos del camarón, lo que (hasta donde se tiene conocimiento) no se ha reportado (ni la expresión génica, ni las bandas de actividad de las isotripsinas en los distintos tejidos del camarón).

Con la recopilación de la información de las tripsinas es fácil advertir que la secuencia del N-terminal de las tripsinas maduras no puede ser utilizado como un clasificador confiable para la correlación cDNA-isoforma, pues algunos son idénticos o varían en tan sólo un aminoácido (Tabla 6). Ejemplos son IVGGSEVT que comparten la tripsina A del Gen 2 (XP_027223417.1) y otra tripsina no clasificada del Gen 3 (XP_027232231.1), igualmente la IVGGTDAT (tripsina A o WVH45071.1) y IVGGSDAT (tripsina-3 O62562).

8.2 Efecto del dsRNA-Try2 en la expresión relativa de genes de peptidasas en GD

En decápodos, el silenciamiento génico mediado por dsRNA es considerado una técnica estándar en investigación (Sagi *et al.*, 2013). Existen varios estudios en donde se utiliza RNAi exógeno para

mediar la expresión genética en *P. vannamei*, principalmente como un método terapéutico contra infecciones virales (Assavalapsakul *et al.*, 2009; Riet *et al.*, 2021). Aunque en los últimos años las investigaciones sobre la función genética a través de esta técnica han ido en aumento (Lee *et al.*, 2015). Las inyecciones directas de dsRNA en el hemocele o en el músculo son los métodos más comunes para administrar dsRNA en camarones (Yang *et al.*, 2014b; Sutthangkul *et al.*, 2015), pues el dsRNA puede circular sistémicamente en la hemolinfa a través del sistema circulatorio abierto, donde el dsRNA puede ser incorporado por células en diferentes tejidos. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte en camarones peneidos en donde se prueba la administración directa del dsRNA en la GD, sitio de síntesis de las peptidasas y donde el silenciamiento mediado por dsRNA es iniciado por endocitosis (Maruekawong *et al.*, 2019). Nuestra aproximación técnica se puede considerar como novedosa por su eficiencia, pues encontramos que el dsRNA induce el silenciamiento desde las 24 hpi y el efecto se mantiene hasta las 120 hpi (Fig. 8a-e). Pero, sobre todo, el silenciamiento es también detectable a nivel de proteínas, en este caso, disminución de las actividades proteolíticas (Fig. 8f-h).

La presencia de cierto tipo lipoproteínas afines al dsRNA en el suero contribuyen a la efectividad del silenciamiento mediado por dsRNA. En algunas especies de decápodos de la familia Paniluridae, el silenciamiento génico no funciona exitosamente debido a la ausencia de dichas lipoproteínas, de acuerdo con los resultados de Banks *et al.* (2020). Es pertinente resaltar que en el mismo estudio se reporta para una especie de camarón peneido, evidencia modesta pero presente de dicho mecanismo (Banks *et al.*, 2020). Esta ambigüedad puede contribuir a la gran variabilidad en la expresión observada en este trabajo para los organismos tratados con dsRNA-Try2 (Fig. 8a-e).

El material utilizado para silenciar la tripsina fue dsRNA diseñado en base al gen 2 de las tripsinas (dsRNA-Try2). Los datos de expresión muestran que efectivamente la tripsina 2 fue silenciada (Fig. 8b). No obstante, el dsRNA-Try2 no sólo silenció a la tripsina 2, sino que también a la tripsina 1 (Fig. 8a). Esto se puede explicar dada a alta homología que comparten ambos genes, con 94% de identidad (Fig. 14). Este resultado es esperado de acuerdo con el mecanismo de silenciamiento mediado por dsRNA, pues dado el tamaño de las moléculas que reconocen por

complementariedad al RNAm a silenciar, el RNAi puede interferir también a genes no blanco con alta homología. Es relevante destacar que este efecto puede producirse también para otras tripsinas u proteínas homólogas a tripsinas, pero no fue detectado dada la técnica dirigida (qPCR) utilizada para evaluar la expresión genética en este trabajo.

Sin embargo, contrario a lo esperado, el silenciamiento de las tripsinas resultó también en una disminución en la expresión de otras peptidasas digestivas evaluadas, la quimotripsina B1 y la metalopeptidasa Mpc1 (Fig. 8d-e). Esto puede deberse a un desbalance genético provocado por la perturbación en la expresión de un gen. Este fenómeno se ha reportado en otros estudios enfocados en enzimas digestivas en donde se utilizan técnicas de genética inversa, como RNAi o CRISPR-Cas. Por ejemplo, en el mosquito *Aedes aegypti* la expresión de enzimas digestivas se afectó cuando se silenció mediante RNAi a una Serino Hidroximetil Transferasa (SHMT). Por esto, a la SHMT se le atribuye un papel regulatorio de enzimas digestivas a nivel transcripcional. La función de la SHMT es la formación de desoxitimidina trifostato (dTTP) durante la síntesis de DNA, por lo tanto, la interferencia con esta función puede estar asociada con la síntesis de enzimas digestivas pero también de otras proteínas (Li *et al.*, 2019).

En la oruga del tabaco (*Helicoverpa armigera*), una especie modelo en estudio de enzimas digestivas, se ha descrito una gran capacidad de compensar la pérdida de función de genes de enzimas digestivas, atribuida al vigor genético, considerado como una adaptación para contrarrestar los inhibidores de enzimas presentes en el alimento. Por ejemplo, el silenciamiento por dsRNA de una tripsina modifica la expresión de otros genes no blanco, observando disminución en la expresión (aunque no significativa) de otros genes de tripsina, pero también sobreexpresión de tripsinas homólogas (Sharath Chandra *et al.*, 2018). En otro estudio de la misma especie, la delección de un *cluster* de 18 genes de tripsina causó la sobre-expresión de 35 serino peptidasas (entre ellas 11 tripsinas y 11 quimotripsinas) y la disminución en la expresión de 12 serino peptidasas (incluyendo 3 tripsinas, 2 quimotripsinas), en GD. La delección también afectó la expresión de aminopeptidasas, carboxipeptidasas y cisteíno peptidasas (Wang *et al.*, 2020), estos resultados sustentan la teoría de compensación ante la pérdida de función a nivel digestivo.

Aunque en *P. vannamei* se ha descrito un aumento en la transcripción de enzimas digestivas ante la presencia de inhibidores de proteasas en el alimento (Rojo-Arreola *et al.*, 2019a), la respuesta compensatoria no es observable en un plazo de 17 días (Fig. 10a-c) ante el silenciamiento de transcritos de enzimas digestivas, lo que podría indicar que el camarón blanco carece de la maquinaria transcripcional para compensar la degradación de transcritos de enzimas digestivas clave, como las tripsinas. Dados los resultados observados, podemos suponer que, en *P. vannamei* el silenciamiento de tripsinas digestivas mediado por dsRNA provocó un desbalance genético generalizado, aunque el mecanismo permanece desconocido.

8.3 Efecto del dsRNA-Try2 en la actividad proteolítica y en el perfil de peptidasas de la GD

Para que se cumpla la premisa de la caracterización de función, el efecto silenciamiento génico mediado por dsRNA deber ser idealmente detectado a nivel de proteína, pues sólo así se comprueba la pérdida de función (Mocellin y Provenzano, 2004). Cómo se observa en las figuras 8g y 10b, el dsRNA-Try2 provocó una disminución en la actividad específica de tripsina, este resultado es reiterativo en ambos bioensayos realizados, aunque en el primero no significativamente. El efecto es detectado tanto en los ensayos en tubo (Fig. 10b) como en los zimogramas (Fig. 9b y 11b).

Aunque las tres bandas de actividad correspondientes a las tripsinas no están claramente separadas en el zimograma de la Fig. 9b, se logra distinguir que las bandas de las tripsinas A y B disminuyen en intensidad en los organismos experimentales, e incluso desaparece en el espécimen 2 (dsRNA-Try2), lo que sugeriría que ambas isotripsinas son codificadas por el gen 2 de tripsina. Sin embargo, debido al gran porcentaje de identidad entre los genes de tripsina, el silenciamiento pudo haber sido inespecífico puesto que el dsRNA-Try2 disminuyó la expresión del gen 1, que codifica la tripsina A/B (Fig. 10b). Cabe recordar que aún no se conoce la correlación entre los genes e isoformas de tripsina, cuya migración electroforética podría ser afectada por modificaciones postraduccionales como la glicosilación (Sainz *et al.*, 2004b). También es importante tomar en cuenta que, como se mencionó en líneas anteriores, existen más de tres tripsinas expresadas en la GD de *P. vannamei*, por lo que es posible que alguna(s) tripsina(s) no

cuantificadas haya(n) cambiado de expresión, pero al carecer de estos datos, no es posible saber si otras tripsinas efectuaron compensación.

El tratamiento con dsRNA-Try2 también resultó en la disminución de la expresión de la quimotripsina B1, que se reflejó en una menor actividad específica (Fig. 8h y 10c), aunque no fue tan evidente en las bandas de actividad correspondientes a la quimotripsina B1 en los zimogramas (Fig. 9b y 11b). Por otro lado, la disminución de la expresión de la metalopeptidasa Mpc1 fue notable tanto en los datos de expresión relativa (Fig. 8e) como en los zimogramas (Fig. 9b y 11b). Estos resultados fueron contrarios a lo esperado y no sustentan la hipótesis de compensación planteada basada en investigaciones previas, que sugieren que los especímenes de *P. vannamei* compensan la disminución de actividad de las tripsinas digestivas, cuando se exponen mediante el alimento al inhibidor de tripsina de la soya, con un aumento en la actividad de metalopeptidasa en GD (Maytorena-Verdugo *et al.*, 2017a; b). El fenómeno de compensación ha sido descrito a detalle en otros artrópodos y comprobado a nivel de genes y proteínas. Por ejemplo, la delección de un *cluster* de 18 tripsinas en *H. armigera*, no redujo la actividad proteolítica total, ni las actividades específicas de la tripsina y quimotripsina, sugiriendo una compensación efectuada por formas alternativas de tripsinas/quimotripsinas (Wang *et al.*, 2020).

Sin embargo, la compensación a la pérdida de función de enzimas digestivas no es un fenómeno común de los artrópodos, y podría ser la excepción, no la generalidad. La afectación de la actividad de quimotripsina provocada por RNAi de tripsina ha sido reportada en la polilla *Grapholita molesta*, aunque los autores sólo evaluaron a nivel de proteína y no de transcritos, esto afectó el peso corporal y la velocidad de desarrollo de los individuos tratados (Lv *et al.*, 2024). Podemos concluir que la pérdida de función a nivel de transcritos es una afectación profunda del estado fisiológico de *P. vannamei* que repercute en la actividad enzimática digestiva, una afectación tan aguda que no es posible compensar.

8.4 Efecto del dsRNA-Try2 en el perfil de aminoácidos de músculo

Los aa representan una fuente de energía (a través de la gluconeogénesis) importante para el camarón, y se utilizan más eficientemente que la glucosa de la dieta (Cuzon *et al.*, 2019; Li *et al.*,

2021). Cada aa participa en diferentes vías catabólicas, pero todos pueden entrar al ciclo de Krebs; por ejemplo, Pro, His, Arg, Glu y Gln son transformados en α -cetoglutarato. Por ello, la composición de aa y la digestibilidad de la proteína han sido ampliamente investigadas y consideradas para la elaboración del alimento del camarón. Por ejemplo, se sabe que la lisina es el aminoácido esencial (aaE) limitante en el alimento, relativo a los requerimientos metabólicos del camarón (McLean *et al.*, 2024), y si uno de los aaE es deficiente limita la utilización de todos los demás aa para la síntesis de proteínas (Li *et al.*, 2021).

Una de las referencias del estado nutricional del camarón es la composición de aa del músculo de la cola, misma que se utiliza para la formulación de dietas en la acuicultura (Cuzon *et al.*, 2004). Para conocer el efecto de la disminución de la expresión de la tripsina, en el presente estudio se cuantificaron 15 aa totales (aa libres más los aa que forman parte de las proteínas) en músculo de camarón, de los cuales ocho son aa esenciales (aaE) y siete son aa no esenciales (aaNE). Las abundancias de los aa obtenidas en este estudio concuerdan con las previamente reportadas en otros trabajos (Cuzon *et al.*, 2004; McLean *et al.*, 2024), la Arg fue el aaE más abundante e His fue de los menos abundantes (Trp seguido de His son de los menos abundantes). Las peptidasas sintetizadas en la GD descomponen las proteínas del alimento en oligopéptidos o aa libres que son liberados en la hemolinfa (Guo *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Vogt, 2021). Los aa libres alcanzan los demás tejidos (a través del sistema circulatorio abierto del camarón) en cuestión de minutos. En *P. vannamei*, los aa totales alcanzan niveles máximos en la hemolinfa después de 30 min de la ingesta de alimento y disminuyen a los 60 min (Guo *et al.*, 2020). Y la fenilalanina tritiada ($[^3\text{H}]\text{Phe}$) liberada en la hemolinfa del primer par de pleópodos se detecta en el músculo de la cola a los 10 min post-inyección (p.i.), tiempo en que también ha empezado a incorporarse a las proteínas recién sintetizadas del músculo (Mente *et al.*, 2002).

En este contexto, dado que la administración de tres dosis espaciadas de dsRNA-Try2 disminuyó las actividades proteolíticas total y específica (de tripsina y quimotripsina) en la GD (Fig. 10a-c), se hubiera esperado que los aa totales (aa libres más los aa que forman parte de las proteínas) fueran menos abundantes en el músculo de los especímenes experimentales, respecto de los controles (dsRNA-GFP). Por ejemplo, se sabe que una dieta baja en proteínas se correlaciona con

una menor abundancia de aa totales en músculo (Cuzon *et al.*, 2004). Contrario a lo esperado (principalmente para los aaE), tanto con dos como con tres inyecciones de dsRNA-Try2, la abundancia de los aa totales cuantificados incrementó no significativamente (a excepción del aaE His, que disminuyó a una concentración no cuantificable). La Lys (aaE) aumentó 2.2 veces y la Pro (aaNE) 1.75-2.5 veces (Fig. 10d, Tablas G1 y G2).

Hay que recordar que los niveles de aa totales en los tejidos dependen de la dieta, la absorción, los niveles de proteína y de aa libres, así como de su síntesis y degradación (Mente *et al.*, 2002). Dado que los aaE se consideran indispensables, porque el organismo no los puede sintetizar *de novo*, el aumento de su abundancia en los especímenes tratados con dsRNA-Try2 no se explica por una mayor síntesis. En cambio, el aumento de los aa totales pudo deberse a una mejor absorción de los aa de la dieta y/o una movilización de los aa de otros tejidos hacia el músculo, como parte de un proceso compensatorio y una estrategia para obtener energía en condiciones estresantes. En pulpo, por ejemplo, se observó un aumento en ciertos aaE (entre ellos la Lys) y aaNE (como Pro) en músculo con la privación de alimento (George-Zamora *et al.*, 2011). Aunque, tampoco se puede descartar un efecto del dsRNA-Try2 en tejidos diferentes a la GD, como el músculo.

Es importante mencionar que la Pro y Lys son aa clave en la estructura del colágeno, y éste junto con la acto-miosina determinan la textura del músculo del camarón (Ezquerro *et al.*, 2003). Tan sólo la Pro (e hidroxiprolina) representa un tercio de los aa que conforman el colágeno; además se ha relacionado con una mayor tolerancia al estrés en *P. vannamei* (Xie *et al.*, 2015). Por otro lado, la Lys es un precursor de carnitina, la cual transporta los ácidos grasos al interior de la mitocondria participando así en la β -oxidación (Xie *et al.*, 2012). Por lo que el aumento de aa en el músculo de especímenes con la tripsina silenciada, particularmente Lys y Pro, podría estar relacionado con la generación de energía y el mantenimiento de la estructura tisular, en un intento de compensar la falta prolongada de nutrientes, derivada de la baja actividad de las peptidasas digestivas. Pues como lo reveló la evaluación histológica (Fig. 12), el silenciamiento de la tripsina no sólo afectó la expresión de otras peptidasas digestivas, sino que además se relacionó con la atrofia del epitelio (disminución de altura de las células) que sintetiza dichas enzimas, y una

menor ganancia de peso de estos especímenes (Tabla 15 del Anexo F). La atrofia, tanto la disminución de altura de las células como la expansión del lumen de los túbulos de la GD, se ha observado en cangrejos *Eriocheir sinensis* en inanición siete días (Huang *et al.*, 2020). En *P. vannamei*, la inanición por 15 días disminuyó el tamaño de las células R y de las vacuolas de las células B (Cervellione *et al.*, 2017). Los especímenes de camarón de este estudio no se privaron de alimento, pero la digestión deficiente de la proteína pudo ser suficiente en algunos individuos para afectar la morfología tisular de la GD.

La pérdida de función de la tripsina tuvo efectos no sólo a nivel molecular (Fig. 8-11), sino también a nivel celular (Fig. 12) e incluso en tejido más allá de la propia GD, como en el músculo de la cola (Fig. 10d), y su disminución aparentemente no pudo ser compensada. Por lo que es importante tomar en cuenta su actividad enzimática durante la formulación de dietas y prácticas de manejo en la acuicultura.

9. CONCLUSIONES

El RNAi silenció el gen blanco (tripsina) de acuerdo con múltiples evidencias: menor expresión génica relativa, menor intensidad de las bandas correspondientes a la proteína/peptidasa, y menor actividad proteolítica total y específica. Adicionalmente, el RNAi disminuyó la expresión y actividad de otras peptidasas digestivas no blanco, como la quimotripsina B1 y la metalopeptidasa Mpc1, probablemente debido a cierta inespecificidad. Sin embargo, estos resultados también podrían deberse a una función reguladora de la tripsina sobre la expresión de otras peptidasas digestivas. Esta regulación es conocida en el mosquito *A. aegypti*, en el que las tripsinas de expresión temprana actúan como sensores que activan la transcripción de tripsinas tardías (Noriega y Wells, 1999).

Los datos obtenidos en la presente investigación sugieren que la tripsina es relevante no sólo en la activación de la red o cascada de peptidasas digestivas, sino posiblemente también en su regulación transcripcional. Aunado a que la disminución del nivel de transcritos de tripsina no pudo ser compensada por otras peptidasas digestivas, afectando la histomorfología de la GD y el nivel de aminoácidos en músculo. Este estudio abre nuevas interrogantes a la vez que respalda la notable importancia de la tripsina en la fisiología digestiva.

10. LITERATURA CITADA

- Akula, S., Fu, Z., Wernersson, S. y Hellman, L. (2021). The evolutionary history of the chymase locus -a locus encoding several of the major hematopoietic serine proteases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20): 10975. doi: 10.3390/ijms222010975
- Al-Mohanna, S.Y. y Nott, J.A. (1987). R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology*, 95(1): 129-137. doi: 10.1007/BF00447494
- Alam, M.S., Islam, M.N., Das, M., Islam, S.F., Rabbane, M.G., Karim, E., Roy, A., Alam, M.S., Ahmed, R. y Kibria, A.S.M. (2023). RNAi-based therapy: Combating shrimp viral diseases. *Viruses*, 15(10): 1-19. doi: 10.3390/v15102050
- Anger, K. (2001). *The biology of decapod crustacean larvae*. 1st ed. CRC Press. 417p. ISBN: 9026518285
- Assavalapsakul, W., Chinnirunvong, W. y Panyim, S. (2009). Application of YHV-protease dsRNA for protection and therapeutic treatment against yellow head virus infection in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84(2): 167-171. doi: 10.3354/dao02044
- Attasart, P., Namramoon, O., Kongphom, U., Chimwai, C. y Panyim, S. (2013). Ingestion of bacteria expressing dsRNA triggers specific RNA silencing in shrimp. *Virus Research*, 171(1): 252-256. doi: 10.1016/j.virusres.2012.11.012
- Banks, T.M., Wang, T., Fitzgibbon, Q.P., Smith, G.G. y Ventura, T. (2020). Double-stranded rna binding proteins in serum contribute to systemic rnaï across phyla—towards finding the missing link in achelata. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18): 1-20. doi: 10.3390/ijms21186967
- Barrett, A.J. (1994). Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*, 244. p.1-15. doi: 10.1016/0076-6879(94)44003-4
- Barrett, A.J. y McDonald, J.K. (1986). Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal*, 237:935
- Bibo-Verdugo, B., O'Donoghue, A.J., Rojo-Arreola, L., Craik, C.S. y García-Carreño, F. (2016). Complementary proteomic and biochemical analysis of peptidases in lobster gastric juice uncovers the functional role of individual enzymes in food digestion. *Marine Biotechnology*, 18(2):201-214. doi: 10.1007/s10126-015-9681-5
- Bode, W., Gomis-Rüth, FX., Huber, R., Zwilling, R. y Stöcker, W. (1992). Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature*, 358(6382): 164-167. doi: 10.1038/358164a0
- Borges-Veloso, A., Saboia-Vahia, L., Dias-Lopes, G., Domont, G.B., Britto, C., Cuervo, P. y De Jesus, J.B. (2015). In-depth characterization of trypsin-like serine peptidases in the midgut of the sugar fed *Culex quinquefasciatus*. *Parasites and Vectors*, 8(373): 1-16. doi: 10.1186/s13071-015-0985-0
- Boyd, C.E. y Jescovitch, L.N. (2021). Penaeid shrimp aquaculture. En: Lovrich & Thiel (ed). *Fisheries and aquaculture: Volume 10*. Oxford University Press, NY, pp 233-258
- Brackney, D.E., Isoe, J., W.C., B., Zamora, J., Foy, B.D., Miesfeld, R.L. y Olson, K.E. (2010). Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 56(7): 736-744. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.01.003
- Broehan, G., Arakane, Y., Beeman, R.W., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S. y Merzendorfer, H. (2010). Chymotrypsin-like peptidases from *Tribolium castaneum*: A role in molting revealed

- by RNA interference. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3): 274-283. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.10.009
- Buarque, D.S., Castro, P.F., Santos, F.M.S., Lemos, D., Júnior, L.B.C. y Bezerra, R.S. (2009). Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research*, 40(7): 861-870. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02183.x
- Burgos-Hernández, A., Farias, S.I., Torres-Arreola, W. y Ezquerro-Brauer, J.M. (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(1-2): 399-410. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.05.024
- Caceci, T., Neck, K.F., Sis, R.F. y Lewis, D.H. (1988). Ultrastructure of the hepatopancreas of the pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 68(2): 323-337. doi: 10.1017/S002531540005222X
- Campos-Ramos, R. (1997). Chromosome studies on the marine shrimps *Penaeus vannamei* and *P. californiensis* (Decapoda). *Journal of Crustacean Biology*, 17(4): 666-673. doi: 10.1163/193724097x00099
- Castejón, D., Rotllant, G., Alba-Tercedor, J., Font-i-Furnols, M., Ribes, E., Durfort, M. y Guerao, G. (2019). Morphology and ultrastructure of the midgut gland ("hepatopancreas") during ontogeny in the common spider crab *Maja brachydactyla* Balss, 1922 (Brachyura, Majidae). *Arthropod Structure and Development*, 49: 137-151. doi: 10.1016/j.asd.2018.11.013
- Cervellione, F., McGurk, C., Berger Eriksen, T. y Van den Broeck, W. (2017). Effect of starvation and refeeding on the hepatopancreas of whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* (Boone) using computer-assisted image analysis. *Journal of Fish Diseases*, 40(11): 1-9. doi: 10.1111/jfd.12639
- Chakrabarty, S., Kahler, J.P., van de Plassche, M.A.T., Vanhoutte, R. y Verhelst, S.H.L. (2018). Recent advances in activity-based protein profiling of proteases. En: *Activity-Based Protein Profiling*. Springer Cham, pp. 253-281
- Chang, L., Xiang, Q.M., Zhu, J.Q., Chen, Y.E., Tang, D.J., Zhang, C.D. y Hou, C.C. (2022). Transport of acrosomal enzymes by KIFC1 via the acroframosomal cytoskeleton during spermatogenesis in *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, Decapoda, Malacostracea). *Animals*, 12(8): 1-21. doi: 10.3390/ani12080991
- Charoonart, P., Worakajit, N., Zedler, J.A.Z., Meetam, M., Robinson, C. y Saksmerprome, V. (2019). Generation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii* expressing shrimp antiviral dsRNA without supplementation of antibiotics. *Scientific Reports*, 9:1-8. doi: 10.1038/s41598-019-39539-x
- Chen, J.M., Kukor, Z., Le Maréchal, C., Tóth, M., Tsakiris, L., Raguénès, O., Férec, C. y Sahin-Tóth, M. (2003). Evolution of trypsinogen activation peptides. *Molecular Biology and Evolution*, 20(11):1767-1777. doi: 10.1093/molbev/msg183
- Chow, S., Dougherty, W.J. y Sandifer, P.A. (1990). Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus*. *Journal of Crustacean Biology*, 10(1): 29-36. doi: 10.2307/1548667
- Córdova-Murueta, J.H. y García-Carreño, F.L. (2002). Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture*, 210(1-4): 371-384. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00011-X

- Córdova-Murueta, J.H., García-Carreño, F.L. y Navarrete-del-Toro, M.D.A. (2003). Digestive enzymes present in crustacean feces as a tool for biochemical, physiological, and ecological studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 297(1): 43-56. doi: 10.1016/S0022-0981(03)00355-1
- Corteel, M., Dantas-Lima, J.J., Wille, M., Alday-Sanz, V., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P. y Nauwynck, H.J. (2012). Moulting cycle of laboratory-raised *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* and *P. monodon*. *Aquaculture International*, 20(1): 13-18. doi: 10.1007/s10499-011-9437-9
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C. y Guillaume, J. (2004). Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 235(1-4): 513-551. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.12.022
- Cuzon, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G. y Van Wormhoudt, A. (2019). Utilization of carbohydrates by shrimp. *Avances en Nutrición Acuicola*: 328-339 <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/282>
- Davie, P.J.F., Guinot, D. y Ng, P.K.L. (2015). Anatomy and functional morphology of Brachyura. En: *Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea*, 9C (2 vols). Brill, Leiden, pp. 11-163
- de Oliveira Cesar, J.R., Zhao, B., Malecha, S., Ako, H. y Yang, J. (2006). Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle. *Aquaculture*, 261(2): 688-694. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.08.003
- Duarte, A.S., Correia, A. y Esteves, A.C. (2016). Bacterial collagenases - A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(1): 106-126. doi: 10.3109/1040841X.2014.904270
- Eizen, A.Z. y Jeffrey, J.J. (1969). An extractable collagenase from crustacean hepatopancreas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 191(3): 517-526. doi: 10.1016/0005-2744(69)90345-3
- Erez, E., Fass, D. y Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*, 459(7245): 371-378. doi: 10.1038/nature08146
- Estrella-Soliz, C.U. (2022). Caracterización de la secuencia de participación de las peptidasas digestivas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría inédita. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, Hermosillo.
- Ezquerro, J.M.B., Salazar, J.A.L., Bringas, L.A. y Rouzaud, O.S. (2003). Effect of dietary protein on muscle collagen, collagenase and shear force of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *European Food Research and Technology*, 217(4): 277-280. doi: 10.1007/s00217-003-0739-7
- Ezquerro, J.M., García-Carreño, F.L., Arteaga, G.M. y Haard, N.F. (1999). Effect of feed diet on aminopeptidase activities from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Journal of Food Biochemistry*, 23(1): 59-74. doi: 10.1111/j.1745-4514.1999.tb00005.x
- FAO (2009). *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Cultured aquatic species fact sheets. Disponible en: https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_w hitelegshrimp.htm [consulta: 06 septiembre 2024].
- Feher, J. (2017). Digestion and Absorption of the Macronutrients. En: *Quantitative Human Physiology: An Introduction*. 2ª ed. Academic Press, pp. 821-833
- Fernández, I., Oliva, M., Carrillo, O. y Van Wormhoudt, A. (1997). Digestive enzyme activities of *Penaeus notialis* during reproduction and moulting cycle. *Comparative Biochemistry and*

- Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 118(4): 1267-1271. doi: 10.1016/S0300-9629(97)86802-8
- Figueredo, A., Lira, C., Vera-Caripe, J., De Donato, M. y Lodeiros, C. (2023). The Pacific white shrimp, the most cultivated shrimp species, is it *Litopenaeus* or *Penaeus vannamei*? *Reviews in Aquaculture*, 15(1): 1-7. doi: 10.1111/raq.12725
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. y Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806-811. doi: 10.1038/35888
- Galgani, F.G., Benyamin, Y. y Ceccaldi, H.J. (1984). Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forskål): A comparison with *Penaeus japonicus* Bate. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 78(2): 355-361. doi: 10.1016/0305-0491(84)90043-9
- Galgani, F.G., Benyamin, Y. y Van Wormhoudt, A. (1985). Purification, properties and immunoassay of trypsin from the shrimp *Penaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 81(2): 447-452. doi: 10.1016/0305-0491(85)90340-2
- Gao, Y., Zhang, X., Wei, J., Sun, X., Yuan, J., Li, F. y Xiang, J. (2015). Whole transcriptome analysis provides insights into molecular mechanisms for molting in *Litopenaeus vannamei*. *PLoS ONE*, 10(12): e0144350. doi: 10.1371/journal.pone.0144350
- García-Carreño, F.L., Hernández-Cortés, M.P. y Haard, N.F. (1994). Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7): 1456-1461. doi: 10.1021/jf00043a013
- García-Carreño, F.L. y Navarrete Del Toro, M.A. (1997). Classification of proteases without tears. *Biochemical Education*, 25(3): 161-167. doi: 10.1016/S0307-4412(97)00005-8
- Gates, B.J. y Travis, J. (1973). Purification and characterization of carboxypeptidases A and B from the white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Biochemistry*, 12(10): 1867-1874. doi: 10.1021/bi00734a005
- George-Zamora, A., Viana, M.T., Rodríguez, S., Espinoza, G. y Rosas, C. (2011). Amino acid mobilization and growth of juvenile *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) under inanition and re-feeding. *Aquaculture*, 314(1-4): 215-220. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.02.022
- Ghaffari, N., Sánchez-Flores, A., Doan, R., García-Orozco, K.D., Chen, P.L., Ochoa-Leyva, A., López-Zavala, A.A., Carrasco, J.S., Hong, C., Brieba, L.G., Rudiño-Piñera, E., Blood, P.D., Sawyer, J.E., Johnson, C.D., Dindot, S.V., Sotelo-Mundo, R.R. y Criscitiello, M.F. (2014). Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. *Scientific Reports*, 4: 7081. doi: 10.1038/srep07081
- Gomis-Rüth, F.X. y Stöcker, W. (2023). Structural and evolutionary insights into astacin metallopeptidases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9: 1080836. doi: 10.3389/fmolb.2022.1080836
- Guevara, T., Rodríguez-Banqueri, A., Stöcker, W., Becker-Pauly, C. y Gomis-Rüth, F.X. (2022). Zymogenic latency in an 250-million-year-old astacin metallopeptidase. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 78(Pt 11): 1347-1357. doi: 10.1107/S2059798322009688
- Guo, J., Duan, M., Qiu, X., Masagounder, K. y Davis, D.A. (2020). Characterization of methionine uptake and clearance in the hemolymph of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

- Aquaculture*, 526: 735351. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735351
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12): 4501-4523. doi: 10.1021/cr000033x
- Hedstrom, L., Szilagy, L. y Rutter, W.J. (1992). Converting trypsin to chymotrypsin: The role of surface loops. *Science*, 255(5049): pp. 1249-1253. doi: 10.1126/science.1546324
- Hendrickx, M.E. (1995). Camarones. En: Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen I. Plantas e invertebrados. FAO, Roma, pp. 417-528.
- Hernandez-Cortes, P. (2021). Bioinformatic analysis of substrate binding sites in decapod brachyurin-C collagenases. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 57(1): 115-125. doi: 10.1134/s0022093021010117
- Hernandez-Cortes, P., Rivera-Pérez, C., García-Carreño, F. y Martínez-Alarcón, D. (2017). Proteinases during early development of the Pacific whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Biological Bulletin*, 232(1): 2-11. doi: 10.1086/691381
- Hernández-Cortés, P., Whitaker, J.R. y García-Carreño, F.L. (1997). Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Food Biochemistry*, 21(1): 497-514. doi: 10.1111/j.1745-4514.1997.tb00202.x
- Hildebrand, J., Chang, W.W., Hu, M.Y. y Stumpp, M. (2023). Characterization of digestive proteases in the gut of a basal deuterostome. *Journal of Experimental Biology*, 226(15): jeb245789. doi: 10.1242/jeb.245789
- Horton, T., Kroh, A., Ahyong, S., Bailly, N., Boyko, C.B., Brandão, S.N., Gofas, S., Hooper, J.N.A., Hernandez, F. y Holovachov, O. (2020). World Register of Marine Species (WoRMS). WoRMS Editorial Board. Disponible en: <https://www.marinespecies.org/> [consulta: 7 septiembre 2024].
- Howard, D.W., Lewis, E.J., Keller, B.J. y Smith, C.S. (2004). Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. NOAA Technical Memorandum. NOS NCCOS 5.
- Howe, S.E., Grider, S.L., Lynch, D.M. y Fink, L.M. (1991). Antisperm antibody binding to human acrosin: A study of patients with unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 55(6): 1176-1182. doi: 10.1016/S0015-0282(16)54371-4
- Hu, K.J. y Leung, P.C. (2007). Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 146(1): 69-80. doi: 10.1016/j.cbpb.2006.09.010
- Huang, X., Feng, Y., Duan, J., Xiong, G., Fan, W., Liu, S., Zhong, L., Wang, K., Geng, Y., Ouyang, P., Chen, D., Yang, S. y Yin, L. (2020). Antistarvation Strategies of *E. Sinensis*: Regulatory Networks under Hepatopancreas Consumption. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020: 085343. doi: 10.1155/2020/6085343
- Hull, D. y Timmons, L. (2004). Methods for delivery of double-stranded RNA into *Caenorhabditis elegans*. En: *RNA Interference, Editing, and Modification. Methods and Protocols*, Humana Press. 265: 23-58. doi: 10.1385/1-59259-775-0:023
- Hyde, C.J., Elizur, A. y Ventura, T. (2019). The crustacean ecdysone cassette: A gatekeeper for molt and metamorphosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 185: 172-183. doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.08.012
- Hyde, C.J., Fitzgibbon, Q.P., Elizur, A., Smith, G.G. y Ventura, T. (2020). CrustyBase: An interactive online database for crustacean transcriptomes. *BMC Genomics*, 21(1): 637. doi: 10.1186/s12864-020-07063-2

- Isoe, J., Rascón, A.A., Kunz, S. y Miesfeld, R.L. (2009). Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(12): 903-912. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.10.008
- Kang, T., Jin, R., Zhang, Y., Wan, H., Lee, K.S., Jin, B.R. y Li, J. (2017). Functional characterization of the aspartic proteinase cathepsin D in the beet armyworm (*Spodoptera exigua*). *Gene*, 617: 1-7. doi: 10.1016/j.gene.2017.03.035
- Khan, AR. y James, M.N.G. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science*, 7(4): 815-836. doi: 10.1002/pro.5560070401
- Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D. y Van Wormhoudt, A. (1996). Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 28(5): 551-563. doi: 10.1016/1357-2725(95)00169-7
- Klein, B., Sellos, D. y Van Wormhoudt, A. (1998). Genomic organisation and polymorphism of a Crustacean trypsin multi-gene family. *Gene*, 216(1): 123-129. doi: 10.1016/S0378-1119(98)00331-X
- Kodama, E., Baba, T., Yokosawa, H. y Sawada, H. (2001). cDNA Cloning and Functional Analysis of Ascidian Sperm Proacrosin. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27): 24594-24600. doi: 10.1074/jbc.M011370200
- Kondo, M.Y., Okamoto, D.N., Santos, J.A.N., Juliano, M.A., Oda, K., Pillai, B., James, M.N.G., Juliano, L. y Gouvea, I.E. (2010). Studies on the catalytic mechanism of a glutamic peptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(28): 21437-21445. doi: 10.1074/jbc.M110.122432
- Koshikawa, N., Hasegawa, S., Nagashima, Y., Mitsuhashi, K., Tsubota, Y., Miyata, S., Miyagi, Y., Yasumitsu, H. y Miyazaki, K. (1998). Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *American Journal of Pathology*, 153(3): 937-944. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65635-0
- Kurreck, J. (2009). RNA interference: From basic research to therapeutic applications. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48: 1378-1398. doi: 10.1002/anie.200802092.
- Kvamme, B.O., Kongshaug, H. y Nilsen, F. (2005). Organisation of trypsin genes in the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Crustacea, copepoda) genome. *Gene*, 352(1-2): 63-74. doi: 10.1016/j.gene.2005.03.011
- Le Boulay, C., Van Wormhoudt, A. y Sellos, D. (1996). Cloning and expression of cathepsin L-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle. *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 166(5): 310-318. doi: 10.1007/BF02439917
- Lee, J.H., Momani, J., Kim, Y.M., Kang, C.K., Choi, J.H., Baek, H.J. y Kim, H.W. (2015). Effective RNA-silencing strategy of Lv-MSTN/GDF11 gene and its effects on the growth in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 179: 9-16. doi: 10.1016/j.cbpb.2014.09.005
- Lee, P.G., Smith, L.L. y Lawrence, A.L. (1984). Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: Relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture*, 42(3-4): 225-239. doi: 10.1016/0044-8486(84)90103-0
- Lehnert, S.A. y Johnson, S.E. (2002). Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 133(2): 163-171. doi: 10.1016/S1096-4959(02)00123-9

- Lemos, D., Ezquerro, J.M. y García-Carreño, F.L. (2000). Protein digestion in penaeid shrimp: Digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*, 186(1-2): 89-105. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00371-3
- Li, C., Wang, F., Aweya, J.J., Yao, D., Zheng, Z., Huang, H., Li, S. y Zhang, Y. (2018). Trypsin of *Litopenaeus vannamei* is required for the generation of hemocyanin-derived peptides. *Developmental and Comparative Immunology*, 79: 95-104. doi: 10.1016/j.dci.2017.10.015
- Li, X., Han, T., Zheng, S. y Wu, G. (2021). Nutrition and functions of amino acids in aquatic crustaceans. En: *Amino acids in nutrition and health. Amino Acids in the Nutrition of Companion, Zoo and Farm Animals*. Springer Cham, pp. 169–198
- Li, X., Yang, J., Pu, Q., Peng, X., Xu, L. y Liu, S. (2019). Serine hydroxymethyltransferase controls blood-meal digestion in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites and Vectors*, 12(1): 460. doi: 10.1186/s13071-019-3714-2
- Li, Z., Lindsay, M.E., Motyka, S.A., Englund, P.T. y Wang, C.C. (2008). Identification of a bacterial-like HslVU protease in the mitochondria of *Trypanosoma brucei* and its role in mitochondrial DNA replication. *PLoS Pathogens*, 4(4): e1000048. doi: 10.1371/journal.ppat.1000048
- Lim, C.E. (1998). Feeding penaeid shrimp. En: *Nutrition and feeding of fish*, 2.^a ed. Springer, Boston, pp. 227-248
- Lin, F.Y. (1996). Structure of the gland filters in the pyloric stomach of *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Crustacean Biology*, 16(3): 515-521. doi: 10.1163/193724096X00531
- Liu, C., Xiao, Y., Li, X., Oppert, B., Tabashnik, B.E. y Wu, K. (2014). Cis-mediated down-regulation of a trypsin gene associated with Bt resistance in cotton bollworm. *Scientific Reports*, 4: 7219. doi: 10.1038/srep07219
- Loizzi, R.F. (1971). Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 113(3): 420-440. doi: 10.1007/BF00968548
- Lovett, D.L. y Felder, D.L. (1990). Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *The Biological Bulletin*, 178(2): 160-174. doi: 10.2307/1541974
- Lovett, D.L. y Felder, D.L. (1989). Ontogeny of gut morphology in the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae). *Journal of Morphology*, 201(3): 253-272. doi: 10.1002/jmor.1052010305
- Lv D., Kassen K., Men C., Yang X., Pan D., Wang X., Wang N., Wang P., Yuan X., Li Y. (2024). Trypsin-encoding gene function of efficient star polycation nanomaterial-mediated dsRNA feeding delivery system of *Grapholita molesta*. *Pest Management Science*. Online ahead of print. doi.org/10.1002/ps.8289
- Maruekawong, K., Panyim, S. y Attasart, P. (2019). Involvement of endocytosis in cellular uptake of injected dsRNA into hepatopancreas but not in gill of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 500: 393-397. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.10.041
- Mayorga, Z.M. (1982). Genética de Crustáceos. *Documenta*, 10: 3-6
- Maytorena-Verdugo, C.I., Córdova-Murueta, J.H. y García-Carreño, F.L. (2017a). Peptidase compensation in the digestive system of whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* against dietary Kunitz-type soybean trypsin inhibitor. *Aquaculture Nutrition*, 23(5): 1-9. doi: 10.1111/anu.12477
- Maytorena-Verdugo, C.I., Córdova-Murueta, J.H. y García-Carreño, F.L. (2017b). *Litopenaeus*

- vannamei* digestive metallo peptidases compensate for anti-nutritional SBTI in feed. *Aquaculture*, 473: 508-512. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.02.023
- McLean, E., Alfrey, K.B., Gatlin III, D.M., Gaylord, G.T. y Barrows, F.T. (2024). Muscle amino acid profiles of eleven species of aquacultured animals and their potential value in feed formulation. *Aquaculture and Fisheries*, 9(4): 642-652. doi: 10.1016/j.aaf.2022.04.010
- Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D., Davidson, I. y Sorgeloos, P. (2002). Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: Effects of dietary protein source. *Journal of Experimental Biology*, 205(20): 3107-3122. doi: 10.1242/jeb.205.20.3107
- MEROPS (2024). The peptidase database. Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/merops/> [consulta: 7 septiembre 2024].
- Michiels, M.S., del Valle, J.C. y López Mañanes, A.A. (2015). Biochemical characteristics and modulation by external and internal factors of aminopeptidase-N activity in the hepatopancreas of a euryhaline burrowing crab. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 185(5): 501-510. doi: 10.1007/s00360-015-0899-3
- Mijalski, T., Harder, A., Halder, T., Kersten, M., Horsch, M., Strom, T.M., Liebscher, H.V., Lottspeich, F., Hrabě De Angelis, M. y Beckers, J. (2005). Identification of coexpressed gene clusters in a comparative analysis of transcriptome and proteome in mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24): 8621-8626. doi: 10.1073/pnas.0407672102
- Mocellin, S. y Provenzano, M. (2004). RNA interference: Learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of Translational Medicine*, 2: 39. doi: 10.1186/1479-5876-2-39
- Möhrlen, F., Baus, S., Gruber, A., Rackwitz, H.R., Schnölzer, M., Vogt, G. y Zwillig, R. (2001). Activation of pro-astacin: Immunological and model peptide studies on the processing of immature astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus*. *European Journal of Biochemistry*, 268(9): 2540-2546. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02136.x
- Muhlia-Almazán, A., García-Carreño, F.L., Sánchez-Paz, J.A., Yepiz-Plascencia, G. y Peregrino-Urriarte, A.B. (2003). Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 135(2): 373-383. doi: 10.1016/S1096-4959(03)00091-5
- Muhlia-Almazán, A., Sánchez-Paz, A. y García-Carreño, F.L. (2008). Invertebrate trypsins: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 178(6): 655-672. doi: 10.1007/s00360-008-0263-y
- National Center for Biotechnology Information. (2023). NCBI Taxonomy Browser. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=12059&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> [consulta: 7 septiembre 2024].
- Navarrete del Toro, M.A., García-Carreño, F.L. y Córdova-Murueta, J.H. (2011). Comparison of digestive proteinases in three penaeids. *Aquaculture*, 317(1-4): 99-106. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.03.035
- Navarrete del Toro, M.A. y García-Carreño, F. (2019). The toolbox for protein digestion in decapod crustaceans: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(4): 1005-1021. doi: 10.1111/raq.12276
- Ning, M., Wei, P., Shen, H., Wan, X., Jin, M., Li, X., Shi, H., Qiao, Y., Jiang, G., Gu, W., Wang, W.,

- Wang, L. y Meng, Q. (2019). Proteomic and metabolomic responses in hepatopancreas of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* infected by microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 87: 534-545. doi: 10.1016/j.fsi.2019.01.051
- Noriega, F.G., Shah, D.K. y Wells, M.A. (1997). Juvenile hormone controls early trypsin gene transcription in the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 6(1): 63-66. doi: 10.1046/j.1365-2583.1997.00154.x
- Noriega, F.G. y Wells, M.A. (1999). A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 45(7): 613-620. doi: 10.1016/S0022-1910(99)00052-9
- Oppert, B., Morgan, T.D., Hartzler, K. y Kramer, K.J. (2005). Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C Toxicology and Pharmacology*, 140(1): 53-58. doi: 10.1016/j.cca.2005.01.006
- Page, M.J. y Di Cera, E. (2008). Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 1220–1236. doi: 10.1007/s00018-008-7565-9
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B.L., Salazar, G.A., Bileschi, M.L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D.H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D.A., Orengo, C.A., Pandurangan, A.P., Rivoire, C., Sigrist, C.J.A., Sillitoe, I., Thanki, N., Thomas, P.D., Tosatto, S.C.E., Wu, C.H. y Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, 51(D1): D418-D427. doi: 10.1093/nar/gkac993
- Perona, J.J. y Craik, C.S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science*, 4(3): 337-360. doi: 10.1002/pro.5560040301
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A. y Ross, L.G. (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, 157(1-2): 107-115. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00148-8
- Qiu, L., Jiang, S., Huang, J., Wang, W., Zhang, D., Wu, Q. y Yang, K. (2008). Molecular cloning and mRNA expression of cathepsin C gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A Molecular and Integrative Physiology*, 150(3): 320-325. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.04.001
- Rabet, N. (2021). Crustaceans. En: *Handbook of marine model organisms in experimental biology*. CRC Press de Taylor & Francis Group, pp, 271-287
- Ramos-Cruz, S. (2011). Relaciones biométricas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* Boone 1931 (Decapoda, Penaeidae) para la región del Golfo de Tehuantepec, México. *CICIMAR Oceanides*, 26(2): 71-75. doi: 10.37543/oceanides.v26i2.104
- Rascón, A.A., Gearin, J., Isoe, J. y Miesfeld, R.L. (2011). *In vitro* activation and enzyme kinetic analysis of recombinant midgut serine proteases from the Dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Biochemistry*, 12: 43. doi: 10.1186/1471-2091-12-43
- Rawlings, N.D. (2020). Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1868(2): 140345. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140345
- Rawlings, N.D. y Barrett, A.J. (2013). Introduction: serine peptidases and their clans. En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd ed. Academic Press, pp. 2491-2523
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. y Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 44(D1): D343-

- D350. doi: 10.1093/nar/gkv1118
- Riet, J., Costa-Filho, J., Dall'Agno, L., Medeiros, L., Azevedo, R., Nogueira, L.F., Maggioni, R., Pedrosa, V.F., Romano, L.A., Altenbuchner, J., Wasielesky, W. y Marins, L.F. (2021). *Bacillus subtilis* expressing double-strand RNAs (dsRNAs) induces RNA interference mechanism (RNAi) and increases survival of WSSV-challenged *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 541: 736834. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736834
- Rodríguez-Siordia, I., Bibo-Verdugo, B., Toro, Navarrete del Toro M.A., Rojo-Arreola, L. y García-Carreño, F. (2016). A synergistic peptidase network mediates food protein digestion in the american lobster *Homarus americanus* (Edwards, 1837). *Journal of Shellfish Research*, 35(4): 1067–1074. doi: 10.2983/035.035.0429
- Rojo-Arreola, L., Choquet, C., Cordova-Murueta, J. y García-Carreño, F. (2019a). The protease-based compensatory mechanism to minimize the effect of dietary Soybean Trypsin Inhibitor in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 500: 18-23. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.10.002
- Rojo-Arreola, L., García-Carreño, F., Romero, R. y Díaz, L.D. (2020). Proteolytic profile of larval developmental stages of *Penaeus vannamei*: An activity and mRNA expression approach. *PLoS ONE*, 15(9): e0239413. doi: 10.1371/journal.pone.0239413
- Rojo-Arreola, L., Long, T., Asarnow, D., Suzuki, B.M., Singh, R. y Caffrey, C.R. (2014). Chemical and genetic validation of the statin drug target to treat the helminth disease, schistosomiasis. *PLoS ONE*, 9(1): e87594. doi: 10.1371/journal.pone.0087594
- Rojo-Arreola, L., Navarrete del Toro, M.A., Cordova-Murueta, J. y García-Carreño, F. (2019b). Techniques for protein digestion research in Decapoda: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 89: 65-75. doi: 10.1016/j.tifs.2019.05.004
- Saborowski, R., Schatte, J. y Gimenez, L. (2012). Catalytic properties and polymorphism of serine endopeptidases from the midgut gland of the brown shrimp *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea). *Marine Biology*, 159(5): 1107-1118. doi: 10.1007/s00227-012-1890-0
- Sagi, A., Manor, R. y Ventura, T. (2013). Gene silencing in crustaceans: from basic research to biotechnologies. *Genes*, 4(4): 620-645. doi: 10.3390/genes4040620
- Sainz, J.C., García-Carreño, F., Sierra-Beltrán, A. y Hernández-Cortés, P. (2004a). Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*, 24(2): 266–273. doi: 10.1651/C-2423
- Sainz, J.C., García-Carreño, F.L., Córdoba-Murueta, J.H. y Cruz-Hernández, P. (2005). Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) isotrypsins: Their genotype and modulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 326(1): 105-113. doi: 10.1016/j.jembe.2005.05.021
- Sainz, J.C., García-Carreño, F.L. y Hernández-Cortés, P. (2004b). *Penaeus vannamei* isotrypsins: Purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 138(2): 155–162. doi: 10.1016/j.cbpc.2004.03.002
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Muhlia-Almazán, A., Hernández-Saavedra, N.Y. y Yepiz-Plascencia, G. (2003). Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 292(1). doi: 10.1016/S0022-0981(03)00142-4
- Sarathi, M., Simon, M.C., Venkatesan, C. y Hameed, A.S.S. (2008). Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *Marine Biotechnology*, 10: 242-249. doi: 10.1007/s10126-007-9057-6
- Sayers, E.W., Bolton, E.E., Brister, J.R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D.C., Farrell, C.M.,

- Feldgarden, M., Fine, A.M., Funk, K., Hatcher, E., Kannan, S., Kelly, C., Kim, S., Klimke, W., Landrum, M.J., Lathrop, S., Lu, Z., Madden, T.L., Malheiro, A., Marchler-Bauer, A., Murphy, T.D., Phan, L., Pujar, S., Rangwala, S.H., Schneider, V.A., Tse, T., Wang, J., Ye, J., Trawick, B.W., Pruitt, K.D. y Sherry, S.T. (2023). Database resources of the National Center for Biotechnology Information in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1): D29-D38. doi: 10.1093/nar/gkac1032
- Schram, F. (2009). On the origin of Decapoda. En: *Decapod crustacean phylogenetics*. CRC Press Taylor & Francis Group, pp. 3-13
- Sellos, D. y Van Wormhoudt, A. (1992). Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vanamei* (Crustacea, Decapoda). *FEBS Letters*, 309(3): 219-224. doi: 10.1016/0014-5793(92)80777-E
- Sellos, D. y Van Wormhoudt, A. (1999). Polymorphism and evolution of collagenolytic serine protease genes in crustaceans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1432(2): 419-424. doi: 10.1016/S0167-4838(99)00121-1
- Sharath Chandra, G., Asokan, R., Manamohan, M., Ellango, R., Sharma, H.C., Akbar, S.M.D. y Krishna Kumar, N.K. (2018). Double-stranded RNA-mediated suppression of trypsin-Like serine protease (t-SP) triggers over-expression of another t-SP isoform in *Helicoverpa armigera*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(2): 746-761. doi: 10.1007/s12010-017-2584-3
- Shoulders, M.D. y Raines, R.T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78: 929-958. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
- Soares, T.S., Watanabe, R.M.O., Lemos, F.J.A. y Tanaka, A.S. (2011). Molecular characterization of genes encoding trypsin-like enzymes from *Aedes aegypti* larvae and identification of digestive enzymes. *Gene*, 489(2): 70-75. doi: 10.1016/j.gene.2011.08.018
- Soto-Rodriguez, S.A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M. y Morales-Covarrubias, M.S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5): 1689-1699. doi: 10.1128/AEM.03610-14
- Sousa, M.C., Kessler, B.M., Overkleeft, H.S. y McKay, D.B. (2002). Crystal structure of HslUV complexed with a vinyl sulfone inhibitor: Corroboration of a proposed mechanism of allosteric activation of HslV by HslU. *Journal of Molecular Biology*, 318(3): 779-785. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00145-6
- Sun, P.S., Venzon, N.C., Calderon, F.R.O. y Esaki, D.M. (2005). Evaluation of methods for DNA delivery into shrimp zygotes of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 243(1-4): 19-26. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.09.037
- Sutthangkul, J., Amparyup, P., Charoensapsri, W., Senapin, S., Phiwsaiya, K. y Tassanakajon, A. (2015). Suppression of shrimp melanization during white spot syndrome virus infection. *Journal of Biological Chemistry*, 290(10): 6470-6481. doi: 10.1074/jbc.M114.605568
- Taylor, A. (1993). Amino-peptidases: structure and function. *The FASEB Journal*, 7(2): 290-298. doi: 10.1096/fasebj.7.2.8440407
- Teschke, M. y Saborowski, R. (2005). Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of *Crangon crangon* and *Crangon allmani* (Decapoda: Caridea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316(2): 213-229. doi: 10.1016/j.jembe.2004.11.007

- Tinwongger, S., Thawonsuwan, J., Kondo, H. y Hirono, I. (2019). Identification of an anti-lipopolysaccharide factor AV-R isoform (LvALF AV-R) related to Vp_PirAB-like toxin resistance in *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 84: 178-188. doi: 10.1016/j.fsi.2018.10.005
- Tsai, I.H., Chuano, K.L. y Chuang, J.L. (1986). Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (Shrimps). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 85(1): 235-239. doi: 10.1016/0305-0491(86)90248-8
- Tsai, I.H., Lu, P.J. y Chuang, J.L. (1991). The midgut chymotrypsins of shrimps (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular*, 1080(1): 59-67. doi: 10.1016/0167-4838(91)90112-D
- Ulaje, S.A., Rojo-Arreola, L., Lluch-Cota, S.E., Ascencio, F., Cruz-Hernández, P. y Sicard, M.T. (2019). Gene expression and energetic metabolism changes in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to short-term hypoxia. *Aquaculture Research*, 50(4): 994-1004. doi: 10.1111/are.13960
- Van Wormhoudt, A., Le Chevalier, P. y Sellos, D. (1992). Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine-protease with chymotrypsic and collagenolytic activities in a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 103(3): 675-680. doi: 10.1016/0305-0491(92)90389-9
- Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Donval, A., Plaire-Goux, S. y Le Moullac, G. (1995). Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea; Decapoda). *Experientia*, 51: 159–163. doi: 10.1007/BF01929362
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. y Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7): research0034.1–0034.11. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Vogt, G. (2019). Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *Journal of Morphology*, 280(9): 1405-1444. doi: 10.1002/jmor.21040
- Vogt, G. (2021). Synthesis of digestive enzymes, food processing, and nutrient absorption in decapod crustaceans: a comparison to the mammalian model of digestion. *Zoology*, 147: 125945. doi: 10.1016/j.zool.2021.125945
- Wang, M., Zhang, S., Shi, Y., Yang, Y. y Wu, Y. (2020). Global gene expression changes induced by knockout of a protease gene cluster in *Helicoverpa armigera* with CRISPR/Cas9. *Journal of Insect Physiology*, 122: 104023. doi: 10.1016/j.jinsphys.2020.104023
- Wang, S., Magoulas, C. y Hickey, D. (1999). Concerted evolution within a trypsin gene cluster in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 16(9): 1117-1124. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026202
- Wang, Z., Luan, S., Meng, X., Cao, B., Luo, K. y Kong, J. (2019). Comparative transcriptomic characterization of the eyestalk in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during ovarian maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 274: 60-72. doi: 10.1016/j.ygcen.2019.01.002
- Wei, J., Zhang, X., Yu, Y., Li, F. y Xiang, J. (2014). RNA-Seq reveals the dynamic and diverse features of digestive enzymes during early development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D Genomics and Proteomics*, 11: 37-44. doi: 10.1016/j.cbd.2014.07.001

- Williams, E.A., Conzelmann, M. y Jékely, G. (2015). Myoinhibitory peptide regulates feeding in the marine annelid *Platynereis*. *Frontiers in Zoology*, 12(1). doi: 10.1186/s12983-014-0093-6
- Xie, F., Zeng, W., Zhou, Q., Wang, H., Wang, T., Zheng, C. y Wang, Y. (2012). Dietary lysine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 358-359: 116-121. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.06.027
- Xie, S.W., Tian, L.X., Li, Y.M., Zhou, W., Zeng, S.L., Yang, H.J. y Liu, Y.J. (2015). Effect of proline supplementation on anti-oxidative capacity, immune response and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 448: 105-111. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.040
- Xu, C., Li, E., Liu, Y., Wang, X., Qin, J.G. y Chen, L. (2017). Comparative proteome analysis of the hepatopancreas from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under long-term low salinity stress. *Journal of Proteomics*, 162: 1-10. doi: 10.1016/j.jprot.2017.04.013
- Yamaji, K., Miyoshi, T., Hatta, T., Matsubayashi, M., Alim, M.A., Anisuzzaman, Kushibiki, S., Fujisaki, K. y Tsuji, N. (2013). HICPL-A, a cathepsin L-like cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, modulated midgut proteolytic enzymes and their inhibitors during blood meal digestion. *Infection, Genetics and Evolution*, 16: 206-211. doi: 10.1016/j.meegid.2013.01.018
- Yang, L., Li, X., Jiang, S., Qiu, L., Zhou, F., Liu, W. y Jiang, S. (2014a). Characterization of Argonaute2 gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and its responses to immune challenges. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1): 261-269. doi: 10.1016/j.fsi.2013.11.010
- Yang, L., Lin, Z., Fang, Q., Wang, J., Yan, Z., Zou, Z., Song, Q. y Ye, G. (2017). The genomic and transcriptomic analyses of serine proteases and their homologs in an endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *Developmental and Comparative Immunology*, 77: 56-68. doi: 10.1016/j.dci.2017.07.014
- Yang, L., Xu, X., Wei, W., Chen, X., Peng, C., Wang, X. y Xu, J. (2023). Identification and gene expression analysis of serine proteases and their homologs in the Asian corn borer *Ostrinia furnacalis*. *Scientific Reports*, 13(1): 4766. doi: 10.1038/s41598-023-31830-2
- Yang, L., Yang, G. y Zhang, X. (2014b). The miR-100-mediated pathway regulates apoptosis against virus infection in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 40(1): 146-153. doi: 10.1016/j.fsi.2014.06.019
- Yao, X., Wang, L., Song, L., Zhang, H., Dong, C., Zhang, Y., Qiu, L., Shi, Y., Zhao, J. y Bi, Y. (2010). A Dicer-1 gene from white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Expression pattern in the processes of immune response and larval development. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(4): 565-570. doi: 10.1016/j.fsi.2010.05.016
- Yu, J., Wu, F.Y., Zou, F.M., Jia, J.Q., Wang, S.P., Zhang, G.Z., Guo, X.J. y Gui, Z.Z. (2012). Identification of ecdysone response elements (EcREs) in the *Bombyx mori* cathepsin D promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(1): 113-118. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.068
- Chen Y.L., Lu, P.J. y Tsai, I.H. (1991). Collagenolytic activity of crustacean midgut serine proteases: Comparison with the bacterial and mammalian enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 100(4): 763-768. doi: 10.1016/0305-0491(91)90287-N
- Zahn, A., Furlong, L.I., Biancotti, J.C., Ghiringhelli, P.D., Marín-Briggiler, C.I. y Vazquez-Levin, M.H. (2002). Evaluation of the proacrosin/acrosin system and its mechanism of activation in human sperm extracts. *Journal of Reproductive Immunology*, 54(1-2): 43-63. doi:

10.1016/S0165-0378(01)00080-8

Zhang, X., Xiang, J., Yuan, J. y Li, F. (2023). Penaeid shrimp chromosome studies entering the post genomic era. *Genes*, 14(11): 2050. doi: 10.3390/genes14112050.

Zhang, D., Wang, F., Dong, S. y Lu, Y. (2016). De novo assembly and transcriptome analysis of osmoregulation in *Litopenaeus vannamei* under three cultivated conditions with different salinities. *Gene*, 578(2): 185-193. doi: 10.1016/j.gene.2015.12.026

Zhang, X., Yuan, J., Sun, Y., Li, S., Gao, Y., Yu, Y., Liu, C., Wang, Q., Lv, X., Zhang, X., Ma, K.Y., Wang, X., Lin, W., Wang, L., Zhu, X., Zhang, C., Zhang, J., Jin, S., Yu, K., Kong, J., Xu, P., Chen, J., Zhang, H., Sorgeloos, P., Sagi, A., Alcivar-Warren, A., Liu, Z., Wang, L., Ruan, J., Chu, K.H., Liu, B., Li, F. y Xiang, J. (2019). Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nature Communications*, 10: 356. doi: 10.1038/s41467-018-08197-4

11. ANEXOS

Anexo A. dsRNA utilizado para los bioensayos de silenciamiento dsRNA

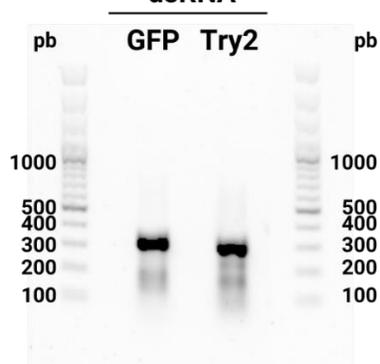


Figura 13. dsRNA que se utilizó para el bioensayo-3. El dsRNA-GFP tiene 359 pb, y el dsRNA-Try2 tiene 345 pb. El estándar de pesos moleculares corresponde a una escalera de DNA de 100 pb (SM0323 Thermo Scientific). Gel de agarosa 1%.

Anexo B. Análisis de las secuencias de tripsina en *P. vannamei*

	Gen 1	Gen 2	Gen 3
Gen 1 (Y15039.1)	100		
Gen 2 (Y15040.1)	94.02	100	
Gen 3 (Y15041.1)	93.26	92.54	100

Figura 14. Matriz de porcentaje de identidad de tres genes de tripsina de *P. vannamei*. Porcentajes obtenidos mediante alineamiento de dos o más secuencias con BLASTn.

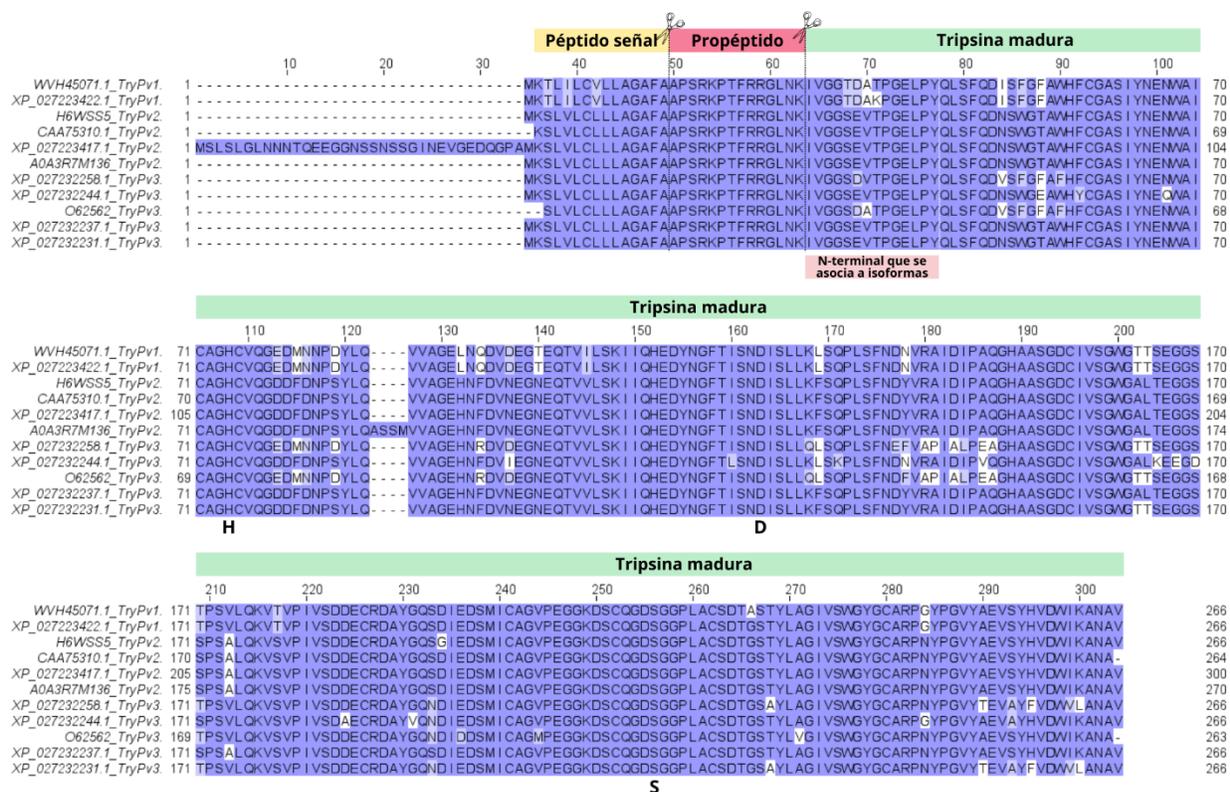


Figura 15. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las tripsinas de *P. vannamei*. Los aa en negritas debajo del alineamiento forman la triada catalítica. La barra rosa indica la secuencia de aa que Sainz *et al.* (2004b) utilizaron para asociar las isotripsinas con las variantes de cDNA reportadas por Klein *et al.* (1996).

Percent Identity Matrix

	XP_027232244.1_TryPv3	XP_027232231.1_TryPv3	A0A3R7M136_TryPv2	H6WSS5_TryPv2	CAA75310.1_TryPv2	XP_027223417.1_TryPv2	XP_027232237.1_TryPv3	WVH45071.1_TryPv1	XP_027223422.1_TryPv1	XP_027232258.1_TryPv3	O62562_TryPv3
XP_027232244.1_TryPv3	100.00%	91.35%	93.23%	92.86%	93.18%	93.23%	93.23%	86.84%	86.84%	85.71%	85.93%
XP_027232231.1_TryPv3	91.35%	100.00%	95.49%	95.11%	95.45%	95.49%	95.49%	88.72%	88.72%	92.11%	88.59%
A0A3R7M136_TryPv2	93.23%	95.49%	100.00%	99.62%	100.00%	100.00%	100.00%	89.47%	89.47%	87.59%	88.59%
H6WSS5_TryPv2	92.86%	95.11%	99.62%	100.00%	99.62%	99.62%	99.62%	89.10%	89.10%	87.22%	88.21%
CAA75310.1_TryPv2	93.18%	95.45%	100.00%	99.62%	100.00%	100.00%	100.00%	89.39%	89.39%	87.50%	88.59%
XP_027223417.1_TryPv2	93.23%	95.49%	100.00%	99.62%	100.00%	100.00%	100.00%	89.47%	89.47%	87.59%	88.59%
XP_027232237.1_TryPv3	93.23%	95.49%	100.00%	99.62%	100.00%	100.00%	100.00%	89.47%	89.47%	87.59%	88.59%
WVH45071.1_TryPv1	86.84%	88.72%	89.47%	89.10%	89.39%	89.47%	89.47%	100.00%	99.25%	88.72%	90.49%
XP_027223422.1_TryPv1	86.84%	88.72%	89.47%	89.10%	89.39%	89.47%	89.47%	99.25%	100.00%	88.72%	90.49%
XP_027232258.1_TryPv3	85.71%	92.11%	87.59%	87.22%	87.50%	87.59%	87.59%	88.72%	88.72%	100.00%	95.82%
O62562_TryPv3	85.93%	88.59%	88.59%	88.21%	88.59%	88.59%	88.59%	90.49%	90.49%	95.82%	100.00%

Figura 16. Matriz de porcentaje de identidad de las proteínas de tripsina de *P. vannamei*.

Tabla 7. BLASTn de los genes de tripsina en *P. vannamei* descritos por Klein *et al.* (1998)

Gen de tripsina	Identidad	Cobertura	Valor e	ID del transcrito en el NCBI	ID del gen en NCBI*
Y15039.1 (Gen 1)	100.0%	100%	0.0	MH734255.1	-
	100.0%	65%	0.0	PP817223.1	-
	100.0%	65%	0.0	X86369.1	-
	99.4%	65%	0.0	XM_027367621.1	113815561
Y15040.1 (Gen 2)	99.8%	60%	0.0	XM_027367624.1	113815565
Y15041.1 (Gen 3)	98.0%	63%	0.0	XM_027376486.1	113823795

*Asociado al transcrito por el propio NCBI

Tabla 8. BLASTx de los genes de tripsina en *P. vannamei* descritos por Klein *et al.* (1998)

ID del gen	Identidad	Cobertura	Valor e	ID de la proteína en el NCBI	ID del gen en el NCBI
Y15039.1 (Gen 1)	86.2%	71%	3E-161	WVH45071.1	113815561
Y15040.1 (Gen 2)	100.0%	56%	7E-120	XP_027223417.1	113815556
Y15041.1 (Gen 3)	100.0%	64%	6E-129	CAA75311.1	113823738

Anexo C. Tripsinas putativas en el genoma de *P. vannamei*

Con la revisión del genoma de referencia (ASM378908v1), se encontró que *P. vannamei* contiene 11 genes etiquetados como tripsina, dos de los cuales serían pseudogenes (Tabla 9).

Tabla 9. Scaffolds, genes, transcritos, y proteínas de tripsina en *P. vannamei* de acuerdo a las anotaciones del NCBI en el genoma de referencia (ASM378908v1)

Scaffold	ID del gen	Posición dentro del scaffold	Longitud (nt)	Exones	ID del transcrito	Longitud (nt)	Longitud (nt) del CDS	ID de la proteína	Longitud (aa)	ID de la proteína en UniProt
NW_020870094.1 955 072 pb (20 genes)	113815555	+ 454 101 - 454 892	792	2	XM_027367615.1	792	630	XP_027223416.1	266	H6WP42
	113815556 (Y15040.1)	- 456 270 - 457 662	1 393	3	XM_027367616.1	1 393	809	XP_027223417.1	300	H6WSS5
	113815560	- 705 557 - 708 517	2 961	3	XM_027367620.1	2 961	795	XP_027223421.1	264	-
	113815561 (Y15039.1)	- 716 512 - 717 868	1 357	3	XM_027367621.1	1 357	801	XP_027223422.1	266	A0A423SXN9, H6WP42
	113815562	+ 719 220 - 720 630	1 411	3	XM_027367622.1	1 411	801	XP_027223423.1	266	A0A3R7NWS2, A0A423TS87
	113815563	+ 722 713 - 724 094	1 382	3	XR_003476602.1	1 382	-	misc_RNA= pseudo	-	-
	113815564	- 725 751 - 727 078	1 328	-	-	-	-	Pseudo	-	-
NW_020868573.1 891 564 pb (20 genes)	113823738 (Y15041.1)	+ 53 478 - 74 317	20 840	9	XM_027367624.1	1 475	801	XP_027223425.1	266	H6WSS5
					XM_027367643.1	1 416	801	XP_027232244.1 (X3)	266	A0A423TS87
					XM_027367643.1	4 792	801	XP_027232237.1 (X2)	266	H6WSS5
					XM_027367643.1	17 433	801	XP_027232231.1 (X1)	266	H6WSS5
					XM_027367645.1	17 405	801	XP_027232258.1 (X5)	266	A0A423TS92, A0A423TSA5
					XM_027367645.1	1 294	801	XP_027232251.1 (X4)	266	A0A423TS92, A0A423TSA5
					XM_027367647.1	1 417	801	XP_027232277.1	266	A0A423TS92
				XM_027367648.1	1 344	801	XP_027232287.1	266	A0A3R7ME08, A0A423TS92	

Los símbolos ± que se encuentran a lado del ID de cada gen, indican la dirección del gen dentro del scaffold.

XP_027223421.1 tiene un dominio tripsina que también es relacionado a Acrosina (aa 20-261) por el sistema de clasificación Panther (miembro de InterPro 100.0), véase Tabla 11. Los otros dos genes sombreados están anotados como pseudogenes. XR_ (RNA no codificante).

El alineamiento de Y15041.1 con los tres genes de tripsina del scaffold NW_020868573.1 (Tabla 10) apoyó que el gen 3 se relaciona a 113823738.

Tabla 10. Porcentajes de identidad* entre el gen 3 (Y15041.1) y tres genes putativos de tripsina

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> 113823738		2021	5517	100%	0.0	97.71%	20840	Query_5814073
<input checked="" type="checkbox"/> 113823795		1443	1507	73%	0.0	97.73%	1344	Query_5814074
<input checked="" type="checkbox"/> 113823785		1415	1479	73%	0.0	97.14%	1417	Query_5814075

*BLASTn.

Las secuencias de proteína mostradas en la tabla Tabla 9 se analizaron en InterPro 100.0 <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>, consorcio de bases de datos que clasifica las proteínas en familias, predice dominios y sitios importantes (Paysan-Lafosse *et al.*, 2023). El análisis mostró que todas las secuencias contienen el dominio tripsina (IPR001254), la triada catalítica, el sitio de corte y los sitios de unión del sustrato (Tabla 11). Adicionalmente, se halló que XP_027223421.1 (codificada por el gen 113815560) podría estar relacionada con la acrosina. La acrosina es una proteína similar a tripsina (su actividad se cuantifica con BApNA y se une a SBTI) que es liberada por los espermatozoides durante la fertilización del óvulo (Howe *et al.*, 1991). La acrosina está conformada por un dominio de tripsina, y puede tener otros dominios cuya identidad (CUB, CLIP, etc.) varía de acuerdo con los diferentes grupos de organismos. (Kodama *et al.*, 2001; Zahn *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2022). La acrosina (con dominio CLIP) también se expresa en corazón en el langostino malayo *Macrobrachium rosenbergii* (Chang *et al.*, 2022). XP_027223421.1 es la proteína que menor porcentaje de identidad (66.16% - 69.58%) comparte con las demás tripsinas putativas, la cuales comparten > 85.34% de identidad (Fig. 17 del Anexo C).

Tabla 11. Sitios importantes en las tripsinas putativas de *P. vannamei* (Tabla 9) de acuerdo con InterPro 100.0

Scaffold	ID del gen	Longitud (nt) del CDS	ID de la proteína	Longitud (aa)	Secuencia señal u otro	Región trans-membranal	Sitio de corte	Dominio Tripsina	Sitio activo	Sitios de unión del sustrato	N-terminal de tripsina madura	
NW_020870094.1 955 072 pb (20 genes)	113815555	630	XP_027223416.1	266	1-15	-	30(I)	29-266	74H, 125D, 218S	212D, 237S, 239G	IVGGSEVT	
	113815556 (Y15040.1)	809	XP_027223417.1	300	1-33 extra-celular†	34-51	64(I)	63-300	108H, 159D, 252S	246D, 271S, 273G	IVGGSEVT	
	113815560	795	XP_027223421.1*	264	1-15	-	30(I)	29-263*	74H, 125D, 215S	209D, 234S, 236G	IVGGTDAT	
	113815561 (Y15039.1)	801	XP_027223422.1	266	1-15	-	30(I)	29-266	74H, 125D, 218S	212D, 237S, 239G	IVGGTDAK	
	113815562	801	XP_027223423.1	266	1-15	-	30(I)	29-266	74H, 125D, 218S	212D, 237S, 239G	IVGGSEVT	
	113815563	-	misc_RNA= pseudo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	113815564	-	Pseudo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	113815565	801	XP_027223425.1	266	1-15	-	30(I)	29-266	74H, 125D, 218S	212D, 237S, 239G	IVGGSEVT	
NW_020868573.1 891 564 pb (20 genes)	801	XP_027232244.1 (X3)	266	1-15	-	30(I)	29-266	74H, 125D, 218S	212D, 237S, 239G	IVGGSEVT		
	113823738 (Y15041.1)	801	XP_027232237.1 (X2)	266	1-15	-	30(I)	29-266	74H, 125D, 218S	212D, 237S, 239G	IVGGSEVT	
	801	XP_027232231.1 (X1)	266	1-15	-	30(I)	29-266	74H, 125D, 218S	212D, 237S, 239G	IVGGSEVT		
	801	XP_027232258.1 (X5)	266	1-15	-	30(I)	29-266	74H, 125D, 218S	212D, 237S, 239G	IVGGSDVT		
	801	XP_027232251.1 (X4)	266	1-15	-	30(I)	29-266	74H, 125D, 218S	212D, 237S, 239G	IVGGSDVT		
	113823785	801	XP_027232277.1	266	1-15	-	30(I)	29-266	74H, 125D, 218S	212D, 237S, 239G	IVGGSDVT	
	113823795	801	XP_027232287.1	266	1-15	-	30(I)	29-266	74H, 125D, 218S	212D, 237S, 239G	IVGGSDVT	

* A diferencia de las demás secuencias de ésta tabla, el dominio tripsina de XP_027223421.1 también es relacionado a Acrosina (aa 20-261) por el sistema de clasificación Panther (miembro de InterPro 100.0).

Los otros dos genes sombreados (113815563 y 113815564) están anotados como pseudogenes por el NCBI.

† Phobius (InterPro 100.0) predijo una región transmembranal (aa 34-51) en XP_027223417.1.

Percent Identity Matrix

	XP_027223421.1	XP_027232258.1	XP_027232251.1	XP_027232287.1	XP_027232277.1	XP_027223416.1	XP_027223422.1	XP_027223423.1	XP_027232244.1	XP_027232231.1	XP_027223417.1	XP_027232237.1	XP_027223425.1
XP_027223421.1	100.00%	68.82%	68.82%	68.82%	68.06%	68.06%	69.58%	66.92%	66.16%	67.68%	66.92%	66.92%	66.92%
XP_027232258.1	68.82%	100.00%	100.00%	99.25%	98.12%	89.85%	88.72%	85.71%	85.71%	92.11%	87.59%	87.59%	87.59%
XP_027232251.1	68.82%	100.00%	100.00%	99.25%	98.12%	89.85%	88.72%	85.71%	85.71%	92.11%	87.59%	87.59%	87.59%
XP_027232287.1	68.82%	99.25%	99.25%	100.00%	98.12%	89.47%	88.72%	85.34%	85.34%	91.73%	87.22%	87.22%	87.22%
XP_027232277.1	68.06%	98.12%	98.12%	98.12%	100.00%	87.97%	86.84%	86.09%	86.84%	90.23%	87.97%	87.97%	87.97%
XP_027223416.1	68.06%	89.85%	89.85%	89.47%	87.97%	100.00%	96.24%	91.73%	90.23%	92.48%	93.23%	93.23%	93.23%
XP_027223422.1	69.58%	88.72%	88.72%	88.72%	86.84%	96.24%	100.00%	88.35%	86.84%	88.72%	89.47%	89.47%	89.47%
XP_027223423.1	66.92%	85.71%	85.71%	85.34%	86.09%	91.73%	88.35%	100.00%	97.74%	90.60%	93.23%	93.23%	92.86%
XP_027232244.1	66.16%	85.71%	85.71%	85.34%	86.84%	90.23%	86.84%	97.74%	100.00%	91.35%	93.23%	93.23%	92.86%
XP_027232231.1	67.68%	92.11%	92.11%	91.73%	90.23%	92.48%	88.72%	90.60%	91.35%	100.00%	95.49%	95.49%	95.11%
XP_027223417.1	66.92%	87.59%	87.59%	87.22%	87.97%	93.23%	89.47%	93.23%	93.23%	95.49%	100.00%	100.00%	99.62%
XP_027232237.1	66.92%	87.59%	87.59%	87.22%	87.97%	93.23%	89.47%	93.23%	93.23%	95.49%	100.00%	100.00%	99.62%
XP_027223425.1	66.92%	87.59%	87.59%	87.22%	87.97%	93.23%	89.47%	92.86%	92.86%	95.11%	99.62%	99.62%	100.00%

Figura 17. Matriz de porcentaje de identidad de las tripsinas putativas de *P. vannamei*.

XP_027223417.1 (codificada por el gen 113815556/Y15040.1) es la tripsina putativa más grande (300 aa), según los modelos predictivos (InterPro 100.0) podría tener un dominio extracelular (aa 1-33), uno transmembranal (aa 34-51) y uno intracelular (aa 64-300). Cabe mencionar que de acuerdo con los comentarios anotados para el gen, las secuencias RefSeq, tanto la del RNA (XM_027367616.1) como la de la proteína (XP_027223417.1), fueron modificadas en relación a la secuencia genómica, añadiéndole 1 046 bases nucleotídicas al transcrito (XM_027367616.1),

no halladas en el ensamble genómico para representar la secuencia codificante (CDS) inferida. XP_027223417.1 (300 aa) es una versión más grande de H6WSS5 (266 aa) (Tabla 6).

Con el objetivo de corroborar la identidad de las tripsinas que se expresan en la GD de *P. vannamei*, se hizo un tBLASTn de la presunta tripsina C (H6WSS5) contra un transcriptoma de GD de camarones de 4-6 g sanos o controles (Tinwongger *et al.*, 2019), a través de CrustyBase, <https://crustybase.org/> (Hyde *et al.*, 2020). El tBLASTn resultó en 20 secuencias o contig_id (junto con la información de sus secuencias de aa y sus niveles de expresión) a las que se les hizo un BLASTp, para comparar con los números de identificación (ID) previamente obtenidos (Tabla 6). Se revisó que estas secuencias de proteína resultantes no tuvieran dominios adicionales al de tripsina, en la sección *Conserved Domain Database* (CDD en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) del NCBI, y se ordenaron conforme al nivel de expresión génica (TMM de Trimmed Mean of M-values) en orden descendente (Tabla 12).

Tabla 12. Resultado del tBLASTn de H6WSS5 (tripsina C putativa) contra el transcriptoma de GD de *P. vannamei* (Tinwongger *et al.*, 2019) en CrustyBase.

contig_id	Expresión génica (TMM) en GD	Tamaño (aa)	Resultado del BLASTp	Gen	Scaffold	Tamaño (aa)	Identidad	Cobertura	Valor-e	Notas
DN22666_c3_g5	32125.3	224	AEZ67461.1	Alelo 113815561	NW_020870094.1	266	100.0% (224/224)	100%	4E-163	AEZ67461.1 tiene ³⁰ IVGGTDAT ₃₇ asociada a la tripsina A
			XP_027223422.1	Alelo 113815561	NW_020870094.1	266	100.0% (224/224)	100%	5E-163	XP_027223422.1 tiene ³⁰ IVGGTDAK ₃₇ asociado a la tripsina B
			WVH45071.1	Alelo 113815561	NW_020870094.1	266	99.5% (223/224)	100%	2E-162	WVH45071.1 tiene ³⁰ IVGGTDAT ₃₇ (tripsina A) y SDTASTY, los otros dos tienen ²²⁵ SDTGSTY ₂₃₁
DN24873_c0_g1	224.5	272	XP_027219590.1	113811939	NW_020869704.1	272	100.0% (272/272)	100%	0.0	IVGGEVAT
DN55264_c0_g1	120.4	215	XP_027223421.1	113815560	NW_020870094.1	264	100% (215/215)	100%	1E-154	IVGGTDAT
DN46368_c0_g1	79.4	99	XP_027223421.1	113815560	NW_020870094.1	264	98.0% (97/99)	100%	4E-63	IVGGTDAT
DN15674_c0_g1	77.7	282	XP_027230401.1	113822075	NW_020870823.1	304	98.2% (277/282)	100%	0.0	IVGGVGAS
DN15619_c0_g1	74.2	275	XP_027216391.1	113809101	NW_020869391.1	270	98.9% (267/270)	98%	0.0	IVGGEDAV
DN11241_c0_g1	47.1	273	XP_027226181.1	113818203	NW_020870376.1	267	100% (267/267)	97%	0.0	IVGGQDSF
DN20591_c0_g1	26.1	279	XP_027231565.1	113823146	NW_020870959.1	276	99.6% (275/276)	98%	0.0	IVGGQEVE
DN22822_c0_g1	25.4	362	XP_027232966.1	113824427	NW_020871102.1	355	98.1% (355/362)	100%	0.0	No tiene GG de la IVGG
DN15918_c0_g1	18.1	314	XP_027238744.1	113829771	NW_020872562.1	314	100% (314/314)	100%	0.0	IVGGIVTE
DN22265_c0_g1	7.4	338	XP_027237466.1	113828658	NW_020872420.1	338	100% (338/338)	100%	0.0	IVGGSPA

También se buscó qué tripsinas se expresan en branquias. Con CrustyBase, se analizó un transcriptoma de camarones de 30-40 mm de largo (Zhang *et al.*, 2016), y se siguió la misma lógica que con los resultados del transcriptoma de GD, para identificar las secuencias de tripsina (Tabla 13). Zhang *et al.* (2016) investigaron la expresión génica en branquias de camarones mantenidos

en agua con tres diferentes salinidades. Bajo cualquiera de las tres salinidades, la expresión de la tripsina (XP_027223422.1) fue prácticamente nula, y al igual que en GD, la secuencia N-terminal de la tripsina C madura (IVGGSEVT/IVGGTEVT) no se halló (Tabla 13).

Tabla 13. Resultado del tBLASTn de H6WSS5 (tripsina C putativa) contra el transcriptoma de branquias de *P. vannamei* (Zhang *et al.*, 2016) en CrustyBase

contig_id	Expresión génica (RPKM) en branquias			Tamaño (aa)	Resultado del BLASTp	Gen	Scaffold	Tamaño (aa)	Identidad	Cobertura	Valor-e	Notas
	Marina (30 ups o control)	Salobre (15 ups)	Dulce									
c232587_c1_s1	0.00	1.95	0.00	266	XP_027223422.1	113815561	NW_020870094.1	266	99.6% (265/266)	100%	0.0	Isotripsina B IVGGTDAK
c205441_c0_s1	1.00	0.58	0.56	278	XP_027230401.1	113822075	NW_020870823.1	304	98.2% (273/278)	100%	0.0	IVGGVGAS
c223920_c0_s1	0.16	0.18	1.22	295	XP_027237466.1	113828658	NW_020872420.1	338	99.66% (294/295)	100%	0.0	IVGGSPA

Por último, se analizaron las tripsinas halladas mediante proteómica en GD de *P. vannamei* por Estrella-Soliz (2002). Dicho estudio encontró la expresión de cuatro tripsinas (A0A3R7ME08, A0A423SXG7, A0A3R7M136 y A0A3R7NWS2), y tomando en cuenta los datos de Klein *et al.* (1996) y Sainz *et al.* (2004b), sugirió que en la GD se expresan al menos seis isotripsinas (Estrella-Soliz, 2022). Para homologar los números de identificación (IDs) de las proteínas dados por los autores (IDs del proteoma UP000283509 en UniProt) con los utilizados en esta investigación (IDs RefSeq), y así saber qué genes de tripsina se expresaron, se realizó un tBLASTn (Tabla 14). La tripsina (proteína) que más se expresó (6-32 veces más) en GD es la XP_027232287.1 (= A0A3R7ME08), la cual no está asociada a ninguna de las isotripsinas conocidas (C, B, A). Sin embargo, la tripsina cuya expresión (proteína) cambia significativamente con la ingesta de alimento (3h postprandial) es la tripsina XP_027223422.1 (=A0A3R7M136), que corresponde a la isotripsina C.

Tabla 14. Resultado del tBLASTn de las tripsinas halladas en proteoma de GD de *P. vannamei* (Estrella-Soliz, 2022)

ID de la proteína en UniProt	Tamaño (aa)	Identidad	Cobertura	Valor e	Transcrito	ID de la proteína en NCBI	Tamaño (aa)	ID del gen	N-terminal de la tripsina madura
A0A3R7M136	270	98.5%	100%	0.0	XM_027367616.1	ROT68888.1 relacionada con (XP_027223417.1)	270	113815556 (Gen 2 Y15040.1): tripsina C	IVGGSEVT
A0A423SXN9	266	94.7%	100%	0.0	XM_027367621.1	XP_027223422.1	266	113815561 (Gen 1 Y15039.1): tripsina B	IVGGTDAK
A0A423SXG7	228	88.8%	96%	9E-139	JQ277721.1 (relacionada con XM_027367615.1)	ROT68887.1 (relacionada con XP_027223416.1)	228	113815555	A0A423SXG7= ROT68887.1, no tienen IVGG (XP_027223416.1 sí tiene)
A0A3R7NWS2	266	100%	100%	0.0	XM_027367622.1	XP_027223423.1	266	113815562	IVGGSEVT
A0A423TSA5	266	94.7%	100%	0.0	XM_027376457.1	XP_027232258.1 (X5)	266	113823738 (Gen 3): Variante X5	IVGGSDVT
A0A3R7ME08*	266	94.7%	100%	0.0	XM_027376486.1	XP_027232287.1*	266	113823795	IVGGSDVT

* A0A3R7ME08 (=XP_027232287.1) es 6-32 veces más abundante que A0A423SXG7, A0A3R7NWS2 y A0A3R7M136 (Estrella-Soliz, 2022).

Anexo D. Expresión génica absoluta de peptidasas de la GD

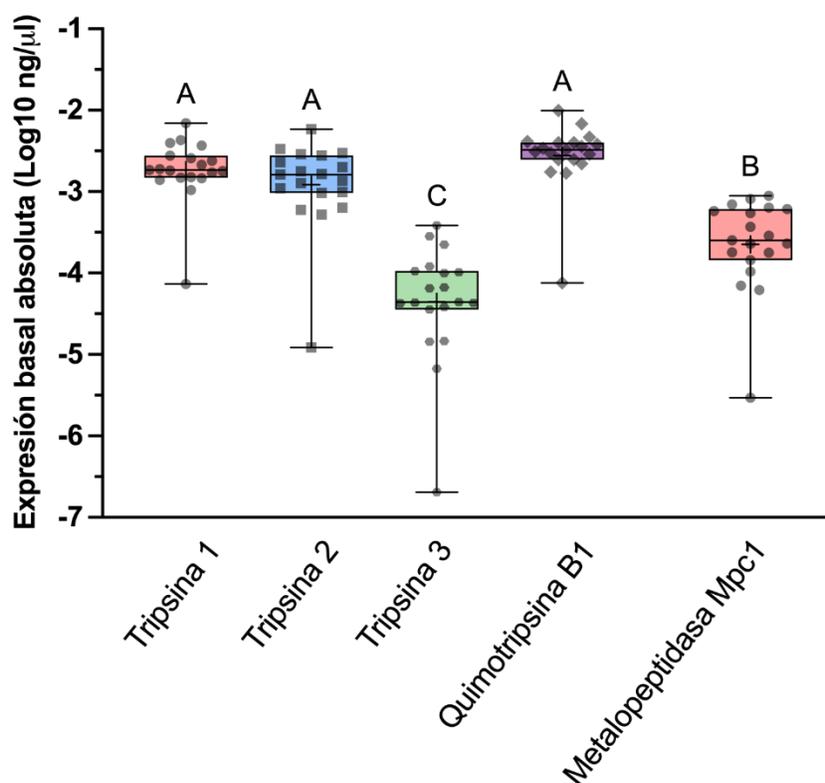


Figura 18. Expresión génica absoluta de peptidasas de la GD. Camarones controles sin inyectar del Bioensayo-1. Las diferencias de letras denotan la diferencia estadística ($p < 0.05$) entre tratamientos determinada mediante ANOVA de una vía ($n = 19$).

Anexo E. Prebioensayo-2

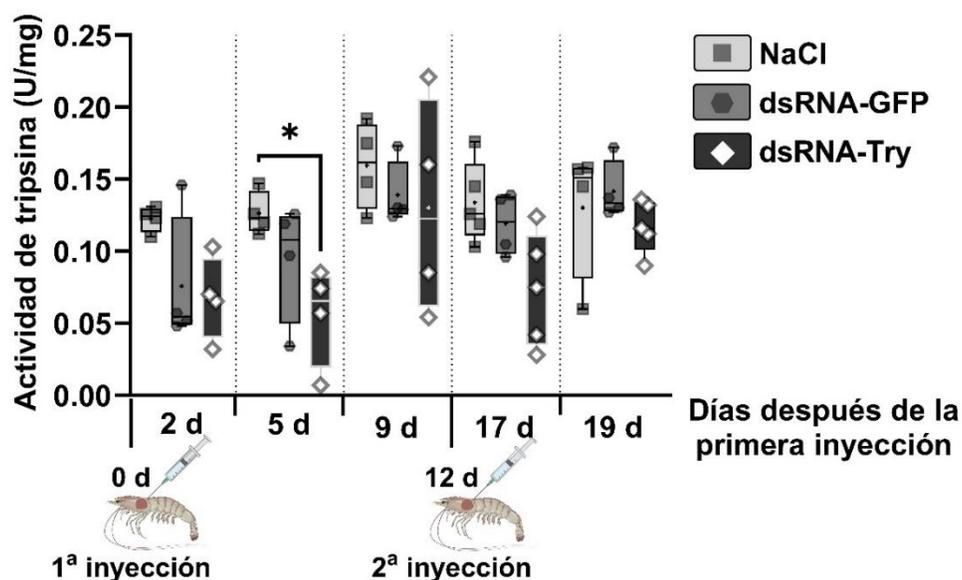


Figura 19. Actividad de la tripsina con una o dos dosis del tratamiento (Prebioensayo-2). Actividad a 2, 5 y 9 días (d) después de la primera inyección (una dosis) de tratamiento. A los 12 d se administró la segunda dosis: Actividad a 5d (17d) y (19d) 7d después de la segunda inyección (dos dosis). Sustrato: BA_pNA 1 mM a pH 8. Cada punto representa la actividad en GD de un solo espécimen de camarón. El asterisco (*) denota la diferencia estadística entre tratamientos determinada mediante la prueba post hoc de comparación múltiple de Dunn (n= 4-5). * $p < 0.05$.

Anexo F. Pesos de especímenes de camarón (Bioensayo-2)

Tabla 15. Diferencias de peso de los especímenes de *P. vannamei* del Bioensayo-2

	Diferencias* de peso (g) promedio		
	5 días	11 días	17 días
	1 iny.	2 iny.	3 iny.
NaCl	1.6	1.1	-0.3
dsRNA-GFP	1.1	0.8	-1
dsRNA-Try2	0.6	1.3	-1.4

* Las diferencias se calcularon a partir de los pesos obtenidos al muestrear menos los pesos obtenidos durante la inyección previa. Por ejemplo, la primera columna de la tabla se calculó con el peso promedio de los especímenes (n=10) del muestreo 1 (M1) menos el peso promedio de los especímenes al momento de la inyección 1 ($P_{M1} - P_{I1}$). Lo mismo se realizó para la segunda ($P_{M2} - P_{I2}$) y tercera ($P_{M3} - P_{I3}$) columna.

Anexo G. Aminoácidos en músculo de *P. vannamei*

Tabla 16. Aminoácidos* no esenciales en músculo de *P. vannamei*

	dsRNA	Ácido glutámico	Ácido aspártico	Serina	Glicina	Alanina	Tirosina	Prolina
M2 B2	GFP	9.49 ± 0.09	14.75 ± 0.12	2.87 ± 0.01	10.15 ± 0.18	6.89 ± 0.06	3.04 ± 0.05	6.91 ± 0.28
2 iny.	Try2	10.44 ± 0.76	15.95 ± 1.22	3.23 ± 0.20	10.93 ± 0.53	7.37 ± 0.46	3.39 ± 0.27	17.49 ± 0.89
M3 B2	GFP	9.11 ± 0.24	14.35 ± 0.33	2.80 ± 0.06	9.36 ± 0.48	6.40 ± 0.18	2.91 ± 0.09	9.23 ± 0.86
3 iny.	Try2	10.79 ± 0.20	16.29 ± 0.30	3.38 ± 0.10	11.47 ± 0.45	7.80 ± 0.11	3.61 ± 0.08	16.22 ± 1.32

*Los valores representan [mg aminoácido/ g muestra]. Promedio ± error estándar (n= 3)

Tabla 17. Aminoácidos* esenciales en músculo de *P. vannamei*

	dsRNA	Arginina	Leucina	Fenilalanina	Lisina	Isoleucina	Valina	Treonina	Histidina
M2 B2	GFP	8.18 ± 0.10	6.86 ± 0.14	4.87 ± 0.09	2.54 ± 0.09	4.08 ± 0.06	3.86 ± 0.04	3.20 ± 0.03	1.37 ± 0.03
2 iny.	Try2	9.00 ± 0.64	7.76 ± 0.56	5.01 ± 0.29	6.19 ± 0.80	4.56 ± 0.26	4.35 ± 0.29	3.68 ± 0.24	NC
M3 B2	GFP	7.58 ± 0.17	6.51 ± 0.17	4.67 ± 0.10	2.70 ± 0.24	3.89 ± 0.09	3.75 ± 0.12	3.16 ± 0.08	1.37 ± 0.03
3 iny.	Try2	8.94 ± 0.18	8.06 ± 0.16	5.32 ± 0.23	5.72 ± 0.25	4.89 ± 0.09	4.64 ± 0.08	3.82 ± 0.06	NC

*Los valores representan [mg aminoácido/ g muestra]. Promedio ± error estándar (n= 3).

NC: no cuantificable

Anexo H. Perfil de proteínas y peptidasas en GD (Bioensayo-2)

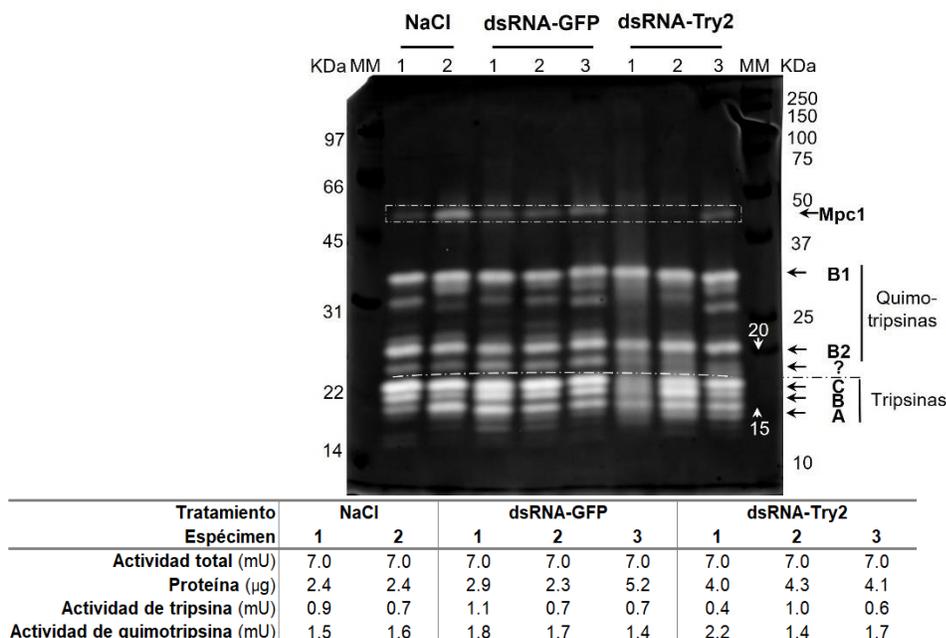


Figura 20. Perfil de peptidasas con tres inyecciones de tratamiento en GD de *P. vannamei* (Bioensayo-2) Zimograma (sustrato: caseína al 3% pH 8) de ocho especímenes inyectados con NaCl, dsRNA-GFP o dsRNA-Try2, con 7 mU de actividad por carril en el gel (poliacrilamida al 12%), véase la tabla. MM: Marcador de peso Molecular. Las flechas blancas señalan las bandas correspondientes a los pesos moleculares indicados.