



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**LIPASAS EN *Penaeus vannamei*: GENES Y
PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA HIDRÓLISIS
DE TRIACILGLICÉRIDOS**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

p r e s e n t a

Crisalejandra Rivera Pérez

La Paz, B.C.S. Agosto de 2010

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:45 horas del día 12 del Mes de Julio del 2010, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"LIPASAS EN *Penaeus vannamei*: GENES Y PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA HIDRÓLISIS DE TRIACILGLICÉRIDOS"

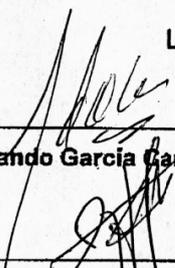
Presentada por el alumno:

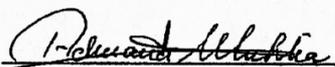
Crisalejandra Rivera Pérez

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA

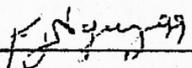
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

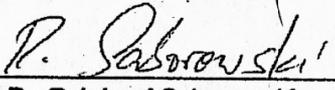
LA COMISION REVISORA

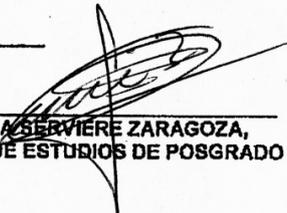

Dr. Fernando Garcia Garreño


Dra. Adriana Muhlia Almazan


Dr. Julio Córdova Murueta


Dr. Fernando Noriega


Dr. Reinhard Saborowski


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Resumen

Una de las principales reservas de energía de todos los organismos son los triacilglicéridos, los cuales se encuentran almacenados como cuerpo graso, las enzimas responsables de su hidrólisis son las lipasas, estas enzimas participan en el proceso de digestión de los lípidos del alimento y de hidrólisis de aquellos almacenados como cuerpo graso en tejidos. Dada su participación en el catabolismo de lípidos y aunado a que se desconoce el proceso de lipólisis de los crustáceos, el estudio de las enzimas lipasas es importante para el entendimiento de la fisiología del camarón.

En esta investigación, se identificaron, aislaron y caracterizaron dos enzimas con actividad de lipasa: una lipasa digestiva (PVL), encontrada exclusivamente en la glándula digestiva y una lipasa intracelular (PV_IL) del camarón blanco *Penaeus vannamei*. A su vez se identificaron los transcritos que codifican a ambas enzimas *pvl* y *pv_il*. Se definió la función biológica de cada una de las enzimas, así como su participación en el ayuno. La lipasa digestiva PVL, se sintetiza en la glándula digestiva y está encargada de la hidrólisis de los triacilglicéridos del alimento; mientras que la lipasa intracelular, que se encontró en todos los tejidos que presentan motilidad y aquellos con depósitos de triacilglicéridos, está encargada de la hidrólisis de triacilglicéridos almacenados como reserva de energía. Durante el ayuno, en la glándula digestiva, el ARNm de *pvl* disminuye cuando los organismos no se están alimentando, así derivado de la ausencia de alimento surge necesidad de usar reservas para satisfacer las demandas de energía de las células; lo anterior se ve reflejado en un aumento del ARNm de *pv_il* durante el ayuno. Derivado de este estudio, se publicó la secuencia completa del ADN complementario (ADNc) de *pvl* (1,186 pb) con número de acceso en el GenBank FJ619564, y la secuencia parcial de *pv_il* (620 pb).

Palabras clave: *Penaeus vannamei*, lipasa digestiva, lipasa intracelular

Vo.Bo. Dr. Fernando García Carreño

Abstract

One of the main energy reserves in all organisms is the triacylglycerides, which are storage as fat body, the responsible enzymes of their hydrolysis are lipases, and these enzymes participate in the lipid digestion of food and those stored as fat body. Because these enzymes participate in the lipid catabolism, and the lipolysis process in crustaceans still unknown, the study of these enzymes is an important issue for understanding shrimp physiology,

In this research, it have been identified, isolated and characterized two enzymes with lipase activity, a digestive lipase (PVL), exclusively of the midgut gland and an intracellular lipase (PV_IL) of shrimp *Penaeus vannamei*, as well as the transcripts who codifies (*pvl*, *pv_il*). The biological function of these enzymes and their transcripts were defined as well as their participation in fasting periods. The digestive lipase (*pvl*), synthesized in the midgut gland, hydrolyze triacylglycerides from feed, while the intracellular lipase (*pv_il*), is synthesized in tissues associated with the movement and those with triacylglyceride storage, and seems to be involved in the triacylglycerides hydrolysis storage as energy reserve. During fasting, in the digestive gland, the RNAm of *pvl* decreased when organisms are not feed actively, indicating the need for energy reserves, this has been reflected in an increase of RNAm of *pv_il* through fasting. As part of this study, the full-length sequence of *pvl* (1,186 bp) and a partial sequence of *pv_il* (620 bp) cDNA has been published (GenBank accession number FJ619564).

Keywords: *Penaeus vannamei*, digestive lipase, intracellular lipase

VoBo. Dr. Fernando García Carreño

Dedicatoria

A mis padres por su amor, su cariño y por apoyar todas las decisiones que he tomado en todas las etapas de mi vida, por eso y más los amo con todo el corazón...

A mi hermano por estar siempre para mí en cualquier etapa de mi vida.

A mi familia, por su confianza, comprensión y paciencia.

Porque mis triunfos son los suyos.

Je les aime

Vale más un hoy que dos mañanas
crp

Agradecimientos

(Del latín gratus. Grato, agradable, agradecido.)

A CONACYT por el apoyo económico recibido (Beca 173780) y al proyecto para FGC: 80935.

A CIBNOR por la formación académica durante estos cinco años, maestría y doctorado (2005-2010).

A Posgrado por todo el apoyo otorgado, Dra. Thelma Castellano, Dra. Elisa Serviere, Lic. Osvelia, Lic. Leticia González, Claudia Olachea, Betty Galvez y Horacio Sandoval.

Al Laboratorio de Bioquímica por abrirme las puertas a un nuevo horizonte académico.

Al comité revisor de la tesis: Dr. Fernando García Carreño, Dr. Julio Córdova Murueta, Dr. Adriana Muhlia Almazán, Dr. Reinhard Saborowski y el Dr. Fernando Noriega.

A María de los Ángeles Navarrete del Toro por el entrenamiento técnico y asesoría durante mi estadía en BQ.

Al Dr. Fernando García Carreño, por sus enseñanzas académicas, los retos y los buenos momentos.

Al Dr. Julio Córdova Murueta por la asesoría en los análisis estadísticos, en el uso del EndNote, programas diversos y por enseñarme que siempre hay manera de divertirse en un laboratorio.

A la Dra. Patricia Hernández por su asesoría con los métodos de purificación de las lipasas, por su técnica de la “salecita”, por sus notas informativas dentro y fuera del laboratorio, por las largas charlas sobre la vida, por acogerme en su hogar y por su amistad.

A la Dra. Mariana Díaz, por estar siempre al pendiente de mi vida académica y personal, por sus consejos, su apoyo y su amistad incondicional.

Al MC Luis Leyva Soto por enseñarme que la vida puede ser tan relajada como uno se lo proponga, por sus recetas de cocina y por su amistad.

A Liliana Rojo, alias la ardilla menor, por su amistad, los buenos ratos, por sus bromas que hicieron amena la estadía en el laboratorio (¿qué es este ruido?: i, ii, iii, iv...).

A todos aquellos que dejaron un granito de arroz durante el desarrollo de esta tesis (observaciones, sugerencias, enseñanzas, ideas, apoyo, etc.), Carmen Contreras, Hugo Palafox, Jorge Rocha, Lili, Margarita Zamorano, Oliviert Martínez, Oswaldo, Claudia Maytorena, Luis Leyva, Marcela Velez, Fausto VzL.

A mi amor FVQ, quien compartió esta aventura conmigo, por su paciencia, comprensión durante todo el desarrollo de la tesis, pero sobre todo por ser parte integral de mi vida...y claro por hacer que el tiempo vuele...

A todas las personas que he tenido la suerte de conocer y trabajar con ellas desde que me incorporé al posgrado y que no menciono por temor a no recordarlos a todos.

Ab imo pectore

GRACIAS

Contenido

Lista de abreviaturas	i
Lista de figuras	ii
Lista de tablas	iii
Introducción	1
Marco Teórico	3
<i>Penaeus vannamei como modelo de estudio</i>	3
<i>El sistema digestivo de los crustáceos</i>	4
<i>Lipasas</i>	7
<i>Lipasas digestivas</i>	10
<i>Lipasas intracelulares</i>	13
Antecedentes	17
Hipótesis	28
Objetivo general	29
<i>Objetivos específicos</i>	29
Materiales y métodos	30
<i>Identificación y caracterización de las lipasas del camarón blanco</i>	30
<i>Obtención de las muestras</i>	30
<i>Determinación de la actividad de lipasa</i>	30
<i>Purificación de la lipasa digestiva</i>	32
<i>Purificación de la lipasa intracelular</i>	34
<i>Características moleculares de las lipasas</i>	36
<i>Características bioquímicas de las lipasas</i>	37
<i>Variables cinéticas $K_{M,app}$, $k_{cat,app}$ y $k_{cat}/K_{M,app}$ de las lipasas</i>	39
<i>Genes de lipasas: Identificación, caracterización y expresión</i>	39
<i>Organismos experimentales</i>	39
<i>Obtención de fragmentos internos del transcrito de las lipasas digestiva e intracelular</i> ...	42
<i>Obtención de la secuencia completa del transcrito de la lipasa digestiva</i>	44
<i>Identificación de la función biológica de las lipasas</i>	45
<i>Efecto del ayuno sobre la cantidad de transcritos de lipasas</i>	46
<i>Análisis estadístico</i>	48
Resultados	49
<i>Identificación y caracterización de las lipasas del camarón blanco</i>	49
<i>Identificación de lipasas en el camarón blanco</i>	49
<i>Purificación de la lipasa digestiva</i>	52
<i>Purificación de la lipasa intracelular</i>	55
<i>Características moleculares de lipasas de <i>P. vannamei</i></i>	57
<i>Características bioquímicas de las lipasas</i>	57
<i>Parámetros cinéticos de las lipasas</i>	61
<i>Genes de lipasas: Identificación, caracterización y expresión</i>	62
<i>Obtención de los fragmentos internos de los transcritos de las lipasas digestiva e intracelular</i>	62
<i>Obtención del transcrito de la lipasa digestiva</i>	65

<i>Identificación de la función biológica de las lipasas</i>	71
<i>Efecto del ayuno en la concentración de transcritos de pvl y pv_il</i>	72
Discusión	74
<i>Identificación y caracterización de las lipasas del camarón blanco</i>	74
<i>Genes de lipasas: Identificación, caracterización y expresión</i>	78
<i>Obtención e identificación de los transcritos de las lipasas</i>	78
<i>Función biológica de las lipasas</i>	81
<i>Efecto del ayuno en la concentración de transcritos de pvl y pv_il</i>	85
Conclusiones	89
Conclusiones generales	91
Referencias	93
Material suplementario	104

Lista de abreviaturas

ADP	Difosfato de adenosina
AKH	Hormona adipoquinética
AKHR	Receptor de la hormona adipoquinética
AMP	Mono fosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ATGL	Lipasa adiposa de triacilglicéridos
CMC	Concentración micelar crítica
DAG	Diacilglicéridos
DFP	Diisopropil fluorofosfato
E-600	Dietil- <i>p</i> -nitrofenil fosfato
Gc	Guanilil ciclasa
CMPC	3',5'-monofosfato de guanosina cíclico
HSL	Lipasa sensible a hormona
MAG	Monoacilglicéridos
MUF	Metil limberilferona
NaDC	Deoxicolato de sodio
NP	Péptido natriurético
Per	Perilipinas
PKA, PKG	Cinasa A, G
PMSF	Fenil metil sulfonil fuoruro
RACE	Rápida amplificación de extremos de ADNc
TAGs	Triacilglicéridos
THL	Tetrahidrolipstatin

Lista de figuras

Figura 1. Anatomía del camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	4
Figura 2. Estructura general y citología de la glándula digestiva de decápodos.	5
Figura 3. Estructura tridimensional de las lipasas.	9
Figura 4. Mecanismo de catálisis de las lipasas.....	12
Figura 5. Estructura del gen y la proteína de HSL.....	14
Figura 6. Activación de la HSL vía hormonal.	15
Figura 7. Modelo de la lipólisis en los insectos.	16
Figura 8. Efecto del ayuno y alimentación con sacarosa en <i>Drosophila</i>	25
Figura 9. Expresión cuantitativa del gen de lipasa (<i>bmm</i>) por Northern blot.	26
Figura 10. Lipasas de <i>Penaeus vannamei</i> en diferentes tejidos.....	49
Figura 11. Identificación de lipasas por medio de inhibidores en diferentes tejidos.....	50
Figura 12. Identificación de lipasas en la glándula digestiva.	51
Figura 13. Purificación de la lipasa digestiva del camarón blanco.....	53
Figura 14. Purificación de lipasa digestiva (PVL) por intercambio aniónico.	54
Figura 15. Purificación de la lipasa intracelular (PV_IL).....	56
Figura 16. Efecto de a) la temperatura y b) el pH, sobre la actividad de las lipasas.	59
Figura 17. Efecto de inhibidores sobre la actividad de las lipasas.	60
Figura 18. Efecto de la concentración de las sales biliares sobre PVL.	61
Figura 19. Fragmentos internos de <i>pvl</i> (335 pb) y <i>pv_il</i> (620 pb).	62
Figura 20. Secuencia deducida de aminoácidos de <i>pv_il</i> comparada con otras secuencias de lipasas.....	64
Figura 21. Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos de <i>pvl</i> de <i>P. vannamei</i>	66
Figura 22. Múltiple alineamiento de <i>pvl</i> y otras lipasas.	68
Figura 23. Comparación de secuencias deducidas de aminoácidos de lipasas de invertebrados.....	69
Figura 24. Relación filogenética de las lipasas de vertebrados, invertebrados y bacterias. .	70
Figura 25. Transcritos de las lipasas en diferentes tejidos de camarón blanco.	71
Figura 26. Cantidad relativa de los transcritos de <i>pvl</i>	73
Figura 27. Cantidad relativa de los transcritos de <i>pv_il</i>	73

Lista de tablas

Tabla I. Características generales de varias lipasas.	18
Tabla II. Genes de lipasas en invertebrados y características de las proteínas traducidas. ..	22
Tabla III. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de fragmentos de transcritos en este estudio.	44
Tabla IV. Tabla de purificación de la lipasa digestiva de <i>Penaeus vannamei</i>	55
Tabla V. Tabla de purificación de la lipasa intracelular de <i>Penaeus vannamei</i>	56
Tabla VI. Características moleculares de las lipasas de <i>Penaeus vannamei</i>	57
Tabla VII. Actividad específica de lipasas de <i>Penaeus vannamei</i>	58
Tabla VIII. Comparación de los valores cinéticos de las lipasas aisladas y lipasas de diferentes origen.	61
Tabla IX. Comparación de la región de la <i>lid</i> en varias lipasas.	67

Introducción

Los lípidos más abundantes en los seres vivos son las grasas neutras, las cuales consisten en una molécula de glicerol unida a uno, dos o tres ácidos grasos, por lo que también se les denomina triacilglicéridos (TAGs). Estos compuestos son una forma importante de almacenamiento de reservas de energía, ya que liberan el doble de energía por gramo, en comparación con carbohidratos. Estos y las proteínas se pueden transformar en grasas por acción enzimática y almacenar en las células del tejido adiposo.

En los crustáceos, la glándula digestiva es el principal sitio de almacenamiento de proteínas y lípidos, estos últimos en forma de TAGs. Este órgano también tiene como función la síntesis de enzimas digestivas (proteasas, carbohidrasas y lipasas) y de lipoproteínas como la HDL (high-density lipoprotein) (Yepiz-Plascencia et al., 2000; Muhlia-Almazán et al., 2005). Las lipasas (E.C. 3.1.1.3, triacilglicerol lipasas) juegan un papel importante en el metabolismo de lípidos y en la homeostasis de energía, ya que los ácidos grasos producidos por la hidrólisis de los TAGs mediante estas enzimas, son la principal fuente de energía en estos organismos.

En los mamíferos se han estudiado dos grupos importantes de lipasas, digestivas e intracelulares (Roussel et al., 1999; Miled et al., 2000). Las lipasas digestivas son las responsables de la hidrólisis de los TAGs que constituyen al alimento. Para realizar la catálisis, los lípidos son emulsificados para hacerlos accesibles al sitio activo de estas enzimas, además estas lipasas requieren de un cofactor proteico, colipasa, el cual permite la activación de la enzima mediante el complejo lipasa-colipasa, este complejo lleva a cabo la hidrólisis de TAGs liberando ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos liberados son

transportados de los sitios de absorción, almacenamiento o síntesis a sitios de utilización mediante lipoproteínas (Miled et al., 2000). Por otro lado, las lipasas intracelulares son las responsables de hidrolizar los TAGs que han sido almacenados como cuerpo graso, la activación de esta enzima ocurre vía mono fosfato de adenosina (AMP) dependiente de una proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila un residuo de Ser (Yeaman, 1990) y se encuentra regulada a nivel hormonal (Gilbert y Chino, 1974; Yeaman, 2004). En los crustáceos se han identificado sólo lipasas digestivas, de las cuales sólo se han aislado y caracterizado dos enzimas, una del cangrejo *Carcinus mediterraneus* (Cherif et al., 2007) y otra del krill *Euphausia superba* (Barriga-González, 2006). Hasta la fecha no existen reportes de la estructura primaria de las proteínas obtenidas de lipasas digestivas e intracelulares aisladas de crustáceos, y únicamente existen dos reportes de secuencias de nucleótidos completas de lipasas digestivas en copépodos *Caligus rogercresseyi* (No. de acceso GenBank BT076773.1) y *Caligus clemensi* (No. de acceso GenBank BT080429.1). Tampoco se han realizado estudios en los que se analice la coordinación de estas dos enzimas durante el ayuno fisiológico.

En este estudio se propone identificar las lipasas digestivas e intracelulares del camarón blanco *Penaeus vannamei*, ampliar el conocimiento acerca de las funciones de estas enzimas, así como la coordinación de la síntesis de ambas enzimas durante el ayuno fisiológico de los crustáceos.

Marco Teórico

Penaeus vannamei como modelo de estudio

Los organismos modelo son especies que se estudian extensivamente para entender a detalle fenómenos fisiológicos particulares, con la expectativa de que los descubrimientos hechos en el organismo modelo podrán extrapolarse a otros organismos. En los crustáceos, el género *Penaeus* (Fig. 1) se encuentra representado por cerca de 27 especies en el mundo (Palumbi y Benzie, 1991), y en México existen por lo menos 4 especies de peneidos cuya importancia económica, derivada de su pesca, justifica la necesidad del conocimiento de su biología, ecología, fisiología, etc. Algunos de los estudios en los que se utilizan crustáceos como organismos modelo, abordan temas de enzimología (Gamboa-Delgado et al., 2003), metabolismo (Rosas et al., 2002) e inmunología (Pascual et al., 2006), entre otros, observando el efecto que tienen algunos estímulos exógenos como exposición a agentes contaminantes (Lavarias et al., 2007), o endógenos como el ayuno (Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2002), sobre variables de respuesta como actividad de enzimas (Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2002), y cantidad de transcritos (Sánchez-Paz et al., 2003). En este tipo de estudios se puede comprobar que el camarón es un modelo de estudio con ventajas para obtener conocimiento que se puede extrapolar a otras especies.

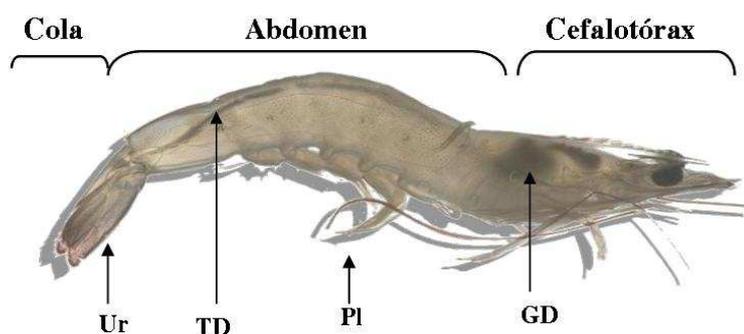


Figura 1. Anatomía del camarón blanco *Penaeus vannamei*.
Ur: urópodos, TD: tubo digestivo, Pl: pleópodos, GD: glándula digestiva.

El sistema digestivo de los crustáceos

La glándula digestiva o hepatopáncreas es un órgano homólogo al hígado y páncreas de los vertebrados, pues es el responsable de la secreción de las enzimas digestivas que se vierten a la región pilórica de la cámara gástrica e intestino, para llevar a cabo la hidrólisis de los componentes del alimento (Dall et al., 1990). Entre las enzimas reportadas en peneidos se encuentran carbohidrasas, proteasas, lipasas y esterases (Dall et al., 1990; López-López et al., 2003).

El proceso de digestión comienza con la trituración del alimento en la región cardiaca o anterior de la cámara gástrica, en donde se mezcla con el jugo gástrico formando el quimo (digestión primaria) (Fig. 2). Posteriormente, el alimento entra al lumen de la glándula digestiva en donde se lleva a cabo la descarga inicial de las enzimas por exocitosis (mecanismo holocrino), llegando a una máxima secreción enzimática por parte de las células F de la glándula digestiva (mecanismo merocrino). La región pilórica de la cámara gástrica se llena de jugo gástrico y las enzimas vertidas llevan a cabo la hidrólisis del

alimento, los productos de dicha hidrólisis son llevados hacia los túbulos de la glándula en donde se lleva a cabo una digestión intraluminal y es en las células R, en donde se realiza la re-absorción de nutrientes a partir del lumen, finalmente en las células B se efectúa una digestión intracelular de los nutrientes (Brusca y Brusca, 2005).

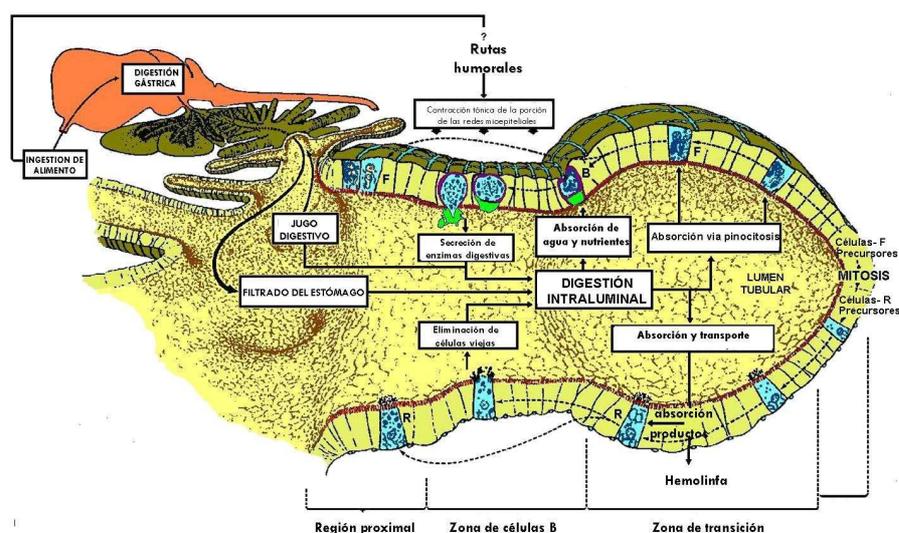


Figura 2. Estructura general y citología de la glándula digestiva de decápodos. Tomado de: Loizzi y Peterson, 1971.

El material que es demasiado grande para atravesar la glándula filtradora y que ingresa en la glándula digestiva, es transportado desde la región dorsal de la cámara pilórica hasta el intestino, donde el epitelio digestivo del extremo anterior del intestino secreta un tubo membranoso, la membrana peritrófica, que envuelve el material que ha de ser eliminado del proctodeo en forma de heces fecales (Brusca y Brusca, 2005).

En los crustáceos, la hidrólisis de los lípidos es realizada por las lipasas, estas enzimas son secretadas por las células B de la glándula digestiva (Ceccaldi, 1989) al lumen donde se mueven a la cámara gástrica para iniciar la digestión de los lípidos. Dado el carácter hidrofóbico de los TAGs, se requieren emulsificantes como las sales biliares de los

vertebrados, sin embargo en los crustáceos no existen sales biliares pero sí compuestos con propiedades tensoactivas comparables (Dall y Moriarty, 1983). Estos últimos suelen estar formados por 22 átomos de carbono y un dipéptido que contiene principalmente taurina. Además, las lipasas pancreáticas de vertebrados requieren de una colipasa, un cofactor proteico (Lowe, 1997), sin embargo en crustáceos como el langostino *Pacifastacus leniusculus* y el cangrejo *Carcinus mediterraneus* no se ha identificado su presencia (Lowe, 1997; Cherif et al., 2007).

En los vertebrados, los ácidos grasos liberados por la hidrólisis de TAGs catalizada por las lipasas digestivas son transportados mediante lipoproteínas a diferentes órganos para la producción de energía vía la β -oxidación (Nelson y Cox, 2000). Los ácidos grasos que no son utilizados para la producción de energía son re-sintetizados a TAGs y almacenados como cuerpo graso en células especializadas, en los vertebrados estos cuerpos grasos están protegidos por proteínas denominadas perilipinas, que impiden que las lipasas intracelulares lleven a cabo la hidrólisis del cuerpo graso (Brasaemle, 2007).

Las lipasas intracelulares son activadas por un estímulo hormonal (glucagón, epinefrina o β -corticotropina), estas hormonas se unen a receptores en la superficie de las células que están acoplados a la activación de la proteína cinasa A (PKA), que a su vez fosforila y activa a la lipasa sensible a la hormona (HSL). Esta lipasa hidroliza los ácidos grasos de los carbonos 1 y 3 de los TAGs, produciendo tres moles de ácidos grasos libres y un mol de glicerol por mol de TAG. Los ácidos grasos producidos se difunden desde las células de reserva, se combinan con la albúmina de sangre y entonces se transportan a otros tejidos, en donde se difunden pasivamente al interior de las células (Birnbaum, 2003; Yeaman, 2004).

En los crustáceos no se han descrito lipasas intracelulares y menos aún la presencia de perilipinas o proteínas análogas que protejan el cuerpo graso. Por lo anterior, estas enzimas juegan un papel clave en la digestión de lípidos en los organismos que presentan ayuno fisiológico como los crustáceos o una indisponibilidad de alimento por el ambiente en donde se desarrollan.

Lipasas

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) o triacilglicerol lipasas, son hidrolasas que en ambientes acuosos actúan sobre los enlaces carboxilésteres presentes en TAGs para liberar ácidos grasos, DAGs, MAGs y glicerol (Beisson et al., 2000; Jaeger y Eggert, 2002).

Las lipasas de todos los organismos se pueden dividir en seis familias: neutral (PF00151), ácidas (PF04083), lipasa2 (PF01674), lipasa3 (PF01764), GDSL (PF00657) y lipasas estimuladas por hormonas (PF06350), esta clasificación está basada en la secuencia de amino ácidos de las proteínas, además las seis familias de enzimas forman parte del clan de las α/β -hidrolasas (CL0028). Dentro de las familias de lipasas, se ha propuesto que las lipasas neutras se restringen a organismos cordados y artrópodos (Zinke et al., 2002).

Todas las familias de lipasas presentan el mismo mecanismo de reacción basado en la triada catalítica Ser-His-Asp/Glu, donde el residuo Ser se encuentra embebido en la secuencia consenso Gly-X-Ser-X-Gly, además presentan una activación interfacial en presencia de sustratos insolubles y un *loop* o *lid* que protege el sitio activo (De Caro, 1981). Dentro de las enzimas sensibles a hormonas, se encuentra también las lipasas adiposas de triacilglicéridos (ATGL), que a diferencia de los otras familias de lipasas, las ATGL

presentan un dominio distintivo patatin (PF01734) (Zimmerman et al., 2004) cuya función es la de movilización de lípidos del cuerpo graso. Además, algunas de las lipasas que conforman las familias antes mencionadas presentan actividad de fosfolipasa, aún cuando las fosfolipasas (E.C. 3.1.1.4) presentan un mecanismo de reacción que difiere al de las lipasas (Yuan y Tsai, 1999).

La información disponible de la bioquímica de las lipasas de las familias de lipasas antes descritas es principalmente obtenida de vertebrados. Los estudios estructurales de lipasas cristalizadas en presencia y ausencia de inhibidores de estas enzimas son limitados en invertebrados, sin embargo indican que las seis familias comparten el mismo plegamiento de α/β -hidrolasa (Fig. 3), el cual consiste en 8 placas β con la segunda placa antiparalela que se encuentra en la parte central de la molécula (Schrag y Cygler, 1997). Las lipasas de invertebrados muestran inserciones de *loops* y dominios, lo que genera enzimas de 25 a 100 kDa (Holmquist, 2000), mientras que las lipasas de vertebrados oscilan entre 43 y 300 kDa (Pahoja y Sethar, 2002).

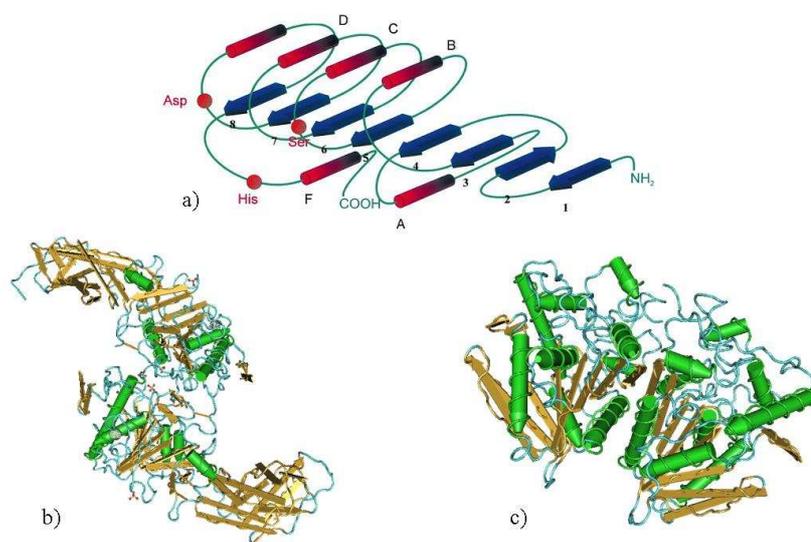


Figura 3. Estructura tridimensional de las lipasas.

a) Representación esquemática de la estructura canónica de una α/β -hidrolasa. Las placas β se muestran en color azul y las α -hélices se muestran en color rojo (Bornscheuer, 2002), b) lipasa pancreática humana y c) lipasa sensible a hormona.

La familia de lipasas GDSL puede hidrolizar TAGs, DAGs, MAGs y fosfolípidos, incluso tiol ésteres (Akoh et al., 2004). Los miembros de las familias de lipasas2 y lipasas3 pueden hidrolizar TAGs o carboxilésteres con longitud variable en la cadena de acilo (Holmquist, 2000). Las lipasas sensibles a hormonas y las lipasas ácidas hidrolizan TAGs y colesterol ésteres (Holm et al., 1988), sin embargo las condiciones de reacción son diferentes para cada enzima. Por otro lado, las lipasas neutras se denominan así, por su capacidad de hidrolizar lípidos neutros como TAGs, DAGs y MAGs, pero algunos miembros de esta familia también pueden hidrolizar la posición *sn-1* de los fosfolípidos y galactolípidos (Derewenda, 1994; Carriere et al., 1998).

Lipasas digestivas

Las lipasas digestivas son las enzimas responsables de la hidrólisis de TAGs del alimento, la lipasa pancreática de los mamíferos, una glicoproteína, fue la primera enzima lipolítica de la cual se obtuvo su estructura tridimensional (Winkler et al., 1990), revelando su configuración la cual está formada por un largo dominio N-terminal (336 aa) y un dominio pequeño C-terminal (residuos 337-449).

El dominio N-terminal pertenece al plegamiento de las α/β -hidrolasas y en él están contenidos los aminoácidos que conforman la triada catalítica del sitio activo (Ser, Asp e His). La estructura de la placa β /Ser/ α -hélice incluye la secuencia consenso Gly-X-Ser-X-Gly (Jaeger et al., 1994). La triada catalítica de esta enzima esta protegida por la *lid*, que consiste en una o dos α -hélices cortas unidas a una placa beta de la lipasa por elementos estructurales móviles y que restringen el acceso al sitio activo (Pleiss, 1998; Nardini y Dijkstra, 1999; Beisson et al., 2000). Adicionalmente, el sitio activo consta de tres hendiduras o bolsillos que acomodan las cadenas acilos de los TAGs (denominados *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*), la hidrofobicidad y el tamaño de éstos determinan la especificidad por el sustrato (Pleiss, 1998; Jaeger, 1999).

El dominio C-terminal representa un sitio de unión para la colipasa, la cual es un cofactor proteico de la lipasa, este cofactor se sintetiza como pro-colipasa y su activación es producida por una tripsina que hidroliza un pentapéptido formado por Ala-Pro-Gly-Pro-Arg que se localiza en el extremo N-terminal de la pro-colipasa (Bowyer et al., 1991), posteriormente la colipasa se une en el dominio C-terminal de la lipasa en presencia de las sales biliares formando el complejo lipasa-colipasa.

El mecanismo de catálisis es esencialmente el mismo para las lipasas digestivas e intracelulares (Fig. 4). En un primer paso, el sustrato interactúa con el residuo nucleofílico (Ser) del sitio activo formándose un intermediario tetraédrico que es estabilizado por los residuos de la cavidad oxianiónica, la histidina y el ácido aspártico del sitio activo. La transferencia de un protón de la histidina produce la liberación de alcohol y la formación de un intermediario covalente. Posteriormente, el ataque nucleofílico (agua en reacción de hidrólisis, alcohol o éster en reacción de trans-esterificación) forma nuevamente un intermediario tetraédrico. Finalmente, la transferencia de un protón de His lleva a la formación de los productos, un ácido y un éster carboxílico) y a la regeneración de la enzima (Jaeger, 1999; Bornscheuer, 2002).

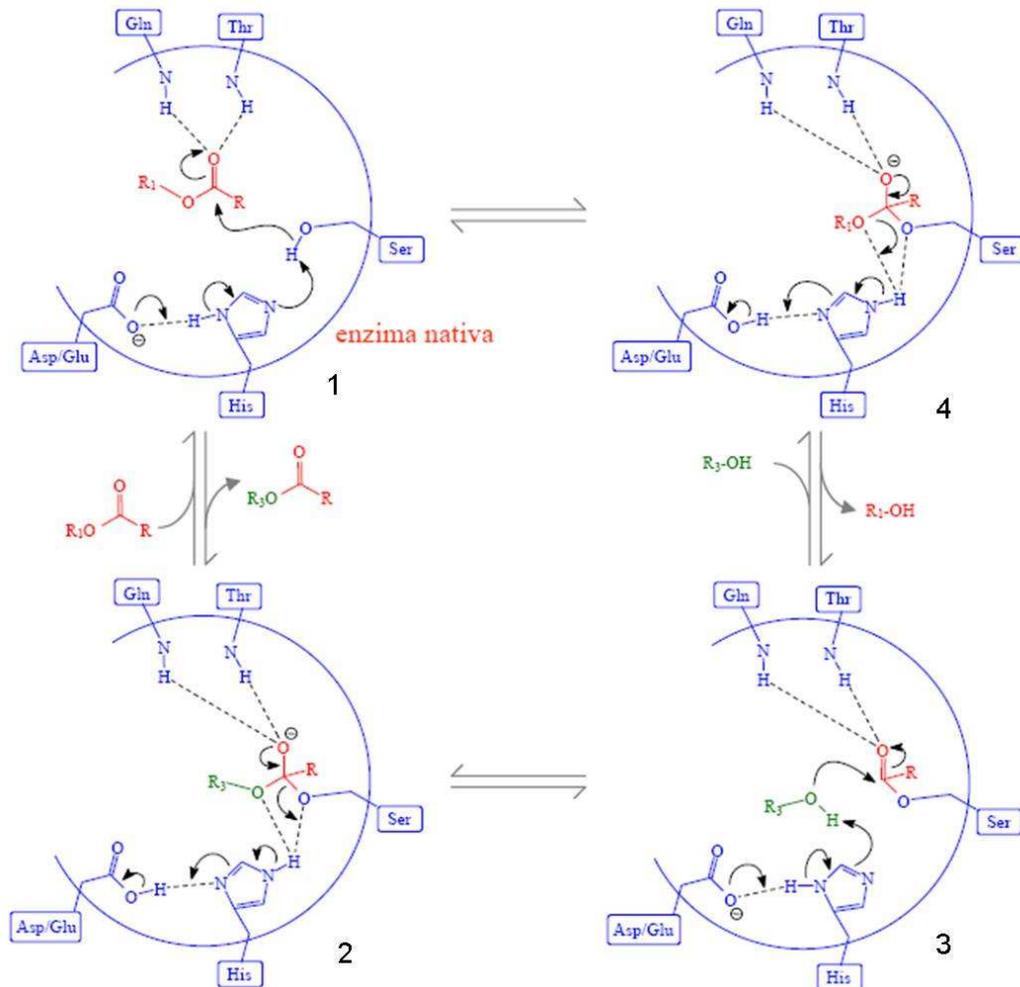


Figura 4. Mecanismo de catálisis de las lipasas.

En el esquema se indican los pasos involucrados en la catálisis enzimática de las lipasas: unión del sustrato (1), formación del intermediario tetraédrico (2), formación de intermediario covalente (3), formación de intermediario tetraédrico y liberación del producto final y regeneración del catalizador (4). Tomado de: Barriga, 2006.

Una característica notable de las lipasas es el fenómeno de activación interfacial que presentan estas enzimas, el cual consiste en el incremento de la actividad cuando la enzima actúa en la interfase agua-lípido de sustratos emulsificados o en micelas, este fenómeno depende de la estabilidad de la interfase de los sustratos empleados, a esta estabilidad se le

denomina concentración micelar crítica (CMC), a valores superiores a la CMC se observa un aumento de la actividad enzimática (Brozowski et al., 1991; Derewenda, 1994; Jaeger, 1999). Este comportamiento se ha utilizado para diferenciar las lipasas de otras enzimas lipolíticas (Verger, 1997).

Lipasas intracelulares

Las lipasas intracelulares de vertebrados e invertebrados son las responsables de la hidrólisis de TAGs almacenados como cuerpo graso, durante los periodos de carencia de nutrientes y/o estrés. La lipasa intracelular o bien lipasa sensible a hormona (HSL), es una hidrolasa de la clase serina y presenta plegamiento α/β -hidrolasa. Cuatro isoformas de esta enzima han sido caracterizadas en vertebrados, con pesos moleculares de 80, 84, 88 y 120 kDa, todas son diméricas, sin embargo la de menor peso, (80 kDa) no es funcional, ya que carece del residuo serina del sitio activo.

Los estudios de la estructura primaria de las HSL y modelado molecular proponen una estructura multi-dominio. La porción N-terminal comprende un dominio de aproximadamente 300 aminoácidos, los cuales participan directamente en la regulación de la HSL por las vías de interacciones proteína-proteína y proteína-lípido (Yeaman, 2004). El extremo C-terminal de la proteína comprende dos regiones distintas, una que contiene la triada catalítica y otra que constituye una asa regulatoria que contiene múltiples sitios de fosforilación (Fig. 5).

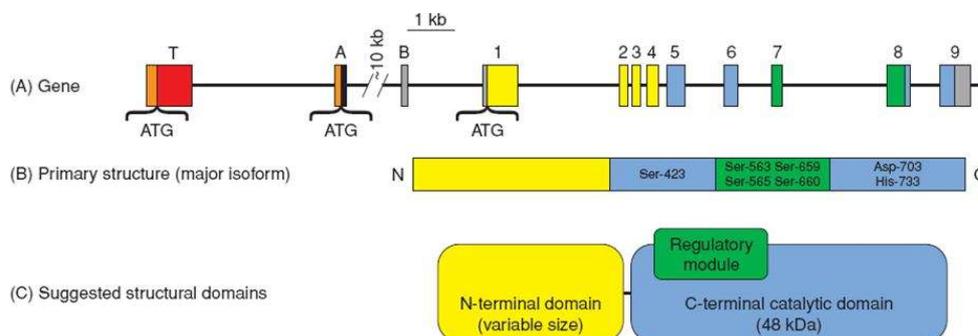


Figura 5. Estructura del gen y la proteína de HSL.

(A) Organización de exones/intrones del gen HSL. Exones T y A codifican 300 y 43 aminoácidos respectivamente, localizados en el extremo N-terminal. (B) Representación lineal de la secuencia de aminoácidos de HSL, dividida en tres regiones funcionales. (C) Dominio propuesto en la estructura de HSL, con dos principales dominios: un dominio N-terminal y un C-terminal, en el cual se encuentra la triada catalítica y la región reguladora que contiene múltiples sitios de fosforilación. Tomado de: Yeaman y cols., 2004.

Existen proteínas que tienen una participación importante en el proceso de lipólisis, las perilipinas, proteínas que pertenecen a la familia de fosfoproteínas (PF03036), son específicas del cuerpo graso y recubren la superficie de las gotas de lípidos actuando como guardianes y controlando los procesos de almacenamiento y liberación de TAGs almacenados (Fig. 6).

En los vertebrados algunos de los inductores de la lipólisis son las catecolaminas (hormonas producidas por las glándulas suprarrenales) y los péptidos natriauréticos (NP), estas moléculas inducen la fosforilación de las perilipinas dependiente de cinasas, en seis residuos de serina, lo que produce cambios conformacionales en las perilipinas que hacen que estas proteínas se desplacen de los depósitos de grasa hacia el citosol, facilitando el desplazamiento de la HSL al cuerpo graso (Londos et al., 1999), permitiendo que se lleve a cabo la hidrólisis de TAGs.

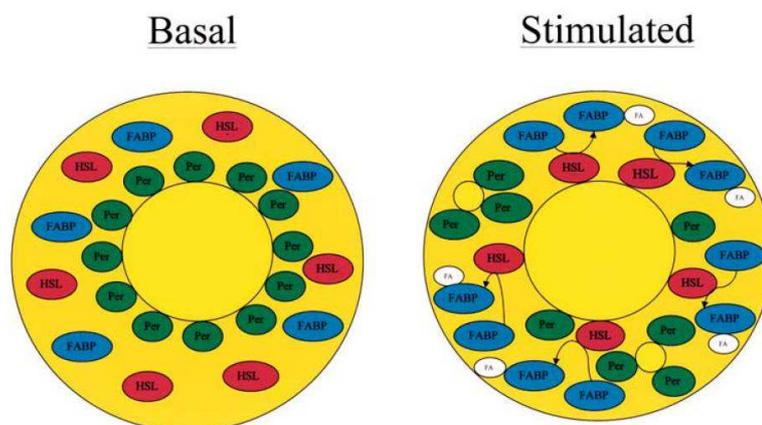


Figura 6. Activación de la HSL vía hormonal.

Bajo condiciones basales, las perlipinas (Per) se localizan en la superficie del cuerpo graso, y HSL se localiza en citoplasma. Cuando la lipólisis es estimulada, las Per y HSL son fosforiladas y las Per son desplazadas permitiendo el acceso de HSL. Tomado de: Yeaman y cols., 2004.

El proceso de lipólisis en los invertebrados es poco conocido y menos aún se sabe en los crustáceos. Hasta ahora se ha propuesto un modelo muy similar al descrito para vertebrados (Fig. 7). El modelo describe como la hormona adipoquinética (AKH) estimula la producción de DAG mediante la hidrólisis de TAGs por lipasas intracelulares. La AKH incrementa las concentraciones de AMPc y Ca^{2+} . El AMPc con o sin Ca^{2+} , activa la proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila la lipasa, causando una traslocación en la superficie del cuerpo graso, permitiendo la interacción de la lipasa con el cuerpo graso y así la catálisis, liberando ácidos grasos y glicerol (Arrese et al., 2001).

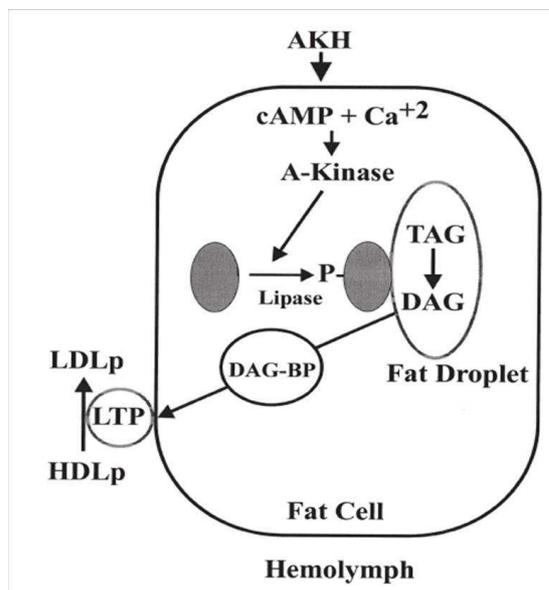


Figura 7. Modelo de la lipólisis en los insectos.
Tomado de: Arrese y cols., 2001.

A diferencia de las lipasas digestivas, HSL puede ser encontrada en diferentes tejidos tales como cuerpo graso (Rajesh Patel, 2004), glándula digestiva (Grönke et al., 2005), hemolinfa (Arreguín-Espinosa et al., 2000) e intestino (Nayak et al., 2004). Estudios sobre el ARNm y la proteína de HSL indican una regulación positiva durante el ayuno tanto en vertebrados como invertebrados (Grönke et al., 2005; Kraemer y Wen-Jun, 2006). Estos estudios indican que HSL es la responsable de la hidrólisis de TAGs para que los ácidos grasos liberados sean movilizados a sitios donde se requiera energía, como el músculo de vuelo de algunos insectos como la mosca *Drosophila melanogaster* (Smith et al., 1994). Además de su papel fisiológico en los organismos, las lipasas son de interés para la industria del aceite y farmacéutica porque son utilizadas para producir muestras racémicas de anti-inflamatorios tales como el naproxeno (Hasan et al., 2006).

Antecedentes

En los crustáceos, la actividad de la lipasa se ha reportado en la langosta *Hommarus americanus* (Berner y Hammond, 1970) y en peneidos como el camarón tigre *Penaeus monodon* (Deering et al., 1996), pero no fue hasta el 2007 cuando la lipasa digestiva del cangrejo *Carcinus mediterraneus* (Cherif et al., 2007) fue aislado y caracterizado. Otras lipasas de invertebrados, principalmente de insectos han sido aisladas y caracterizadas (Tabla I), las lipasas de invertebrados tienen un peso molecular entre 32 y 72 kDa, algunas han sido descritas como enzimas ácidas y neutras (Pistillo et al., 1998; Zinke et al., 2002), y son tejido-específicas; también se ha demostrado que no requieren de un cofactor proteico para llevar a cabo la catálisis (Zouari et al., 2005; Cherif et al., 2007; Kyoung et al., 2008) y además carecen de sales biliares para llevar a cabo la emulsión de las grasas (Zouari et al., 2005; Cherif et al., 2007), en Peneidos, la función emulsificante es atribuida a las acilaurinas (Dall et al., 1990). Por todo lo anterior, es posible que las lipasas de los crustáceos puedan presentar características estructurales que las distinguen de las de los vertebrados.

Por otro lado, las lipasas intracelulares de invertebrados, que presentan características típicas de una lipasa, incluyendo la triada catalítica, el dominio PLAT y los residuos de cisteína que delimitan a la *lid* (Horne et al., 2009), estas enzimas sólo han sido reportadas en mamíferos e insectos (Rajesh Patel, 2005; Arrese et al., 2006).

Tabla I. Características generales de varias lipasas.

Especies	Peso molecular (kDa)	Tejido	pH óptimo	Temperatura óptima	Inhibidores	Referencia
Insecta						
<i>Helicoverpa armigera</i>	31	Glándula digestiva	—	—	-	(Yi-Peng et al., 2008)
<i>Lymantria dispar</i>	—	Glándula digestiva	8.2	—	PMSF, Fe ²⁺ , Ag ²⁺ , Pb ²⁺	(Mrdakovic et al., 2008)
<i>Rodnius prolixus</i>	—	Lumen	7.0-7.5	—	PMSF	(Grillo et al., 2007)
<i>Scorpio maurus</i>	50	Glándula digestiva	9.0	—	THL	(Zouari et al., 2005)
<i>Cephaloleia presignis</i>	31	Hemolinfa	6.9	20 – 40 °C	Ag ⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , DFP	(Arreguín-Espinosa et al., 2000)
<i>Drosophila melanogaster</i>	50.66	Glándula digestiva	7.0	—	DFP	(Smith et al., 1994)
<i>Bombyx mori</i>	28.97	Tubo digestivo	—	—	—	(Ponnuvel et al., 2003)
<i>Manduca sexta</i>	76	Cuerpo graso	7.9	—	DFP, ATP, ADP, Mg ²⁺ and NaF	(Arrese y Wells, 1994)
Crustacea						
<i>Eubamia vermiculata</i>	60	Glándula digestiva	8.0	—	—	
<i>Carcinus mediterraneus</i>	65	Glándula digestiva	8.0	60 °C	—	(Cherif et al., 2007)
<i>Euphasia superba</i>	40	Todo el organismo	6.6	40 °C	—	(Barriga Gonzalez, 2006)
<i>Euphasia superba</i>	37	Todo el organismo	8.0	37 °C	—	(Barriga Gonzalez, 2006)
<i>Hommarus americanus</i>	43	Jugo gástrico	7.0	—	—	(Brockerhoff et al., 1970)
Molusca						
<i>Todarodes pacificus</i>	27	Glándula digestiva	8.0	35 – 40 °C	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺ , Co ²⁺ and Cd ²⁺	(Park et al., 2008)
<i>Ommastrephes bartramii</i>	33	Glándula digestiva	7.0	30 – 40 °C	—	(Sukarno et al., 1996)

PMSF fenil metil sulfonil fluoruro, THL tetrahidrolipstatin, DFP diisopropilfluorofosfato, ATP trifosfato de adenosina, ADP difosfato de adenosina.

Las lipasas actúan sobre una amplia variedad de sustratos. Las lipasas de crustáceos como los peneidos, *Penaeus schmitti*, *Penaeus vannamei*, *Farfantepenaeus californiensis*, y *Farfantepenaeus notialis* presentan una tendencia a hidrolizar TAGs con cadena de acilo larga, tales como trioleína, tripalmitina y triestearina (Del Monte et al., 2002; Forrellat Barrios et al., 2004). En mamíferos, las sales biliares además de permitir la emulsión de los TAGs, son inhibidores de las lipasas, esta inhibición está asociada con cambios conformacionales en la enzima durante la catálisis (Borgstrom y Erlanson-Albertsson, 1973). Actualmente se han desarrollado inhibidores sintéticos que han permitido discriminar entre esterasas y lipasas: tetrahidrolipstatin THL y diisopropil fluorofosfato (DFP). Estos inhibidores han sido empleados para caracterizar lipasas digestivas del escorpión *Scorpio maurus* (Zouari et al., 2005) y el cangrejo *Carcinus mediterraneus* (Cherif et al., 2007) como lipasas del tipo serino.

Existen varios trabajos en los que se estudia el ayuno en el camarón blanco *P. vannamei*, dado que durante la muda, los crustáceos presentan periodos de ayuno, en los cuales son incapaces de alimentarse, por lo que usan sus reservas de energía (proteínas, carbohidratos y lípidos) para satisfacer las demandas energéticas.

Los primeros estudios sobre el tema en esta especie incluyen la caracterización de metabolitos producidos durante el ayuno, proteínas, carbohidratos y lípidos en la glándula digestiva y hemolinfa (Sánchez-Paz et al., 2007); la cuantificación de estos metabolitos fue realizada en diferentes periodos de ayuno, siendo 24 días el periodo más largo evaluado (Stuck et al., 1996; Pascual et al., 2006). Todos los estudios realizados demostraron un decremento en la concentración de lípidos totales durante el ayuno en la glándula digestiva de *P. vannamei*. Por otro lado, los estudios en la cuantificación de los transcritos de las

lipasas y sus enzimas codificantes es limitado en peneidos; en un trabajo reciente en el camarón blanco se ha encontrado un aumento de la actividad de lipasa durante el ayuno, presentando mayor actividad a las 120 h de ayuno (Rivera-Pérez et al., 2010), sugiriendo que los lípidos son la primera fuente de energía de estos organismos. Por lo anterior, la identificación, aislamiento y caracterización de estas enzimas en *P. vannamei* permitiría ampliar el conocimiento acerca de las funciones específicas de estas enzimas sintetizadas por el organismo y podría ofrecer evidencias sobre su fisiología bajo condiciones de estrés alimentario.

Hasta ahora no se han reportado secuencias completas de proteínas, ARNm o genes en bases de datos como GenBank o EMBL-EBI, correspondientes a lipasas de peneidos. Únicamente dos secuencias completas de nucleótidos han sido reportadas para crustáceos, las de los copépodos *Caligus rogercresseyi* (No. de acceso GenBank BT076773.1), y *Caligus clemensi* (No. de acceso GenBank BT080429.1) y cuatro marcadores de secuencia expresada ó EST (acrónimo del inglés “Expressed Sequence Tags”) del camarón blanco *P. vannamei* (No. de acceso GenBank DQ858927.1), del camarón tigre *P. monodon* (No. de acceso GenBank GO081405.1), de la langosta *Hommarus americanus* (No. de acceso GenBank FF277852.1) y del copépodo *Calanus finmarchicus* (No. de acceso GenBank EL965789.1), mientras que para los insectos se pueden encontrar para muchas especies (Zinke et al., 2002) (Tabla II). Los pocos reportes sobre la cuantificación de la actividad enzimática de lipasas ha sido durante la ontogenia de diferentes crustáceos (Lovett y Felder, 1990; Fang y Lee, 1992; González-Baró et al., 2000; Johnston et al., 2004; Perera et al., 2008; Ying et al., 2009), y ninguno de los trabajos ha realizado una distinción entre las lipasas digestivas e intracelulares de crustáceos o sobre la distinción entre lipasas y

estearasas. Por extrapolación con insectos se hipotetiza que los crustáceos deben sintetizar más de una lipasa para poder llevar a cabo la hidrólisis de los TAGs del alimento y aquellos almacenados como cuerpo graso, además el mecanismo de lipólisis deberá ser similar. Dado que la estructura primaria de las lipasas es poco conservada entre organismos, ha sido difícil amplificar secuencias de nucleótidos que codifiquen para estas enzimas, lo anterior se ve reflejado en el número de secuencias reportadas para crustáceos en las bases de datos. Pistillo et al. (1998) reportaron tres genes de lipasas (*lip1*, *lip2* y *lip3*) en artrópodos, utilizando la mosca *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio (No. de acceso en GenBank: NM_078816, NM_13574.2, NM_07983.3). Desde entonces se han publicado diversos trabajos sobre lipasas y sus secuencias de ADNc en insectos como el gusano de seda *Bombyx mori* (Ponnuvel et al., 2003), el gusano del tabaco *Manduca sexta* (Rajesh Patel, 2004) y la mosca de Hess *Mayetiola destructor* (Shukle et al., 2009), entre otros.

Tabla II. Genes de lipasas en invertebrados y características de las proteínas traducidas.

No. de acceso GenBank	Especie	Número de genes/ADNc	Péptido señal (aa)	Sitio activo	Proteína Madura (aa)	Referencias
Arachnida						
XM_002413665.1	<i>Ixodes scapularis</i>	Dos ADNc	—	—	319	—
Crustacea						
BT076773.1	<i>Caligus rogercresseyi</i>	Un ADNc	—	—	416	—
Insecta						
AB076385.1	<i>Bombyx mori</i>	Dos ADNc	25	Ser ₁₄₇ , Asp ₁₇₁ , His ₂₃₂	269	(Ponnuvel et al., 2003)
AY945209.1						
XP_001652442	<i>Aedes aegypti</i>	Tres ADNc	10	Ser ₁₉₆ , Asp ₂₂₁ , His ₂₈₉	347	(Nene et al., 2007)
ABK29468	<i>Helicoverpa armigera</i>	Un ADNc	18	-	292	(Yi-Peng et al., 2008)
EU660853						
EU660854	<i>Mamestra configurata</i>	Tres ADNc	16-18	Ser ₁₈₃ , Asp ₂₆₅ , His ₃₁₉	296, 331, 335	(Toprak et al., 2008)
EU660855	<i>Phlebotomus papatasi</i>	ADNc	20-21	Ser ₁₈₄ , Asp ₂₁₂ , His ₂₇₀	342	(Rosetto et al., 2003)
AY179968						
NM_078816	<i>Drosophila melanogaster</i>	60 genes, tres ADNc	20	—	273, 434, 439	(Rubin et al., 2000)
NM_13574.2						
NM_07983.3						
EV805158	<i>Epiphyas postvittana</i>	Dos ADNc	—	—	—	(Simpson et al., 2007)
EV806704						
EU877196	<i>Mayetiola destructor</i>	Un ADNc, un gen	18	Cys ₁₃₄ , Asp ₁₈₈ , His ₂₅₂	326	(Shukle et al., 2009)
EU433400	<i>Patiopecten destructor</i>	Un ADNc	-	-	353	(Kyoung et al., 2008)
FJ807781.1	<i>Manduca sexta</i>	Un ADNc	-	-	649	-
XM_001845751	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Tres ADNc	-	-	340, 339, 377	-
XM_001845758						
XM_001846738						
AY684998	<i>Solenopsis invicta</i>	Un ADNc	26	-	346	(Anand, 2004)
XM_001358037.2	<i>Drosophila pseudoscura</i>	Un ADNc	—	—	378	—
Nematode						
NM_0707832	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Dos ADNc	—	—	403, 404	—
NM_070832.2						

Dado que las lipasas digestivas e intracelulares catalizan la misma reacción, la distinción entre las lipasas ha permitido identificar su participación en el proceso de lipólisis en los organismos. La presencia de los transcritos en diferentes tejidos ha ayudado a elucidar la función de cada lipasa, es decir, la presencia exclusiva de un transcrito de lipasa en la glándula digestiva indica un posible rol en la función de digestión de lípidos. El ARNm de *lip3* de la mosca *D. melanogaster* se ha localizado únicamente en el cuerpo graso del organismo, por lo que se establece que la enzima codificada por este transcrito tiene la función de lipasa intracelular (Pistillo et al., 1998), tal como la lipasa del gusano de seda *B. mori* (lipasa brummer) (Grönke et al., 2005) y el gusano del algodón *Helicoverpa armigera* (Yi-Peng et al., 2008) las cuales han mostrado poseer lipasas tejido-específicas del cuerpo graso. Mientras que las lipasas de los gusanos *M. configurata* y *B. mori* (Bmlipase-1) se han expresado exclusivamente en la glándula digestiva, por lo que se establece que esta enzima esta involucrada en la digestión de lípidos del alimento (Ponnuvel et al., 2003; Toprak et al., 2008). En el GenBank esta reportado un EST similar a lipasa en el camarón blanco (No. de acceso DQ858927.1), el cual fue amplificado de la glándula digestiva, pero no se ha hecho ningún estudio para comprobar su identidad o su participación en la lipólisis en el camarón blanco *P. vannamei*.

Los organismos poseen un mecanismo para controlar la actividad de las enzimas, estudios recientes indican que la actividad de las lipasas de invertebrados está regulada espacial y temporalmente. Los mecanismos de regulación ocurren durante la transcripción, postranscripción y/o postraducción (Santos et al., 1997; Zinke et al., 2002; Rajesh Patel, 2005). FOXO1 (acrónimo en inglés “Forkhead box O1”), es un factor de transcripción que regula positivamente las lipasas homóloga a la lipasa ácida de humanos, esta lipasa a su vez

es regulada por la ingesta de lípidos del alimento y por un estímulo hormonal (Hiruma y Riddiford, 2001; Kunte et al., 2006; Vihervaara y Puig, 2008). Estas evidencias muestran que la regulación de la actividad de las lipasas es un proceso complejo tanto en vertebrados como en invertebrados.

Otro tipo de inductores de la transcripción de las lipasas estudiados en invertebrados son el ciclo de muda y la ontogenia, procesos que están controlados por dos hormonas, la ecdisona y la hormona juvenil (Hiruma y Riddiford, 2001). Se ha reportado que estas hormonas regulan diferencialmente las lipasas en la ontogenia de varios invertebrados (Ziegler, 1991; Toprak et al., 2008; Yi-Peng et al., 2008). Entre ellas, el metopreno y la ecdisona hidroxilada (20-hidroxiectdisona) también han promovido cambios en la expresión de las lipasas del gusano cogollero *H. armigera* (Yi-Peng et al., 2008).

Por otro lado, el ayuno es otro estímulo que puede inducir cambios en la concentración de los transcritos de las principales enzimas digestivas (Sánchez-Paz et al., 2003). En el 2002, Zinke y colaboradores identificaron genes regulados por el ayuno y por la ingesta exclusiva de sacarosa en la mosca *Drosophila* mediante microarreglos. Cuando los organismos fueron alimentados con sacarosa, hubo una regulación negativa de los genes que codifican a las lipasas (No. de acceso GenBank CG8093, CG6283 y CG6287), de manera importante los tres genes disminuyeron su expresión en diferentes porcentajes (Fig. 8). Esta respuesta se atribuyó a que los carbohidratos fueron convertidos a ácidos grasos, reprimiendo el metabolismo de hidrólisis de los TAGs. Caso contrario, durante el ayuno hubo una regulación positiva del gen de una lipasa lisosomal (No. de acceso GenBank CG8093), sugiriendo la movilización de los lípidos por parte de esta enzima intracelular.

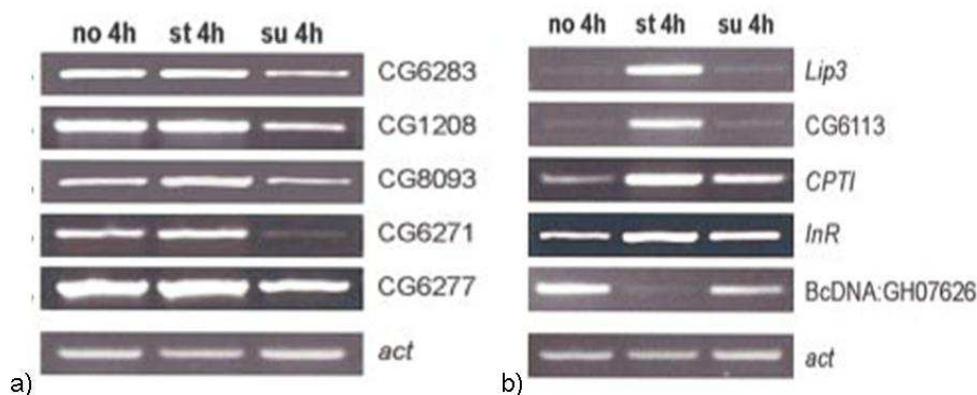


Figura 8. Efecto del ayuno y alimentación con sacarosa en *Drosophila*.

Lista de genes regulados durante alimentación con sacarosa y durante el ayuno. no: control, st: ayunados, su: alimentados con sacarosa. Triacilglicerol-lipasas: lip3, CG6113, CG6283, CG8093, CG6271 y CG6277. Gen constitutivo: actina (act). Tomado de: Zinke y cols., 2002.

De acuerdo a la Fig. 8, es evidente que la expresión de los genes que codifican a las lipasas pancreáticas cambian relativamente poco con respecto a las intracelulares bajo condiciones de ayuno. Esta respuesta también se observó en la lipasa intracelular del gusano de seda *B. mori* (lipasa brummer) por aumento en la concentración de transcritos después de 24 h de ayuno, caso contrario, cuando los organismos fueron re-alimentados la cantidad de transcritos disminuyó. Es claro que las proteínas de las lipasas intracelulares juegan un papel clave en la movilización de reservas energéticas en procesos que requieren alta energía como el estrés alimentario (Fig. 9a) y la ontogenia de los organismos (Fig. 9b).

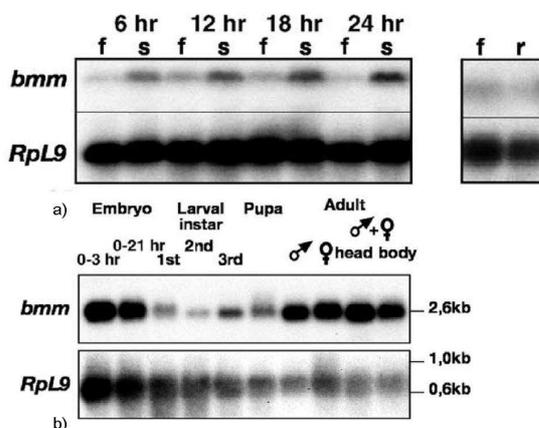


Figura 9. Expresión cuantitativa del gen de lipasa (*bmm*) por Northern blot. (a) Durante el ayuno, (b) En la ontogenia. f: alimentado, s: ayunado, r: re-alimentado. RpL9: gen constitutivo. Tomado de: Gronke y cols., 2005.

Debido a que no hay estudios en donde se evalúen los genes de lipasas digestivas e intracelulares bajo un mismo estímulo, no existen datos concluyentes que ayuden a elucidar el papel coordinado de estas enzimas durante el ayuno en los crustáceos. En el camarón blanco, *P. vannamei*, los estudios de lipasas ante el ayuno fisiológico como estímulo son escasos, además, no se ha encontrado ninguna estructura primaria completa para lipasa digestiva e intracelular relacionada con la hidrólisis de TAGs. Finalmente, no existe ningún reporte de secuencias parciales, ni cuantificación de transcritos para estas lipasas. Por lo tanto, un posible acercamiento al entendimiento del proceso de digestión de lípidos en el camarón blanco, es la identificación de los ARNm que codifican a las enzimas encargadas de la hidrólisis de TAGs del alimento y aquellos almacenados como cuerpo graso.

Los genes de las lipasas presentan duplicación génica en tandem, esta duplicación propicia la formación de genes parálogos, ortólogos y pseudogenes (Horne, 2008), que hace que

ambas copias acumulen un mayor número de sustituciones explorando así nuevas combinaciones y con ello nuevas posibles funciones. Pero en la mayoría de los casos, este periodo de redundancia funcional finaliza con la inactivación de una de las copias debido a la incorporación de codones de paro; esto se ha evidenciado en la mosca *D. melanogaster*, el gusano *C. elegans* y la levadura *S. cerevisiae* (Lynch y Conery, 2000).

En el caso del camarón *P. vannamei*, no existen trabajos sobre los genes de lipasas, digestivas e intracelulares, ni reportes de cuantificación de transcritos de lipasas durante el ayuno. Por lo tanto, un posible acercamiento al entendimiento de la función y regulación de las lipasas en peneidos, es la identificación y cuantificación de los ARNm que codifican a las enzimas encargadas de la hidrólisis de lípidos del alimento y aquellos almacenados como TAGs como cuerpo graso.

Hipótesis

1. Si las características bioquímicas y la localización de las lipasas digestiva e intracelular de los invertebrados difiere entre las enzimas, entonces la función fisiológica en el catabolismo de triacilglicéridos podrá ser establecida para camarón blanco.

2. Si la función fisiológica de la lipasa digestiva es hidrolizar TAGs del alimento y la de la lipasa intracelular es la de hidrolizar TAGs almacenados en tejido graso durante el ayuno, entonces la tasa de transcripción del gen de la lipasa digestiva aumentará como consecuencia de la ingesta de TAGs y disminuirá durante el ayuno, mientras que la tasa de transcripción del gen de lipasa intracelular aumentará como consecuencia del ayuno y disminuirá durante la ingesta de TAGs.

Objetivo general

Evaluar las características bioquímicas de la(s) lipasas presentes en la glándula digestiva de *Penaeus vannamei* y la expresión de los gen(es) de esta(s) enzimas, relacionados con la digestión de triacilglicéridos en respuesta al estrés alimentario.

Objetivos específicos

- ☞ Identificar, aislar y caracterizar las lipasas digestivas e intracelulares de camarón blanco *Penaeus vannamei*.
- ☞ Identificar los transcritos de lipasa digestiva e intracelular.
- ☞ Definir la función biológica de cada uno de los transcritos de estudio.
- ☞ Evaluar los cambios en la cantidad de transcritos de lipasa digestiva e intracelular en la glándula digestiva de *Penaeus vannamei* durante el ayuno.

Materiales y métodos

Identificación y caracterización de las lipasas del camarón blanco

Obtención de las muestras

Los organismos del género *Penaeus vannamei* (23.0 ± 1.0 g), fueron mantenidos en el laboratorio húmedo del CIBNOR en tanques de fondo plano a 28 °C, 30 ppm de salinidad y 7.4 mg/L de oxígeno. Los organismos fueron alimentados dos veces al día, a las 8:00 y a las 17:00 con alimento de la Promotora Industrial de Acuasistemas S.A. (PIASA).

Con el objetivo de aislar las lipasas digestiva e intracelular, los organismos fueron decapitados, la glándula digestiva (5 g peso húmedo) y los pleópodos (250 mg peso húmedo) extirpados fueron homogenizados individualmente con un homogenizador de tejidos, adicionando agua destilada (1:4 *p/v*), y posteriormente fueron centrifugados por 30 min a 10,000 *g* a 4 °C, el sobrenadante del extracto de las glándulas digestivas, extracto crudo, fue liofilizado y almacenado a 4 °C para análisis posteriores, mientras que el extracto crudo de pleópodos sólo fue almacenado a 4 °C para análisis.

La concentración de proteína de los extractos crudos fue determinada por el método de Bradford (1976), empleando albúmina sérica bovina como estándar.

Determinación de la actividad de lipasa

La actividad de lipasa durante el proceso de purificación y su posterior caracterización fue evaluada empleando dos métodos, uno de titulación y otro empleando un sustrato fluorogénico. El primer ensayo de actividad fue realizado mediante la titulación de los

ácidos grasos liberados por la hidrólisis de TAGs, empleando 0.25 ml de trioleína (Sigma, T-7140) en 30 ml de Tris-HCl 2.5 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0 y goma arábiga al 3% (Gargouri et al., 1984). La actividad de lipasa fue calculada empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Ecuación [1]} \quad U/\text{mg} = \frac{(A/t_A - B/t_B) \times 0.01 \times 10^3}{E}$$

Donde U/mg son los ácidos grasos libres ($\mu\text{mol}/\text{min}$) por mg de proteína, A y B es el volumen de NaOH 0.01 N (μl); t_A y t_B son el tiempo de reacción (min) del ensayo y del blanco, respectivamente. E es la concentración de proteína de la muestra en mg/ml. La actividad de la enzima fue expresada en relación a la media de todas las mediciones (100%).

El segundo ensayo fue realizado empleando el sustrato fluorogénico MUF-butirato (Methylumberyl-butyrate, Sigma, 19362). La concentración de sustrato en el ensayo fue de 100 μM en un volumen total de 300 μl de amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 8.0). La fluorescencia fue medida a 355 nm (excitación) y 460 nm (emisión) por 10 min en un fluorómetro (Kontron SFM 25). Se preparó una curva estándar con 4-methylumbelliferone (Sigma, M1381). Una unidad corresponde a una unidad de fluorescencia relativa (UFR) por min. La actividad de la enzima fue calculada por mg de proteína y expresada en relación a la media de todas las mediciones realizadas (100%).

Purificación de la lipasa digestiva

Cromatografía de exclusión molecular

La muestra liofilizada de la glándula digestiva (200 mg) fue disuelta en 1 ml de amortiguador de fosfatos (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5). Las proteínas del extracto obtenido fueron separadas mediante cromatografía de filtración en gel usando un sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia Biotech). Primero, las proteínas de bajo peso molecular (menores a 5000 Da) fueron eliminadas mediante la aplicación de la muestra en una columna NAPTM-10 Sephadex G25 (Amersham Biosciences) y eluidas con 1.5 ml de amortiguador de fosfatos. Posteriormente, las proteínas contenidas en el extracto crudo fueron separadas por masa molecular mediante filtración en gel, empleando una columna de 124 ml de gel HiLoad Superdex 200 16/60 (Amersham Biosciences), las proteínas fueron eluidas empleando 175 ml de amortiguador de fosfatos. De forma simultánea al proceso de separación de las proteínas, se realizó un monitoreo de la absorbancia a 280 nm y de la conductividad durante la cromatografía. El flujo fue 1 ml/min y el volumen final de elución fue de 125 ml. Se colectaron fracciones de 5 ml cada una, las cuales fueron concentradas por centrifugación (AMICON[®] Ultra-15, Millipore) a 4,000 g por 15 min a 25 °C para obtener un volumen final de 500 μl .

Cromatografía de intercambio aniónico

Las fracciones con actividad de lipasa obtenidas de la cromatografía por filtración en gel fueron aplicadas a una columna NAPTM-5 Sephadex G25 (Amersham Biosciences), las muestras se eluyeron usando amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 8.0. Posteriormente, la

muestra fue aplicada a una columna Resource Q (Pharmacia, Biotech), la cual fue previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos. Bajo estas condiciones, la enzima se adsorbió en el soporte iónico a la columna, la muestra se eluyó con un gradiente de NaCl (0–1 M) en amortiguador de fosfatos. Simultáneamente, la absorbancia a 280 nm y la conductividad fueron monitoreadas. El flujo de salida de la columna fue de 1 ml/min y el volumen final de elución fue 35 ml. Fracciones de 500 μ l cada una fueron colectadas.

La actividad de cada una de las fracciones fue evaluada en microplaca mediante la hidrólisis de MUF-butirato. Una alícuota de 10 μ l de cada fracción fue incubada a 30 °C con 250 μ l de MUF-butirato a una concentración final de 100 μ M. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones antes descritas. La proteína aislada con actividad de lipasa (PVL) fue almacenada a -80 °C.

Análisis de las proteínas por espectrometría de masas

La enzima purificada de la glándula digestiva PVL fue identificada por electroforesis, donde 3 μ g de proteína fueron cargados en un gel de acrilamida al 12%, después de la separación de la proteína, la banda proteica fue visualizada por tinción con azul de Coomassie, posteriormente la banda proteica fue cortada y almacenada. El análisis de la secuencia fue realizado en el Wistar Institute Proteomic Facility mediante la digestión con tripsina y HPLC acoplado a un espectrómetro de masas (Gel/LC-MS/MS).

Purificación de la lipasa intracelular

Cromatografía de intercambio hidrofóbico

La muestra de pleópodos fue homogenizada con amortiguador Tris-HCl 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M, pH 8.0. El extracto proteico obtenido fue separado mediante una cromatografía hidrofóbica en un sistema FPLC. La muestra fue aplicada a una columna de Fenil-sefarosa CL-4B (1 ml), la cual fue previamente equilibrada con amortiguador Tris-HCl 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M, pH 8.0. Posteriormente, la columna fue lavada con el mismo amortiguador, las proteínas que no se unieron fueron removidas durante el lavado. Las proteínas unidas se eluyeron mediante una reducción de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dada la alta afinidad por la matriz que mostró la proteína de interés, se hizo una segunda elusión mediante un gradiente de propanol (0 – 100%). Simultáneamente, la absorbancia a 280 nm fue monitoreada. El flujo fue de 1 ml/min y el volumen final de elusión fue 20 ml. Se colectaron fracciones de 500 μl cada una. El solvente de las muestras fue removido por centrifugación (AMICON[®] Ultra-15, Millipore) a 4,000 g por 15 min a 25 °C, la muestra concentrada y sin solvente fue almacenada a 4 °C para su posterior análisis.

Electroforesis

Las bandas de proteínas fueron analizadas mediante electroforesis bajo condiciones reductoras y no reductoras, SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Para las condiciones reductoras, las muestras fueron diluidas (1:2) con el amortiguador de muestra (Tris-HCl 0.125 M, 2% SDS, 20% v/v glicerol, 0.04% bromofenol azul, 5% β -mercaptoetanol a pH 6.8) y calentadas a 100 °C por 2 min. Para las condiciones no reductoras, las muestras fueron

mezcladas con el mismo amortiguador de muestra sin β -mercaptoetanol y SDS, las muestras no fueron calentadas. La separación de las proteínas se llevó a cabo a 15 mA y 2 °C. Las bandas de proteína fueron reveladas con una solución de azul de Coomassie (R-250) 0.1% en ácido acético 7.5% y metanol 5% a temperatura ambiente y el gel fue desteñado con ácido acético 10% y metanol 40%. También se hicieron tinciones con plata de acuerdo a la metodología descrita por Merril y Washart (1998).

La actividad de lipasas fue revelada en zimogramas empleando MUF-butirato como sustrato (Diaz et al., 1999). Después de la separación de las proteínas por electroforesis, el gel fue lavado con 25 ml Tris-HCl 50 mM pH 8.0, conteniendo Tritón X-100 1%. Posteriormente, el gel fue sumergido en una solución de MUF-butirato 100 μ M en el mismo amortiguador sin Tritón X-100 por 10 min. El gel se reveló bajo luz ultravioleta.

La inhibición de lipasa fue revelada empleando inhibidores específicos para lipasas, tetrahidrolipstatin (THL, Sigma, O-4139) y dietil-*p*-nitrofenil fosfato (E-600, Sigma, PS610), los cuales fueron incubados con las muestras *v/v*, durante 1 h y aplicados a geles de poliacrilamida al 8% bajo condiciones no reductores, después de la separación de las proteínas, la actividad residual fue visualizada empleando MUF-butirato como sustrato bajo luz ultravioleta, tal como se describió anteriormente.

Determinación de la colipasa en la glándula digestiva de camarón

La presencia de colipasa en la glándula digestiva fue determinado mediante el protocolo de Cherif et al. (2007). El extracto crudo de la glándula digestiva fue incubado por 30 min a pH 4.0 y 65 °C para desnaturalizar las proteínas, pero preservando la actividad de colipasa.

Al mismo tiempo, la lipasa porcina (control), fue inhibida con 3 mM de NaDC y se intentó reactivar con el extracto de la glándula digestiva de *P. vannamei*, en el cual estuviera contenido la potencial colipasa, mezclándolo en la reacción empleando trioleína como sustrato.

Características moleculares de las lipasas

Determinación de peso molecular de las lipasas

Las masas moleculares de las lipasas fueron evaluadas bajo condiciones reductoras por el método de Laemmli (1970). Las masas moleculares de las enzimas fueron estimadas por comparación de la movilidad electroforética (R_f) con estándares de alto (220 – 53 kDa) y bajo (97 – 14.4 kDa) peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, 17-0615-01, 17-0446-01).

Determinación del punto isoeléctrico de las lipasas del camarón

El punto isoeléctrico (pI) de las lipasas aisladas fueron evaluados por un análisis de electroenfoque en un gel de poliacrilamida en capa fina (LKB Ampholine, PhastSystem) conteniendo anfolitas en un rango de pH 3 – 9. Como estándar se utilizó un equipo de calibración para isoelectroenfoque conteniendo 11 proteínas estándar (Amersham Pharmacia Biotech, 17-0471-01). Las bandas de proteína fueron observadas mediante tinción con plata.

Glicoproteínas

La presencia de carbohidratos asociados a las proteínas fueron evaluados mediante electroforesis en condiciones no reductoras (Thornton et al., 1994). Después de la separación electroforética, el gel fue incubado 30 min a temperatura ambiente en una solución de etanol 50%, después se lavó con agua por 10 min. Posteriormente, el gel fue transferido a una solución de ácido periódico 1% v/v, ácido acético 3% v/v durante 30 min. Después el gel se lavó con agua destilada 30 min, y posteriormente el gel fue incubado por 20 min en una solución metabisulfito de sodio 0.1% p/v en HCl 10 mM. Posteriormente, el gel fue incubado por 1 h en oscuridad en reactivo Schiff (Sigma, S5133) para detectar carbohidratos covalentemente unidos a las proteínas y después incubado por 1 h en metabisulfito de sodio 0.1% p/v en HCl 10 mM. Finalmente, el gel es incubado por 2 h en oscuridad en una solución de metabisulfito de sodio 0.5% p/v en HCl 10 mM. El gel fue almacenado en una solución de ácido acético 7.5% v/v, metanol 5% v/v.

Características bioquímicas de las lipasas

Actividad específica de las lipasas

La actividad específica de las enzimas fue evaluada empleando derivados de naftol y TAGs de diferente longitud de cadena de acilo como sustratos: tributirina (C4:0, Sigma, T-8626), tripalmitina (C16:0, Sigma, T-5888), triestearina (C18:0, Sigma, T-5016), y trioleina (C18:1, Sigma, T-7140). La actividad específica fue determinada espectrofotométricamente para los derivados de naftol (Versaw et al., 1989) y mediante titulación (Gargouri et al., 1984) para TAGs.

Efecto de la temperatura y el pH en la actividad de las lipasas

Para evaluar el efecto de la temperatura en la actividad específica de las lipasas, varias alícuotas de 2 µg de proteína fueron disueltas en 15 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, posteriormente fueron incubadas por 1 h a temperaturas de 10 – 80 °C, después la actividad de lipasa se evaluó por el método de pH-stat empleando trioleína como sustrato.

Para evaluar el efecto del pH, alícuotas de 2 µg de enzima fueron disueltas en 15 µl de buffer universal (Stauffer, 1989); 20 ml de la solución stock (H₃BO₃ 57 mM, ácido cítrico monohidratado 36 mM, NaH₂PO₄ H₂O 28 mM, 310 ml de NaOH 1N) fueron mezclados con HCl 1N para obtener el pH deseado y se aforó a 100 ml. En este experimento se incluyeron valores de pH entre pH 2 y 12. Después de incubar durante 1h a temperatura ambiente, la actividad de lipasa se midió empleando MUF-butirato como sustrato mediante fluorescencia.

Efecto del calcio e inhibidores sobre la actividad de la lipasa digestiva

El efecto del Ca²⁺ fue evaluado por pH-stat (Gargouri et al., 1984), empleando trioleína como sustrato y diferentes concentraciones de CaCl₂ (0 – 100mM), los controles sin calcio fueron incluidos en el análisis.

Para determinar si la enzima es del tipo serino, volúmenes iguales de solución de enzima (2 µg de proteína) y de inhibidor, tetrahidrolipstatin (THL, Sigma, O-4139) y dietil-*p*-nitrofenil fosfato (E-600, Sigma, PS610), fueron incubados por una 1 h empleando diferentes concentraciones de inhibidor (0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mM THL). La actividad

residual fue evaluada por fluorescencia usando MUF-butirato como sustrato. Un control sin inhibidor fue incluido.

El efecto de las sales biliares en la actividad de la enzima (2 μg de proteína), se evaluó a diferentes concentraciones de deoxicolato de sodio, 0 – 4 mM (NaDC, Sigma, D-6750), usando trioleína como sustrato, la actividad residual fue cuantificada por el método de pH-stat. La inhibición de la enzima fue revertida mediante la adición de trioleína a los 30 min de reacción.

Variables cinéticas $K_{M,app}$, $k_{cat,app}$ y $k_{cat}/K_{M,app}$ de las lipasas

Las variables de las enzimas aisladas fueron evaluadas con la gráfica de Lineweaver-Burk, las concentraciones de sustrato de trioleína fueron 0 – 20 mM, y las de MUF-butirato fueron 0 – 100 μM . La actividad fue evaluada mediante pH-stat para trioleína y por fluorometría para MUF-butirato.

Genes de lipasas: Identificación, caracterización y expresión

Organismos experimentales

Organismos adultos de la especie *Penaeus vannamei* con un peso promedio de 23.0 ± 1.0 g, se mantuvieron en el laboratorio de bioensayos, en las instalaciones del CIBNOR, bajo condiciones controladas, 28 °C, 34 ppm salinidad, 7.4 mg/L oxígeno disuelto, con un recambio de agua del 70% una vez al día. Durante este periodo se les proporcionó alimento PIASA 35% (el 3% de su peso), dos veces al día. Después de 7 días de aclimatación, los organismos fueron divididos en dos grupos, alimentados (control) y ayunados, los

organismos ayunados fueron sometidos a ayuno durante 120 h, realizando muestreos a las 2, 24, 72 y 120 h de ayuno, además un subgrupo de los organismos ayunados fue realimentado a las 96 h y muestreado a las 120 h (re-alimentados). Una vez muestreados, tres organismos de cada tiempo de ayuno se sacrificaron y se disectó la glándula digestiva de cada uno para obtener 100 mg de tejido. Las muestras fueron almacenadas en TRIzol® (Invitrogen) a -80 °C, para su uso posterior.

Aislamiento del ARN total

El ARN se extrajo utilizando TRIzol® (Invitrogen), que tiene su fundamento en la metodología descrita por Chomczynsky y Sacchi (1987). Se adicionó 1 ml de reactivo de TRIzol® por cada 100 mg de tejido, enseguida se realizó el homogenizado con un pistilo. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir la disociación completa de complejos de nucleoproteínas. Después, a cada muestra se adicionó 200 µl de cloroformo, se agitaron vigorosamente por 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,000 g a 4 °C por 15 minutos y la fase acuosa superior se transfirió a un tubo de 1.5 ml y enseguida se adicionó 500 µl de isopropanol. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugaron a 12,000 g a 4 °C por 15 minutos. Posteriormente, se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado de ARN con 1 ml de etanol al 75% frío en agua con dietilpirocarbonato al 0.1% (DEPC). La muestra se mezcló con vortex y se centrifugó a 7,500 g a 4 °C por 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el pellet de ARN se secó al aire por 5 – 10 minutos. Finalmente, el ARN se disolvió en 50 µl

de agua libre de ARNasa (DEPC), se incubó a 60 °C por 10 minutos y se almacenó a – 80°C.

Evaluación cuantitativa y cualitativa de ARN

La concentración fue determinada por el método Warburg-Christian (1942). La absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm fue obtenida por triplicado empleando un espectrofotómetro. Se hicieron diluciones 1:250 en agua DEPC y las muestras se leyeron en celdas de cuarzo de 1 ml empleando un espectrofotómetro Lambda Bio 20 (Perkin-Elmer). Con la finalidad de comprobar la calidad del ARN, la composición de la muestra fue separada por electroforesis en un gel de agarosa al 1% bajo condiciones desnaturalizantes, la cual consistió en tres procesos: elaboración del gel, preparación de las muestras y corrimiento de la electroforesis. En la elaboración del gel se disolvió la agarosa (0.25 g) en 21.8 ml de agua DEPC y 2.5 ml de buffer MOPS 10X (MOPS 0.2 M, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7.0 y esterilizado en autoclave, preparado en agua DEPC), y 3.75 µl de SYBR Safe 10,000 X (Invitrogen, S33102), la mezcla se calentó por un minuto y posteriormente se enfrió mediante agitación suave, después se agregó 1 ml de formaldehído y se vació en el molde al cual previamente se le colocó el peine. Para la preparación de las muestras se mezclaron 3 µg de ARN total, 2 µl de buffer de carga 6X (750 µl de formamida, 150 µl MOPS 10X, 240 µl formaldehído, 100 µl de agua DEPC, 100 µl de glicerol y 80 µl de azul de bromofenol al 10%). Enseguida las muestras se calentaron a 65 °C por 15 minutos y se enfriaron en hielo. Posteriormente, se colocó el gel dentro de la cámara asegurándose de que quedara completamente cubierto por el buffer de corrida MOPS 1X y los pozos del gel

sin burbujas. Después, se cargó el gel con las muestras y se corrió a 40 V hasta que el azul de bromofenol del buffer de carga alcanzó la mitad del gel. Se fotodocumentó con un transiluminador. Las soluciones que tuvieron contacto con el ARN fueron preparadas con agua DEPC. El material de cristalería se esterilizó en autoclave a 120 °C por 20 minutos.

Limpieza del ARN y síntesis de ADNc

Se incubaron 10 µg del ARN obtenido con 4 ó 6 U de la enzima ADNasa I (Sigma, AMPD1) en un volumen final de 20 µl, para eliminar la contaminación por ADN genómico (ADNg), la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, posteriormente se adicionó 1 µl de una solución para inhibir la actividad de la ADNasa I y finalmente se incubó a 70 °C por 10 minutos.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó utilizando 1 µg de ARN libre de ADNg y el sistema de transcripción reversa (Promega, A3500) en el cual el ARN se mezcla con 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de buffer de transcripción reversa 10X, 2 µl de dNTP 10 mM, 0.5 µl de inhibidor de ribonucleasa, 0.6 µl de transcriptasa reversa AMV, 1 µl de oligo(dT)₁₅ en un volumen final de 20 µl. La mezcla de reacción fue calentada a 42 °C por 15 minutos y posteriormente calentado a 95 °C por 5 minutos y finalmente enfriada en hielo por 5 minutos.

Obtención de fragmentos internos del transcrito de las lipasas digestiva e intracelular

Se amplificaron los transcritos de *pvl* y *pv_il* mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el ARNm de la lipasa digestiva (*pvl*) se diseñaron oligonucleótidos partiendo de una secuencia parcial similar a lipasa de *P. vannamei* (No. de

acceso DQ858927.1). Los oligonucleótidos utilizados fueron *pvl_Fwd* y *Rev* (Tabla III) y se utilizó ADNc de glándula digestiva para su amplificación. Para amplificar el transcrito de la lipasa intracelular (*pv_il*) se diseñaron oligonucleótidos específicos utilizando secuencias reportadas para el gusano de la col *H. armigera* (No. de acceso EU325554) y del mosquito *C. quinquefasciatus* (No. de acceso XM_001841899). Los oligonucleótidos utilizados fueron: *pv_il Fwd* y *Rev* (Tabla III).

Las amplificaciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 μ l que contenían: 12.5 μ l de Gotaq® Green Master Mix (Promega, M7122), 9.5 μ l de agua libre de nucleasas, 1 μ l de cada oligonucleótido (20 μ M) y 1 μ l de ADNc sintetizado para cada tejido. En todos los casos el programa utilizado fue: 95 °C, 5 min; 35 ciclos de 95 °C 30 s, T_a (Tabla III) 30 s, y 68 °C 1 min por cada 1,000 bases de producto. Para *pvl* se utilizó ADNc de glándula digestiva, mientras que para *pv_il* se obtuvo de glándula digestiva, pleópodos y urópodos. Los productos fueron clonados en un vector TOPO (Invitrogen), transformados en células competentes DH5 α (Invitrogen) y su secuencia fue determinada (Macrogen Inc., Seúl, Corea). Se comprobó la identidad del fragmento amplificado por análisis bioinformático usando la base de datos de la NCBI, y el algoritmo de BLAST (Zhang et al., 2000).

Tabla III. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de fragmentos de transcritos en este estudio.

Nombre	Dirección	Secuencia (5'→3')	Temperatura de alineación (°C)	Producto (pb)
<i>pvl</i>	Fwd	GAAAGCGCTGGCTTACAAAC	55	335
	Rev	TAGGACCTTCGGCATTGTTC		
<i>pv_il</i>	Fwd	GGCAACGTGGATTCTATCC	58	620
	Rev	CAGAGCAGCATCCAGCAGTA		
<i>L8</i>	Fwd	TAGGCAATGTCATCCCCATT	58	167
	Rev	TCCTGAAGGAAGCTTTACACG		
<i>pv_il</i>	Fwd2	CCTTTGAACAGGGTCGATGT	58	400
	Rev2	CAGAGCAGCATCCAGCAGTA		
<i>pvlRT</i>	Fwd	CTGCCGAAGTCTGCTACAAC	62.5	143
	Rev	GACCAGCTGTGCGTAGTGAT		
<i>pv_ilRT</i>	Fwd	GGCAACGTGGATTCTATCC	62.5	190
	Rev	ACATCGACCCTGTTCAAAGG		

Obtención de la secuencia completa del transcrito de la lipasa digestiva

El transcrito *pvl* fue obtenido mediante la siguiente estrategia: primero la región central fue obtenida por PCR, utilizando los oligonucleótidos *pvl* Fwd y Rev (nucleótidos 1-335). La región del extremo 3' (nucleótidos 1- 880), se obtuvo empleando un ADNc sintetizado con un sistema comercial (GeneRacer Kit, Invitrogen) por el método de amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE). El extremo 3' de *pvl* se amplificó utilizando los oligonucleótidos *pvl*_Fwd y el oligonucleótido 3' Nested del kit, mientras que el extremo 5' se amplificó utilizando el oligonucleótido *pvl*_Rev y el oligonucleótido 5' Nested del kit. Las amplificaciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 µl que contenían: 12.5 µl de Gotaq® Green Master Mix (Promega, M7122), 9.5 µl de agua libre de nucleadas, 1 µl de cada oligonucleótido (20 µM) y 1 µl de ADNc sintetizado para glándula digestiva. En todos los casos el programa utilizado fue: 95 °C, 5 min; 35 ciclos de 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, y 68 °C 1 min por cada 1,000 bases de producto. Los productos fueron clonados en un vector

TOPO (Invitrogen), transformados en células competentes DH5 α (Invitrogen) y su secuencia fue determinada (Macrogen Inc., Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas de nucleótidos y la deducida de aminoácidos fueron analizadas por BLAST (Zhang et al., 2000). Las propiedades teóricas de las secuencias obtenidas fueron analizadas usando el software PredictProtein (Rost 2004) y el servidor SignalP 3.0 Server (Nielsen 1997).

Identificación de la función biológica de las lipasas

Para determinar la función biológica de las lipasas, primeramente se extrajo ARNm de la glándula digestiva, músculo, pleópodos, urópodos, branquias, tallo ocular, hemocitos, tubo digestivo, sistema nervioso y gónada de camarón *P. vannamei* (Chomczynski y Sacchi, 1987), la integridad del ARN total, la limpieza del ARN total y la síntesis de ADNc fue realizada de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.

Los transcritos *pvl*, *pv_il* y el gen constitutivo *L8* (GenBank No. de acceso: DQ316258) fueron amplificados para cada tejido. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación fueron: para *L8*, L8 Fwd y Rev; para *pvl*, *pvl* Fwd y Rev; para *pv_il*, *pv_il* Fwd2 y Rev2 (Tabla III). En todos los casos el programa utilizado fue: 95 °C, 5 min; 35 ciclos de 95 °C 30 s, T_a (Tabla III) 30 s, y 68 °C 1 min por cada 1,000 bases de producto. Las amplificaciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 μ l que contenían: 12.5 μ l de Gotaq® Green Master Mix (Promega, M7122), 9.5 μ l de agua libre de nucleadas, 1 μ l de cada oligonucleótido (20 μ M) y 1 μ l de ADNc sintetizado para cada tejido. La presencia de productos de PCR se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe y se fotodocumentó con un transiluminador.

Efecto del ayuno sobre la cantidad de transcritos de lipasas

Se cuantificaron los ARNm de *L8* (control), *pvl* y *pv_il* por PCR cuantitativo, utilizando un equipo StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystem) y la mezcla de IQ SYBR Green Super Mix 2X (BioRad, 170-8882) (KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM, pH 8.4, dNTPs 0.4 mM, iTaq DNA polimerasa, 50 U/ml, MgCl₂ 6 mM, SYBR Green I, fluoresceína 20 nM y estabilizadores) para la detección de la amplificación por fluorescencia en cada ciclo (40 ciclos). Se utilizó ARN total de 3 camarones por tiempo de ayuno (2, 24, 72 y 120 h ayunado y 120 h re-alimentado) de los organismos control y de los ayunados, se preparó un ADNc de cada ARN (200 ng) y se realizaron duplicados de las reacciones individuales. Los fragmentos de *L8*, *pvl* y *pv_il* se amplificaron usando los siguientes oligonucleótidos: para *L8*, L8 Fwd y Rev; para *pvl*, pvl_RT Fwd y Rev; para *pv_il*, pv_iIRT Fwd y Rev (Tabla III). Las amplificaciones de PCR se realizaron en volúmenes de 20 µl que contenían: 10 µl de IQ SYBR Green Super Mix 2X, 3 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de cada oligonucleótidos (10 µM) y 5 µl de ADNc (diluído 1:5 con agua libre de nucleasas). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento de los oligonucleótidos a 62.5 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 55 s, seguido de una curva de disociación que consistió de 95 °C 15 s, 70 °C por 20 s seguido de incrementos de 0.3 °C hasta 90 °C por 15 s. Se obtuvieron valores de C_T (threshold cycle), ciclo en el que se registra amplificación en cada muestra, utilizando el software StepOne software v2.0 (Applied Biosystem).

La eficiencia del PCR fue validada de acuerdo a las premisas de Livak et al., (2001). Se realizaron diluciones seriadas de ADNc (1:10 v/v) que se usaron como templado en la amplificación de los tres genes a evaluar *pvl*, *pvl_il* y *L8*. La muestra más concentrada de ADNc contenía 1 ng de RNA total. Tanto la media del C_T como el delta C_T fueron calculados para *pvl*, *pvl_il* y *L8*, $\Delta C_T (C_{T_{pvl}} - C_{T_{L8}})$ y $\Delta C_T (C_{T_{pvl_il}} - C_{T_{L8}})$, respectivamente. Se graficó el *log* de las concentraciones de ADNc versus ΔC_T de cada gen, y se hizo una regresión lineal (n=3). De acuerdo a la metodología del $2\Delta\Delta C_T$, si el valor absoluto de la pendiente es cercano a cero, la eficiencia del gen de interés y el gen de referencia es similar y este método puede ser utilizado para analizar los datos (Livak et al. 2001).

El método $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ fue empleado para la cuantificación relativa de ARNm de cada gen evaluado de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{Ecuación [2]} \quad (\Delta\Delta C_T) = (C_{TB} - C_{TL8})_{\text{tiempo x}} - (C_{TB} - C_{TL8})_{\text{control c}}$$

donde C_{TB} , es el C_T del gen blanco (*pvl* o *pvl_il*); C_{TL8} , el C_T del gen *L8*, tiempo X, es el tiempo de ayuno correspondiente; control c, es el tiempo de muestreo en organismos control (Livak y Schmittgen, 2001). Para la validación del gen constitutivo *L8*, se cuantificó su abundancia a lo largo del ayuno, con la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación [3]} \quad E = 2^{-(\Delta C_T)}$$

$$\text{Ecuación [4]} \quad (\Delta C_T) = (C_{TL8})_{\text{tiempo x}} - (C_{TL8})_{\text{control C}}$$

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica de PVL y PV_IL se analizaron utilizando métodos estadísticos paramétricos, la normalidad de los valores obtenidos fueron analizados mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad por medio de la prueba de Barlett. Luego se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

Los resultados de la cuantificación de *pvl* y *pv_il* por el método de $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ fueron analizados por métodos no paramétricos debido a la falta de normalidad de los datos obtenidos, los datos fueron analizados con el estadístico de prueba Kruskal-Wallis (nivel de significancia $p < 0.05$) y las diferencias entre las medianas de cantidad de los transcritos en los diferentes tiempos de ayuno fueron localizadas por medio de gráficas de caja con muesca y bigote, utilizando el programa computacional Statgraphics Centurion XVI v. 16.0.03 (2009).

Resultados

Identificación y caracterización de las lipasas del camarón blanco

Identificación de lipasas en el camarón blanco

Previo a la purificación de la lipasa digestiva e intracelular de *P. vannamei*, las proteínas con actividad de lipasa fueron identificadas por zimogramas en geles de poliacrilamida al 8%, empleando MUF-butirato como sustrato, en varios tejidos de la especie, glándula digestiva, músculo, pleópodos y urópodos (Fig. 10).

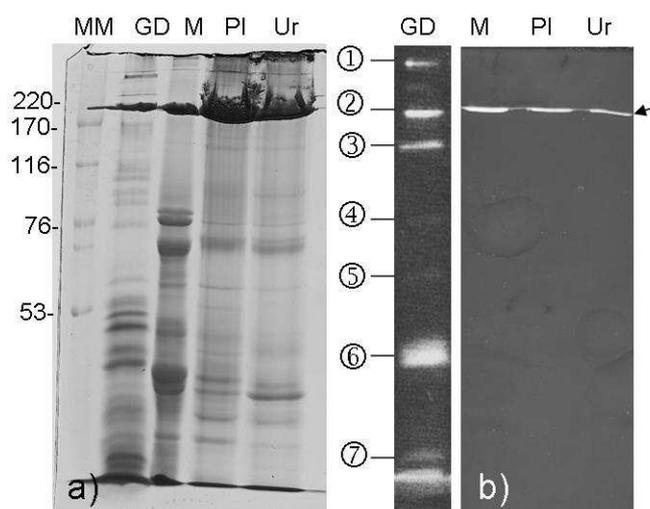


Figura 10. Lipasas de *Penaeus vannamei* en diferentes tejidos. Electroforesis SDS-PAGE 8%. a) Composición de proteínas y b) lipasas usando MUF-butirato como sustrato. MM: Marcador de peso molecular, GD: glándula digestiva, M: músculo, PI: pleópodos y Ur: urópodos.

Siete bandas de actividad fueron identificadas en la glándula digestiva, mientras que en músculo, pleópodos y urópodos sólo una banda de actividad fue identificada, la lipasa (banda 1) con una masa molecular ~220 kDa de la glándula digestiva fue inhibida por E-

600 pero no por THL (Fig. 11). La banda 2 con una masa molecular ~ 200 kDa (Fig. 10) encontrada en todos los tejidos incluyendo la glándula digestiva fue inhibida por THL y E-600 al igual que la banda 3 y 6 (Fig. 11) con masas moleculares de ~ 150 y 45 kDa respectivamente. Las lipasas inhibidas por THL y E-600 fueron reconocidas como lipasas tipo serino, ya que ambos inhibidores se unen covalentemente al residuo serina de la triada catalítica de las lipasas, el cual es esencial para la catálisis (Hadváry et al., 1991). Por lo anterior la banda 2 observada en todos los tejidos corresponde a una lipasa intracelular.

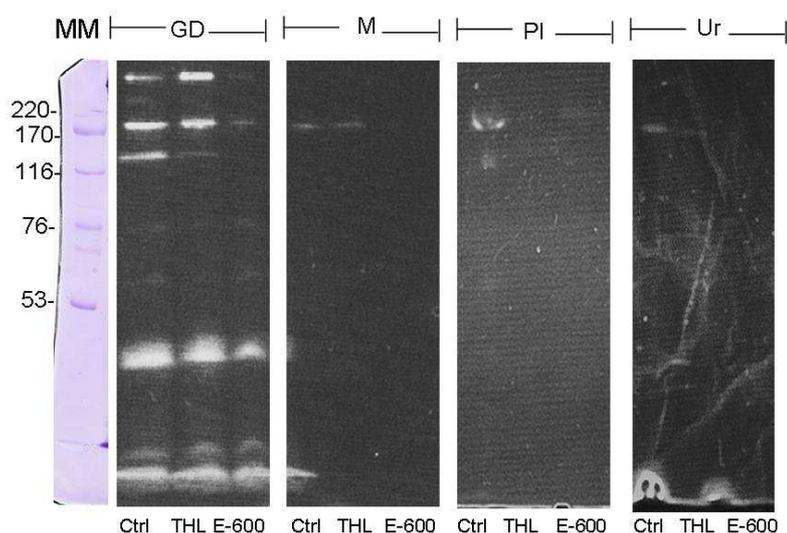


Figura 11. Identificación de lipasas por medio de inhibidores en diferentes tejidos. Electroforesis SDS-PAGE 8%, glándula digestiva (GD), músculo (M), pleópodos (PI) y urópodos (Ur). MM: Marcador molecular, Ctrl: control, THL y E-600: muestra incubada con el inhibidor correspondiente.

La lipasa digestiva fue identificada mediante un análisis comparativo entre la composición de proteína de la glándula digestiva, la actividad de lipasa y de proteasa (Fig. 12) (García-Carreño, 1993), dado que se ha descrito que las quimotripsinas pueden hidrolizar enlaces éster dada la homología con el sitio activo de las lipasas (Nelson y Cox, 2000), quienes

comparten la misma triada catalítica (Ser, His, Asp) y mecanismo de reacción, se hizo un análisis comparativo del extracto crudo de la glándula digestiva mediante zimogramas para proteasas, usando caseína como sustrato, y para lipasas usando MUF-butirato como sustrato. Mediante este estudio, 7 bandas de actividad fueron identificadas, de las cuales 1-3 son de alto peso molecular y de 4-7 de bajo peso molecular, las bandas 6 y 7 corresponden a quimotripsinas, ya que presentan actividad sobre el sustrato de caseína, éstas enzimas ya fueron descritas para el camarón blanco como quimotripsinas (Hernández-Cortés et al., 1997). Por lo tanto, la banda 5, la cual no presenta actividad de proteasas, pero si presenta actividad sobre MUF-butirato, corresponde a una lipasa digestiva, la cual es objeto de estudio en este trabajo.

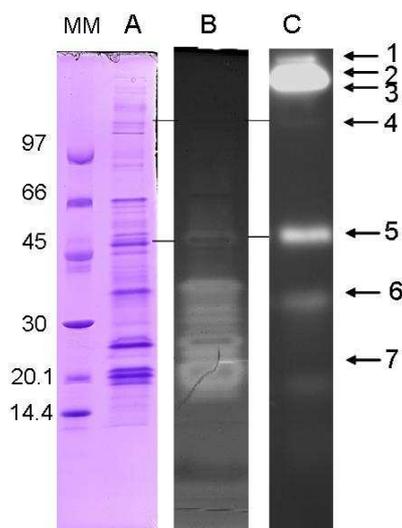


Figura 12. Identificación de lipasas en la glándula digestiva. SDS-PAGE 12%. MM: marcador molecular, A: composición de proteína, B: zimograma de proteasas, C: zimograma de lipasa. Flechas indican bandas con actividad de lipasa.

Purificación de la lipasa digestiva

La lipasa digestiva, nombrada PVL, fue aislada en dos pasos cromatográficos, la figura 13 muestra el cromatograma de la cromatografía de exclusión molecular (Fig. 13a), donde las proteínas fueron separadas por masa molecular, siendo las fracciones 5-7 donde se encontrara la actividad de la enzima de interés (Fi. 13b,c). Estas fracciones (5-7) fueron empleadas para la cromatografía de intercambio aniónico (Fig. 14), método por el cual cuatro fracciones (37-40) fueron obtenidas con la proteína (Fig. 14a), todas las fracciones presentaron actividad (Fig. 14b). La proteína (Fig. 14d) mostró una banda de actividad (Fig. 14e) con una masa molecular de 44.8 kDa. La masa molecular fue estimada por R_f . Los resultados sugieren que PVL es una proteína monomérica. El rendimiento de la purificación de PVL se presenta en la Tabla IV. Utilizando 200 mg de glándula digestiva se recuperó 0.52 mg de PVL pura.

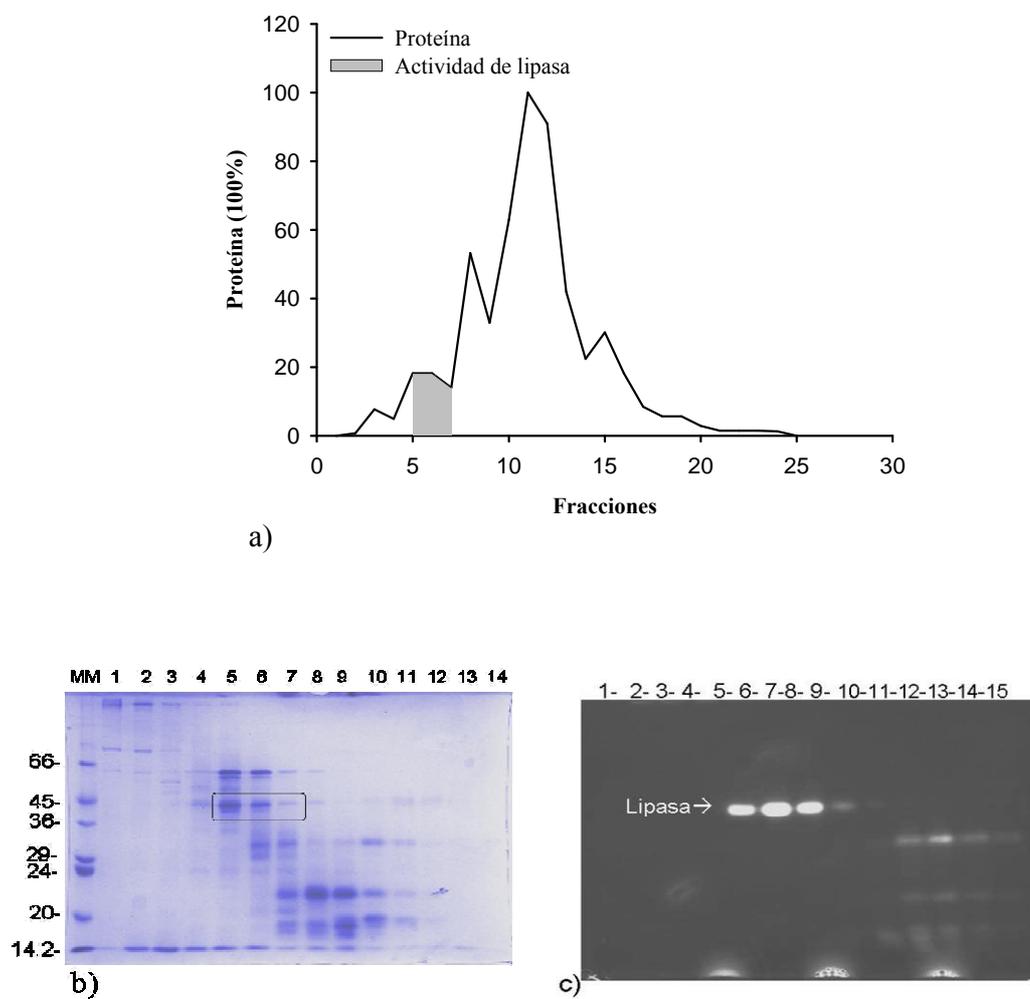
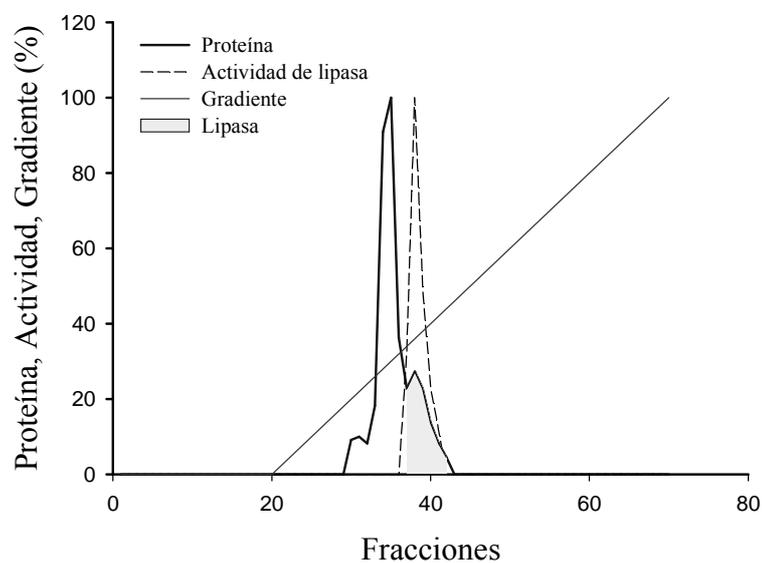


Figura 13. Purificación de la lipasa digestiva del camarón blanco.

a) Cromatograma de exclusión molecular en gel Superdex 200. b) Composición de proteína y c) zimograma de actividad empleando MUF-butirato. Las bandas con actividad de lipasa se marcan con un cuadro en el gel para proteína. MM: marcador molecular.



a)

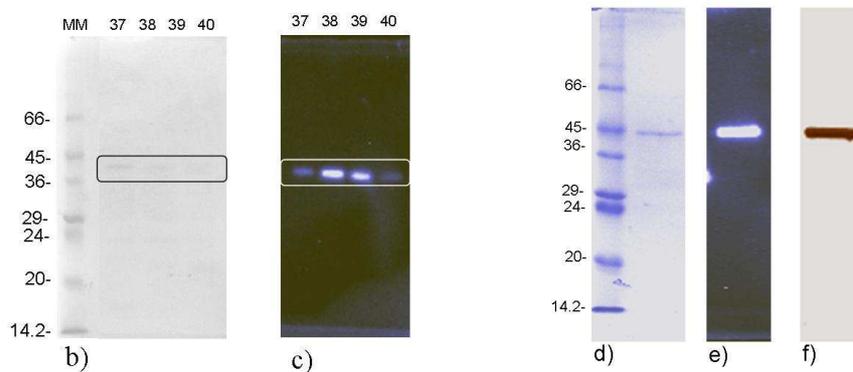


Figura 14. Purificación de lipasa digestiva (PVL) por intercambio aniónico. Cromatograma de intercambio aniónico. b) Composición de proteína y c) zimograma de fracciones colectadas, d) PVL concentrada por Amicon y separada por SDS-PAGE 12%, e) zimograma de PVL empleando MUF-butirato y f) Tinción de plata de PVL. Bandas con actividad de lipasa se indican con cuadros en b y c. MM: marcador molecular.

Tabla IV. Tabla de purificación de la lipasa digestiva de *Penaeus vannamei*.

Paso	^a Proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	^a Actividad Total (U)	^a Actividad Específica (U/mg)	Factor de Purificación	(%)
Liofilizado	197.6 ± 2.5	197.6 ± 2.5	14162 ± 70.7	71.6 ± 0.65	1	100
Filtración en gel S-200	3.65 ± 0.13	1.82 ± 0.06	2285 ± 4.08	1252 ± 45.2	17.46 ± 0.47	0.16 ± 0.0
Cromatografía aniónica Resource Q	1.03 ± 0.05	0.518 ± 0.02	1783 ± 5.11	3447 ± 174	48.12 ± 2.8	0.12 ± 0.0

^aUna unidad: 1 μmol de ácido graso producido por minuto usando TC₁₈.

^bEl contenido de proteína fue estimado por el método de Bradford (1976).

Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Análisis de espectrometría de masas de la lipasa digestiva

Se obtuvieron 5 péptidos de la lipasa digestiva, QQTQR, YYAGWSMGTTVFW, AMMSEK, EEFNHLDF y GWGIHADELVYR, uno de ellos muestra evidencia de la secuencia consenso característica de este grupo de enzimas GX SXG, en la cual se encuentra el residuo de serina de la triada catalítica, confirmando la identidad de la enzima.

Purificación de la lipasa intracelular

La lipasa intracelular, nombrada PV_IL en este trabajo, fue aislada por cromatografía hidrofóbica a partir de un extracto de pleópodos (Fig. 15a). La lipasa intracelular con masa molecular de 196 kDa fue aislada a homogeneidad (Fig. 15b). La enzima mostró estar compuesta por dos monómeros, un monómero de 95.26 kDa y otro de 63.36 kDa (Fig. 15b, carril 5). Las subunidades de la enzima no están unidas por enlaces disulfuro, esto se vio reflejado en el patrón de bandeo de la enzima en presencia de DTT (Fig. 15b, carril 5) y en ausencia del agente reductor (Fig. 15b, carril 6). El rendimiento de la purificación de PV_IL se presenta en la Tabla V. Utilizando 17.18 mg de pleópodos se recuperaron 0.277 mg de PV_IL.

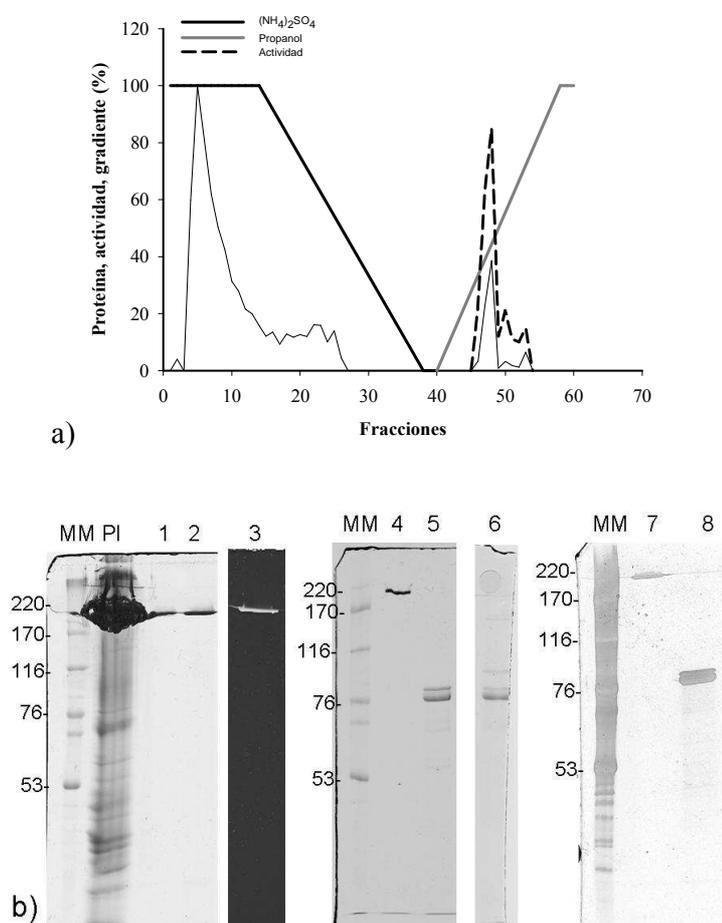


Figura 15. Purificación de la lipasa intracelular (PV_IL).

a) Cromatograma de interacción hidrofóbica. b) Composición de proteína y actividad de fracciones eluidas. MM: marcador molecular, PI: pleópodos, 1-2: fracciones concentradas, 3: zimograma de fracciones concentradas, 4: PV_IL reducida con DTT y hervida 10 min, 5: proteína hervida 10 min, 6-7: tinción de plata de PV_IL aislada y reducida con DTT, respectivamente.

Tabla V. Tabla de purificación de la lipasa intracelular de *Penaeus vannamei*.

Paso	^a Proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	^a Actividad Total (U)	^a Actividad Específica (U/mg)	Factor de Purificación	(%)
Extracto crudo	17.18 ± 0.12	17.18 ± 0.12	271.95 ± 0.11	15.83 ± 0.1	1	100
Fenil-Sepharosa CL-4B	0.231 ± 0.04	0.277 ± 0.05	55.44 ± 0.03	200 ± 0.5	12.63	20

^aUna unidad: 1 μmol de ácido graso producido por minuto usando TC_{18} .

^bEl contenido de proteína fue estimado por el método de Bradford (1976).

Características moleculares de lipasas de P. vannamei

Las características moleculares de las lipasas, digestiva e intracelular, aisladas de glándula digestiva y pleópodos respectivamente, se describen en la Tabla VI.

Tabla VI. Características moleculares de las lipasas de *Penaeus vannamei*

Enzima	Conformación	Masa molecular	<i>pI</i>	Glicosilaciones
Lipasa digestiva	Monomérica	44.8 kDa	3.5	+
Lipasa intracelular	Dimérica	196 kDa (95.26 y 63.36 kDa)	5.0	–

Características bioquímicas de las lipasas

Actividad específica de las lipasas

La actividad de las lipasas fue evaluada con ésteres derivados de naftol y con TAGs. La Tabla VII, muestra que tanto PVL como PV_IL son capaces de hidrolizar ácidos grasos de cadena corta y larga. La lipasas, digestiva e intracelular, presentan una tendencia a hidrolizar TAGs de cadena larga, siendo la lipasa digestiva la que presenta mayor actividad.

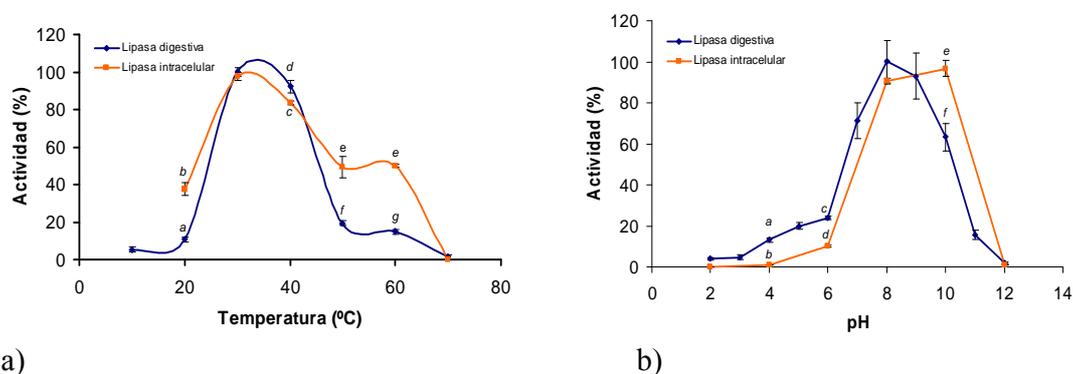
Tabla VII. Actividad específica de lipasas de *Penaeus vannamei*.

Sustratos	Actividad específica (U/mg)	
	PVL	PV_IL
Naftil-esteres		
α -Naftil-acetato	429.5 \pm 2.3 ^a	85.13 \pm 7.2 ^b
β -Naftil-acetato	441.0 \pm 1.3 ^a	71.52 \pm 5.02 ^b
β -Naftil-caprilato	15.1 \pm 0.1 ^b	27.22 \pm 2.02 ^c
Triacilglicéridos		
Tributirina (C:4)	475.8 \pm 4.9 ^c	215 \pm 1.9 ^d
Tripalmitina (C:16)	661.0 \pm 9.8 ^e	213.66 \pm 3.2 ^d
Triestearina (C:18)	780.6 \pm 9.8 ^f	416.56 \pm 3.3 ^g
Trioleina (C18:1)	1787.3 \pm 7.9 ^f	930.02 \pm 1.6 ^g

Las letras indican diferencias entre las enzimas ($p < 0.05$).

Efecto de la temperatura y del pH en la actividad de las lipasas

La dependencia de la actividad de las lipasas fue evaluada en un rango de 10 a 70 °C (Fig. 16). Se observó una respuesta diferencial ($p < 0.05$) en la actividad de las lipasas digestiva e intracelular. A temperaturas de 10 y 20 °C, la actividad de la lipasa digestiva fue menos del 10% con respecto a la máxima actividad mostrada a la temperatura de 30 °C para ambas lipasas. Con temperaturas mayores a 50 °C la actividad disminuye para la lipasa digestiva, mientras la intracelular conserva el 50% de su actividad. A 70 °C la actividad de ambas enzimas se perdió totalmente.



a) b)
Figura 16. Efecto de a) la temperatura y b) el pH, sobre la actividad de las lipasas. Las letras diferentes muestran diferencias significativas entre las enzimas ($p < 0.05$).

Efecto del calcio e inhibidores en la actividad de lipasas

Los cofactores no son requeridos para la actividad de lipasa, pero algunos cationes divalentes como calcio han mostrado que estimulan la actividad de la enzima en lipasas de origen bacteriano (Lesuisse, 1993). En las lipasas de *P. vannamei*, la actividad de las enzimas no se vieron afectadas por la concentración de Ca^{2+} .

El efecto de los inhibidores sobre la actividad de la lipasa digestiva e intracelular se muestra en la Figura 17. El inhibidor THL inhibió en un 100% a la lipasa digestiva y a la intracelular a concentraciones de 2.5 y 1 mM, mientras que para inhibir la actividad con el inhibidor E-600 se requirieron concentraciones de 7.5 y 10 mM para inhibir cerca del 100% de la actividad. Se encontraron diferencias significativas entre las lipasas tratadas con THL y E-600 ($p < 0.05$).

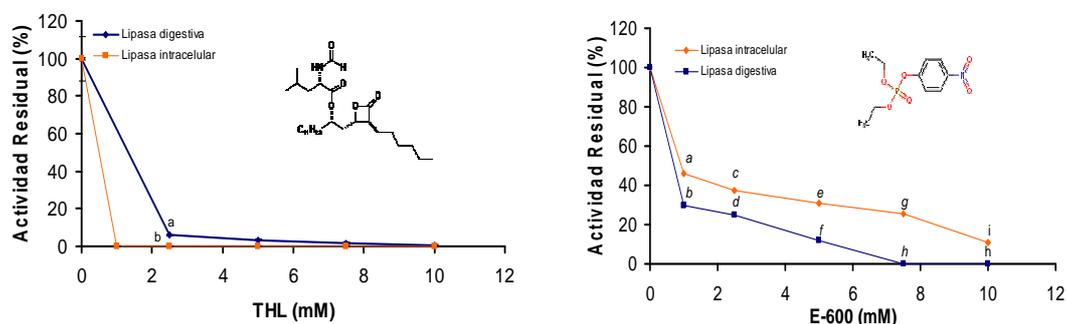


Figura 17. Efecto de inhibidores sobre la actividad de las lipasas. Las letras diferentes muestran diferencias significativas entre las lipasas ($p < 0.05$).

Efecto de la concentración de sales biliares sobre PVL

La inhibición por sales biliares se muestra en la Figura 18. En una concentración de NaDC 1 mM, la actividad de la lipasa digestiva decreció un 60% (1759 U/mg) y perdió toda su actividad a 3 mM NaDC. Con la finalidad de ver si la reacción era reversible, se adicionó trioleína a los 30 min de reacción a las mezclas que contenían 1 mM y 2 mM NaDC, los resultados mostraron que sí hubo una recuperación de la actividad enzimática, sin embargo los valores de actividad no superaron a los registrados para la reacción de hidrólisis sin NaDC.

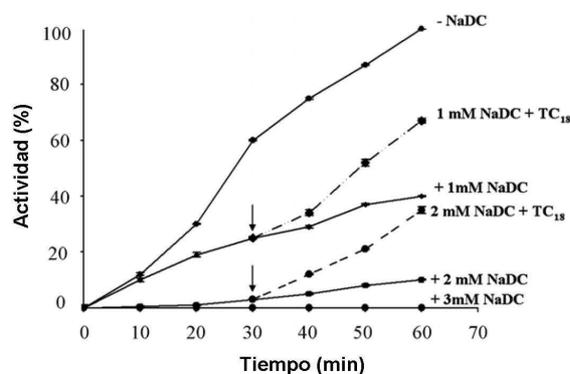


Figura 18. Efecto de la concentración de las sales biliares sobre PVL. NaDC: taurocolato de sodio, TC₁₈: trioleína usado como sustrato a pH 8.0 y 30 °C. Flechas indican adición de TC₁₈ a los 30 min de reacción.

Parámetros cinéticos de las lipasas

Los valores de $K_{M,app}$, $k_{cat,app}$ y $k_{cat}/K_{M,app}$ de las dos lipasas de *P. vannamei* se muestran en la Tabla VIII. La lipasa digestiva presentó una K_M menor que la intracelular y también mostró una mayor eficiencia catalítica con MUF-butirato como sustrato.

Tabla VIII. Comparación de los valores cinéticos de las lipasas aisladas y lipasas de diferentes origen.

	Sustrato	$V_{max,app}$	$K_{M,app}$ (mM)	$k_{cat,app}$ (s ⁻¹)	$k_{cat}/K_{M,app}$ ($\times 10^3 \text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Referencia
PVL	TC ₁₈	3404 ± 29.51 mM/min	3.22 ± 0.12	1010 ± 0.04	0.303 ± 0.02	Este estudio
PVL	MUF-TC ₄	3042 ± 2.88 uM/min	0.24 ± 0.00	12670 ± 0.27	52.8 ± 2.33	Este estudio
PV_IL	MUF-TC ₄	1226 ± 1.23 uM/min	41.03 ± 0.02	200.24 ± 0.87	4.88 ± 1.1	Este estudio
<i>M. tuberculosis</i>	TC ₁₈	0.6533 mM/min	7.57	ND	ND	(Deb et al., 2006)
<i>Paenibacillus sp.</i> BP-23	MUF-TC ₄	ND	0.0155	ND	ND	(Prim et al., 2003)
<i>Bacillus sp.</i> BP-7	MUF-TC ₄	ND	0.026	ND	ND	(Prim et al., 2003)
<i>Bacillus subtilis</i> LipA	MUF-TC ₄	ND	0.031	ND	ND	(Prim et al., 2003)

Genes de lipasas: Identificación, caracterización y expresión

Obtención de los fragmentos internos de los transcritos de las lipasas digestiva e intracelular

Se obtuvieron fragmentos internos de los transcritos de la lipasa digestiva e intracelular de *P. vannamei* de 335 y 620 pb para *pvl* y *pv_il*, respectivamente (Fig. 19). Para la amplificación de lipasa digestiva se utilizó ADNc de glándula digestiva. La lipasa intracelular fue amplificada en glándula digestiva, pleópodos y urópodos. Los productos fueron secuenciados por MACROGEN.

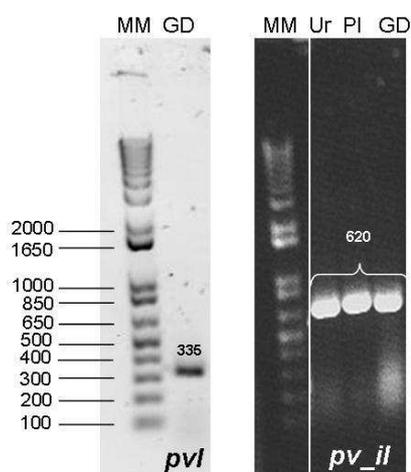


Figura 19. Fragmentos internos de *pvl* (335 pb) y *pv_il* (620 pb). Geles de agarosa (1.5%). MM: marcador molecular (1 Kb plus, Invitrogen), GD: glándula digestiva, Ur: urópodos, Pl: pleópodos.

Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de lipasas, *pvl* y *pv_il*, se identificaron mediante la comparación de las secuencias de nucleótidos obtenidas para las lipasas de camarón, con otras secuencias de nucleótidos de lipasas de otros organismos reportados en el GenBank mediante la herramienta BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool). La

secuencia parcial del transcrito *pvl* de 335 pb, resultó ser similar a un EST de *P. vannamei* (100% de identidad en nucleótidos; No. de acceso DQ858927) y similar a la lipasa de *C. elegans* (80% similar en nucleótidos; No. de acceso NM_070832.2). Se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos de la lipasa digestiva en donde se identificó la secuencia consenso GXSXG que corroboró que el fragmento de *pvl* pertenece a una lipasa. La secuencia parcial del transcrito *pvl* de 620 pb se identificó en glándula digestiva, pleópodos o urópodos. A partir de este fragmento, la secuencia deducida de aminoácidos fue obtenida, la cual por medio de un Blastp *pvl* resultó ser 38% similar a la lipasa de *Acyrtosiphon pisum* (, No. de acceso XP_001948643), 37% a la lipasa de *Aedes aegypti* (No. de acceso XP_001662791) y 33% a la lipasa de *Tribolium castaneum* (No. de acceso BA885636). La estructura primaria de *pvl* presenta dominios que corresponden a la familia de las esterasas – lipasas y un dominio de las superfamilia PLAT (Fig. 20).

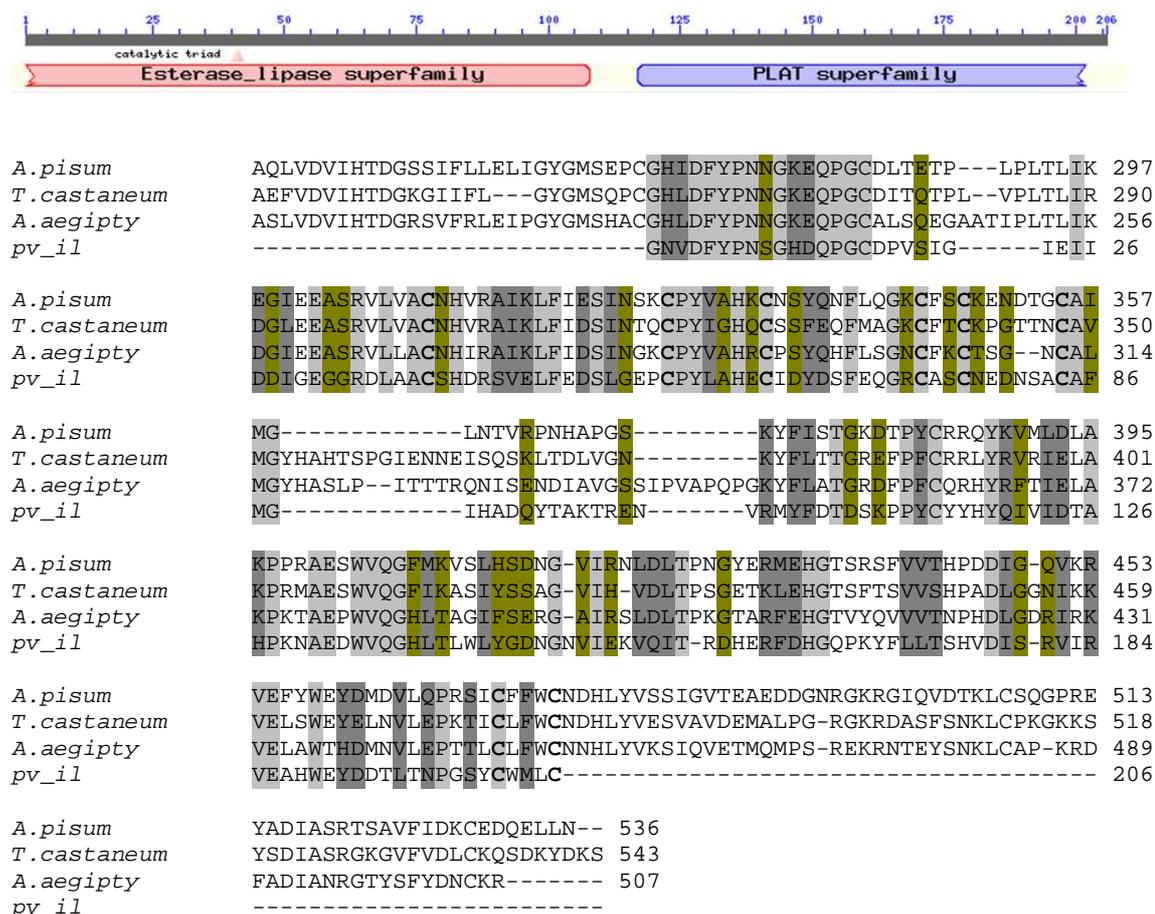


Figura 20. Secuencia deducida de aminoácidos de *pv_il* comparada con otras secuencias de lipasas.

A. pisum (No. de acceso XP_001948643), *T. castaneum* (No. de acceso, BA885636), *A. aegypti* (No. de acceso XP_001662791). Aminoácidos conservados se muestran en gris claro, las sustituciones conservativas se muestran en gris oscuro y las sustituciones semi-conservativas se muestran en verde.

Obtención del transcrito de la lipasa digestiva

Se obtuvo el transcrito completo de lipasa digestiva de *P. vannamei*, y fué publicado en GenBank con número de acceso FJ619564. La secuencia obtenida es de 1,186 pb y codifica para una proteína de 362 aminoácidos con un peso molecular deducido de 41.2 kDa y un punto isoelectrico calculado de 4.7. La secuencia nucleotídica presenta una región no transcrita en el extremo 5' (UTR) de 59 nucleótidos, delimitados por un codón de inicio (ATG). En el extremo 3' - se observó la cola de poli-adeninas en el extremo 3' de 20 pb. Se examinó la similitud de la secuencia de nucleótidos con otras secuencias de nucleótidos de lipasas en diferentes bases de datos a través de BLAST (NCBI, LED y ESTHER). Los resultados indican que esta enzima pertenece a la familia de las lipasas, por contener la región consenso GX SXG y una triada catalítica conformada por Ser, Asp e His, además, se dedujo un patrón de aminoácidos que corresponde al dominio de las α/β - hidrolasas [DY] [L] [G] XXX [VYY] X [GX SXGX] y la región correspondiente a la *lid* de la lipasa (aminoácidos 219-241) (Fig. 21), la *lid* de camarón blanco fue comparada con la de otras especies (Tabla IX).

```

-59ctgaaggagtagaaaaaattctcataatctcctttcttgtattgtatctgatagttgaatg
1 M
63 gataaatggcaaaaatatggaaatctaataaatcgatatagaagaaacgttaatgaatgc
2 D K W Q K Y G N L I N R Y R R N V N E C
123 acgatggaatacggaggatattctcattctccttttacgaaaacaaaatagttaaagca
22 T M E Y G R I F S F S F Y E N K I V K A
182 atggagaggagagacagaccgggagacagagaaaagacaacagacacaaagaaaggcaacg
41 M E R R D R P G D R E R Q Q T Q R K A T
242 aaagcgctggccttacaaaactcgccgatgcgggctatgatgtgtggctttcgaacatgcgc
61 K A L A Y K L A D A G Y D V W L S N M R
302 ggaaacacctattccagaaacctgtggagttggatcctgaagacatcagcttctggcag
81 G N T Y S R N H V E L D P E D I S F W Q
362 ttcagctgggacgaattagcttactacgatgttcctgagcattgattatgttctcggc
101 F S W D E L A Y Y D V P A S I [D Y] V [L] G
422 atgactggggctgaagcagtatactatgctggctggagcatggggaccaccgtcttctcg
121 M T [G] A E A [V Y Y] A [G W S M G] T T V F W
482 gcgatgatgagtgaaaaacctgagtataatgaaaaggttcgagccatggccgataggct
141 A M M S E K P E Y N E K V R A M A M A
542 cctgtcgccttcatgaacaatgccgaaggtcctatcatggcgctggctccttactctgat
161 P V A F M N N A E G P I M A L A P Y S D
602 gatcttgatttcatggccacccttctcggcgctcggggagtttctgccaagttcggacctg
181 D L D F M A T L L G V G E F L P S S D L
662 cttgatcacttctgagacgtactgagactcggaggccgtgactgccgaagtctgctac
201 L D H F V E T Y C D S E A V T A E V C Y
722 aacttctcctcctcctcctcgcggcccgaccccgacgaaattccgaaggacttctcctc
221 N F L L L L A G P D P D E I P K D F L P
782 ataatcctggctcacacacctgccggagcgtctgttcacaccgtcaatcactacgcacag
241 I I L A H T P A G A S V H T V N H Y A Q
842 ctggtcatgtcaggtgttttcgacaaatacattacggcctcattggcaacctgaaccac
261 L V M S G V F D K Y D Y G L I G N L N H
902 tacggacagaacacgcccgccttgttcaacctcagcagagtcgcccgccttggcttg
281 Y G Q N T P P L F N L S R V A A P V G L
962 ttctggggctccacggactggctggctgatcctacggacgtggcaaggctcgctgaagga
301 F W G S T D W L A D P T D V A R L A E G
1022cttccaaatctcgccttaatacacaaggtggataaggaagagttcaaccatctagacttt
321 L P N L A L N H K V D K E E F N H L D F
1082ggctgggggatccacgcccagcaactgggtgtaccgccacattctcgatttcttcgccaac
341 G W G I H A D E L V Y R H I L D F F A N
1142tactgataacaagaagaacttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
362 Y STOP

```

Figura 21. Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos de *pvl* de *P. vannamei*. Se muestran en sombreado claro el codón de inicio y de término. La señal de poliadenilación se muestra subrayada. La secuencia consenso GX SXG se muestran encerradas en el cuadro. Las regiones que corresponden a la estructura de las α/β -hidrolasas se muestran encerradas en cuadros punteados. Los aminoácidos de la triada catalítica se muestran sombreados en verde. La *lid* se muestra en gris oscuro. No. de acceso GenBank FJ619564.

Tabla IX. Comparación de la región de la *lid* en varias lipasas.

Proteína	Secuencia de <i>Lid</i>																				No. de acceso GenBank			
EL	C	G	L	N	D	V	L	G	S	I	A	Y	-	G	-	T	I	T	E	V	V	K	C	Q9Y5X9
LPL	C	N	I	G	E	A	I	R	V	I	A	E	R	G	L	D	V	D	Q	L	V	K	C	P06858
HL	C	H	F	L	E	L	Y	R	H	I	A	Q	H	G	F	N	A	I	T	Q	T	K	C	A2RUB4
PVL	C	Y	N	F	L	L	L	L	A	G	P	D	P	D	E	I	P	K	D	F	L	P		Este estudio
	*			•	:	•	•	•	:	•	•						•			•	•			

• Sustituciones semi-conservativas: sustituciones conservativas. EL: Lipasas endotelial, LPL: lipasa lipoproteica, HL: lipasa hepática, PVL: lipasa digestiva *P. vannamei*.

La secuencia deducida de aminoácidos de *pvl* presenta un 45% de similitud con la lipasa de *A. aegypti* (No. de acceso XP_001662499), 46% a la lipasa de *Culex quinquefasciatus* (No. de acceso XP_001844302), 42% a la lipasa de *Ixodes scapularis* (No. de acceso EEC17018) y 40% a la lipasa de *Drosophila mleanogaster* (NP_609418) (Fig. 22).

La estructura primaria de *pvl* de camarón blanco se comparó con otras estructuras primarias de lipasas de invertebrados con la finalidad de distinguir regiones conservadas de las lipasas (Fig. 23).

La comparación de las estructuras primarias por el método “Neighbor joining” con el programa “Clustal W” y el test de “Bootstrapping” empleando el programa MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) con 500 replicas (Tamura et al., 2007) de lipasas de vertebrados, invertebrados y bacterias permitió generar una relación filogenética de estas enzimas. Dado que las lipasas de los invertebrados carecen de un dominio de unión con colipasa en el extremo C-terminal, el análisis fue restringido al N-terminal en el cual se encuentra la secuencia consenso GX SXG (Fig. 24).

<i>C. quinquefasciatus</i>	MAQLLPSIPILLALISWACGVPTARNISATRHFQVDAEDAHLSPQLILKYGYGAEVHHA	60
<i>P. vannamei</i>	-----MDKWQKYGNLINRYYRNVNNECTMEYGR--IFSFS	32
<i>A. aegypti</i>	-----MLTASLTTLLITAGAIQRALAGTEQLVKRMGLPVEKHRA	39
<i>I. scapularis</i>	-----SLIASKGYQVEEYEV	15
<i>C. quinquefasciatus</i>	TTEDGYILELHRIP--KPGAP-----VVLLMHGLLCSSADWVSIQVGNGLAYLLADQ	110
<i>P. vannamei</i>	FYENKIVKAMERRD--RPGD-----RERQQTQRKATKALAYKLADA	71
<i>A. aegypti</i>	VTSDGYVLTMFRIIPANNNTSP-----VAFLOHGLIASSADWVILGPGKSLAHSLVTA	91
<i>I. scapularis</i>	TTSDGYILLAVQRIPEGRSNALRIQDTPKKVVFLLHGLLGSSADWVNLNYPQSLGFIILADA	75
<i>C. quinquefasciatus</i>	GYDVWLCNARGNRYSRKHRTLTPKMFQFWQFSWHEIGFYDLPASTIDYVLEKTRSKLHYI	170
<i>P. vannamei</i>	GYDVWLSNMRGNTYSRNHVELDPEDISFWQFSWDELAYYDVPASIDYVLMGTGAEAVYYA	131
<i>A. aegypti</i>	GYDVVMCNFRGNTISRKHVSLDPAQPFQWDFSWHEIGLYDLPAMIDYVLLKKTQKTLHYV	151
<i>I. scapularis</i>	GYDVWLCNVRGNTYSR--HVKNRRRSKEFWNFVDEMIERDLPETLDFVLKRTGRKRLFFV	134
	GXSXG	
<i>C. quinquefasciatus</i>	GHSQGTTSFFVMTSTRPEYNAKIALAQALAPVAFTENMQSPLLRIMALFODTLAALFETF	230
<i>P. vannamei</i>	GWSMGTTFVFWAMMSEKPEYNEKVRAMAAMAPVAFMNAECPIM-ALAPYSDDLDFMATLL	190
<i>A. aegypti</i>	GHSQGTTAFFVMAAMKPEYNSKLLSMQALAPIAFMGQMKSPFIRAIAPFSTQIEWTMRML	211
<i>I. scapularis</i>	GHSQGTSIMFGLLSLRPEYSEKIKLFCALGCVSAITNTRSP--MRYMSPFGKYIGAFVNSL	193
	▲	
<i>C. quinquefasciatus</i>	GVAEFAPSNAILHDISKLLCTQ-ISNNLCLNVLFQLAGANPDQVDLKLIPILMGHTPAG	289
<i>P. vannamei</i>	GVGEFLPSSDLLDHFVETYCDSEAVTAEVQYVFLLLLAGPDPDEIPKDFLPIILAHTPAG	250
<i>A. aegypti</i>	GVNELLP SHKMMIAGGQKACEDTSTLQEVQVNVIFLICGYDSAQLNRTLLPTIVQHTPAG	271
<i>I. scapularis</i>	GRYEFLENNFVMKLLDAVCRHEG-PRDVCNIVFLIYGPETMELNVTRLPPVFLCHVPAG	252
<i>C. quinquefasciatus</i>	ASTKQIVHYAQGVRSGRFRQYDHTGKIKNRFVYGTADPPVYNLTQVTAPVVFYALNDYLA	349
<i>P. vannamei</i>	ASVHTVNHYAQLVMVSGVFDKYDYGLIGNLNHYGQNTPLPLNLSRVAAPVGLFWGSTDWLA	310
<i>A. aegypti</i>	ASVKQLAHYAQGINSGRFRQFDHGVVGNVMNYGSSTPPSYPLKRITAPVFLHYGDNDWLA	331
<i>I. scapularis</i>	TSVRTMVHYSQILISGRFRQKDFGGENRNQLVYGASTPPEYDVSRVAVPVALFWSEGDWMA	312
	▲	
<i>C. quinquefasciatus</i>	VPVDVERLSRGIGNLAGYRQVRMETFNHLDLFAKDVRTLLEYEILGNVRRYGG-----	403
<i>P. vannamei</i>	DPTDVARLAEGLNPLALNKKVDKEEFNHLDFGWGIHADELVYRHLIDFFANY-----	362
<i>A. aegypti</i>	AVSDVRLLYRQLGNGTRLLRVPEKQWNHLDFEYATGAKSLLYNRVMDLMNRYNNAMPEKY	391
<i>I. scapularis</i>	DRDVALRRRRLBNVVLDFKVSQPKFSEIDFAAGIHAKALVYEPMMKLMASYKSAGE---	369
	▲	
<i>C. quinquefasciatus</i>	----	
<i>P. vannamei</i>	----	
<i>A. aegypti</i>	RMEE 395	
<i>I. scapularis</i>	----	

Figura 22. Múltiple alineamiento de *pvl* y otras lipasas.

Lipasas de *C. quinquefasciatus* (No. de acceso XP_001844302), *A. aegypti* (No. de acceso XP_001662499), *I. scapularis* (No. de acceso EEC17018). Números a lado derecho indican la posición de los aminoácidos. Aminoácidos idénticos se muestran sombreados en negro. Los triángulos indican los aminoácidos de la triada catalítica: serina (S), ácido aspártico (D) e histidina (H). La secuencia consenso está representada por GXSXG.

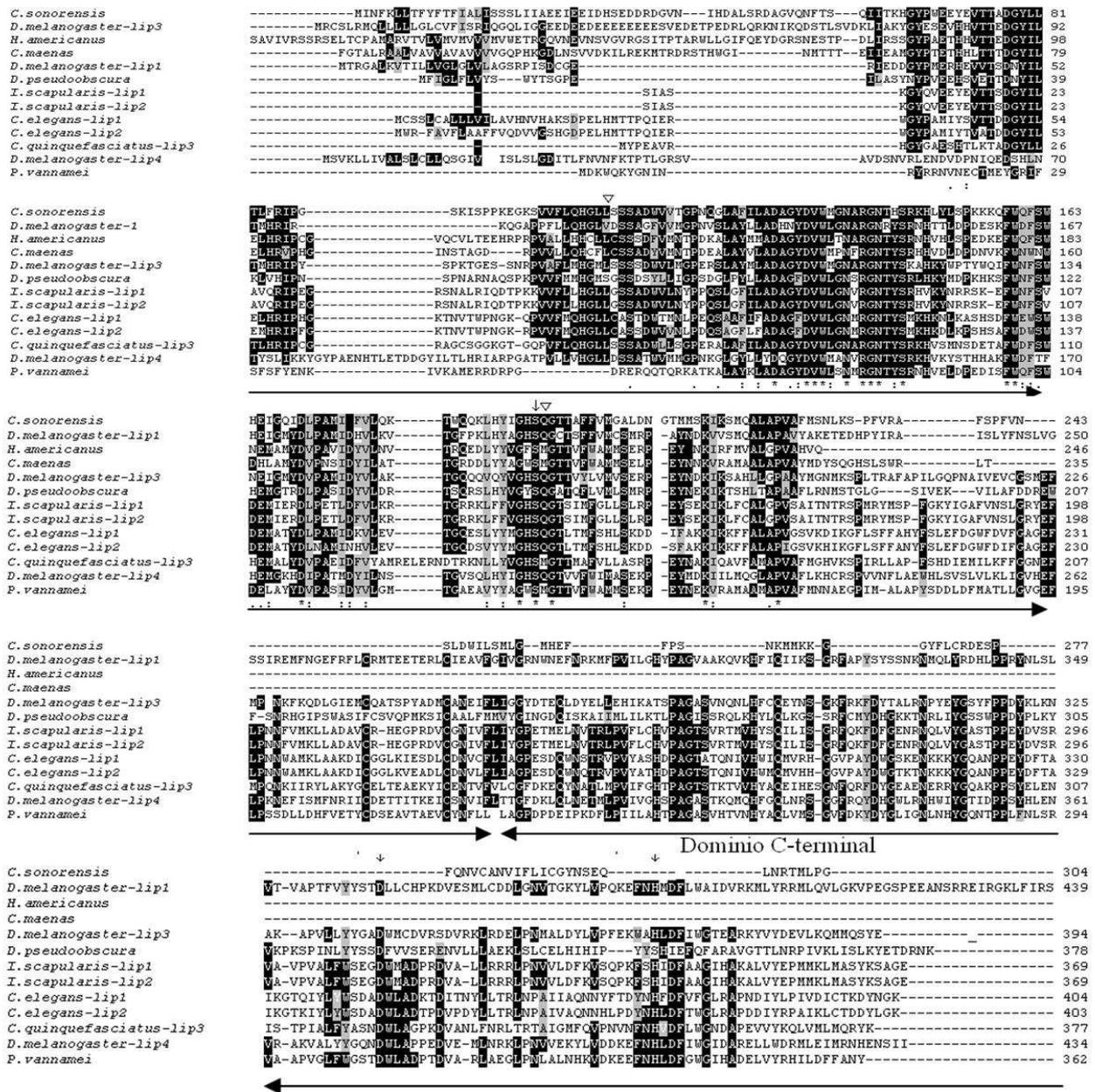


Figura 23. Comparación de secuencias deducidas de aminoácidos de lipasas de invertebrados.

Las flechas indican la triada catalítica, triángulos el codó nucleofílico (∇). *C. sonorensis* (AAV84257.1), *D. melanogaster* lip1 (NP_523540.1), *D. melanogaster* lip3 (CAA74737.1), *D. melanogaster* lip4 (AAF52971.1), *D. pseudoobscura* (XP_001358074), *I. scapularis* lip1 (XP_002413710.1), *I. scapularis* lip2 (EEC17018), *C. elegans* lip1 (NP_503233.1), *C. elegans* lip2 (NP_503184.1), *C. quinquefasciatus* lip3 (XP_001846790.1), *H. americanus* (EH116029.1), *C. maenas* (DV111912.1), *P. vannamei* (No. de acceso FJ619564).

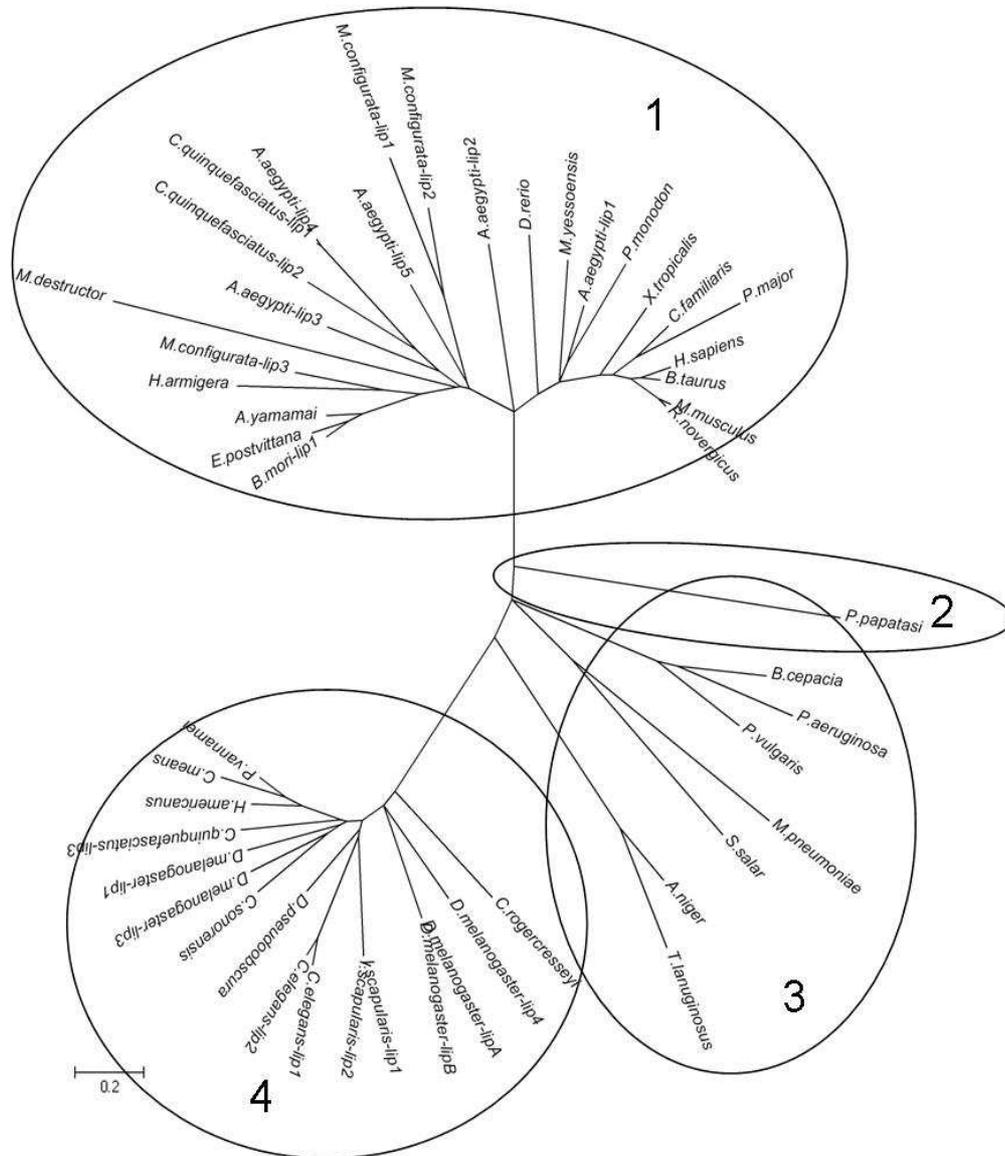


Figura 24. Relación filogenética de las lipasas de vertebrados, invertebrados y bacterias. Árbol filogenético generado usando el método Neighbor-joining y un bootstrap de 500, basado en la secuencia de aminoácidos del extremo amino de 48 lipasas (ver material suplementario).

Identificación de la función biológica de las lipasas

Una vez identificados los transcritos de la lipasa digestiva (*pvl*) y de la lipasa intracelular (*pv_il*), se trató de explicar su participación en la lipólisis del camarón blanco a través de un análisis cualitativo del ARNm de los transcritos en diferentes tejidos. La presencia de los transcritos *pvl* y *pv_il* en los tejidos del camarón blanco como pleópodos, tubo digestivo, branquias, glándula digestiva, urópodos, tallo óptico, sistema nervioso, hemocitos, músculo y gónada, se muestran en la Fig. 25, visualizadas en geles de agarosa (1.5%). El análisis cualitativo muestra claramente que *L8*, el gen constitutivo de camarón blanco, una proteína ribosomal, se encuentra en todos los tejidos del camarón, sin embargo el ARNm de *pvl* es exclusivo de la glándula digestiva. El transcrito de *pv_il* fue observado en pleópodos, tubo digestivo, branquias, glándula digestiva, urópodos, hemocitos, músculo y gónada. La intensidad de las bandas en cada caso fueron variables, lo que podría indicar abundancia del transcrito, sin embargo para fines de este estudio no se cuantificó el ARNm en cada tejido.

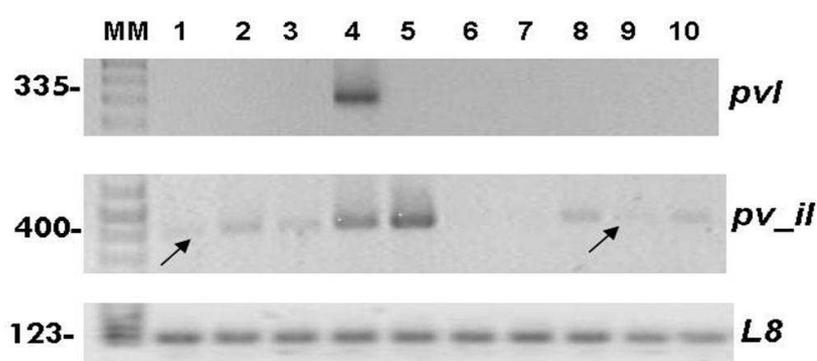


Figura 25. Transcritos de las lipasas en diferentes tejidos de camarón blanco.

MM: Marcador molecular, *L8*: gen constitutivo, *pvl*: lipasa digestiva y *pv_il*: lipasa intracelular en ADNc proveniente de pleópodos (1), tubo digestivo (2), branquias (3), glándula digestiva (4), urópodos (5), tallo óptico (6), sistema nervioso (7), hemocitos (8), músculo (9), y gónada (10) de camarón blanco.

*Efecto del ayuno en la concentración de transcritos de *pvl* y *pv_il**

La cuantificación relativa de los transcritos de *pvl* y *pv_il*, incluyó el uso de un gen constitutivo (*L8*) cuya expresión no presentó variaciones en las condiciones del experimento ($p < 0.05$). En este estudio se utilizó el gen *L8* para normalizar los datos de cantidad de *pvl* y *pv_il*. La temperatura de disociación de cada producto de PCR fueron de 86.07 °C, 89.62 °C y 83.9 °C para *pvl*, *pv_il* y *L8* respectivamente. La eficiencia de las reacciones de los transcritos de *pvl* y *pv_il* con respecto a *L8* cumplieron las premisas establecidas por Livak et al. (2001).

En la figuras 26 y 27, se muestran las gráficas de la cuantificación de los transcritos de *pvl* y *pv_il*, respectivamente. La concentración relativa de ambos transcritos presentó variaciones significativas durante el ayuno ($p < 0.05$). Se observó una disminución de 0.81 veces en los transcritos de *pvl* a las 24 h de ayuno, el cual representa el valor más bajo de *pvl* durante el ayuno. A las 120 h de ayuno, los transcritos de *pvl* no superan a los valores iniciales del experimento, sólo aquellos organismos que fueron re-alimentados a las 96 h y evaluados a las 120 h de ayuno superan los valores iniciales de *pvl*, siendo 0.6 veces mayor que a las 2 h de ayuno. Por otro lado, *pv_il* también mostró cambios durante el ayuno ($p < 0.05$). Al igual que *pvl*, los transcritos de *pv_il* mostraron su valor más bajo a las 24 h de ayuno, pero a las 72 h se duplican los valores iniciales de *pv_il*, obteniendo un aumento hasta de 4 veces la cantidad de transcritos a las 120 h de ayuno. Los organismos re-alimentados presentan una disminución de transcritos de 2.47 veces que los ayunados a las 120 h.

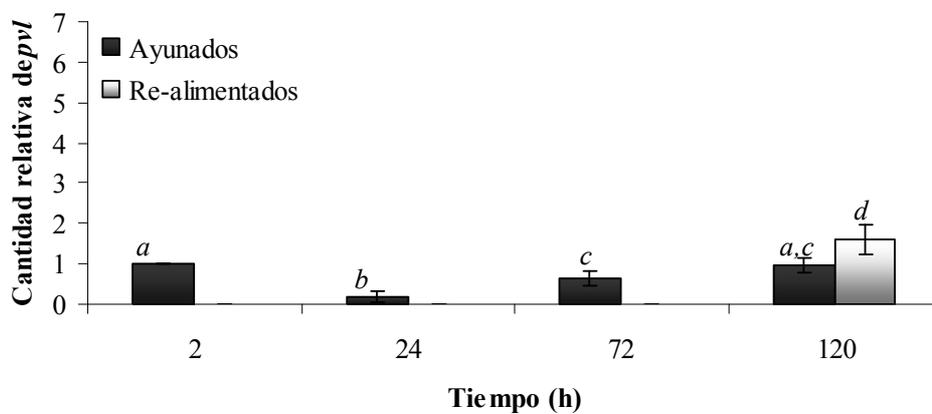


Figura 26. Cantidad relativa de los transcritos de *pvl*.
Medianas de la cuantificación de *pvl*, normalizada contra la cantidad del transcrito *L8* y la abundancia en los diferentes tiempos de ayuno (organismos control).

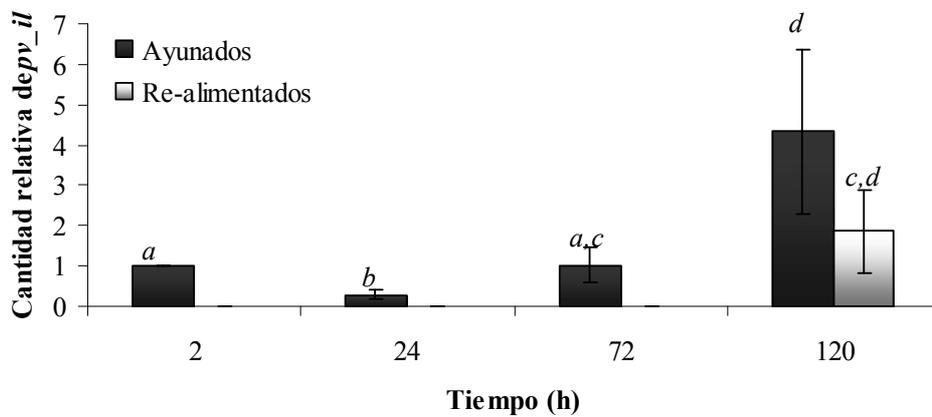


Figura 27. Cantidad relativa de los transcritos de *pv_il*.
Medianas de la cuantificación de *pv_il*, normalizada contra la cantidad del transcrito *L8* y la abundancia en los diferentes tiempos de ayuno (organismos control).

Discusión

Identificación y caracterización de las lipasas del camarón blanco

De acuerdo con Smith y cols. (1994) la localización de la actividad de lipasa en diferentes tejidos permite establecer la función fisiológica de la enzima, ellos establecieron que las enzimas que se encuentran en la glándula digestiva presentan un rol en la digestión de TAGs, mientras que las lipasas en tejidos diferente a la glándula digestiva son responsables de la hidrólisis de TAGs almacenados como cuerpo graso. De acuerdo con la actividad de lipasa encontrada en diferentes tejidos del camarón en este estudio, la lipasa denominada PVL presenta un rol en la digestión y PV_IL presenta un rol como lipasa intracelular.

Las dos lipasas en su forma nativa se observan como un solo polipéptido en SDS-PAGE. Sin embargo, la lipasa intracelular en su forma reducida presenta dos subunidades, las cuales se presentan de igual forma cuando la proteína fue sometida a ebullición en ausencia de agentes reductores. Este resultado es la consecuencia de que las subunidades se disocian en presencia de calor demostrando que los monómeros no están unidos por enlaces disulfuro sino por otro tipo de interacciones como son las iónicas o las hidrofóbicas. Este tipo de interacciones de las subunidades que conforman la lipasa ocurre en otras lipasas como la HSL (Langin Dominique, 1993) y la lipasa lipoproteica de humanos (Lookene et al., 2004).

Las enzimas purificadas mostraron propiedades de lipasas clase serino porque fueron inhibidas por los inhibidores THL y E-600, lo cual es consistente con la presencia del residuo de serina en el sitio catalítico. Además, los péptidos obtenidos por espectrometría de masas para la lipasa digestiva mostraron la región consenso GX SXG que caracteriza a

esta clase de enzimas y el cual ha sido encontrado en otras enzimas de invertebrados (Horne et al., 2009).

La presencia de carbohidratos asociados a PVL es una característica de las lipasas digestivas (Buscá et al., 1995). Esta modificación postraducciona puede estar asociada con el control de la secreción de la enzima por las células B durante la digestión. Esta característica ha sido observada en lipasas digestivas de invertebrados como el escorpión *Scorpio maurus* (Zouari et al., 2005) y la mosca *Drosophila melanogaster* (Pistillo et al., 1998), sin embargo existen excepciones en las cuales algunas lipasas digestivas no muestra glicosilaciones, tal es el caso de la lipasa pancreática del caballo *Equus caballus* (Rathelot et al., 1981).

El *pI* de PVL difiere de los observados en lipasas digestivas de otros organismos como la lipasa digestiva SDL (*pI* 9.6) del escorpión *S. maurus* (Zouari et al., 2007) y lipasa de rata (*pI* 4.9) (Tsuji et al., 1984), mientras que el *pI* de PV_IL es similar a las lipasas intracelulares de invertebrados como la lipasa TG (*pI* 5.6) de *Manduca sexta* (Arrese et al., 2006) y difiere de las lipasas HSL (*pI* 6.7 – 6.9) de mamíferos (Holm et al., 1988). Las diferencias en los *pIs* entre las lipasas de camarón confirman que son dos moléculas distintas.

A diferencia de los mamíferos, la lipasa digestiva de camarón en este estudio, no sintetiza colipasa como cofactor proteico de la lipasa pancreática. Este resultado se ha comprobado en otros invertebrados como el de cangrejo *C. mediterraneus* (Cherif et al., 2007) y el del langostino *P. leniusculus* (Marcus y Talalay, 1956), lo que marca una gran diferencia entre lipasas de vertebrados e invertebrados.

Si bien no se han descrito sales biliares en invertebrados que lleven a cabo la emulsión de los lípidos, moléculas análogas como las aciltaurinas han sido propuestos (Bezzine et al., 1999). Estos emulsificantes tienen un efecto inhibitorio sobre las lipasas digestivas, tal como se ha observado para PVL en este estudio, la inhibición de la enzima es reversible y esta relacionada con la concentración micelar crítica (CMC) del compuesto anfipático (NaDC) en la micela, es decir, a una concentración dada, las sales biliares o sus análogos tienen una tendencia a formar agregados denominados micelas, en las que se orientan presentando su grupo polar hacia el exterior y cara hidrofóbica hacia el interior (Desnuelle et al., 1960), permitiendo llevar a cabo la activación interfacial de la enzima mediante los cambios conformacionales (Hermoso et al., 1996), este mismo efecto ha sido observado en el cangrejo *C. mediterraneus* (Cherif et al., 2007), el camarón *P. monodon* (Deering et al., 1996) y el escorpión *S. maurus* (Zouari et al., 2005).

Además de otros factores, la actividad de una enzima esta en función de la temperatura y el pH. En *P. vannamei*, el 80% de la actividad de las lipasas es mantenida entre 30 y 40 °C, siendo la lipasa intracelular la que conserve el 50% de su actividad a 50 – 60 °C. Lipasas de otros organismos tienen su máximo de actividad en un rango más estrecho, por ejemplo el copépodo *Euphasia superba*, el pez *Labeo rohita* 40 – 50 °C (Barriga, 2006, Nayak 2004) mientras que el cangrejo *C. mediterraneus* alcanza el máximo a los 60 °C (Cherif, 2007), este último organismo mantiene el 80% de su actividad durante 10 min a 60 °C.

Las lipasas de *P. vannamei* mantienen más del 80% de actividad entre los pHs 8 y 10 siendo cada pH el óptimo para la lipasa digestiva e intracelular respectivamente. Las lipasas de invertebrados presentan un pH óptimo neutro o alcalino (Zouari et al., 2005; Barriga Gonzalez, 2006; Cherif et al., 2007; Grillo et al., 2007; Mrdakovic et al., 2008), el cual es

similar a las lipasas de mamíferos (Shahani et al., 1976; De Caro et al., 1977; Nayak et al., 2004) con excepción de las langostas *H. americanus* y *C. virilis* quienes presentan un pH óptimo de 5.5 y 4, respectivamente (Besiot y McDowell Capuzzo, 1990) al igual que el insecto *Rodnius prolixus*, pH que es consistente con el proceso de digestión de estas especies (Houseman y Downe, 1980).

Una de las maneras clásicas de comprobar la especificidad de las lipasas es realizar reacciones de hidrólisis de ésteres frente a diversos sustratos solubles e insolubles con distinta longitud de cadena del ácido graso, pudiendo ser éste saturado o insaturado. Los resultados obtenidos para las lipasas de *P. vannamei* sugieren que ambas enzimas son capaces de hidrolizar derivados del naftol y TAGs. Las lipasas aisladas mostraron diferencias significativas entre la actividad registrada para triestearina y trioleina, mostrando mayor actividad sobre trioleina, un TAG conformado por *cis*-9-ácido octadecanoico, que triestearina, la baja actividad registrada para PV_IL puede estar relacionada con que parte de la proteína aislada no estuviera activada por fosforilación (Yeaman, 2004). Resultados similares han sido reportados para lipasas de origen bacteriano como *Bacillus subtilis* 168, *Aeromonas hydrophila* y *Acinetobacter* spp. (Anguita et al., 1993; Lesuisse et al., 1993; Snellman et al., 2002), lipasas de invertebrados como la lipasa del coleóptero *C. presignis* (Arreguín-Espinosa et al., 2000), la mosca *D. melanogaster* (Smith et al., 1994) y las lipasas de vertebrados como el pez *Trematomus newnesi* (Hazel y Sidell, 2004) y la lipasa HSL de humano (Kraemer y Shen, 2002).

Los valores de K_M de las dos lipasas de *P. vannamei* fueron diferentes cuando MUF-butirato fue usado como sustrato, la lipasa digestiva presentó mayor afinidad por este sustrato que la intracelular, pero menos afinidad que las lipasas de microorganismos (Prim

et al., 2003), sin embargo la lipasa digestiva presentó mayor afinidad sobre trioleína que la lipasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Deb et al., 2006). Los resultados muestran que el valor de K_M de la lipasa digestiva se encuentra dentro del rango de las enzimas que se usan en la industria oleoquímica (Fullbrook, 1996), por lo que esta enzima tiene un potencial uso biotecnológico.

Genes de lipasas: Identificación, caracterización y expresión

Obtención e identificación de los transcritos de las lipasas

Lipasa digestiva

La presencia de la lipasa digestiva en los crustáceos ha sido comprobada a través de mediciones enzimáticas en diferentes especies de peneidos (Vega Villasante et al., 1999; Moss et al., 2001; Lavarías et al., 2006) y sólo en un cangrejo y en krill han sido aisladas lipasa digestivas de crustáceos (Barriga-González, 2006; Cherif et al., 2007), sin embargo en crustáceos no existen reportes de secuencias de nucleótidos reportadas.

En este trabajo, se describió la secuencia de nucleótidos completa de una lipasa digestiva de camarón, la cual además de presentar similitud con la secuencias codificantes de otros insectos (*A. aegypti*, *C. quinquefasciatus*, *I. scapularis*), el tamaño de la secuencia codificante también es similar (Fig. 22, 23). La identidad de la proteína codificada por este transcrito, fue deducida por análisis de dominios (BLAST, Pfam), encontrando que los nucleótidos 407 – 452 pertenecen a las α/β -hidrolasas, estructura que caracteriza a este grupo de enzimas (Ollis et al., 1992). La secuencia GXSXG, fue identificada como la

secuencia consenso descrita para la familia de lipasas (Hide et al., 1992), en la cual se encuentra embebido el residuo de serina que forma parte de la triada catalítica (Ser, Asp, His) (Brenner, 1988).

El análisis de las secuencias por neighbor joining de los diferentes grupos taxonómicos incluyendo la lipasa digestiva de camarón blanco, reveló que las lipasas se pueden agrupar con base a su secuencia consenso (G-X-S-X-G), el árbol filogenético produjo cuatro grupos de lipasas (Fig. 24), compuestos por 24, 1, 7 y 16 miembros respectivamente. El primer grupo está caracterizado por compartir una secuencia consenso G-H/F-S-L-G, de la cual los vertebrados son miembros, al igual que algunos insectos y una lipasa de crustáceo; el segundo grupo está representado por la secuencia consenso G-F-S-F-G, que incluye una lipasa de un organismo (*P. papatasi*); el tercer grupo representado por G-H-S-M(L/Q)-G incluye bacterias y lipasas de peces como *Salmo salar* y finalmente el cuarto grupo representado por G-H-S-Q/M-G incluye a todas las lipasas de *Drosophila* spp. y tres lipasas de crustáceos. Se ha descrito que aquellas lipasas que carecen del residuo serina en la secuencia consenso no son activas, tal es el caso de tres lipasas de *H. armiguera*, *M. configurata* y *M. destructor* (GXGXG) (Toprak et al., 2008; Yi-Peng et al., 2008; Shukle et al., 2009), cuyo residuo de serina está substituido por glicina. Algunas sustituciones de la triada catalítica han resultado en lipasas funcionales (Cys o Thr por Ser) (Dodson y Wlodawer, 1998), pero la gran mayoría de las enzimas con sustituciones en la triada catalítica resultan en proteínas no funcionales como las antes mencionadas. De acuerdo a la estructura primaria de *pvl*, la lipasa digestiva de camarón blanco está más relacionada a las lipasas de insectos que a la de vertebrados, además su secuencia consenso revela que la lipasa que codifica es una proteína activa.

Todas las lipasas neutras que tienen actividad de hidrolizar TAGs presentan un β 9 loop y una *lid* que cubre el sitio activo y está implicado en el reconocimiento del sustrato (Winkler et al., 1990; van Tilbeurgh et al., 1992). En la lipasa pancreática humana se ha reconocido que el β 9 loop está contenido entre los residuos que conforman la *lid* (Aoki et al., 2007). La lipasa lipoproteica, hepática y pancreática tienen un β 9 loop (18-19 residuos) y *lids* (22-23 residuos) y presentan actividad sobre TAGs, mientras que la lipasa endotelial tiene un β 9 loop (17 residuos) y una *lid* más corta (19 residuos) y una baja actividad sobre TAGs (Hirata et al., 1999), por otro lado la fosfolipasa A1 presenta un β 9 loop (13) y una *lid* (12) corta y no presenta actividad sobre TAGs (Aoki et al., 2002), hasta ahora el número mínimo de residuos necesarios para formar un loop y una *lid* funcional aún se desconoce (Aoki et al., 2007). En la lipasa digestiva de *P. vannamei* en este estudio, se reconoció una región de 22 aminoácidos que conforman a la *lid* de la enzima, dadas las características de la *lid*, el cual presenta residuos de aminoácidos hidrofóbicos (Tabla IX), se presume que la enzima que codifica *pvl*, tiene actividad sobre TAGs, además de que presenta la triada catalítica (Ser, Asp, His) los cuales son necesarios para la catálisis. Aunado a esto, se tienen evidencias de que la lipasa digestiva que codifica *pvl*, presenta actividad de hidrólisis de TAGs, dado que los péptidos obtenidos por masas de la proteína aislada de glándula digestiva de este organismo previamente, coinciden con la estructura primaria de *pvl* (Fig. 23).

Lipasa intracelular

Se obtuvo una secuencia parcial de nucleótidos correspondiente a una lipasa intracelular (*pv_il*). Esta secuencia corresponde a 620 pb de un transcrito que codifica para una enzima encargada de hidrolizar TAGs almacenados tanto en glándula digestiva, músculo, pleópodos y urópodos, como reserva energética en camarón blanco *P. vannamei*. Las lipasas que presentaron mayor similitud a *pv_il* son las de *A. pisum* y *A. aegypti*, que tienen un tamaño total de 2283 y 1562 pb, respectivamente, lo cual permite predecir el tamaño aproximado de la secuencia de *pv_il*. Aunque la secuencia de nucleótidos de *pv_il* es corta, ésta puede ser identificada como una lipasa ya que la secuencia de aminoácidos para la que codifica presenta regiones conservadas, como son los dominio de la superfamilia de las esterasas-lipasas y el dominio PLAT, el cual es un sitio de unión a lípidos y está reconocido que permite estabilizar la conformación activa de la enzima (van Tilbeurgh et al., 1999).

Función biológica de las lipasas

Aunque la función de todas las lipasas es la de hidrolizar los enlaces éster de los TAGs, las lipasas descritas en este estudio tienen funciones fisiológicas diferentes. Según los fragmentos encontrados en este estudio, el camarón blanco sintetiza al menos 2 lipasas, una lipasa digestiva y otra intracelular (Figuras 20 y 21).

A diferencia de los vertebrados, en insectos se han reportado varios transcritos de lipasas en un solo tejido (Ponnuvel et al., 2003), lo que podría ser resultado de isoformas de lipasas, por lo que no se descarta la posibilidad de otros transcritos de lipasas en la glándula digestiva de *P. vannamei* que no fueran amplificadas en este estudio. Esta sugerencia está

apoyada por las observaciones descritas en *Drosophila* spp., donde se ha detectado un cluster de lipasas que es regulado por la presencia de ácidos grasos o constituyentes de las grasas en el alimento (Zinke et al., 2002). Además en esta misma especie se ha identificado otro grupo de lipasas ácidas que también son expresadas en la glándula digestiva y que al igual que otros insectos (Campbell et al., 2005), tienen una participación importante en la hidrólisis de TAGs del alimento.

Dado que todas las bandas amplificadas en los tejidos evaluados fueron obtenidas con oligonucleótidos específicos y presentan el mismo tamaño, se sugiere que la secuencia del fragmento de *pv_il* es la misma para cada tejido (Fig. 25). La función bioquímica de las lipasas intracelulares es la misma que la de las lipasas digestivas, sin embargo su participación en la lipólisis se da durante circunstancias diferentes. Estas enzimas llevan a cabo la hidrólisis de los TAGs almacenados como cuerpo graso en células especializadas, en insectos estas grasas almacenadas son hidrolizadas para obtener energía durante el vuelo (Arrese et al., 1999) o en la ontogenia (Kurokawa et al., 2002), y son activadas via hormonal por la hormona adipoquinetica (AKH) la cual es liberada a la corpora cardiaca (Arrese et al., 1996) y se une al receptor del cuerpo graso, una proteína G (Staubli et al., 2002), para activar una cascada de señales en el cuerpo graso, esta señal provoca un incremento en el flujo de iones calcio e incrementa el cAMP, el cual activa a una quinasa A (Rajesh Patel, 2004), la cual es la responsable de activar a la lipasa vía fosforilación; esto explica la presencia de *pv_il* en tejidos que requieren energía para el motilidad del organismo, tales como pleópodos, urópodos y músculo.

Las branquias de los camarones están formadas por filamentos que se encuentran unidos a un eje central o filamento branquial, cada filamento se divide en filamentos secundarios,

estas estructuras son alargadas y están cubiertas por una capa delgada de cutícula y una capa de epitelio (Wu et al., 2009) en la cual están contenidos los microsomas, es en esta fracción microsomal donde se han encontrado TAGs almacenados en camarones como *M. borrelli* (González-Baró y Pollero, 1993), por lo que se tiene la hipótesis, de que el transcrito de *pv_il* amplificado en las branquias del camarón está relacionado con la movilización de los TAGs almacenados en la fracción microsomal.

En el caso de la glándula digestiva, por ser el principal sitio de secreción de enzimas y de almacenamiento de lípidos, la presencia de la lipasa digestiva y la lipasa intracelular es justificable, ya que la lipasa digestiva es secretada durante la digestión y la lipasa intracelular lleva a cabo la movilización de las grasas almacenadas como cuerpo graso, tal como ha sido reportado en *B. mori* (Ponnuvel et al., 2003). En el tubo digestivo de los peneidos no se han realizado estudios de actividad o cuantificación de transcritos de las lipasas, pero existen evidencias en los bivalvos como *Solen grandis*, en donde se ha encontrado actividad de fosfatasa, esterasa y lipasa en el epitelio del tubo digestivo, el cual se sugiere que estas células son capaces de llevar a cabo una digestión intracelular del alimento, por parte de las enzimas contenidas y una posterior absorción de los monómeros producidos (Sheng et al., 2003), por lo que se presume que los transcritos detectados de la lipasa en este tejido de *P. vannamei* están relacionados con una digestión posterior de los productos de la hidrólisis de la glándula digestiva, permitiendo una mayor absorción de los monómeros producidos.

Si bien la función de las lipasas intracelulares es la de hidrolizar TAGs almacenados para proveer energía, otras funciones biológicas han sido atribuidas a estas enzimas, en *M. sexta* se ha identificado la actividad hidrolítica de varias enzimas incluyendo lipasas a partir de

fracciones enriquecidas de hemocitos y su significancia biológica ha sido relacionada con la hidrólisis de ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos celulares, además se sugiere que esta enzima puede alterar los factores de inmunidad de la bacteria *Nematophila xenorhabdus*, ya que los ácidos grasos sirven como precursores para la producción de eicosanoides, responsables de mediar y coordinar las reacciones inmunes celulares (Park et al., 2005). Así mismo, se ha reconocido que las lipasas digestivas además de participar en la digestión de los TAGs del alimento, tienen capacidad para hidrolizar a aquellos organismos que son invasores (bacterias, hongos, virus e incluso parásitos) (Baton y Ranford-Cartwright, 2005), tal es el caso de *B. mori*, en el cual la expresión de lipasa es activada mediante la infección de los organismos con el virus de la polihedrosis nuclear y se sugiere que estas enzimas pueden actuar hidrolizando la cobertura del virus antes de que éste infecte las células (Ponnuvel et al., 2003), o bien en el caso de infección por bacterias, estas enzimas pueden hidrolizar la pared celular de las bacterias, ya que éstas contienen lipopolisacáridos (Boulanger et al., 2006). Además de la función de hidrólisis de TAGs de las lipasas intracelulares y digestivas, otra participación en el sistema inmune no ha sido reportada en los crustáceos, por lo que es necesario realizar más investigación para poder establecer una función dual a estas enzimas.

En este estudio se ha mostrado que los transcritos de *pv_il* se encuentran en casi todos los tejidos de camarón blanco, principalmente en aquellos tejidos donde exista un almacén de TAGs, por lo que no es sorprendente encontrar transcritos de *pv_il* en la gónada. Si bien, no existen evidencias de actividad de lipasa o transcritos de lipasas en la gónada de crustáceos, sí existen reportes en insectos. Smith et al. (1994), reportaron que la glándula accesoria de la gónada de los machos, además de secretar fluidos como péptidos sexuales, inhibidores de

proteasas clase serino y precursores de feromonas, secreta lipasas que al igual que los antes mencionados, son transferidos a las hembras durante la reproducción, la función de esta enzima ha sido relacionada con la utilización de los lípidos del macho que son transferidos durante el apareamiento.

Efecto del ayuno en la concentración de transcritos de pvl y pv_il

La abundancia de los transcritos de *pvl* y *pv_il* de *P. vannamei* se cuantificaron durante el experimento de ayuno (Fig. 26 y 27). Tanto la cantidad de transcritos de la lipasa digestiva como la intracelular se vieron afectados por el ayuno inducido, lo que sugiere que ambos genes son inducibles por la ausencia de alimento.

Los crustáceos como los peneidos, están sujetos a periodos de ayuno durante el proceso de muda, el cual es un proceso fisiológico cíclico que les permite a estos organismos crecer; los camarones naturalmente ayunan por periodos cortos de tiempo (3 – 4 días), en esta etapa los organismos carecen de estructuras rígidas para manejar el alimento (Chan et al., 1988), por lo que, al no haber alimento disponible o capacidad para alimentarse activamente se esperaba que existiera una disminución en los transcritos de la lipasa digestiva y un aumento de los transcritos de lipasa intracelular, ya que esta última ha sido reconocida como responsable de la movilización de TAGs almacenados como reservas energéticas, tal como se observó en *P. vannamei* en este estudio. Esta observación es apoyada en los resultados de Zinke et al.(2002), quienes describieron que de los tres genes (CG17191, CG17192 y CG6296) asociados a la hidrólisis de lípidos del alimento (lipasas digestivas) en *Drosophila* spp., la expresión de CG17192 es mucho menor que la de los

otros genes durante el ayuno. Sin embargo, se sabe que la movilización de los lípidos almacenados, por parte de las lipasas intracelulares, puede ser inducida por condiciones de estrés como el ayuno (Arrese et al., 1996). Entonces, durante el ayuno, la movilización de los TAGs del cuerpo graso es crítico para la sobrevivencia y depende de la ruta de la hormona adipoquinética involucrada en la activación de la enzima o regulación a través de las proteínas asociadas a los lípidos (perilipinas) (van der Horst y Ryan, 2004).

Gronke et al. (2005), identificaron dos lipasas y una fosfolipasa que son regulados positivamente durante el ayuno en la mosca *D. melanogaster*, tal como se muestra en el camarón blanco *P. vannamei*, y están involucrados en la movilización de lípidos, al igual que el gen lipasa brummer que pertenece a la familia de lipasas ATGL en mamíferos (Zimmerman et al., 2004). En mamíferos, ATGL es co-activado por una proteína inactiva de 40 kDa (CGI-58) que resulta de la fosforilación de las proteínas que protegen al cuerpo graso (perilipinas) (Zechner et al., 2009), permitiendo que el cuerpo graso esté disponible para hidrólisis por las ATGL en mamíferos. En crustáceos, no se han reportados ortólogos de CGI-58 ó función equivalente, implicados en la liberación del cuerpo graso. Ortólogos de ATGL han sido reportados en levaduras, nemátodos y en plantas (Eastmond, 2006). La carencia de este gen resulta en un aumento desmesurado de los lípidos almacenados, este efecto se ha observado en la mosca *D. melanogaster* (Grönke et al., 2005) y ratones (Haemmerle et al., 2006).

El control de la movilización de los lípidos se ha evaluado creando mutantes que carezcan del gen de lipasa intracelular, los organismos que carecen de este gen presentan baja actividad de lipasa durante el ayuno y un exceso de almacenamiento de lípidos, que pueden ser hidrolizados sólo por una sobre-expresión de los receptores de AKH. Mientras que

aquellos mutantes que carecen de AKHR, presentan valores normales de actividad de lipasa, pero a 12 h de ayuno causan una hiper-estimulación de la actividad de lipasa (Grönke et al., 2007). Esto sugiere que la activación de la lipólisis en respuesta al ayuno responde a la unión de AKHR con AKH, y a modificaciones postransduccionales de la lipasa. En crustáceos, aún se desconoce qué hormona y qué receptores están implicados en la estimulación de las lipasas intracelulares.

La baja actividad registrada en organismos que carecen del gen *bmm* y que mantienen un flujo de lípidos durante el ayuno (Gronke, 2005), sugiere que hay más de una enzima responsable de la movilización de los lípidos almacenados, eso explicaría la alta eficiencia en la digestión de lípidos de invertebrados comparada con la de mamíferos, donde una lipasa pancreática y una lipasa gástrica en conjunto hidrolizan cerca del 95% de los TAGs del alimento, siendo la lipasa gástrica la que contribuya con un 17% de esta hidrólisis (Carrière et al., 1993), mientras que en invertebrados se han reconocido más de una lipasa digestiva y dos potenciales lipasas intracelulares ortólogas a ATGL y a HSL que son las responsables del 95% de la hidrólisis de los TAGs almacenados (Schweiger et al., 2006).

El número de lipasas encontradas en invertebrados ha sido relacionado con la alimentación de los organismos, se establece que los principales alimentos de muchos de los insectos contienen bajas cantidades de TAGs, y predominan los fosfolípidos y galactolípidos, por ello se atribuye que la especificidad de las lipasas de insectos difiera a las de mamíferos (Horne et al., 2009).

Por lo anterior, se puede establecer que tanto los transcritos de lipasas digestivas como las intracelulares se ven afectados por el ayuno, mostrando una correlación inversa, es decir, mientras que los transcritos de lipasa digestiva disminuyen, los correspondientes a la lipasa

intracelular presentan un aumento, sugiriendo una movilización de las reservas energéticas después de 24 h de ayuno en *P. vannamei*, pero también es claro dado los antecedentes en insectos, el proceso de regulación es complejo, ya que implica mecanismos de regulación postranscripcionales y postransduccionales, por lo que es necesario hacer más estudios sobre el metabolismo de lípidos en estos organismos.

Conclusiones

En concreto, se encontró que la lipasa digestiva de *P. vannamei* se traduce exclusivamente en la glándula digestiva, indicando un rol en la digestión de lípidos, mientras que la lipasa intracelular se traduce en diferentes tejidos (músculo, pleópodos y urópodos), incluyendo glándula digestiva, esto sugiere que tiene una participación en la movilización de lípidos almacenados como TAGs en los tejidos, pero no excluye su participación en la digestión. Las variaciones en los diferentes parámetros analizados en este estudio sugieren que las enzimas purificadas comparten características del grupo de lipasas: secuencia consenso, triada catalítica, especificidad, etc., pero presentan diferencias estructurales relacionadas con su secuencia de aminoácidos.

La lipasa digestiva presentó una constante de Michaelis-Menten menor con respecto a la intracelular, y una eficiencia catalítica muy alta. Esta característica tiene una connotación biológica importante, que pudiera describirse como una mayor capacidad de digerir más moléculas de lípidos en menor tiempo. Dado que el tiempo que transcurre entre la ingestión del alimento y la excreción dura menos de 2 h, es factible que exista una relación entre el poco tiempo de residencia del alimento y la alta capacidad de la lipasa digestiva para digerirlo.

Dos ADNc codificantes para una lipasa digestiva (*pvl*) y una lipasa intracelular (*pvl_il*) de camarón blanco *P. vannamei* fueron obtenidos por PCR, las cuales representan el primer reporte de secuencias de nucleótidos de lipasas y función biológica de las enzimas que codifican en crustáceos. *pvl*, una lipasa digestiva que se sintetiza exclusivamente en la glándula digestiva, se encarga de hidrolizar los TAGs del alimento, liberando los ácidos

grasos y glicerol; este transcrito es regulado negativamente durante el ayuno, dado la ausencia del alimento, mientras *pv_il*, una lipasa intracelular que se encuentra en diferentes tejidos es la responsable de la movilización de TAGs almacenados como cuerpo graso, que funcionan como reservas energéticas para satisfacer las necesidades metabólicas del organismo durante el ayuno, esta función se vio reflejada en el aumento de los transcritos de *pv_il* de camarón blanco a las 120 h de ayuno.

Conclusiones generales

La digestión de elementos de la dieta es un paso importante en el uso de alimento, y es importante desde varios aspectos como el ecológico. El enfoque de este problema científico es interdisciplinario e incluye experiencias de fisiología, bioquímica, biología molecular, ecología y evolución y se ha enfocado en entender el funcionamiento fisiológico bioquímico de sistemas digestivos de organismos marinos.

A la fecha, el estado del conocimiento de la biología básica de crustáceos es aún limitado, sobretodo en lo relacionado con la fisiología y los procesos metabólicos de la digestión de los lípidos que ocurre gracias a las lipasas. Por lo que en este estudio, empleando como modelo el camarón blanco *Penaeus vannamei*, se identificaron y estudiaron a dos grupos de enzimas: lipasas digestivas e intracelulares, enzimas responsables de la hidrólisis de los TAGs del alimento y aquellos almacenados como cuerpo graso, respectivamente, así como se evaluó el efecto del ayuno sobre los transcritos de lipasas, ya que los productos de hidrólisis son la principal fuente de energía de invertebrados, siendo las lipasas intracelulares las que representan un papel importante durante el ayuno.

Además se demostró una expresión diferencial de los transcritos de lipasas, aparentemente por mecanismos distintos (regulación postranscripcional y postrasduccional), lo que permite mantener un equilibrio energético cuando estos organismos están sujetos a estrés alimenticio, por lo que la hipótesis planteada para este trabajo fue aceptada.

Sin embargo, para poder elucidar con mayor certeza el proceso de lipólisis de crustáceos es necesario buscar los factores que intervienen en la activación de estas enzimas y los

factores transcripcionales que están involucrados en la síntesis de los transcritos que codifican a estas enzimas.

Referencias

- Akoh, C. C., L. Guan-Chiun, L. Yen-Chywan, H. Tai-Huang y S. Jei-Fu. 2004. GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research* 43: 534-552.
- Anand, A. N. 2004. The signal transduction of the adipokinetic hormone and regulation of energy metabolism in the cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Enisfera: Gryllidae). der Fakultät für Biologi, Chemie und Geowissenschaften. Bayreuth, Germany, der Universität Bayreuth. Doktorgrades: 94.
- Anguita, J., L. B. Rodríguez Aparicio y G. Naharro. 1993. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2411-2417.
- Aoki, J., A. Inoue, K. Makide, N. Saiki y H. Arai. 2007. Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging the pancreatic lipase gene family. *Biochimie* 89: 197-204.
- Aoki, J., Y. Nagai, H. Hosomo, K. Inoue y K. Arai. 2002. Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1582: 26-32.
- Arreguín-Espinosa, R., B. Arreguín y C. González. 2000. Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 31: 239-244.
- Arrese, E. L., L. E. Canavoso, Z. E. Jouni, J. E. Pennington, K. Tsuchida y M. A. Wells. 2001. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 7-17.
- Arrese, E. L., M. T. Flowers, J. L. Gazard y M. A. Wells. 1999. Calcium and cAMP are second messengers in the adipokinetic hormone-induced lipolysis of triacylglycerols in *Manduca sexta* fat body. *Journal of Lipid Research* 40.
- Arrese, E. L., R. T. Patel y J. L. Soulages. 2006. The main triglyceride-lipase from the insect fat body is an active phospholipase A1: identification and characterization. *Journal of Lipid Research* 47: 2656-2667.
- Arrese, E. L., B. I. Rojas Vivas y M. A. Wells. 1996. The use of decapitated insects to study lipid mobilization in adult *Manduca sexta*: Effects of adipokinetic hormone and trehalose on fat body lipase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26: 775-782.
- Arrese, E. L. y M. A. Wells. 1994. Purification and properties of a phosphorylatable triacylglycerol lipase from the fat body of an insect *Manduca sexta*. *Journal of Lipid Research* 35: 1652-1660.
- Barriga-González, A. A. 2006. Enzimas lipolíticas de krill antártico: Purificación y caracterización, ¿enzimas adaptadas al frío? Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceúticas Santiago, Chile, Universidad de Chile. Doctor: 181.
- Barriga Gonzalez, A. A. 2006. Enzimas lipolíticas de krill antártico: Purificación y caracterización, ¿enzimas adaptadas al frío? Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceúticas Santiago, Chile, Universidad de Chile. Doctor: 181.
- Baton, L. A. y L. C. Ranford-Cartwright. 2005. How do malaria ookinetes cross the mosquito midgut wall? *Trends in Parasitology* 21: 22-28.

- Beisson, F., A. Tiss, C. Rivière y R. Verger. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*: 133-153.
- Berner, D. L. y E. G. Hammond. 1970. Phylogeny of lipase specificity. *Lipids* 6: 558-562.
- Besiot, P. M. y J. McDowell Capuzzo. 1990. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 136: 107-122.
- Bezzine, S., F. Ferrato, M. G. Ivanova, V. Lopez, R. Verger y F. Carrère. 1999. Human pancreatic lipase: Colipase dependence and interfacial binding of lid domain mutants. *Biochemistry (Moscow)* 38(17): 5499-5510.
- Birnbaum, M. J. 2003. Lipolysis: more than just a lipase. *Journal of Cell Biology* 161(6): 1011-1012.
- Borgstrom, B. y C. Erlanson-Albertsson. 1973. Pancreatic lipase and co-lipase: Interactions and effects of bile salts and other detergents. *European Journal of Biochemistry* 37: 60-68.
- Bornscheuer, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 73-81.
- Boulanger, N., P. Bulet y C. Lowenberg. 2006. Antimicrobial peptides in the interaction between insects and flagellate parasites. *Trends in Parasitology* 22: 262-268.
- Bowyer, R. C., A. M. T. Jehanli, G. Patel y J. Hermon-Taylor. 1991. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for free human pro-colipase activation peptide (APGPR). *Clinica Chimica Acta* 200(2-3): 137-152.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brasaemle, D. L. 2007. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of Lipid Research* 48: 2547-2559.
- Brenner, S. 1988. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* 334: 528-530.
- Brockerhoff, H., R. J. Hoyle y P. C. Hwang. 1970. Digestive enzyme of the American lobster (*Homarus americanus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 27: 1357-1370.
- Brozozowski, A. M., U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Høge-Jensen, S. A. Patkar y L. Thim. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 351: 491-494.
- Brusca, R. C. y G. J. Brusca. 2005. *Invertebrados*. McGraw-Hill. 1: 1032.
- Buscá, R., M. A. Pujana, P. Pognonec, J. Auwerx, S. S. Deeb, M. Reina y S. Vilaró. 1995. Absence of N-glycosylation at asparagine 43 in human lipoprotein lipase induces its accumulation in the rough endoplasmic reticulum and alters this cellular compartment. *Journal of Lipid Research* 36: 939-951.
- Campbell, C. L., K. A. Vandyke, G. J. Letchworth, B. S. Drolet, T. Hanekamp y W. C. Wilson. 2005. Midgut and salivary glands transcriptomes of the arbovirus vector *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Insect Molecular Biology* 14: 121-136.
- Carrière, F., J. A. Barrowman, R. Verger y R. Laugier. 1993. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* 105: 876-888.

- Carriere, F., C. Withers-Martinez, H. van Tilbeurgh, A. Roussel, C. Cambillau y R. Verger. 1998. Structural basis for the substrate specificity of pancreatic lipases and some related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1376: 417-432.
- Ceccaldi, H. J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. *Advances in Tropical Aquaculture* 9: 243-259.
- Chan, S.-M., S. M. Rankin y L. L. Keeley. 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biological Bulletin* 175: 185-192.
- Cherif, S., A. Fendri, N. Miled, H. Trabelsi, H. Mejdoub y Y. Gargouri. 2007. Crab digestive lipase acting at high temperature: purification and biochemical characterization. *Biochimie* 89: 1012-1018.
- Dall, W., B. J. Hill, P. C. Rothlisberg y D. J. Staples. 1990. The biology of the Penaeidae. *Advanced Marine Biology*. S. A. Blaxter J. London, Academic Press: 1-489.
- Dall, W. y D. J. W. Moriarty. 1983. Nutrition and digestion. *The Biology of Crustacea*. L. H. Mantle. New York and London, Academic Press. 5: 215-261.
- De Caro, A., C. Figarella, J. Amic, R. Michel y O. Guy. 1977. Human pancreatic lipase: A glycoprotein *Biochimica et Biophysica Acta* 490: 411-419.
- De Caro, J. D. 1981. Porcine pancreatic lipase. Completion of the primary structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 671: 129-138.
- Deb, C., J. Daniel, T. D. Sirakova, B. Abomoelak, V. S. Dubey y P. E. Kolattukudy. 2006. A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* 281(7): 3866-3875.
- Deering, D. M. J., D. R. Hewitt y I. Brock. 1996. Triacylglycerol digestion by the leader prawn *Penaeus monodon*. *Journal of the World Aquaculture Society* 27(3): 359-361.
- Del Monte, A., H. Nolasco, A. Forrellat, C. Aragón, A. García, J. Díaz y O. Carrillo 2002. Evidencias de la presencia de lipasas en el hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitti*. *Memorias del Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA*. Zaragoza, España.
- Derewenda, Z. S. 1994. Structure and function of lipases. *Advances in Protein Chemistry* 45: 1-52.
- Desnuelle, P., L. Sarda y G. Ailhaud. 1960. Inhibition de la lipase pancréatique par le diéthyl-p-nitrophényl phosphate en émulsion. *Biochimica et Biophysica Acta* 37: 570-571.
- Diaz, P., N. Prim y F. I. Pastor. 1999. Direct fluorescence-base lipase activity assay. *BioTechniques* 27: 696-700.
- Dodson, G. y A. Wlodawer. 1998. Catalytic triads and their relatives. *TIBS* 23: 347-352.
- Eastmond, P. J. 2006. Sugar-dependent1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell* 18: 665-675.
- Fang, L.-S. y B. N. Lee. 1992. Ontogenetic change of digestive enzymes in *Penaeus monodon* *Comp. Biochem. Physiol. B* 103: 1033-1037.
- Forrellat Barrios, A., A. Del Monte, T. Estévez, B. Boburg, H. Nolasco y O. Carrillo Farnés 2004. Caracterización de lipasas en tres especies de camarones peneidos. Su importancia en la digestión. *Memorias del Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA*. Zaragoza, España.
- Fullbrook, P. D. 1996. *Practical applied kinetics*. New York, Stockton Press.

- Gamboa-Delgado, J., C. Molina-Poveda y C. Cahu. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research* 34: 1403-1411.
- García-Carreño, F. L. 1993. Protease inhibition in theory and practice. *Biochemical Education*: 146-150.
- Gargouri, Y., R. Julien, G. Pieroni, R. Verger y L. Sarda. 1984. Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. *Journal of Lipid Research* 25: 1214-1221.
- Gilbert, L. I. y H. Chino. 1974. Transport of lipids in insects. *Journal of Lipid Research* 15: 439-456.
- González-Baró, M. d. R. y R. Pollero. 1993. Palmitic acid metabolism in hepatopancreas of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii*. *Comparative Biochemistry and Physiology B Comparative Biochemistry* 106(1): 71-75.
- González-Baró, M. R., H. Heras y R. J. Pollero. 2000. Enzyme activities involved in lipid metabolism during embryonic development of *Macrobrachium borellii*. *Journal of Experimental Zoology* 286: 231-237.
- Grillo, L. A. M., D. Majerowicz y K. C. Gondim. 2007. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 579-588.
- Grönke, S., A. Mildner, S. Fellert, N. Tennagels, S. Petry, G. Muller, H. Jackle y R. P. Kühnlein. 2005. Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metabolism* 1: 323-330.
- Grönke, S., G. Müller, J. Hirsch, S. Fellert, A. Andreou, T. Haase, H. Jäcle y R. P. Kühnlein. 2007. Dual lipolytic control of fat body storage and mobilization in *Drosophila*. *PLOS Biology* 5(6): 1248-1256.
- Hadváry, P., W. Sidler, W. Meister, W. Vetter y H. Wolfer. 1991. The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase. *Journal of Biological Chemistry* 266(4): 2021-2027.
- Haemmerle, G., A. Lass, R. Zimmerman, G. Gorkiewicz, C. Meyer, J. Rozman, G. Heldmaier, R. Maier, C. Theussl, S. Eder, D. Kratky, F. Wagner, M. Klingenspor, G. Hoefler y R. Zechner. 2006. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triacylglyceride lipase. *Science* 312: 734-737.
- Hasan, F., A. S. Aamer y H. Abdul. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*.
- Hazel, J. R. y B. D. Sidell. 2004. The substrate specificity of hormone-sensitive lipase from adipose tissue of the Antarctic fish *Trematomus newnesi*. *Journal of Experimental Biology* 207: 897-903.
- Hermoso, J., D. Pignol, B. Kerfelec, I. Crenon, C. Chapus y J. C. Fontecilla Campos. 1996. Lipase activation by nonionic detergents. *Journal of Biological Chemistry* 271(30): 18007-18016.
- Hernández-Cortés, M. P., J. Whitaker y F. L. García-Carreño. 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Food Biochemistry* 2: 497-514.
- Hide, W. A., L. Chan y L. W. Hsiung. 1992. Structure and evolution of the lipase superfamily. *Journal of Lipid Research* 33: 168-178.

- Hirata, K., H. L. Dichek, J. A. Cioffi, S. Y. Choi, N. J. Leeper, L. Quintana, G. S. Kronmal, A. D. Cooper y T. Queretermous. 1999. Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *Journal of Biological Chemistry* 274: 14170-14175.
- Hiruma, K. y L. M. Riddiford. 2001. Regulation of the transcription factors, MHR4 and b-FTZ-F1, by 20-hydroxyecdysone during a larval molt in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental Biology* 232: 265-274.
- Holm, C., T. G. Kirchgessner, K. Svenson, G. Fredrikson, S. Nilsson, C. G. Miller y M. C. Schotz. 1988. Hormone-sensitive lipase: Sequence, expression and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science* 241: 1503-1506.
- Holmquist, M. 2000. Alpha/beta-hydrolase fold enzymes: Structures, functions and mechanisms. *Current Protein and Peptide Science* 1: 209-235.
- Horne, I., V. S. Haritos y J. G. Oakeshott. 2009. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39(8): 547-567.
- Houseman, J. G. y A. E. R. Downe. 1980. Endoproteinase activity in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry* 10: 363-366.
- Jaeger, K.-E. 1999. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review Microbiol* 53: 315-351.
- Jaeger, K.-E., B. W. Dijkstra, C. Colson, M. v. Heuvel y O. Misset. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 29-63.
- Jaeger, K.-E. y T. Eggert. 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 390-397.
- Johnston, D. J., A. J. Ritar y C. W. Thomas. 2004. Digestive enzyme profiles reveal digestive capacity and potential energy sources in fed and starved spiny lobster (*Jasus edwardsii*) phyllosoma larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology B Comparative Biochemistry* 138: 137-144.
- Kraemer, F. B. y W.-J. Shen. 2002. Hormone-sensitive lipase: Control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *Journal of Lipid Research* 43: 1585-1594.
- Kraemer, F. B. y S. Wen-Jun. 2006. Hormone-sensitive lipase knockouts. *Nutrition and Metabolism* 3: 1-7.
- Kunte, A. S., K. A. Matthews y R. B. Rawson. 2006. Fatty acid auxotrophy in *Drosophila* larvae lacking SREBP. *Cell Metabolism* 3: 183-193.
- Kurokawa, T., T. Suzuki, H. Ohta, H. Kagawa, H. Tanaka y U. Tatsuya. 2002. Expression of pancreatic enzyme genes during the early larval stage of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 68.
- Kyoung, S. K., K. K. Bo, J. K. Hak, S. Y. Myong, L. M. Donald y K. Hyun-Woo. 2008. Pancreatic lipase-related protein (PY-PLRP) highly expressed in the vitellogenic ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology* 151: 52-58.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Langin Dominique, L. H., Stenson Holst Lena, Belfrage Per and Holm Cecilia 1993. Gene organization and primary structure of human hormone-sensitive lipase: Possible

- significance of a sequence homology with a lipase of *Moraxella* TA144, an antarctic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 4897-4901.
- Lavarias, S., F. García, R. J. Pollero y H. Heras. 2007. Effect of the water-soluble fraction of petroleum on microsomal lipid metabolism of *Macrobrachium borelli* (Arthropoda:Crustacea). *Lipids*.
- Lavarias, S., R. J. Pollero y H. Heras. 2006. Activation of lipid catabolism by the water-soluble fraction of petroleum in the crustacean *Macrobrachium borellii*. *Aquatic Toxicology (Amsterdam)* 77: 190-196.
- Lesuisse, E., K. Schanck y C. Colson. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *European Journal of Biochemistry* 216: 155-160.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2^{-C_T} Method. *Methods* 25: 402-408.
- Loizzi, R. F. y D. R. Peterson. 1971. Lipolytic sites in crayfish hepatopancreas and correlation with the fine structure. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 39: 227-236.
- Londos, C., D. L. Brasaemle, C. J. Schultz, D. C. Adler-Wailes, D. M. Levin, A. R. Kimmel y C. M. Rondinone. 1999. On the control of lipolysis in adipocytes. *Annual review of Academic Sciences* 18: 155-168.
- Lookene, A., L. Zhang, M. Hultin y G. Olivecrona. 2004. Rapid subunit exchange in dimeric lipoprotein lipase and properties of the inactive monomer. *Journal of Biological Chemistry* 279: 49964-49972.
- López-López, S., H. Nolasco y F. Vega Villasante. 2003. Characterization of digestive gland esterase lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 135: 337-347.
- Lovett, D. y D. Felder. 1990. Ontogenic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.* 178: 144-159.
- Lowe, M. E. 1997. Molecular mechanism of rat and human pancreatic triglyceride lipases. *Journal of Nutrition* 127: 549-557.
- Lynch, M. y J. S. Conery. 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290(10): 1151-1155.
- Marcus, P. I. y P. Talalay. 1956. Induction and purification of alpha and beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry* 218(2): 661-674.
- Merril, C. R. y K. M. Washart. 1998. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. New York, Oxford University Press.
- Miled, N., S. Canaan, L. Dupuis, A. Roussel, M. Rivière, F. Carrière, A. de Caro, C. Cambillau y R. Verger. 2000. Digestive lipases: From three-dimensional structure to physiology. *Biochimie* 82: 973-986.
- Moss, S. M., S. Divakaran y B. G. Kim. 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 32: 125-131.
- Mrdakovic, M., J. Lazarevic, V. Peric-Mataruga, L. Ilijin y M. Vlahovic. 2008. Partial characterization of a lipase from gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larval midgut. *Folia Biologica (Cracow)* 56(1-2): 103-110.

- Muhlia-Almazán, A. y F. L. García-Carreño. 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology B Comparative Biochemistry* 133: 383-394.
- Muhlia-Almazán, A., A. Sánchez-Paz, F. F. García-Carreño, A. B. Peregrino-Uriarte y G. Yepiz-Plascencia. 2005. Starvation and diet composition affect mRNA levels of the high density-lipoprotein- β glucan binding protein in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 142: 209-216.
- Nardini, M. y B. W. Dijkstra. 1999. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology* 9: 732-737.
- Nayak, J., P. G. V. Nair, S. Mathew y K. Ammu. 2004. A study on the intestinal lipase of Indian major carp *Labeo rohita*. *Asian Fisch Sci* 17: 333-340.
- Nelson, L. y M. Cox. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York.
- Nene, V., J. R. Wortman, D. Lawson, B. Haas, C. Kodira, Z. Tu, B. Loftus, Z. Xi, K. Megy, M. Grabherr, Q. Ren, E. M. Zdobnov, N. F. Lobo, K. S. Campbell, S. E. Brown, M. F. Bonaldo, J. Zhu, S. P. Sinkins, D. G. Hogenkamp, P. Amedeo, P. Arensburger, P. W. Atkinson, S. Bidwell, J. Biedler, E. Birney, R. V. Bruggner, J. Costas, M. R. Coy, J. Crabtree, M. Crawford, B. deBruyn, D. DeCaprio, K. Eiglmeier, E. Eisenstadt, H. El-Dorry, W. M. Gelbart, S. L. Gomes, M. Hammond, L. I. Hannick, J. R. Hogan, M. H. Holmes, D. Jaffe, J. S. Johnston, R. C. Kennedy, H. Koo, S. Kravitz, E. V. Kriventseva, D. Kulp, K. LaButti, E. Lee, S. Li, D. D. Lovin, C. Mao, E. Mauceli, C. F. M. Menck, J. R. Miller, P. Montgomery, A. Mori, A. L. Nascimento, H. F. Naveira, C. Nusbaum, S. O'Leary, J. Orvis, M. Pertea, H. Quesneville, K. R. Reidenbach, Y.-H. Rogers, C. W. Roth, J. R. Schneider, M. Schatz, M. Shumway, M. Stanke, E. O. Stinson, J. M. C. Tubio, J. P. VanZee, S. Verjovski-Almeida, D. Werner, O. White, S. Wyder, Q. Zeng, Q. Zhao, Y. Zhao, C. A. Hill, A. S. Raikhel, M. B. Soares, D. L. Knudson, N. H. Lee, J. Galagan, S. L. Salzberg, I. T. Paulsen, G. Dimopoulos, F. H. Collins, B. Birren, C. M. Fraser-Liggett y D. W. Severson 2007. Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a Major Arbovirus Vector. *316*: 1718-1723.
- Ollis, D. L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag y J. Sussman. 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering* 5: 197-211.
- Pahoja, V. M. y M. A. Sethar. 2002. A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms. *Pakistan Journal of Applied sciences* 2(4): 474-484.
- Palumbi, S. R. y J. Benzie. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1: 27-34.
- Park, J., C. Soon-Yeong y C. Suk-Jung. 2008. Purification and characterization of hepatic lipase from *Todarodes pacificus*. *BMB Reports* 41(3): 254-258.
- Park, Y., A. R. Nor Aliza y D. Stanley. 2005. A secretory PLA2 associated with tobacco hornworm hemocyte membrane preparations acts in cellular immune reactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 60(3): 105-115.

- Pascual, C., A. Sánchez, E. Zeteno, G. Cuzon, G. Gaxiola, R. Brito, R. Gelabert, E. Hidalgo y C. Rosas. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 251: 416-429.
- Perera, E., F. J. Moyano, M. Díaz, R. Perdomo-Morales, V. Montero-Alejo, L. Rodríguez-Viera, E. Alonso, O. Carrillo y G. S. Galich. 2008. Changes in digestive enzymes through development and molt stages in the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B Comparative Biochemistry* 151: 250-256.
- Pistillo, D., A. Manzi, A. Tino, P. Pilo, F. Graziani y C. Malva. 1998. The *Drosophila melanogaster* lipase homologs: A gene family with tissue and developmental specific expression. *Journal of Molecular Biology* 276: 877-885.
- Pleiss, M. F., Schmid Rolf D. 1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids* 93: 67-80.
- Ponnuvel, K. M., H. Nakazawa, S. Furukawa, A. Asaoka, J. Ishibashi, H. Tanaka y M. Yamakawa. 2003. A lipase isolated from the *Silkworm Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* 77(19): 10725-10729.
- Prim, N., M. Sánchez, C. Ruiz, F. I. J. Pastor y P. Diaz. 2003. Use of methylumbelliferyl-derivate substrates for lipase activity characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22: 339-346.
- Rajesh Patel, J. L. S., Balaji Hariharasundaram, and Estela L. Arrese. 2005. Activation of the lipid droplet controls the rate of lipolysis of triglycerides in the insect fat body. *Journal of Biological Chemistry*(280): 22624-22631.
- Rajesh Patel, J. L. S., Michael A. Wells, Estela L. Arrese. 2004. cAMP-dependent protein kinase of *Manduca sexta* phosphorylates but does not activate the fat body triglyceride lipase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 1269-1279.
- Rathelot, J., R. Julien, I. Bosc-Bierne, Y. Gargouri, P. Canioni y S. L. 1981. Horse pancreatic lipase interaction with colipase from various species *Biochimie* 63: 227-234.
- Rivera-Pérez, C., M. d. I. Á. Navarrete del Toro y F. L. García-Carreño. 2010. Digestive lipase activity through development and after fasting and re-feeding in the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 300(1-4): 163-168.
- Rosas, C., G. Cuzon, G. Gaxiola, C. Pascual, G. Taboada, L. Arena y V. w. A. 2002. An energetic and conceptual model of the physiology role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268: 47-67.
- Rosetto, M., M. Belardinelli, A. M. Fausto, D. Marchini, G. Bongiorno, M. Maroli y M. Mazzini. 2003. A mammalian-like lipase gene is expressed in the female reproductive accessory glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Phlebotomidae). *Insect Molecular Biology* 12(5): 501-508.
- Roussel, A., S. Canaan, M.-P. Egloff, M. Rivière, L. Dupuis, R. Verger y C. Cambillau. 1999. Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *Journal of Biological Chemistry* 274(24): 16995-17002.
- Rubin, G. M., M. D. Yandell, J. R. Wortman, G. L. Gabor Miklos, C. R. Nelson, I. K. Hariharan, M. E. Fortini, P. W. Li, R. Apweiler, W. Fleischmann, J. M. Cherry, S. Henikoff, M. P. Skupski, S. Misra, M. Ashburner, E. Birney, M. S. Boguski, T. Brody, P. Brokstein, S. E. Celniker, S. A. Chervitz, D. Coates, A. Cravchik, A. Gabrielian, R. F.

- Galle, W. M. Gelbart, R. A. George, L. S. Goldstein, F. Gong, P. Guan, N. L. Harris, B. A. Hay, R. A. Hoskins, J. Li, Z. Li, R. O. Hynes, S. J. Jones, P. M. Kuehl, B. Lemaitre, J. T. Littleton, D. K. Morrison, C. Mungall, P. H. O'Farrell, O. K. Pickeral, C. Shue, L. B. Vosshall, J. Zhang, Q. Zhao, X. H. Zheng y S. Lewis. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287(5461): 2204-15.
- Sánchez-Paz, A., F. García-Carreño, J. Hernández-López, A. Muhlia-Almazán y G. Yepiz-Plascencia. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 340: 184-193.
- Sánchez-Paz, A., F. García-Carreño, A. Muhlia-Almazán, N. Y. Hernández-Saavedra y G. Yepiz Plascencia. 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: 1-17.
- Santos, E. A., L. E. Maia Nery, R. Keller y A. A. Gonçalves. 1997. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiological Zoology* 70(4): 415-420.
- Schrag, J. D. y M. Cygler. 1997. Lipases and α/β hydrolase fold. *Methods in Enzymology* 284: 85-107.
- Schweiger, M., R. Schreiber, G. Haemmerle, A. Lass, c. Fledelius, P. Jacobsen, H. Tornqvist, R. Zechner y R. Zimmerman. 2006. Adipose triacylglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *Journal of Biological Chemistry* 281: 40236-40241.
- Shahani, K. M., I. M. Khan y R. C. Chandan. 1976. Bovine pancreatic lipase. I. Isolation, homogeneity, and characterization. *Journal of Dairy Science* 59(3): 369-375.
- Sheng, X., W. Zhan y S. Ren. 2003. Structure and function of the digestive system of *solen grandis* dunker. *Journal of Ocean University of China* 2(2): 155-159.
- Shukle, R. H., O. Mittapalli, P. K. Morton y M. S. Chen. 2009. Characterization and expression analysis of a gene encoding a secreted lipase-like protein expressed in the salivary glands of the larval Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Journal of Insect Physiology* 55(2): 105-112.
- Simpson, R. M., R. D. Newcomb, H. S. Gatehouse, R. N. Crowhurst, D. Chagné, L. N. Gatehouse, N. P. Markwick, L. L. Beuning, C. Murray, S. D. Marshall, Y.-K. Yauk, B. Nain, Y.-Y. Wang, A. P. Gleave y J. T. Christeller. 2007. Expressed sequence tags from the midgut of *Epiphyas postvittana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Molecular Biology* 16(6): 675-690.
- Smith, G. M., K. Rothwell, S. L. Wood, S. J. Yeaman y M. Bownes. 1994. Specificity and localization of lipolytic activity in adult *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Journal Reviews* 304: 775-779.
- Snellman, E. A., E. R. Sullivan y R. R. Colwell. 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur. J. Biochem.* 269: 5771-5779.
- Staubli, F., T. J. Jorgensen, G. Cazzamall, M. Williamson, C. Lenz, L. Sondergaard, P. Roepstorff y C. J. P. Grimmelikhuijzen. 2002. Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *PNAS* 99(6): 3446-3451.
- Stauffer, C. 1989. *Enzyme assays for food scientist*. New York.

- Stuck, K. C., L. M. Stuck, R. M. Overstreet y Y. Wang Shiao. 1996. Relationship between BP (*Baculovirus penaei*) and energy reserves in larval and postlarval Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organism* 24: 191-198.
- Sukarno, K. Takahashi, M. Hatano y Y. Sakurai. 1996. Lipase from neon flying squid hepatopancreas: Purification and properties. *Food Chemistry* 57(4): 515-521.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thornton, D. J., I. Carlstedt y J. K. Sheehan. 1994. Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes and gels. *Methods in Molecular Biology*. J. M. Walker. Totowa, NJ, Humana Press. 32: 119-129.
- Toprak, U., D. Baldwin, M. Erlandson, C. Gillott, X. Hou, C. Coutu y D. D. Hegedus. 2008. A chitin deacetylase and putative insect intestinal lipases are components of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix. *Insect Molecular Biology* 17(5): 573-585.
- Tsujita, T., A. Nakagawa, K. Shirai, Y. Saito y H. Okuda. 1984. Methyl butyrate-hydrolyzing activity of hepatic triacylglyceride lipase from rat post-heparin plasma. *Journal of Biological Chemistry* 259(18): 11215-11220.
- van der Horst, D. J. y R. O. Ryan. 2004. Lipid transport. *Comprehensive Insect Physiology*. E. J. Gilbert, K. Iatrou and S. Gill. Oxford, Elsevier 225-246.
- van Tilbeurgh, H., S. Bezzine, C. Cambillau, R. Verger y F. Carrière. 1999. Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1441: 173-184.
- van Tilbeurgh, H., L. Sarda, R. Verger y C. Cambillau. 1992. Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature* 359: 159-162.
- Vega Villasante, F., I. Fernández, R. M. Preciado, M. Oliva, D. Tovar y H. Nolasco. 1999. The activity of digestive enzyme during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863 (crustacea: decapoda: Portunidae). *Bulletin of Marine Science* 65(1): 1-9.
- Verger, R. 1997. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *TIBTECH* 15: 32-37.
- Versaw, W. K., S. L. Cuppert, D. D. Winter y L. E. Williams. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in non fat dry milk. *Journal of Food Science* 54: 1557-1558.
- Vihervaara, T. y O. Puig. 2008. dFOXO regulates transcription of a *Drosophila* acid lipase. *Journal of Molecular Biology* 376(5): 1215-1223.
- Winkler, F. K., A. D'Arcy y W. Hunziker. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343: 771-774.
- Wu, J.-P., H.-C. Chen y D.-J. Huang. 2009. Histopathological alterations in gills of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) after acute exposure to cadmium and zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82: 90-95.
- Yeaman, S. J. 1990. Hormone-sensitive lipase - a multipurpose enzyme in lipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1052: 128-132.
- Yeaman, S. J. 2004. Hormone-sensitive lipase-new roles for an old enzyme. *Biochem. J.* 379: 11-22.

- Yepiz-Plascencia, G., F. Vargas-Albores y I. Higuera-Ciapara. 2000. Penaeid shrimp hemolymph lipoprotein. *Aquaculture* 191: 177-189.
- Yi-Peng, S., W. Jin-Xing y Z. Xiao-Fan. 2008. Effects of classical insect hormones on the expression profiles of a lipase gene from the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Insect Molecular Biology* 17(5): 523-529.
- Ying, D., W. Ting-Ting, W. Yu-Feng, G. Xue-Jie y Y. Cai-Feng. 2009. Activities of digestive enzymes during embryonic development in the crayfish *Procamabrus clarkii* (Decapoda). *Aquaculture Research*: 1-6.
- Yuan, C. y M.-D. Tsai. 1999. Pancreatic phospholipase A2: New views on old issues. *Biochimica et Biophysica Acta* 1441: 215-222.
- Zechner, R., P. C. Kienesberger, G. Haemmerle, R. Zimmermann y A. Lass. 2009. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of Lipid Research* 50: 3-21.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner y W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7(1-2): 203-214.
- Ziegler, R. 1991. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Physiology B Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 161: 125-131.
- Zimmerman, R., J. G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter y R. Zechner. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306: 1383-1386.
- Zinke, I., C. S. Schütz, J. D. Katzenberger, M. Bauer y M. J. Pankratz. 2002. Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *European Molecular Biology Organization Journal* 21(22): 6161-6173.
- Zouari, N., N. Miled, S. Cherif, H. Mejdoub y Y. Gargouri. 2005. Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: the scorpion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1726: 67-74.
- Zouari, N., N. Miled, S. Rouis y Y. Gargouri. 2007. Scorpion digestive lipase: A member of a new invertebrate's lipase group presenting novel characteristics. *Biochimie (Paris)* 89: 403-409.

Material suplementario

No.	Organism	Accession number
1	<i>Aedes aegypti-lip1</i>	XP_001652442.1
2	<i>Aedes aegypti-lip2</i>	XP_001652520.1
3	<i>Aedes aegypti-lip3</i>	XP_001652524.1
4	<i>Aedes aegypti-lip4</i>	XP_001652528.1
5	<i>Aedes aegypti-lip5</i>	EAT35159.1
6	<i>Antherea yamamai</i>	BAD22559.1
7	<i>Aspergillus niger</i>	ABG379061.1
8	<i>Bombyx mori-lip1</i>	BAC00960.1
9	<i>Bos taurus</i>	XP_593842.3
10	<i>Burkholderia cepacia</i>	P22088
11	<i>Caenorhabditis elegans-lip1</i>	NP_503233.1
12	<i>Caenorhabditis elegans-lip2</i>	NP_503184.1
13	<i>Caligus rogercresseyi</i>	ACO11197.1
14	<i>Canis familiaris</i>	AAA30885.1
15	<i>Carcinus maenas</i>	DV111912.1
16	<i>Culex quinquefasciatus-lip1</i>	XP_001844302.1
17	<i>Culex quinquefasciatus-lip2</i>	XP_001845810.1
18	<i>Culex quinquefasciatus-lip3</i>	XP_001846790.1
19	<i>Culicoides sonorensis</i>	AAV84257.1
20	<i>Danio rerio</i>	AAI63963.1
21	<i>Drosophila melanogaster-lip1</i>	NP_523540.1
22	<i>Drosophila melanogaster-lip3</i>	CAA74737.1
23	<i>Drosophila melanogaster-lip4</i>	AAF52971.1
24	<i>Drosophila melanogaster-lipA</i>	ACF37117.1
25	<i>Drosophila melanogaster-lipB</i>	P_001014548.1
26	<i>Drosophila pseudoscura</i>	XP_001358074
27	<i>Epiphyas postvittana</i>	EV806704.1
28	<i>Helicoverpa armigera</i>	ABK29468.1
29	<i>Hommarus americanus</i>	EH116029.1
30	<i>Homo sapiens</i>	CAA01714.1
31	<i>Ixodes scapularis-lip1</i>	XP_002413710.1
32	<i>Ixodes scapularis-lip2</i>	EEV17018
33	<i>Mamestra configurata-1</i>	ACD37363.1
34	<i>Mamestra configurata-2</i>	ACD37364.1
35	<i>Mamestra configurata-3</i>	ACD37365.1
36	<i>Mayetiola destructor</i>	ACF95831.1
37	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	ACA23976.1
38	<i>Mus musculus</i>	NP_081201.2
39	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NP_110161
40	<i>Pagrus major</i>	BAF31237.1
41	<i>Penaeus monodon</i>	GO081405.1
42	<i>Penaeus vannamei</i>	FJ619564
43	<i>Phlebotomus papatasi</i>	AA022149.1
44	<i>Proteus vulgaris</i>	AAB01071
45	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	NP_251552
46	<i>Rattus norvegicus</i>	AAA79888.1
47	<i>Salmo salar</i>	ACI33308.1
58	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	O599952
49	<i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001072431.1

