



PROGRAMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA ADAPTACIÓN ENZIMÁTICA E INDUCTORES QUE PROMUEVEN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EN LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE PENEIDOS

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta:

M. en C. ADRIANA TERESITA MUHLIA ALMAZÁN

Abril, 2003.

Dedicatoria

A mi padre del cielo, sin quien nada soy, nada tengo y nada puedo.

A mi Arturo

A mi niña, Samanta

A mis padres, Jorge y Tere

A Beto, Cati y Valentina

Agradecimientos

A mi esposo, la otra manecilla, por que siempre estuviste ahí conmigo de la mano y porque los logros son siempre de los dos.

A mi hijita Samanta, por que ahora contigo nada me falta y te quiero con mi corazón.

A mis padres Jorge y Tere por tanto amor, apoyo y por ser mi guía y ejemplo desde siempre.

Al Dr. Fernando L. García Carreño, porque creiste en mi, me enseñaste, fuiste mi amigo y le diste un giro completo a mi vida, gracias.

A Ann mil gracias por tu valiosa enseñanza, tu paciencia y sobre todo tu amistad.

A los Dres. Norma Hernández, Fernando Noriega, Ricardo Vázquez y Alejandro Maeda por el tiempo que me dedicaron a lo largo de estos tres años y medio, por sus ideas y sugerencias en la elaboración de este trabajo.

En especial quiero agradecer a la Dra. Gloria Yepiz por su apoyo, su casa y sus conocimientos, además por la amistad que ahora nos une, una vez mas, mil gracias.

Agradezco al CIBNOR y a la gente de la institución que facilitó la realización de mi investigación.

Al CONACYT por el apoyo económico de la beca crédito y por el financiamiento de los proyectos otorgados al Dr. Fernando García Carreño.

A la Dra. Thelma Castellanos y su equipo femenino, Lety, Osvelia y Bety y Sra. Lupita, gracias por su amable ayuda y atención.

A mis amigos Norma y Arturo, quienes dentro y fuera del CIB han sido el mejor oído, y consejo, muchas gracias.

A mis amigos Mariana y Luis, Paty, Julio Humberto, Julio Antonio, Laura y Cynthia que hicieron de mi estancia en el laboratorio algo que siempre quiero recordar. A Dany, Rafa, Mene, Paola Magallón, Dariel, Paty Hinojosa, Alma Peregrino, Murugan, y Ira Fogel porque todos, de alguna forma contribuyeron en este trabajo, gracias chicos.

ESTUDIO DE LA ADAPTACIÓN ENZIMÁTICA E INDUCTORES QUE PROMUEVEN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EN LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE PENEIDOS

Adriana T. Muhlia Almazán

Esta tesis se basa en los resultados experimentales que se presentan en dos artículos principales y en otras tres publicaciones relacionadas con el tema de tesis.

1. Muhlia-Almazán, A. and García-Carreño, F.L. 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*. 133B(3): 383-394.

2. Muhlia-Almazán, A., García-Carreño, F. L., Sánchez-Paz, J. A., Yepiz-Plascencia, G. and Peregrino-Uriarte, A.B. 2003. Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part B. (aceptado 24/03/03).

Publicaciones Adicionales:

1.- de Albuquerque-Cavalcanti, C., Muhlia-Almazán, A., Hernández-Cortés, P. and García-Carreño, F. 2001. Proteinases from marine organisms. In: *Recent advances in Marine Biotechnology*. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi. Vol 6, subtitled *Bio-organic Compounds: Chemistry and Biomedical Applications*.

2.- Arturo Sánchez-Paz, Fernando García-Carreño, Adriana Muhlia-Almazán, Norma Y. Hernández-Saavedra, and Gloria Yepiz-Plascencia. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (aceptado 24/03/03).

3.- Adriana Muhlia-Almazán and Fernando L. García-Carreño. 2003. Digestive enzymes and biochemical physiology of crustacean species of the Mexican Pacific ocean. In: Hendrickx, M.E. (Ed). *Contributions to the Study of East Pacific Crustaceans* (sometido).

RESUMEN

Las enzimas proteolíticas de la glándula digestiva de camarones peneidos juegan un papel clave en la degradación de la proteína del alimento. Las enzimas más abundantes en esta glándula son la tripsina y la quimotripsina, ambas realizan cerca del 60% de la proteólisis en dicho órgano. A la fecha existen reportes de varios factores que inducen cambios en la síntesis de estas enzimas. Algunos estudios se han enfocado en los mecanismos de regulación de la síntesis enzimática tanto en modelos vertebrados como en algunos invertebrados; en los crustáceos son pocos los reportes y gran cantidad de interrogantes las que permanecen abiertas hasta la fecha. Como parte inicial del estudio de la adaptación enzimática en peneidos, esta investigación se enfoca a la búsqueda de evidencia de este proceso en la glándula digestiva del camarón blanco *Penaeus vannamei*.

La adaptación enzimática ha sido demostrada en ratas, bovinos, peces y algunas especies de invertebrados como el mosquito. El conocimiento de los posibles inductores de cambios en la actividad enzimática en la glándula digestiva, aunado a los cambios fisiológicos propios del organismo como el ciclo de muda, permite la evaluación y análisis de las respuestas del organismo y los mecanismos de regulación asociados al proceso de adaptación enzimática.

En la presente investigación la búsqueda de respuestas está basada en el uso de diferentes estrategias y herramientas que permiten el establecimiento de hipótesis y conclusiones mas claras acerca del proceso estudiado. Los resultados establecen la base del entendimiento de los mecanismos que regulan los cambios de la síntesis enzimática en la glándula digestiva. La presente investigación demuestra la existencia de la adaptación enzimática en la glándula digestiva del camarón como un mecanismo de regulación de la síntesis y actividad de las enzimas. Establece la relación entre los efectos causados por inductores relacionados con el estrés alimenticio y los mecanismos y moléculas que participan en el proceso de regulación y, por último, sugiere la presencia de un mecanismo regulatorio a nivel transcripcional de la expresión del(los) gen(es) de tripsina en la glándula digestiva del camarón. A su vez se sugiere el desarrollo de futuras estrategias para la evaluación del fenómeno de adaptación enzimática en peneidos.

Palabras clave: enzimas proteolíticas, Peneidos, quimotripsina, regulación, tripsina.

ABSTRACT

Proteolytic enzymes from the midgut gland in peneids play a key role in the hydrolysis of food proteins. Trypsin and chymotrypsin are the most abundant enzymes in the midgut gland, and are responsible for up to 60% of the proteolysis. Many factors have been reported to induce changes in the synthesis of these enzymes. Some studies have focused on the regulatory mechanisms of proteolytic enzyme synthesis in vertebrates and invertebrates. For crustaceans, there are only a few reports, and many questions remain open. The first part of this research intended to find evidence for the existence of an enzymatic adaptation process in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Previously, enzymatic adaptation has been demonstrated in rats, cattle, fish, and insects, such as mosquitoes. The evaluation of factors that induce changes in enzymatic activity of this gland, the study of the relationship between these changes, and the effect of physiological processes in the white shrimp, such as the molting cycle, provide a basis for analysis of regulatory mechanisms associated with enzymatic adaptation processes.

In this research, we used several approaches. The results of our experiments allow us to suggest a hypothesis and establish clear conclusions about enzymatic adaptation processes. Our observations show the presence of an enzymatic adaptation process in the midgut gland of shrimp that is a regulatory mechanism of enzyme synthesis and activity. A relationship was established between the effects of alimentary stress and mechanisms and molecules participating in the regulatory process. We suggest a regulatory mechanism at the transcriptional level of trypsin gene expression. Suggestions are made about the enzymatic adaptation process in peneids and the possibility of new strategies for further evaluations.

Key words: chymotrypsin, Peneids, proteolytic enzymes, regulation, trypsin.

Índice general	Página
Lista de figuras.....	VIII
Lista de tablas.....	IX
Introducción	1
I. Enzimas proteolíticas	1
Origen y función	1
Biotecnología: uso y aplicación de las enzimas.....	2
II. Regulación de la síntesis enzimática	3
Inductores y efectores.....	3
Adaptación enzimática	3
Expresión de genes: un mecanismo complejo.....	6
Participación hormonal: un efector de importancia	9
Zimógenos e inhibidores: dos mecanismos de regulación post-traducciona.....	14
La proteína del alimento: un inductor con respuestas múltiples.....	19
III. Crustáceos.....	22
Investigación, avances e importancia	22
El camarón como modelo de estudio.....	22
Las enzimas digestivas de los crustáceos.....	23
Tripsina y quimotripsina	27
Objetivos	30
Hipótesis.....	30
Estrategia Metodológica.....	31
Resultados.....	34
Parte I. Efecto del ayuno y del estadio de muda en la actividad proteolítica de la glándula digestiva del camarón blanco <i>P. vannamei</i>	34
Parte II. Efecto del ayuno a corto plazo en la actividad proteolítica de la glándula digestiva del camarón blanco <i>P. vannamei</i>	40
Parte III. Efecto de la concentración de proteína del alimento en la concentración relativa de ARNm de tripsina y en la actividad proteolítica de la glándula digestiva del camarón blanco <i>P. vannamei</i>	44
Alimento y organismos experimentales	44
Actividad enzimática	45
Concentración relativa del ARNm de tripsina y L21	47
Discusión	50
Consideraciones finales	64
Referencias bibliográficas.....	65
Anexos.....	83

Lista de figuras	Página
Figura 1. Cascada de activación de enzimas hidrolasas en vertebrados.....	16
Figura 2. Aparato digestivo del camarón.	25
Figura 3. Estructura general y citología de la glándula digestiva de decápodos.....	26
Figura 4. Metodología para la evaluación de la actividad enzimática de extractos de la glándula digestiva del camarón blanco <i>P. vannamei</i>	31
Figura 5. Metodología para el análisis electroforético de la actividad enzimática de extractos de la glándula digestiva del camarón blanco <i>P. vannamei</i>	32
Figura 6. Metodología para la evaluación de la concentración de ARNm de tripsina en la glándula digestiva del camarón blanco <i>P. vannamei</i>	33
Figura 7. Efecto del ayuno y el estadio de muda en el índice hepatosomático de <i>P. vannamei</i>	35
Figura 8. Efecto del ayuno y el estadio de muda en la actividad tripsina de la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i>	37
Figura 9. Efecto del ayuno y el estadio de muda en la actividad quimotripsina de la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i>	38
Figura 10. SDS-PAGE del extracto de la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> en diferentes estadios de muda y tiempos de ayuno.	39
Figura 11. SDS-PAGE del extracto enzimático de la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> , ensayo de inhibición.....	40
Figura 12. Contenido de proteína y actividad proteolítica total de la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> después de la ingesta.....	41
Figura 13. Actividad de tripsina y quimotripsina en la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> después de la ingesta.	42
Figura 14. SDS-PAGE de extractos enzimáticos de la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> después de la ingesta.	43
Figura 15. (A) Actividad de tripsina y (B) quimotripsina (U/mg proteína) de la glándula digestiva del camarón blanco <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes concentraciones de proteína.....	46
Figura 16. SDS-PAGE de extractos enzimáticos de la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> alimentados con diferentes concentraciones de proteína.	47
Figura 17. Productos de RT-PCR de tripsina y L21 de la glándula digestiva del camarón blanco <i>P. vannamei</i>	48
Figura 18. Concentraciones del ARNm de (A) Tripsina y L21, (B) Tripsina/L21 en la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i> usando la técnica de RT-PCR.....	46
Figura 19. Índice actividad/concentración de ARNm de tripsina/L21 en la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i>	50

Lista de tablas	Página
Tabla I. Hábitos alimenticios y niveles de regulación de la síntesis de tripsina.	4
Tabla II. Moléculas asociadas a la regulación de la síntesis de enzimas digestivas proteolíticas en el páncreas de vertebrados.	9
Tabla III. Diagrama general del proceso de digestión de la proteína en crustáceos..	267
Tabla IV. Efecto del ayuno y el estadio de muda en el peso corporal y en el peso de la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i>	34
Tabla V. Efecto del ayuno y el estadio de muda en el contenido de proteína y en la actividad proteolítica total de la glándula digestiva de <i>P. vannamei</i>	35
Tabla VI. Composición de los alimentos experimentales para <i>P. vannamei</i>	44
Tabla VII. Peso corporal, peso de la glándula, contenido de proteína y actividad proteolítica total de la glándula digestiva del camarón blanco <i>P. vannamei</i>	44

Introducción

I. Enzimas proteolíticas

Origen y función

Las enzimas, como catalizadores de origen proteico, son producidas en todos los sistemas biológicos haciendo posible un gran número de reacciones químicas específicas, siendo las responsables de la regulación de todas las actividades sintéticas y metabólicas de la célula (Rodríguez, 1999). Cada enzima es específica para un determinado sustrato debido a la capacidad que tiene de reconocer cierto tipo de enlaces. Las enzimas proteolíticas, objeto de este estudio, catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos, permitiéndole al organismo degradar la proteína del alimento que consume. Los productos de la degradación de las proteínas del alimento, los aminoácidos, son asimilados con el fin de ser utilizados por el organismo como componentes estructurales permitiendo el crecimiento del mismo (Eckert et al., 1990).

En la actualidad, el estudio de las enzimas pertenecientes a la clase serin-proteasas se ha intensificado puesto que estas enzimas participan en varios procesos fisiológicos importantes como son los procesos digestivos y de degradación fisiológica de proteína funcional, la coagulación sanguínea, la inmunidad celular, la fibrinólisis, la fertilización y el desarrollo embrionario (Krem y Di Cera, 2002). Varias de estas funciones, en particular la coagulación sanguínea y la degradación de la proteína del alimento, están mediadas por proteasas que participan en la regulación de la actividad celular (Dall et al., 1990; Whitaker, 1994).

Los primeros estudios de enzimas digestivas se realizaron a comienzos del siglo XX con la descripción de las enzimas secretadas por el páncreas en vertebrados y por la glándula digestiva (hepatopáncreas) de insectos y crustáceos, como las responsables de la hidrólisis de nutrientes poliméricos en el alimento (Gibson y Barker, 1979). En los años sesentas se iniciaron varios estudios sobre el aislamiento, caracterización y evolución de las enzimas digestivas como tripsina y quimotripsina en invertebrados, mostrando que la mayoría de las especies de invertebrados, incluyendo

terrestres y acuáticos (ya sea de agua dulce o marinos) cuentan con enzimas tripsina ó tipo-tripsina en sus tubos digestivos (Ryan, 1965; Keil et al., 1968; Arnon y Neurath, 1969; Pfeleiderer et al., 1970). Estudios sobre la filogenia de tripsinas y tripsinógenos en vertebrados e invertebrados han proporcionado algunas pistas sobre la evolución de esta familia de proteínas (Roach et al., 1997). El alto grado de similitud observada en la estructura tridimensional de las tripsinas en diferentes especies incluyendo las bacterias, sugiere que las tripsinas surgieron millones de años antes de la divergencia de vertebrados e invertebrados (Arnon y Neurath, 1969).

Biología: uso y aplicación de las enzimas

Las enzimas, al ser las únicas moléculas con capacidad de biotransformación, resultan herramientas de gran interés en áreas biológicas de relevancia como la biotecnología (Whitaker, 1994; de Albuquerque-Cavalcanti et al., 2001). Los catalizadores biológicos, como las enzimas, suelen ser atractivos para procesos industriales dada su alta especificidad para transformar un sustrato, la eficiencia catalítica, el incremento de la tasa de reacción y la especificidad que presentan por la reacción (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997; Mars et al., 1999). En ciencia y tecnología de alimentos, las enzimas han sido importantes en diferentes formas: (1) en la producción, procesamiento (biotransformación) y almacenamiento de materia prima, (2) en nutrición, durante los procesos de ingestión, digestión y asimilación del alimento y (3) como herramientas analíticas (Reed, 1993; Díaz López y García Carreño, 2000).

Las enzimas proteolíticas son un grupo de enzimas importantes puesto que presentan un uso comercial muy amplio (García-Carreño, 1991). La mayoría de las termo-proteasas son del tipo serina y son estables a altas temperaturas. A su vez, las serin-proteasas son enzimas muy resistentes a la desnaturalización por detergentes y a condiciones alcalinas, por lo tanto se pueden usar como aditivo en detergentes domésticos. Las aplicaciones de estas enzimas en la industria de los alimentos van

desde la producción de queso y su maduración, modificación de la proteína de soya, como ablandadores de carne, hasta la modificación de las propiedades proteicas de cereales en la producción de pan y cereales (Whitaker, 1994; Suárez et al., 2002). Por todas las razones antes mencionadas estas enzimas han sido objeto de un sinnúmero de estudios en organismos vertebrados e invertebrados (Suárez et al., 2002).

II. Regulación de la síntesis enzimática

Inductores y efectores

La respuesta fisiológica de un organismo a cambios ambientales de corto plazo está dada por una serie de procesos que ocurren a escala celular ó subcelular, ajustando las cantidades o tipos de macromoléculas presentes en las células. Los factores del medio que influyen directa o indirectamente en el metabolismo celular afectarán al organismo "*in toto*". Cada factor cambiante en el medio actúa como inductor y es detectado por el organismo por medio de un sensor (normalmente células nerviosas sensoriales), el cual a su vez envía señales al órgano controlador (sistema nervioso), quien ajusta la actividad del órgano efector por medio de una respuesta, ya sea temprana de tipo nervioso ó tardía de tipo hormonal (Hochachka y Somero, 1984). Este esquema general de control de las respuestas fisiológicas le permite al organismo adaptarse a un ambiente cambiante, de tal forma que pueda sobrevivir y perpetuarse (Eckert et al., 1990).

Adaptación enzimática

Las enzimas son moléculas que se encuentran reguladas respondiendo al sistema de control general antes mencionado, estas tienen como función principal la catálisis de reacciones químicas, sin embargo, la mayoría de ellas forman parte de

algún mecanismo de control de la regulación metabólica (Hochachka y Somero, 1984). La adaptación enzimática esta definida como la variación en la cantidad y, por lo tanto, en la actividad de las enzimas cuando los organismos son expuestos a cambios externos capaces de modificar sus funciones metabólicas (Hochacka y Somero, 1984).

Las enzimas proteolíticas digestivas son sintetizadas y secretadas al tracto digestivo como respuesta al estímulo que produce el alimento ingerido, de donde se asume que la maquinaria celular del tejido u órgano involucrado en esta función debe ser sensible a dichas señales. De acuerdo a García-Carreño y Hernández (1996), los cambios en la actividad de las enzimas digestivas son inducidos cuando los organismos son expuestos a estrés alimenticio, incluyendo alimentos inadecuados nutricionalmente o alimentos que contienen factores antinutricionales. La actividad de las enzimas en el tracto digestivo de cualquier organismo juega un papel clave en la asimilación de los aminoácidos provenientes de la proteína del alimento, y es por esto que el entendimiento de los mecanismos de regulación de la síntesis de estas enzimas es de gran importancia para conocer la fisiología bioquímica de la digestión (Olli et al., 1994; Zambonino-Infante y Cahu, 1994; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2002; Muhlia-Almazán et al., 2003).

La cantidad de cualquier enzima presente en una célula puede ser regulada en diferentes sitios y momentos (Hochachka y Somero, 1984). Estudios realizados tanto en vertebrados como en invertebrados muestran la posible existencia de uno o varios mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de las enzimas proteolíticas. Dichos mecanismos son especie-específicos y dependen del ciclo de vida, los hábitos alimenticios y el ambiente en el que se desarrollan los organismos (Tabla I) (Carreira et al., 1996; Lehane et al., 1998; Secor y Diamond, 1998; Sahin-Tóth, 2000; Secor, 2001, García-Carreño 2002).

Tabla I. Hábitos alimenticios y niveles de regulación de la síntesis de tripsina en invertebrados.

Especie	Hábito alimenticio	Nivel de regulación	Tipo de consumidor	Cita
<i>Stomoxys calcitrans</i> (mosca)	Hematófago	Posttranscripcional. Tripsinógeno	Infrecuente	Moffat y Lehane, 1990. Lehane et al., 1998.
<i>Aedes aegypti</i> * (mosquito)	Hematófago	Traduccional. Tripsina temprana. Transcripcional Tripsina tardía.	Infrecuente	Noriega y Wells, 1999.
<i>Anopheles gambiae</i> * (mosquito)	Hematófago	Genes constitutivos e inducidos. Zimógenos	Infrecuente	Muller et al., 1995. Vizioli et al., 2001.
<i>Blatella germanica</i> (cucaracha)	Omnívoro	Post-traduccional. Tripsinógeno	Anautógeno frecuente	Bennet y Owens, 1986. Holbrook et al., 2000. Maestro et al., 2001.
<i>Tineola bisselliella</i> (polilla)	Herbívoro	Post-traduccional. Formas activas asociadas con vesículas	Frecuente	Ward, 1975.
<i>Glossina morsitans morsitans</i> * (mosca)	Hematófago	Traduccional. Genes constitutivos.	Infrecuente	Yan et al. 2001.
<i>Bombyx mori</i> (gusano de seda)	Herbívoro	Post-traduccional. Formas activas asociadas con vesículas	Frecuente	Eguchi y Iwamoto, 1982. Eguchi y Kuriyama, 1985.
<i>Botryllus schosseri</i> (ascidia)	Filtrador	Post-traduccional. Tripsinógeno	Frecuente	Muller et al., 1994; Pancer et al., 1996.
<i>Pascifastacus leniusculus</i> (langostino)	Omnívoro	Post- traduccional. Tripsinógeno	Frecuente	Hernández et al. 1999.
<i>Penaeus vannamei</i> (camarón)	Filtrador	Transcripcional y post-traduccional.	Frecuente	Klein et al., 1996. Sánchez-Paz, 2001.

Nota: * (Especies vectores de parásitos).

Estudios realizados en peces (Péres et al., 1998) y en el mosquito *Aedes aegypti* (Noriega y Wells, 1999), han mostrado que factores internos, como los genéticos y endócrinos, y factores externos, como las propiedades cualitativas y

cuantitativas del alimento, son inductores en el sistema de regulación de la síntesis enzimática. En mamíferos, se ha observado que los mecanismos específicos mediante los que los componentes del alimento influyen en la síntesis de enzimas pancreáticas específicas, pueden ser: (1) transcripcional, (2) postranscripcional y (3) traduccional/postraduccional (Ayala y Kiger, 1984). Incluso, diferentes mecanismos de regulación pueden presentarse solos ó combinados en cada especie (Xiong y Jacobs-Lorena, 1995; Lehane et al., 1998; Noriega y Wells, 1999).

Expresión de genes: un mecanismo complejo

Existen genes que pueden ser expresados diferencialmente, tanto en tiempo como en espacio; estos son la base del proceso que lleva a una simple célula, a dar origen a organismos con una extraordinaria variedad de tipos celulares (Blumberg e Ispisúa-Belmonte, 1999). El mecanismo más complejo de regulación de la concentración de una enzima involucra los procesos de activación y represión de genes. El control genético de la síntesis de enzimas puede llevar a: (a) cambios en la cantidad de una misma enzima, (b) cambios en los tipos diferentes de enzimas presentes en la célula, y (c) cambios en la abundancia relativa de las variantes enzimáticas (isoenzimas), que si bien catalizan la misma reacción, tienen propiedades catalíticas específicas (Hochachka y Somero, 1984).

Los mecanismos de control que actúan sobre la expresión de un gen son mucho más complejos en organismos eucariontes que en procariontes, siendo la diferencia principal, la presencia de un núcleo rodeado por una membrana que presentan los eucariontes (Lewin, 1994). El inicio de la transcripción es el mecanismo de control más importante en la expresión de genes eucariontes. La transcripción de una secuencia de ADN a ARN mensajero (ARNm) es la respuesta a una señal química específica (Hochachka y Somero, 1984). Existen factores específicos que ejercen control sobre la transcripción de un gen, estos incluyen elementos promotores dentro de la secuencia de ADN de un gen dado, la presencia ó ausencia de secuencias

facilitadoras que promueven la actividad de la ARN polimerasa, y la interacción entre proteínas activadoras ó inhibidoras múltiples (Cowell, 1994).

En eucariontes, el procesamiento y modificación de los transcritos es un mecanismo conocido como maduración, y es otra forma de regulación en la síntesis de una enzima. Los ARN mensajeros deben ser poliadenilados, y los intrones deben ser adecuadamente removidos por enzimas específicas (Lewin, 1994). Una vez maduro, el ARNm debe salir del núcleo para poder ser traducido en proteína (Darnell, 1982). A diferencia de los ARNm procariontes cuya vida media es de 1 a 5 min, los ARNm eucariontes son más estables, lo que les permite una tasa de transcripción mayor (Lewin, 1994).

La mayoría de las hidrolasas de proteína son sintetizadas como isoformas (isoenzimas), como es el caso de la tripsina, colagenasa y catepsina-L en el camarón (Klein et al. 1996; Sellos y van Wormhoudt 1992). Cada isoforma posee diferentes propiedades cinéticas, diferente afinidad por el sustrato y es codificada por genes diferentes como en el caso del bacalao *Gadus morhua*, el mosquito y otras especies de insectos (Male et al., 1995; Noriega y Wells, 1999; Zhu y Baker, 1999). A su vez, se ha observado que diferentes enzimas pueden estar activas en diferentes tejidos, como ocurre en el camarón blanco *Penaeus vannamei*, en cuya glándula digestiva existen varias tripsinas activas, diferentes a aquellas expresadas en tejido muscular (Klein et al., 1998; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2002). Además, en organismos vertebrados, incluyendo la rata y el humano, se ha reportado la existencia de varias familias de multi-genes que codifican para tripsina; en rata se han encontrado cuando menos 10 genes codificantes de tripsina (Zwilling y Neurath, 1981; Craik et al., 1984).

En algunas especies de insectos la organización del sistema y proceso digestivos ya ha sido descrita. Los hábitos alimenticios de estos organismos han sido correlacionados con la fisiología, anatomía y bioquímica de la digestión, sobretodo en algunas especies que son vectores de parásitos causantes de enfermedades en el humano (Tabla I). El prototipo de la digestión muestra, además, una relación con la

posición filogenética de cada grupo, y puede ser utilizado para establecer relaciones evolutivas entre especies según sugirió Terra (1990). El sistema y procesos digestivos de la hembra del mosquito *A. aegypti* ha sido uno de los mejor descritos: el modelo es un complejo mecanismo de regulación de genes, el cual está controlado, endógenamente por hormonas y exógenamente por la ingesta de sangre. La tripsina es la endopeptidasa con mayor actividad en la glándula digestiva del mosquito. Dos isoformas, la tripsina temprana y la tardía, son sintetizadas en dicha glándula y la cantidad y presencia de cada una varían después de la ingesta (Barrillas-Mury et al., 1991; Barrillas-Mury y Wells, 1993; Kalhok et al., 1993). La tripsina temprana que es sintetizada en su forma activa y en pequeñas cantidades, aparece entre 4 y 6 h después de la ingesta siendo responsable de la primera fase de la actividad tripsina. La actividad de esta enzima es la señal que activa la síntesis de la tripsina tardía, que es la principal endoproteasa responsable de la digestión de la proteína ingerida y, por lo tanto, se sintetiza en mayor concentración y aparece aproximadamente 12 h después de la ingesta de alimento (Graf y Briegel, 1989; Noriega et al., 1994; Barillas-Mury et al., 1995). La concentración de ARNm de ambas tripsinas también es variable. El ARNm de la tripsina temprana se transcribe bajo el control de la hormona juvenil inmediatamente después de que el adulto emerge (Noriega et al., 1997; Edgar et al., 2000). Después de la ingesta de sangre se inicia la traducción, y hay una disminución del ARNm de tripsina temprana, manteniéndose en baja concentración durante los dos días siguientes (Noriega et al., 1996). Se ha sugerido que este tipo de regulación le permite al mosquito evaluar la calidad y cantidad de proteína de la ingesta por medio de la proteólisis de la tripsina temprana. Algunos aminoácidos específicos liberados durante esta primera (y limitada) etapa de la digestión, son el disparador de la transcripción de la tripsina tardía, que a su vez es responsable de la digestión de la proteína del alimento (Noriega y Wells, 1999).

Los modelos y mecanismos hasta ahora descritos tanto en vertebrados como en invertebrados demuestran que el control genético de la concentración de enzimas

tiene ventajas y desventajas. La activación/represión de un gen es una forma efectiva de cambiar las concentraciones de una enzima por una vía altamente específica. Sin embargo, en células eucariontes, la activación de un gen suele ser un proceso que lleva horas. En contraste, los cambios ambientales a los que puede estar sujeto el organismo pueden ocurrir en un orden de segundos ó minutos, de donde se esperaría que los procesos de adaptación bioquímica de un organismos se dieran en tiempos reducidos (Hochachka y Somero, 1984).

Participación hormonal: un efector de importancia

El efecto que provoca un estímulo a lo largo de un conjunto de fibras nerviosas causa la liberación de una serie de mensajeros químicos y reguladores (neurotransmisores y/o hormonas) que pueden ser liberados ya sea por tejido nervioso ó por tejido endócrino no-neural. Las hormonas, que pueden ser de origen peptídico ó esteroideo, juegan un papel muy importante en los mecanismos de regulación de los sistemas biológicos, incluyendo el proceso digestivo (Eckert et al., 1990).

El estudio de vertebrados incluyendo la rata, bovinos y al humano ha permitido, dadas sus características e importancia, un avance constante y dirigido en la descripción de los mecanismos que regulan la síntesis de enzimas digestivas y la participación de moléculas neurotransmisoras y hormonas. La cascada de activación de las hidrolasas digestivas ya ha sido descrita (ver apartado posterior: zimógenos), al igual que la participación de algunas hormonas (Krem y Di Cera, 2002). Sin embargo, en los invertebrados son aún pocos los estudios y modelos descritos aunque se han identificado células endócrinas, en particular neurosecretoras (Eckert et al., 1990). En vertebrados, existen reportes que sugieren que tanto la ingestión como la digestión son procesos regulados por neurotransmisores y neuromoduladores (Katsuura et al., 2002) y una serie de moléculas han sido relacionadas con la síntesis y secreción de las enzimas digestivas de estos organismos (Tabla II).

Tabla II. Moléculas asociadas a la regulación de la síntesis de enzimas digestivas proteolíticas en el páncreas de vertebrados.

Molécula	Lugar de Secreción	Función
Colecistoquinina (Cck)	Células endócrinas del duodeno. Neuronas del tracto gastrointestinal y SNC.	Secretada después de la ingestión de alimento. Péptido gastrointestinal (33 residuos), regulador hormonal que estimula la secreción de enzimas digestivas en el páncreas y actúa en el control de la ingestión.
Gastrina	Células endócrina de la mucosa intestinal y neuronas.	Hormona liberada por estímulos químicos, reflejos nerviosos y presencia de bombesina. Estimula la secreción de protones y enzimas pancreáticas y es competitivamente inhibida por Cck.
Secretina	Células endócrina de la mucosa del duodeno y neuronas.	Péptido hormonal (27 residuos), liberado por la acidificación del intestino que estimula la secreción de pepsina y jugo biliar e inhibe la secreción gástrica ácida.
Péptido vasoactivo intestinal (VIP)	Células endócrinas gastrointestinales y células del SNC.	Neuropéptido (28 residuos). Liberado por la presencia de ácido clorhídrico y lípidos que estimula la vasodilatación de la vascularización esplácnica.
Polipéptido pancreático (PP)	Células F de las isletas pancreáticas y neuronas.	Neuropéptido (36 residuos) que inhibe la secreción pancreática exógena, modula la secreción gástrica ácida y regula la ingestión de alimento.
Polipéptido inhibidor gástrico (GIP)	Células del duodeno y yeyuno.	Neuropéptido (42 residuos) que es liberado en presencia de azúcares, ácidos grasos y aminoácidos (Leu y Trp), estimula la liberación de insulina e inhibe la secreción de ácidos gástricos.
Bombesina (BN)	Células endócrinas gastrointestinales y neuronas.	Neuropéptido relacionado con el control de la ingestión de alimento. Estimula la secreción directa de Cck en presencia de iones Ca^{2+} y gastrina e inhibe el vaciado gástrico.
Secretina	Células endócrinas de la mucosa del duodeno y neuronas.	Péptido hormonal (27 residuos), estimula la secreción pancreática e inhibe la secreción gástrica ácida. Es liberada en respuesta a la acidificación del intestino.
Somatostatina	Células endócrinas gastrointestinales y neuronas.	Péptido de 26 aminoácidos que es liberado por la ingestión de grasas, proteínas y azúcares. Inhibe la secreción de ácidos gástricos y de pepsina.

Adaptado de Kitamoto et al., 1994; Snow, et al., 1994; Liddle, 1994 y 1997; Ladenheim et al., 1999; Merali et al., 1999; Resch-Sedlmeier y Sedlmeier, 1999; Wei et al., 2000; Sitniewska, 2001; Henning et al., 2002; Katsuura et al., 2002.

En los vertebrados, la colecistoquinina (Cck) es una hormona cuya liberación es estimulada por la ingesta de alimento, siendo los productos de la degradación de grasas y proteínas (conteniendo residuos Trp y Phe) los estimulantes más potentes de la secreción de Cck (Liddle, 1997). El mecanismo específico por el que el alimento causa la secreción de Cck no ha sido descrito aún, sin embargo, se han encontrado

evidencias de la existencia de factores de liberación endógenos (Snow et al., 1994). Uno de ellos es el factor liberador sensible a tripsina (trypsin-sensitive releasing factor), que es secretado en el lumen del intestino y estimula la liberación de CCK (Miyasaka et al., 1989; Liddle, 1997).

Según Lehane et al. (1995), la glándula digestiva de los insectos contiene numerosas células endócrinas putativas, sin embargo, no existe evidencia clara de que la secreción de estas células esté directamente relacionada con el control de la actividad enzimática de dicho órgano. La información hasta ahora descrita en invertebrados sugiere la existencia de mecanismos de control hormonal tanto en la expresión de genes como en la activación directa de dichas enzimas (Harsman y James, 1998; Resch-Sedlmeier y Sedlmeier, 1999). En insectos, algunas hormonas han sido reportadas con capacidad de control en el inicio de la transcripción de los genes de enzimas (Harsman y James, 1998). Tal es el caso de la hormona juvenil (JH) en las hembras de la cucaracha *Leucophaea maderae* y del mosquito *A. aegypti*, en los que esta hormona da la señal indicadora de inicio del proceso reproductivo, puesto que el estado adulto ha sido alcanzado. En el mosquito, el incremento de la biosíntesis de esta hormona (JH) es la señal de inicio de la transcripción del gen de la tripsina temprana y una vez que esta tripsina ha sido transcrita, un mecanismo complejo se lleva a cabo para la digestión de la proteína del alimento ingerido, como fue descrito anteriormente (Hammock, 1985; Noriega et al., 1996; Edgar et al., 2000; Noriega et al., 2001).

La familia de neuropéptidos CCK–gastrina originalmente identificada sólo en mamíferos, parece tener representantes en todo el Phylum Chordata e incluso en invertebrados. A pesar de que en algunas especies de insectos ha sido posible la identificación y purificación de sustancias de la familia CCK-gastrina, en el caso de los crustáceos los esfuerzos de purificación de estas han fallado y el conocimiento de estas sustancias es aún muy limitado (Favrel et al., 1991; Resch-Sedlmeier y Sedlmeier, 1999).

En varias especies de peneidos se ha propuesto la existencia de una regulación hormonal de la actividad de la tripsina. En 1983, Larson y Vigna, propusieron que una hormona tipo CCK-gastrina apareció en los invertebrados como un neuropéptido que fue subsecuentemente usado por los vertebrados como un péptido regulador tanto en el sistema nervioso, como en el sistema endócrino gastrointestinal, por lo que se debería esperar que la presencia de estas moléculas gastrointestinales en los crustáceos fuera amplia. En 1989, van Wormhoudt et al., reportaron variaciones cuantitativas post-prandiales en la concentración de péptidos tipo CCK-gastrina encontrados en la hemolinfa de las especies *Penaeus japonicus* y *Penaeus stylirostris*, sugiriendo la participación de estos péptidos en la estimulación de la síntesis de enzimas digestivas.

En el cangrejo *Cancer magister*, se han encontrado péptidos con estructura similar a la secuencia de aminoácidos de la parte bioactiva C-terminal común en gastrinas y colecistoquininas. Existen reportes de inmunoreactividad positiva en tejidos de crustáceos usando anticuerpos generados para la detección de CCK8 en mamíferos. El reconocimiento de péptidos tipo CCK se ha reportado en tejidos neuronales como el pedúnculo ocular de *Astacus leptodactylus* y *Palaemon serratus*, en el sistema nervioso estomatogástrico del cangrejo de roca *Cancer borealis* (Favrel et al., 1987; Christie et al., 1995) y en tejidos no-neuronales como el estómago de *Cancer magister* y *P. serratus* y la hemolinfa de algunas especies de peneidos (Larson y Vigna, 1983; Favrel et al., 1987). Resch-Sedlmeier y Sedlmeier (1999) detectaron en el langostino americano *Orconectes limosus*, actividad proteasa y amilasa en la glándula digestiva después de un periodo de incubación con CCK-8, gastrina, secretina y bombesina. Estos resultados apoyan la propuesta de que los crustáceos poseen factores endógenos similares a las hormonas de los vertebrados, cuando menos en lo relacionado a los receptores de membrana que tienen la capacidad de reconocer a las hormonas de vertebrados antes mencionadas. La función específica de estas hormonas en crustáceos se desconoce, aunque se acepta una relación directa con la digestión de alimento (Favrel et al., 1991; Resch-Sedlmeier y Sedlmeier, 1999).

Otros neuropéptidos con homología a los de la familia CCK-gastrina son los llamados sulfaquininas, estos fueron descritos como una familia de péptidos que habían sido encontrados sólo en insectos, y cuya función parece estar relacionada, entre otras, con el control de la ingestión y digestión del alimento, actuando como hormonas, moduladores o transmisores (Wei et al., 2000; Maestro et al., 2001). La presencia de péptidos de la familia de las sulfaquininas se ha reportado en insectos como la mosca *Calliphora vomitoria* (Duve et al., 1995), la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Nichols y Lim, 1996), la langosta del desierto *Schistocerca gregaria* (Wei et al., 2000) y la cucaracha alemana *Blatella germanica* (Maestro et al., 2001), entre otros. Estos péptidos han sido detectados por medio de anticuerpos ó por análisis dot-blot en células nerviosas y no-nerviosas. En especies como la mosca *D. melanogaster*, estas moléculas se encuentran en células de tejidos nerviosos (Nichols y Lim, 1996). Sin embargo, en otras especies, la distribución de estas células esta limitada a sólo unos cuantos pares neuronales como en la mosca *C. vomitoria* (Duve et al., 1994 y 1995) y en el camarón *Penaeus monodon* (Johnsen et al., 2000).

La similitud de la estructura de las sulfaquininas con los péptidos de la familia CCK-gastrina y el alto porcentaje de correspondencia entre sus secuencias C-terminales, son los argumentos que han permitido a autores como Nachman et al., (1991) y Maestro et al., (2001) sugerir que ambos grupos de péptidos son homólogos (presentan un mismo origen), que están involucrados en los mecanismos que regulan la alimentación y que se han conservado durante la evolución de insectos y vertebrados. Sin embargo, para otros autores existen diferencias importantes en la secuencia del tetrapéptido C-terminal His-Met-Arg-Phe-NH₂ de las sulfaquininas y Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ de gastrina y colecistoquinina, las cuales aunadas a las diferencias en el número de células que expresan los genes de sulfaquininas entre especies, y a la reacción positiva (poco específica) de una serie de tejidos en insectos hacia

anticuerpos CCK-gastrina de mamíferos, sugieren la ausencia de homología entre ambas familias de péptidos (Duve et al., 1994 y 1995).

Johnsen et al. (2000) purificaron tres nuevos miembros de la familia de las sulfaquininas a partir de un extracto del sistema nervioso central del camarón *P. monodon*. Estudios inmunocitoquímicos con anticuerpos anti-sulfaquininas han mostrado en crustáceos un patrón de distribución neuronal de estas sustancias muy limitado así como en algunas especies de insectos como la mosca *C. vomitoria*, sugiriendo que las sulfaquininas son sustancias neurotransmisoras o neuromoduladoras que conectan al cerebro con los ganglios torácico y abdominal (Duve et al., 1994; Johnsen et al., 2000). Sin embargo, en crustáceos aún se desconoce la relación de estos péptidos con la fisiología del aparato digestivo, como ya ha sido demostrado en ensayos *in vitro* para las sulfaquininas de insectos ortópteros (Maestro et al., 2001).

Zimógenos e inhibidores: dos mecanismos de regulación post-traducciona

Una vez que el ARNm maduro de una proteína sale del núcleo celular, debe ser traducido para convertirse en una proteína (Hochachka y Somero, 1984). El inicio de la traducción es otro mecanismo de regulación de la síntesis de proteínas. Debido a que las secuencias de ARNm presentan codones de inicio en su extremo 5', la habilidad de los ribosomas para traducir un codón AUG (de inicio) puede afectar la expresión del gen (Cowell, 1994). Otro tipo de modificaciones pueden ocurrir después de la traducción (post-traducciona). Estas se llevan a cabo en la proteína ya sintetizada y suelen ser necesarias para que la proteína sea funcional. Estas modificaciones incluyen la glicosilación, acetilación, formación de puentes disulfuro, e incluso la activación de los zimógenos (Lewin, 1994).

En el caso específico de las enzimas proteolíticas, se han reportado dos mecanismos importantes de regulación post-traducciona para adquirir y regular la

actividad catalítica: la síntesis de enzimas en forma de zimógenos y la presencia de inhibidores de dichas enzimas (García-Carreño, 1992).

Debido a la necesidad que presentan todos los organismos de digerir macromoléculas exógenas sin destruir constituyentes similares endógenos, especialmente en los vertebrados (Kitamoto et al., 1994), se ha observado una cascada de activación de hidrolasas que convierte los zimógenos pancreáticos en enzimas activas en el lumen del intestino (Fig. 1). La enteropeptidasa o enteroquinasa es una serin-proteasa intrínseca de la membrana de los enterocitos del intestino proximal. Este es el activador fisiológico del zimógeno de la tripsina ó tripsinógeno, pues elimina el péptido de activación N-terminal para producir tripsina activa, quien a su vez, usando el mismo mecanismo, activa a otros zimógenos pancreáticos (Light y Janska, 1989; Yuang et al., 1998; Zamolodchikova et al., 2000; Fig. 1). Tanto las secuencias del péptido señal y del péptido de activación, como el mecanismo de activación de las proteasas pancreáticas es conservado en vertebrados y la aparente necesidad de activación de la pro-enteropeptidasa sugiere la existencia de otra proteasa activadora (Kitamoto et al., 1994).

Zamolodchikova et al. (2000) sugieren un nuevo esquema de la cascada de activación de las proteasas digestivas (Fig. 1). Estos autores reportaron una nueva enzima de la clase de las serin-proteasas en el duodeno de bovinos: la duodenasa. Esta enzima parece ser el activador primario de la proenteropeptidasa y, aparentemente, permite mantener una cierta concentración de enteropeptidasa activa en el duodeno, a partir del cual se da la activación del tripsinógeno y las demás enzimas proteolíticas cuando se ha ingerido alimento. La presencia de enteropeptidasa en invertebrados se reduce a un solo reporte (Vundla y Whitehead, 1985), en el que se detectó en el intestino de la mosca *Glossina morsitans*, sin embargo, ninguna evidencia posterior ha confirmado su existencia.

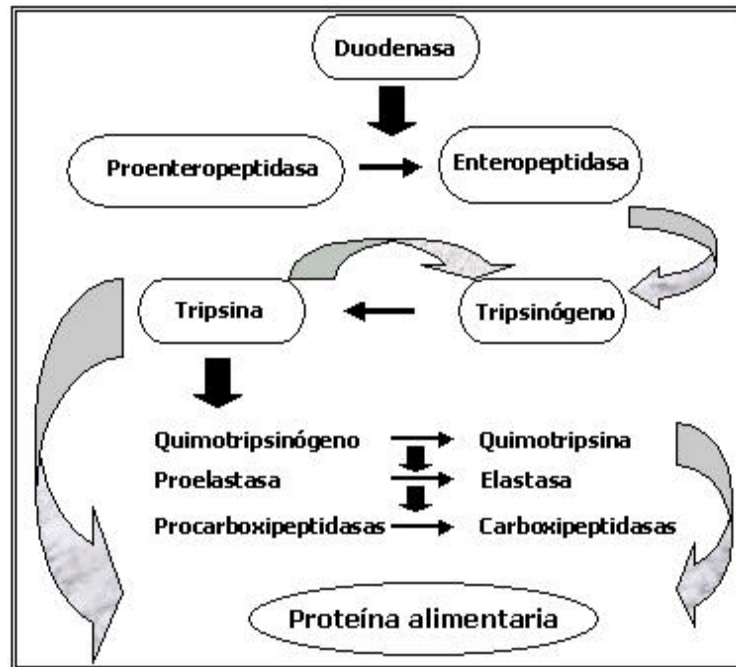


Figura 1. Cascada de activación de enzimas hidrolasas en vertebrados (Zamolodchikova et al., 2000, modificado por García-Carreño y Muhlia-Almazán, 2002).

Como ya se mencionó, la tripsina es sintetizada como un precursor inactivo ó zimógeno (Carreira et al., 1996). En la mayoría de las especies estudiadas, los zimógenos se almacenan en glóbulos intracelulares hasta que son activados-secretados al lúmen intestinal para la digestión de la proteína del alimento. La forma activa de la tripsina es el resultado del corte y remoción de un péptido altamente cargado en el extremo amino del zimógeno, este corte específico se da entre los residuos lisina/arginina e isoleucina (Male et al., 1995). El nuevo residuo amino-terminal (Ile16) se pliega hacia una bolsa formando un puente con Asp194, lo cual resulta en un cambio en la conformación del dominio de activación creando el sitio de unión de la enzima con el sustrato (Pasternak et al., 1999).

La tripsina es una enzima de importancia fisiológica particular debido a las características que la distinguen de las demás serin-proteasas pancreáticas: (1) especificidad por residuos L-arginina y L-lisina y (2) capacidad de activar otros zimógenos pancreáticos, siendo su activación el primer paso de una serie de

reacciones consecutivas o en cascada en la digestión de proteína del alimento (Neurath, 1984; Fletcher et al., 1987). Hasta 1980, se desconocía la existencia de zimógenos en especies de invertebrados. La ausencia de zimógenos y la síntesis de tripsina en su forma activa en la glándula digestiva de especies como la polilla *Tineola bisselliella* (Ward, 1975), el gusano de seda *Bombix mori* (Eguchi y Iwamoto, 1982; Eguchi y Kuriyama, 1985) y el mosquito *A. aegypti* (Barillas-Mury et al. 1991), sugerían que en los insectos el control de la actividad de las proteasas digestivas, dada la ausencia de formas inactivas, estaba dado por mecanismos de control diferentes a los de los vertebrados (Terra y Ferreira, 1994). Posteriormente, algunos reportes sugirieron la existencia de zimógenos en algunas especies de insectos, dada la importancia de su función en vertebrados. En 1990, Moffat y Lehane reportaron la existencia de una tripsina almacenada como zimógeno inactivo en la glándula digestiva de la mosca *Stomoxys calcitrans*. Posteriormente, Lehane et al. (1998), reportaron dos zimógenos de tripsina sintetizados en la zona opaca de dicha glándula de la misma especie, que son activados después de la ingesta de sangre. En algunas especies de insectos como el barrenero *Rhizopertha domeniica* y la mariposa de la India *Plodia interpunctella*, se han clonado y secuenciado los ADN complementarios de tripsinógenos putativos, y las secuencias de aminoácidos deducidas han sido comparadas con las de algunas especies de vertebrados (Zhu y Baker, 1999; Zhu et al., 2000), de donde se sugiere la existencia de zimógenos en varias especies de insectos.

En crustáceos, Klein et al. (1996) reportaron la secuencia de un tripsinógeno putativo de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei*. Posteriormente, Hernández et al. (1999) reportaron el aislamiento del tripsinógeno de la glándula digestiva del langostino *Pacifastacus leniusculus*. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados para aislar y purificar dicha molécula en crustáceos, los resultados no han sido exitosos.

Se han observado diferencias importantes entre los tripsinógenos de vertebrados y tripsinógenos putativos de invertebrados. La secuencia completa de los tripsinógenos de camarón y langostino es más larga que en vertebrados (Klein et al., 1996; Hernández et al., 1999). El camarón blanco *P. vannamei* y el tunicado *Botryllus schlosseri* no muestran identidad de secuencia del péptido de activación con el de vertebrados, lo cual sugiere mecanismos de activación diferentes (Klein et al., 1996; Pancer et al., 1996). Otra diferencia reside en el número de residuos Cys y en consecuencia, en el número de puentes disulfuro que muestra la molécula activa. En el tripsinógeno de vertebrados (bovinos, porcinos y peces), existen 12 residuos Cys que forman 6 puentes disulfuro (Fletcher et al., 1987), mientras que en el langostino *P. leniusculus* sólo se observan 6 residuos Cys formando 3 puentes disulfuro (Hernández et al., 1999). En el caso del mosquito *A. aegypti* (Kalhok et al., 1993), la mosca hematófaga *S. calcitrans* (Lehane et al., 1998) y el camarón *P. vannamei* (Klein et al., 1996), se han observado 8 residuos Cys, de donde se ha propuesto que la diferencia en el número de residuos de cisteína está relacionada a la temprana separación entre vertebrados e invertebrados en el curso evolutivo (Titani et al., 1983), y pudiera asumirse, que el ancestro común de estas moléculas pudiera tener el mismo número de puentes disulfuro y en la misma posición que en cualquiera de las secuencias de tripsina reportadas en vertebrados (De Haen et al., 1975). Tanto en invertebrados como en vertebrados se han observado las dos formas de tripsina: aniónica y catiónica, aunque se sabe que la presencia de estas formas es especie-dependiente en invertebrados (Ward, 1975; Fletcher et al., 1987; Pancer et al., 1996).

En el caso de la quimotripsina, también se ha reportado la presencia de zimógenos en algunas especies de insectos. En la palomilla *Manduca sexta*, la secuencia de aminoácidos deducida de la quimotripsina muestra una secuencia señal putativa de 17 residuos y un péptido de activación de 41 residuos, indicando que esta enzima también es sintetizada en forma de zimógeno (Peterson et al., 1995).

Los inhibidores de proteasas también se encuentran involucrados en los mecanismos de regulación en los organismos (Horler y Briegel, 1997). Se ha descrito y propuesto la presencia de una serie de inhibidores en mamíferos, como un mecanismo que controla la actividad enzimática evitando la activación espontánea de las enzimas, con el fin de prevenir la hidrólisis no deseada de componentes proteicos intracelulares (Graf et al., 2000). En el páncreas de las ratas se ha reportado un mecanismo de autoprotección contra la actividad tripsina mediante la síntesis y secreción paralela de un inhibidor de tripsina de secreción pancreática (PSTI), el cual es capaz de neutralizar la tripsina en circunstancias normales.

En insectos se han reconocido una serie de inhibidores con diversas funciones desde inhibidores contra proteasas de hongos patógenos (Eguchi et al., 1994), hasta aquellos que se encuentran en varias especies de mosquitos de los géneros *Aedes spp.* y *Anopheles spp.* que no son sólo inhiben tripsina, sino también quimotripsina. Estos inhibidores parecen estar involucrados en la cascada de activación de la fenoloxidasa (Horler y Briegel, 1997).

En crustáceos la información es escasa, sin embargo, recientemente se ha reportado el aislamiento de un inhibidor de tripsina de la glándula digestiva de *P. vannamei* (García-Carreño, 1998). De igual forma, también se ha reportado la existencia de este inhibidor en otras especies del género *Penaeus spp.*, (de Albuquerque-Cavalcanti et al., 2002). Haciendo analogía con modelos mejor conocidos, como la rata o el humano, se espera que estos inhibidores inhiban a tripsinas de la misma especie y de especies cercanas.

La proteína del alimento: un inductor con respuestas múltiples

El incremento en la tasa de síntesis o secreción de una enzima causado por la interacción directa de las células productoras de enzimas digestivas con alguno de los elementos del alimento se conoce como un mecanismo prandial (Lehane et al., 1995). Los reportes sobre cambios en la síntesis de enzimas proteolíticas y los

mecanismos de regulación, inducidos tanto por la ingesta del alimento como por la variación en el contenido de los elementos que forman dicho alimento, son numerosos sobretodo en modelos como la rata y el humano (Giorgi et al., 1985, Corring et al., 1989; Le Huerou- Luron et al. 1993; Lhoste et al., 1994; Rodríguez et al., 1994; Péres et al., 1998; Noriega y Wells, 1999). El estímulo que provoca el cambio del alimento es capaz de inducir respuestas adaptativas muy variadas; desde la expresión genética hasta el incremento o disminución de la síntesis y/o activación de una serie de moléculas interrelacionadas en el proceso digestivo. Una de las respuestas mejor conocidas a la presencia de alimento en el tracto digestivo de vertebrados es la respuesta hormonal. En 1997, Yamada et al. sugirieron que la transcripción de los genes de la gastrina y colecistoquinina en el páncreas y tracto digestivo de las ratas está regulada por la ingesta de alimento con cierto contenido de proteína. Sin embargo, el efecto que provoca el cambio del contenido de proteína del alimento en los organismos, también se ha demostrado para enzimas e incluso inhibidores de estas enzimas.

En 1984, Wicker et al. reportaron una relación positiva entre la biosíntesis proteica y el contenido de ARNm de amilasa y serin-proteasas (quimotripsinógeno, tripsinógeno y proelastasa) en ratas tratadas con alimentos de alta y baja concentración de proteína, concluyendo que el control de la síntesis de estas enzimas es pre-traducciona. Posteriormente, estos hallazgos fueron apoyados por los estudios de Giorgi et al. (1985) y Carreira et al. (1996) quienes reportaron que el cambio en la proteína del alimento afecta la concentración de ARNm del gen del quimotripsinógeno y, en especial, del gen del tripsinógeno, reforzando la idea de un control pre-traducciona en la síntesis de estas enzimas y mostrando que la expresión de los genes de ambas no es afectada en la misma medida ni con la misma sensibilidad.

La secreción de las enzimas proteolíticas del páncreas es proporcional, o al menos muestra una respuesta en el hombre, a la cantidad de nitrógeno alimentario ó, en la rata, a la cantidad de nitrógeno ingerido oralmente (Gorell y Gilbert, 1979; Corring et al., 1989; Lee et al., 1998). Sin embargo, según Lhoste et al. (1994) en el

páncreas de la rata además del contenido de proteína en el alimento, la naturaleza de la proteína también es un factor que provoca cambios en la síntesis de enzimas pancreáticas. Graf et al. (2000) reportaron que el incremento en el contenido de proteína del alimento, provoca no sólo el incremento en la síntesis de enzimas pancreáticas, específicamente del tripsinógeno, sino también provoca cambios paralelos en la síntesis del inhibidor de tripsina (PSTI), debido al daño potencial que la activación espontánea del tripsinógeno puede provocar al organismo. De acuerdo a lo anterior, en el páncreas de la rata el control sobre la síntesis de enzimas digestivas inducido por la cantidad de proteína del alimento se puede dar en varios niveles. Se han observado cambios a nivel pre-traducciona, ya sea en la transcripción y/o la vida media del ARNm de estas enzimas, y cambios a nivel post-traducciona en la síntesis de zimógenos e inhibidores específicos de estas enzimas.

En invertebrados, un ejemplo de la inducción de cambios en la síntesis de enzimas proteolíticas en el sistema digestivo por la proteína del alimento es la síntesis de tripsinas y quimotripsina en el mosquito *A. aegypti*. Como ya se mencionó, la síntesis y activación de ambas tripsinas depende de la ingesta de sangre y el contenido proteico de esta. En esta especie la síntesis de quimotripsina ha mostrado en esta especie un mecanismo de regulación diferente al de otras endoproteasas (Jiang et al., 1997). De manera semejante al mecanismo de la tripsina temprana, el gen de la quimotripsina se transcribe al inicio de la vida adulta del organismo. La concentración de ARNm alcanza su máximo antes de la ingestión de sangre, y la proteína no es traducida hasta que se da la ingesta. A diferencia de la tripsina temprana, la concentración de ARNm permanece constante durante la digestión (Jiang et al., 1997). La inducción de la síntesis y actividad de la quimotripsina por efecto de la ingesta de sangre ha sido también reportada en *Anopheles gambiae* (Horler y Briegel, 1997; Muller et al., 1995).

En crustáceos peneidos también se han reportado cambios post-prandiales en la síntesis enzimática de la glándula digestiva, y cuando los organismos son alimentados con alimentos con diferente concentración proteica (Lee et al., 1984; Le

Moullac, 1994; Le Moullac et al., 1996; Ezquerro et al., 1999; Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002; Muhlia et al., 2003). La presente investigación hace un análisis y proporciona datos adicionales a los ya reportados en peneidos, en un apartado posterior de este texto.

III. Crustáceos

Investigación, avances e importancia

Los crustáceos han sido tradicionalmente importantes para biólogos, pescadores, tecnólogos en alimentos y consumidores. Actualmente, con la creciente demanda de alimentos obtenidos a partir de estos organismos, los crustáceos son cada vez más importantes para acuicultores e investigadores que estudian aspectos relacionados con los procesos biológicos que afectan a los cultivos de las especies comerciales, como lo es la nutrición.

La importancia económica de los crustáceos como recurso de alto valor en el mercado internacional, la diversidad de especies susceptibles de ser cultivadas y la diversidad de habitats, conductas, patrones de migración y hábitos alimenticios, entre otros, hacen de este grupo de organismos un objeto de estudio de alto interés.

El camarón como modelo de estudio

La mayoría de los estudios sobre enzimas digestivas de invertebrados se concentran en insectos drosófilos, algunas especies no drosófilas (Lehane et al., 1995; Noriega y Wells, 1999; Sitniewska, 2001; Krem y Di Cera, 2002), y algunas especies de moluscos y crustáceos (Titani et al., 1983; Klein et al., 1996; García-Carreño et al., 1994, Serviere et al., 1997), siendo estos últimos el objeto de estudio de la presente investigación.

A pesar de la amplia diversidad de especies que comprenden los invertebrados, sólo algunos modelos han sido estudiados, ya sea por las características biológicas que presentan, el acceso a las muestras, la fácil manipulación o por la importancia médica de ciertas especies al ser vectores de enfermedades infecciosas para animales

o plantas. Sin embargo, el estudio de la fisiología de algunos procesos metabólicos importantes como es el caso de la digestión y la regulación de la síntesis enzimática, requiere de modelos que cubran algunas características importantes. Aquellas especies que presentan estructuras o respuestas exageradas permiten evaluaciones experimentales con resultados más claros. De aquí que la frecuencia de alimentación de un organismo, así como el tiempo que le lleva a éste digerir el alimento, permiten en mayor o menor medida, la evaluación de las respuestas post-prandiales, ya sean modestas ó extremas (Secor y Diamond, 1998). En el caso de los crustáceos, los peneidos son el grupo mas estudiado y las especies que lo conforman son, en general, consumidores frecuentes (cuando menos una ingesta por día), de porciones pequeñas (equivalentes a solo un pequeño porcentaje de su peso corporal), lo cual implica que el intestino está constantemente lleno y como resultado se observan respuestas regulatorias modestas. Sin embargo, los peneidos como modelos de estudio presentan características fisiológicas poco comunes como: transformaciones cíclicas y secuenciales que incluyen cambios morfológicos relacionados con la ontogenia (Lovett y Felder, 1989; 1990), cambios en las tasas metabólicas relacionados con consumo de oxígeno (Rosas et al., 1995) y procesos fisiológicos como la muda. Todo esto hace de estas especies un modelo de estudio complejo y singular, que comparado con otros modelos de invertebrados marinos respecto a la disponibilidad de muestra, existencia de información sobre la biología básica, importancia económica, y posible existencia de nuevos mecanismos de regulación, los hace modelos de estudio de gran interés.

Las enzimas digestivas de los crustáceos

Los crustáceos, como todas las especies de artrópodos, están sometidos cíclicamente a un periodo de muda ó ecdisis durante el cual el organismo pierde el exoesqueleto. Durante este proceso, el organismo, además de requerir una considerable cantidad de energía, presenta periodos de alimentación y periodos de ayuno dependiendo del estadio en el que se encuentre. Debido a la pérdida del exoesqueleto que implica la muda, los organismos pierden la capacidad de manipular

e ingerir el alimento por periodos de hasta 120 h (Dall et al., 1990). La habilidad de los organismos de crecer, sobrevivir y reproducirse bajo estas condiciones implica flexibilidad en su fisiología (Icely y Nott, 1992; Rodríguez et al., 1994).

Los efectos causados por la muda sobre la síntesis de enzimas digestivas no han sido descritos a profundidad, y muchas preguntas quedan aún por responder (Dall et al., 1990). De acuerdo con algunos estudios realizados en especies de peneidos, la ausencia de alimento provoca cambios en la actividad enzimática, en la estructura histológica y en la composición bioquímica de la glándula digestiva de estos organismos (Cuzon et al., 1980; Barclay et al., 1983; Chan et al., 1988; Al-Mohanna y Nott, 1989; Leung et al., 1990; Dall et al., 1990).

En camarones el hepatopáncreas ó glándula digestiva es el órgano responsable de la secreción de las enzimas digestivas que migran a la región pilórica de la cámara gástrica (también llamada estómago) e intestino, para llevar a cabo la degradación del alimento. Debido al tipo de alimentación que presentan, que en estado silvestre consta principalmente de pequeños invertebrados (Dall et al., 1990), los peneidos cuentan con una serie de enzimas que son sintetizadas y liberadas bajo diferentes condiciones y mecanismos, permitiendo de esa manera, la asimilación y aprovechamiento de los elementos contenidos en el alimento. En la glándula digestiva del camarón se han reportado enzimas: (1) carbohidrasas: α - y β -amilasas, glucogenasa, β -fructofuranosidasa, α - y β -glucosidasas, α - y β -galactosidasas, celulasas y quitinasas (Dall et al., 1990); (2) proteasas: tripsina, quimotripsina (Cuzon et al., 1980; Lee y Lawrence, 1982; Galgani et al., 1984; Lee et al., 1984; Tsai et al., 1986; García-Carreño et al., 1993; Hernández-Cortés et al., 1997; van Wormhoudt et al., 1995; Le Moullac et al., 1996); catepsina, colagenasa, aminopeptidasas y carboxipeptidasas (Klimova et al., 1990; Charfi-Cheikhrouha, 1994); (3) lipasas y esterases (Sevilla y Lagarrigue, 1975; Dall et al., 1990; Charfi-Cheikhrouha, 1994; Figs. 2 y 3).

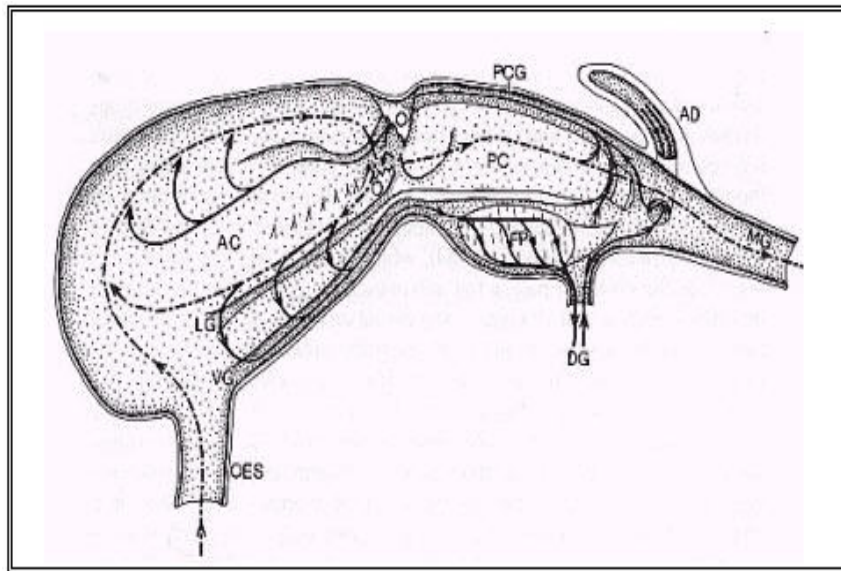


Figura 2. Aparato digestivo del camarón.

OES= esófago, VG y LG= hendiduras lateral y ventral, AC= cámara anterior ó cardíaca, PC= cámara posterior ó pilórica, DG= abertura hacia la glándula digestiva, MG=intestino medio, AD=divertículo anterior, PCG= hendiduras dorsolaterales de la cámara posterior y FP= filtro de presión (Dall et al., 1990).

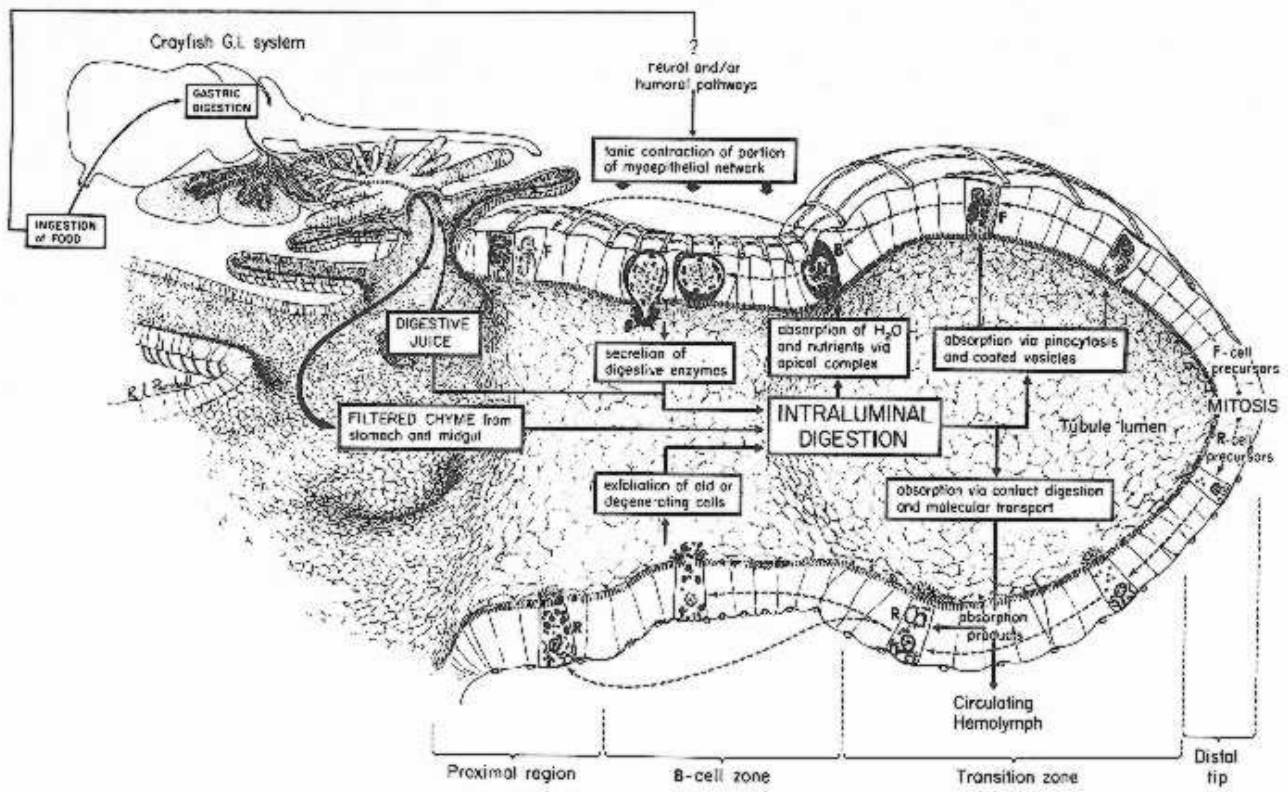


Figura 3. Estructura general y citología de la glándula digestiva de decápodos. (Loizzi, 1971, adaptado de Saborowski, 2002).

Se ha propuesto que las células fibrilares (F, Fig. 3), que se encuentran en los túbulos de la glándula digestiva de los crustáceos son el único sitio de secreción de las enzimas digestivas, las cuales se sintetizan en forma de gránulos de zimógenos y son almacenadas en las vacuolas supranucleares de manera muy similar a la formación de gránulos de zimógenos en las células pancreáticas exocrinas de los vertebrados (Al-Mohanna et al., 1985); las enzimas digestivas son liberadas periódicamente al lumen del intestino, dependiendo de la especie y condición nutricional del organismo (Al-Mohanna y Nott, 1989; Icely y Nott, 1982; Figs. 2 y 3, Tabla III).

Tabla III. Diagrama general del proceso de digestión de la proteína en crustáceos

Tiempo después de la ingesta	Lugar	Actividad
0 h	Cámara gástrica	Trituración en la región cardiaca ó anterior de la cámara gástrica y digestión primaria.
1 h	Células F de los túbulos de la glándula digestiva.	Entrada del alimento al lúmen de la glándula digestiva. Descarga inicial de enzimas por exocitosis (mecanismo holocrino).
3.5 – 6.0 h	Células F de los túbulos de la glándula digestiva.	Máximos de secreción enzimática subsecuentes (mecanismo merocrino).
	Región pilórica de la cámara gástrica	Digestión extracelular. Vaciado de jugo gástrico a la cámara gástrica y activación de zimógenos.
	Túbulos de la glándula digestiva	Introducción de los productos degradados a los túbulos de la glándula digestiva por contracciones del mioepitelio.
7.0 h	Túbulos de la glándula digestiva	Digestión intraluminal del producto de la digestión
	Células R de los túbulos de la glándula digestiva.	Ingestión de nutrientes a partir del lúmen a las células R, digestión de contacto.
	Células B de los túbulos de la glándula digestiva.	Digestión intracelular de nutrientes.
8.0 h		Aparición de heces

Tomado de Waterman, 1960; Gibson y Barker, 1979; Al-Mohanna y Nott, 1989; Dall et al., 1990.

Tripsina y quimotripsina

La tripsina y quimotripsina de crustáceos son enzimas pertenecientes a la clase de las serin-proteasas (EC 3.4.21.X.). Estas enzimas presentan una triada catalítica His-Asp-Ser y presentan un mecanismo de catálisis que permite la formación del complejo covalente enzima-sustrato (Neurath, 1989). Ambas enzimas son sintetizadas en la glándula digestiva de los crustáceos y han sido reportadas como las enzimas proteolíticas más abundantes en dicho órgano puesto que son responsables de aproximadamente el 60% de la digestión total de proteína (Gibson y Barker, 1979; Galgani et al., 1985; Dall et al., 1990; García-Carreño et al., 1994; Lemos et al., 1999).

La tripsina cuya clasificación en NC-IUBMB es EC 3.4.21.4., es una enzima que hidroliza enlaces peptídicos en el lado carboxilo de residuos de aminoácidos

básicos (Dixon y Webb, 1979). Es una enzima que trabaja a pH alcalinos (7 – 10) (Zwilling y Neurath, 1981; Dionysius et al., 1993; Zhu y Baker, 1999) y a temperaturas óptimas reportadas entre los 50 y 60°C (Maeda-Martínez et al., 2000). La masa molecular de las tripsinas reportadas en especies de invertebrados presentan un amplio grado de variación desde los 17 hasta los 34 kDa (Fletcher et al., 1987; Zhu y Baker, 1999; Maeda-Martínez et al., 2000; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2002).

En crustáceos, la secuencia de aminoácidos de la tripsina fue reportada por primera vez en la especie *Astacus fluviatilis* por Titani et al. (1983). En peneidos, la tripsina se detectó por vez primera en la glándula digestiva de *P. setiferus* y posteriormente fue aislada y caracterizada en otras especies (Lee et al., 1984; Galgani et al., 1985). Se sabe que en la glándula digestiva de *P. japonicus*, la tripsina contribuye con cerca del 6% del total de proteína soluble (Galgani et al., 1985). En la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei*, objeto del presente estudio, se han reportado tres isoformas principales de tripsina, las cuales están codificadas por un número igual de genes (Klein et al., 1996), mientras que en *P. japonicus* se han reportado seis isoformas (Galgani et al., 1985) y en *P. indicus* sólo se han encontrado dos variantes (Honjo et al., 1990).

En 1996, Klein et al. reportaron la secuencia de aminoácidos a partir de ADNc de un tripsinógeno putativo y de la enzima madura de *P. vannamei*. Estos mismos autores han reportado hasta 14 secuencias que pertenecen a 3 diferentes familias de genes que codifican para enzimas tripsina y tipo-tripsina (Klein et al., 1998). En esta especie, las familias de genes de tripsina I y II se expresan en células de la glándula digestiva, sin embargo, uno de los genes encontrados y que pertenece a la familia III, mostró estar pobremente expresado en la glándula digestiva de los adultos de *P. vannamei*, pero se expresa en el tejido muscular de organismos en otros estadios del ciclo de vida de esta misma especie (Klein et al., 1998).

Las características principales de los genes que codifican las isoformas de la enzima tripsina en la glándula digestiva de *P. vannamei*, según Klein et al. son: (1)

una secuencia completa de 810 pares de bases (pb) y una secuencia final no-codificante de 51 pb (secuencia deducida de 256 residuos), (2) cada gen consiste de tres exones y dos intrones, (3) la secuencia deducida de la proteína incluye el codón de inicio, un péptido señal hidrofóbico de 14 residuos (-28 al -15), un péptido precursor de 14 residuos (-14 a -1) y la enzima activa (1 - 227), (4) señal de poliadenilación presente, y (5) peso molecular promedio de la secuencia deducida de la proteína de 22.5 kDa.

Por su parte la quimotripsina, cuya clasificación es EC 3.4.21.1., es una enzima que hidroliza enlaces peptídicos en el lado carboxilo de aminoácidos aromáticos (Dixon y Webb, 1979). La presencia de esta enzima en invertebrados ha sido reportada en varias especies de insectos y crustáceos (Graf y Briegel, 1989; García-Carreño et al., 1994; van Wormhoudt et al., 1995). A diferencia de la tripsina, la quimotripsina parece ser menos abundante, sin embargo, no menos importante en la glándula digestiva de los invertebrados. Los estudios realizados sobre quimotripsina en especies de insectos como el mosquito *A. aegypti*, muestran que esta enzima se encuentra presente en concentraciones constantes pero menores a las reportadas para tripsina (Kalhok et al., 1993, Noriega et al., 1996; Omondi y Stark, 2001). Las quimotripsinas de algunas especies de insectos y crustáceos muestran las características típicas de las quimotripsinas de vertebrados, incluyendo la triada catalítica propia de las serin-proteasas, los residuos que dan la especificidad de la quimotripsina por el sustrato, y seis residuos de cisteína en posiciones conservadas comunes a las quimotripsinas de vertebrados (Jiang et al., 1997; Tsai et al., 1991; van Wormhoudt et al., 1992). Estas enzimas trabajan a pH óptimos alcalinos entre 8.0 y 11.0 (Ward, 1975; Terra y Ferreira, 1994; Peterson et al., 1995) y son sintetizadas como zimógenos en algunas especies como la mariposa *M. sexta* (Peterson et al., 1995). En la glándula digestiva de crustáceos se ha detectado actividad quimotripsina en especies como camarones, langostas y cangrejos (Tsai et al., 1991; van Wormhoudt et al., 1992; Fernández-Gimenez et al., 2001; Omondi y Stark, 2001). En 1995, van Wormhoudt et al. reportaron la síntesis de quimotripsina

en gránulos del citoplasma de las células F de la glándula digestiva de *P. vannamei*. Se han reportado dos isoformas principales de esta enzima en la glándula digestiva de *P. vannamei* y su actividad muestra variaciones constantes dependiendo del estadio de muda de los organismos (van Wormhoudt et al., 1995; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2002).

Objetivos

El **Objetivo General** de la presente investigación fue contribuir al conocimiento del proceso de adaptación enzimática y los inductores y mecanismos involucrados en la regulación de la síntesis de enzimas proteolíticas en la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei*.

Los **Objetivos Particulares** fueron:

1.- Entender la fisiología digestiva y comportamiento alimenticio del camarón blanco *P. vannamei*, determinar las bases moleculares de la síntesis de la tripsina en la glándula digestiva del camarón y confirmar la existencia del proceso de adaptación enzimática en dicho órgano.

2.- Evaluar el efecto de tres inductores que promueven cambios en la actividad de la tripsina y quimotripsina:

Parte I. Efecto del ayuno y la muda

Parte II. Efecto del ayuno a corto plazo

Parte III. Efecto de la concentración de proteína en el alimento.

3.- Evaluar los cambios en la expresión génica de tripsina (a nivel de ARNm) en la glándula digestiva de *P. vannamei*.

Hipótesis

1.- La glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei* responde a la ausencia de alimento ó cambios en la concentración de proteína del mismo, con un proceso de adaptación que ajusta la síntesis de las enzimas proteolíticas.

2.- La expresión de las isoformas de tripsina en la glándula digestiva del camarón blanco esta regulada de forma diferencial a nivel de transcripción.

Estrategia Metodológica

La descripción detallada de los métodos utilizados en este trabajo se encuentra en los manuscritos referidos en los anexos. Sin embargo, en las figuras 4, 5, y 6 se presenta una síntesis esquemática de los procedimientos seguidos en cada uno de los experimentos.

Evaluación de la Actividad Enzimática de la Glándula Digestiva

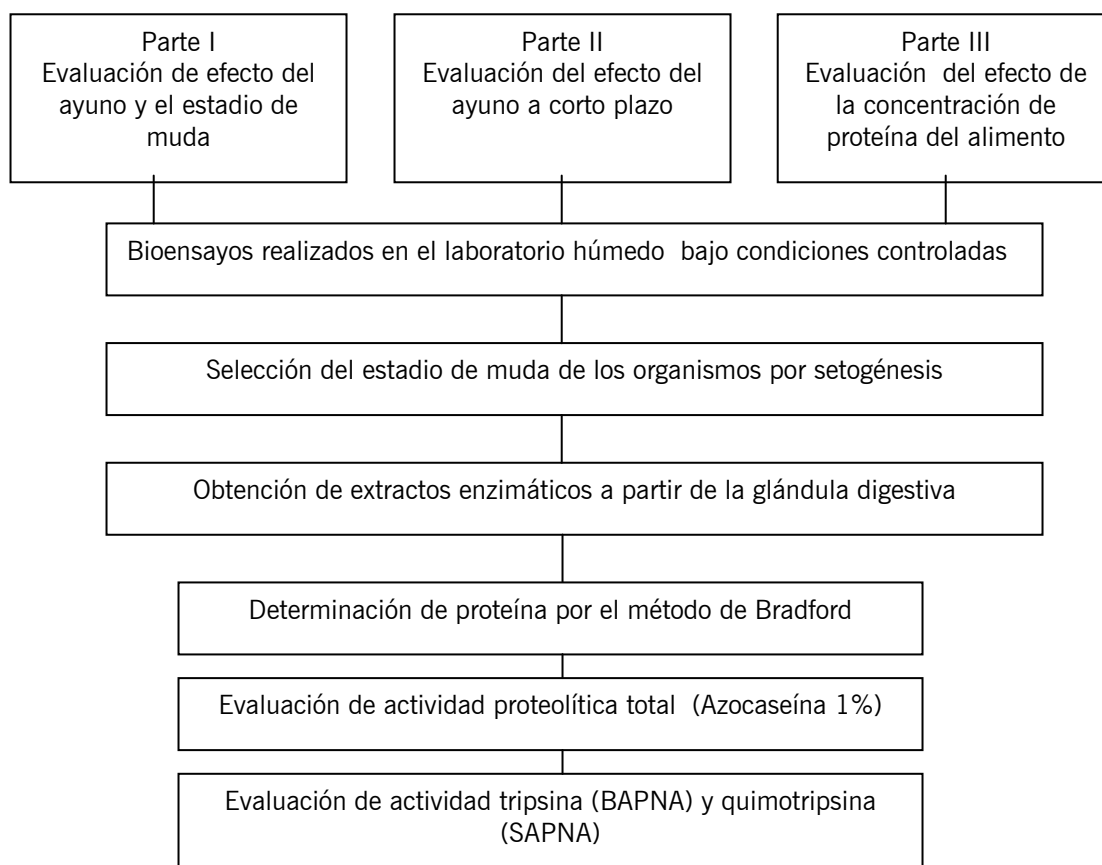


Figura 4. Metodología para la evaluación de la actividad enzimática de extractos de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei*.

Análisis Electroforético en Geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

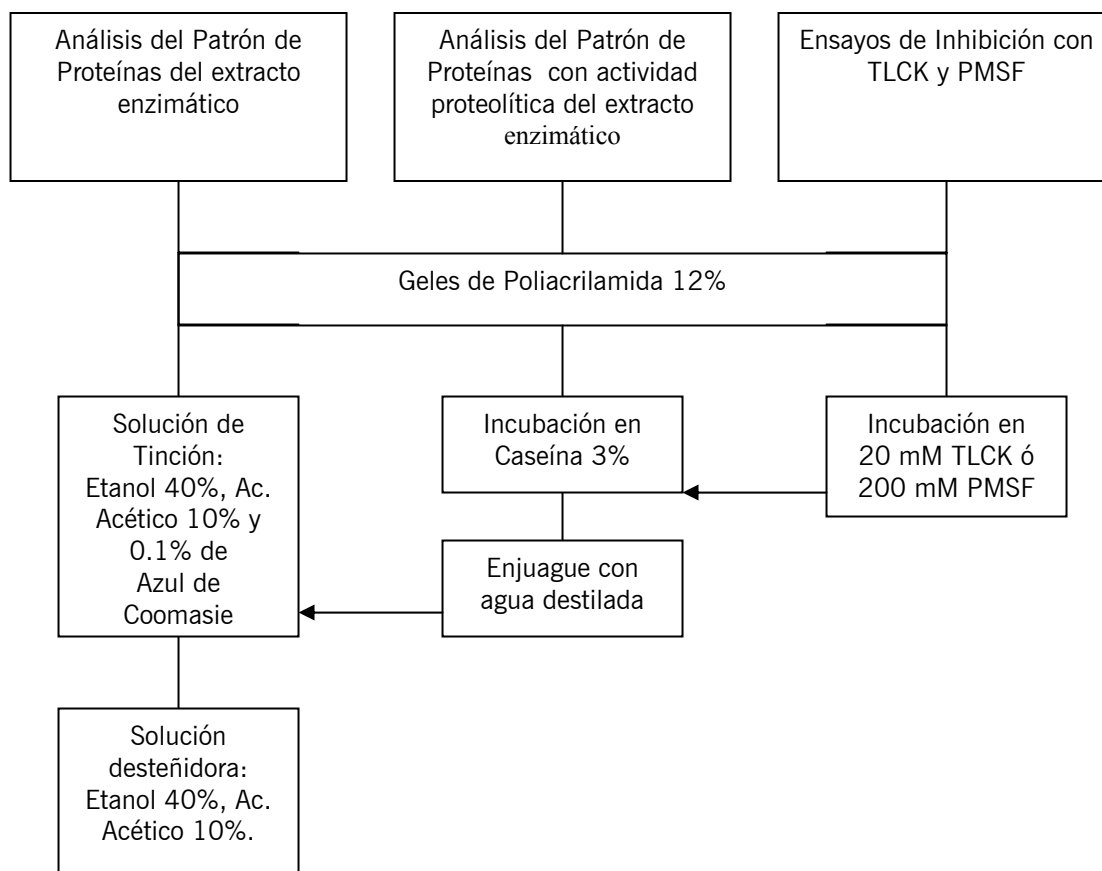


Figura 5. Metodología para el análisis electroforético de la actividad enzimática de extractos de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei*.

Evaluación de la Concentración de ARNm de Tripsina por RT-PCR

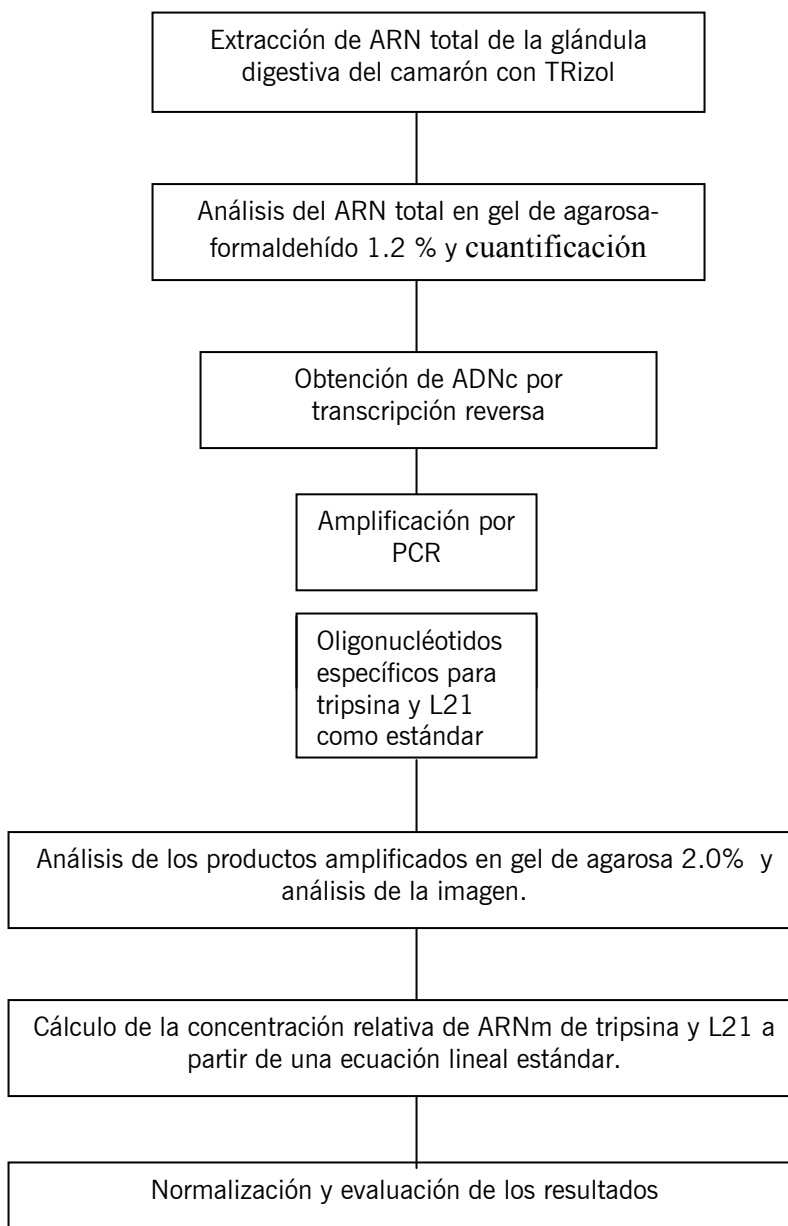


Figura 6. Metodología para la evaluación de la concentración de ARNm de tripsina en la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei*.

Resultados

Parte I. Efecto del ayuno y el estadio de muda en la actividad proteolítica de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei* (metodología en el anexo I)

El ayuno demostró ser un importante inductor de respuestas fisiológicas en el camarón blanco. El efecto de un periodo de ayuno (2, 24, 72 y 120 h) fue evaluado en organismos experimentales en diferente estadio de muda, observándose respuestas variadas de acuerdo al tiempo de ayuno y al estadio de muda.

No se observaron diferencias en el peso corporal de los organismos entre diferentes estadios de muda, sin embargo, el tiempo de ayuno ejerció un efecto significativo en el peso corporal en los estadios de postmuda (A/B) e intermuda (C) (Tabla IV). El peso de la glándula digestiva (GD) tampoco fue afectado por el estadio de muda, pero conforme el tiempo de ayuno incrementó, el peso de este órgano decreció en postmuda (A/B), intermuda (C), y premuda temprana (ED) después de 120 h ($P < 0.05$; Tabla IV).

El índice hepatosomático (Jussila, 1999), que relaciona el peso corporal y el peso de la GD, mostró resultados que reflejaron lo ya observado en los pesos corporal y de la glándula digestiva. No se observó efecto por estadio de muda, pero hubo un decremento significativo en los estadios postmuda (A/B), intermuda (C) y premuda temprana (ED) por efecto del tiempo de ayuno ($P < 0.05$; Fig. 7).

Tabla IV. Efecto del ayuno y el estadio de muda en el peso corporal y en el peso de la glándula digestiva de *P. vannamei*

Tiempo de Ayuno (h)	Peso Corporal (g)			Peso de la GD (g)		
	Estadio de Muda			Estadio de Muda		
	A/B	C	ED	A/B	C	ED
2	8.2 ± 0.8 1a	8.2 ± 0.8 1a	7.8 ± 0.8 1a	0.32 ± 0.07 1a	0.32 ± 0.04 1a	0.32 ± 0.04 1a
24	7.3 ± 0.8 1ab	7.1 ± 0.8 1ab	7.1 ± 0.8 1a	0.24 ± 0.03 1b	0.26 ± 0.04 1ab	0.27 ± 0.03 1a
72	7.2 ± 0.9 1ab	6.8 ± 0.8 1b	6.9 ± 0.7 1a	0.22 ± 0.05 1bc	0.22 ± 0.04 1b	0.21 ± 0.05 1b
120	6.5 ± 0.8 1b	7.1 ± 0.8 1ab	7.0 ± 0.8 1a	0.18 ± 0.03 1c	0.20 ± 0.06 1b	0.18 ± 0.04 1b

GD = glándula digestiva; A/B= postmuda; C= intermuda; ED= premuda temprana. Los valores representan la media ± ds de las replicas. Letras itálicas muestran diferencias estadísticas por efecto del ayuno entre grupos del mismo estadio de muda ($P < 0.05$). Números itálicos muestran diferencias estadísticas por efecto de la muda entre grupos con el mismo tiempo de ayuno ($P < 0.05$).

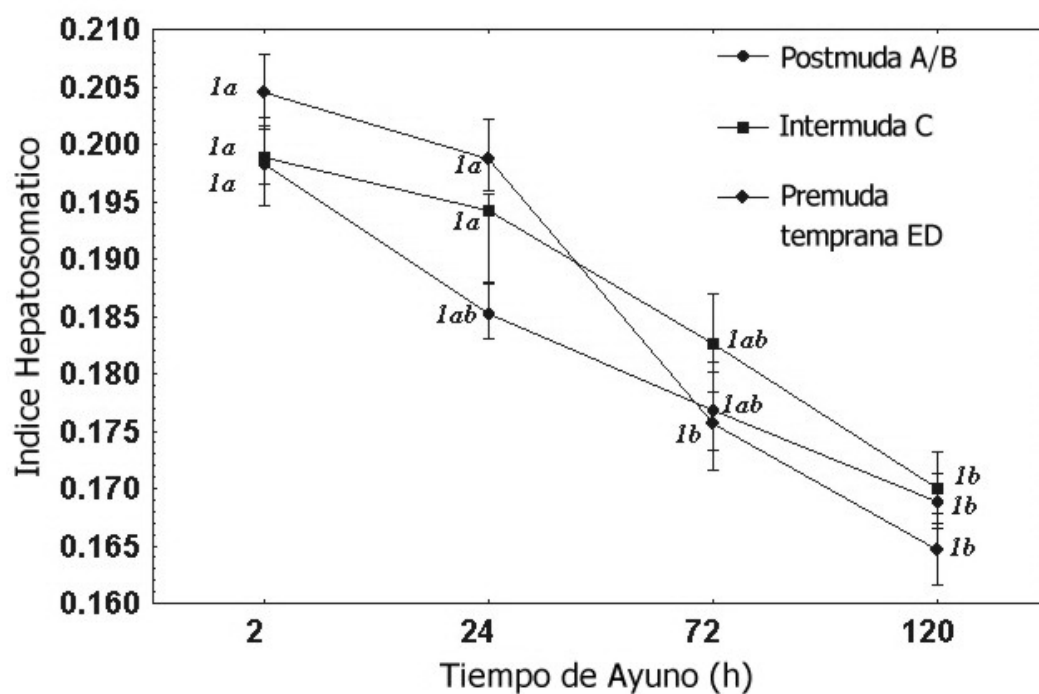


Figura 7. Efecto del ayuno y el estadio de muda en el índice hepatosomático de *P. vannamei*. Letras itálicas muestran diferencias estadísticas por efecto del ayuno entre grupos del mismo estadio de muda ($P < 0.05$). Números itálicos muestran diferencias significativas por efecto de la muda entre grupos del mismo tiempo de ayuno ($P < 0.05$).

Como se muestra en la tabla V, los datos del contenido de proteína de la glándula digestiva mostraron un amplio rango de dispersión, especialmente en los organismos en intermuda (C). El análisis estadístico correspondiente no mostró diferencias en el contenido de proteína por efecto del estadio de muda, pero sí diferencias significativas por efecto del tiempo de ayuno en intermuda (C) y premuda temprana (ED). Los resultados de la actividad proteolítica total correspondieron con los del contenido de proteína de dicha glándula, no habiendo efecto por el estadio de muda, pero sí un efecto causado por el tiempo de ayuno en premuda temprana (ED). No se observó interacción significativa de la muda y el tiempo de ayuno ni en el contenido de proteína, ni en la actividad proteolítica total ($P > 0.05$; Tabla V).

Tabla V. Efecto del ayuno y el estadio de muda en el contenido de proteína y en la actividad proteolítica total de la glándula digestiva de *P. vannamei*

Tiempo de Ayuno (h)	Contenido de proteína (mg/GD)			Actividad Proteolítica Total (Unidades/GD)		
	Estadio de Muda			Estadio de Muda		
	A/B	C	ED	A/B	C	ED
2	8.93 ± 2.5 <i>1a</i>	11.45 ± 5.7 <i>1a</i>	10.39 ± 1.2 <i>1a</i>	11.48 ± 5.2 <i>1a</i>	10.70 ± 3.1 <i>1a</i>	13.03 ± 5.0 <i>1a</i>
24	7.19 ± 1.5 <i>1a</i>	9.45 ± 3.2 <i>1ab</i>	9.54 ± 2.5 <i>1ab</i>	8.47 ± 2.7 <i>1a</i>	11.97 ± 3.0 <i>1a</i>	9.38 ± 5.3 <i>1ab</i>
72	7.47 ± 1.4 <i>1a</i>	7.18 ± 1.8 <i>1b</i>	7.76 ± 2.4 <i>1ab</i>	8.28 ± 3.6 <i>1a</i>	9.00 ± 2.5 <i>1a</i>	8.75 ± 3.9 <i>1ab</i>
120	7.68 ± 3.5 <i>1a</i>	7.46 ± 3.9 <i>1b</i>	6.77 ± 1.6 <i>1b</i>	7.62 ± 2.1 <i>1a</i>	10.65 ± 5.3 <i>1a</i>	7.28 ± 1.2 <i>1b</i>

GD= glándula digestiva; A/B= postmuda; C= intermuda; ED= premuda temprana. Los valores representan la media ± ds de las replicas. Letras itálicas muestran diferencias estadísticas por efecto del ayuno entre grupos del mismo estadio de muda ($P < 0.05$). Números itálicos muestran diferencias estadísticas por efecto de la muda entre grupos con el mismo tiempo de ayuno ($P < 0.05$).

La actividad tripsina de la glándula digestiva mostró cambios significativos por la interacción de ambos efectos evaluados, estadio de muda y tiempo de ayuno (Fig. 8). En los estadios de intermuda (C), y premuda temprana (ED), se observó una mayor actividad de tripsina que en postmuda (A/B), durante las primeras 24 h de ayuno. Después de 2 h de ayuno la diferencia de actividad tripsina entre los organismos en premuda temprana (ED), y postmuda (A/B), fué del 34%, después de 24 h, esta diferencia incrementó a un 54%. Por su parte, el tiempo de ayuno provocó un decremento significativo en la actividad tripsina de los organismos en intermuda (C) y premuda temprana (ED) conforme este se incrementó (Fig. 8).

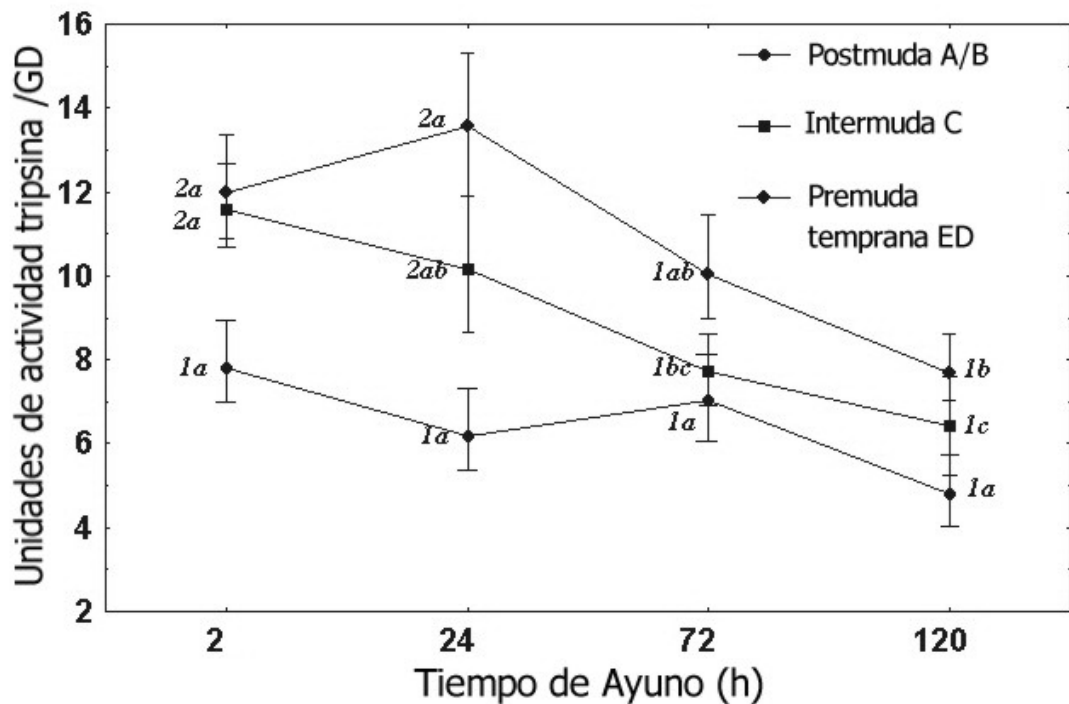


Figura 8. Efecto del ayuno y el estadio de muda en la actividad tripsina de la glándula digestiva de *P. vannamei*. Letras itálicas muestran diferencias estadísticas por efecto del ayuno entre grupos del mismo estadio de muda ($P < 0.05$). Números itálicos muestran diferencias significativas por efecto de la muda entre grupos del mismo tiempo de ayuno ($P < 0.05$).

La actividad quimotripsina de la glándula digestiva no fue afectada por el estadio de muda (Fig. 9), sin embargo, el progreso del ayuno afectó severamente esta actividad. Los valores promedio de actividad a las 120 h de ayuno fueron 44% menores que la actividad promedio de los organismos a las 2 h de ayuno ($P < 0.05$; Fig. 9).

Todas las muestras fueron analizadas individualmente mediante electroforesis de acuerdo al método descrito por García-Carreño et al. (1993). Se observaron algunas diferencias entre organismos, pero se mostró un patrón común en el número de bandas correspondientes a tripsina y quimotripsina entre organismos del mismo grupo experimental. De acuerdo al estadio de muda y al tiempo de ayuno, se observaron cambios en el número de bandas tanto de proteína como de actividad (Fig. 10).

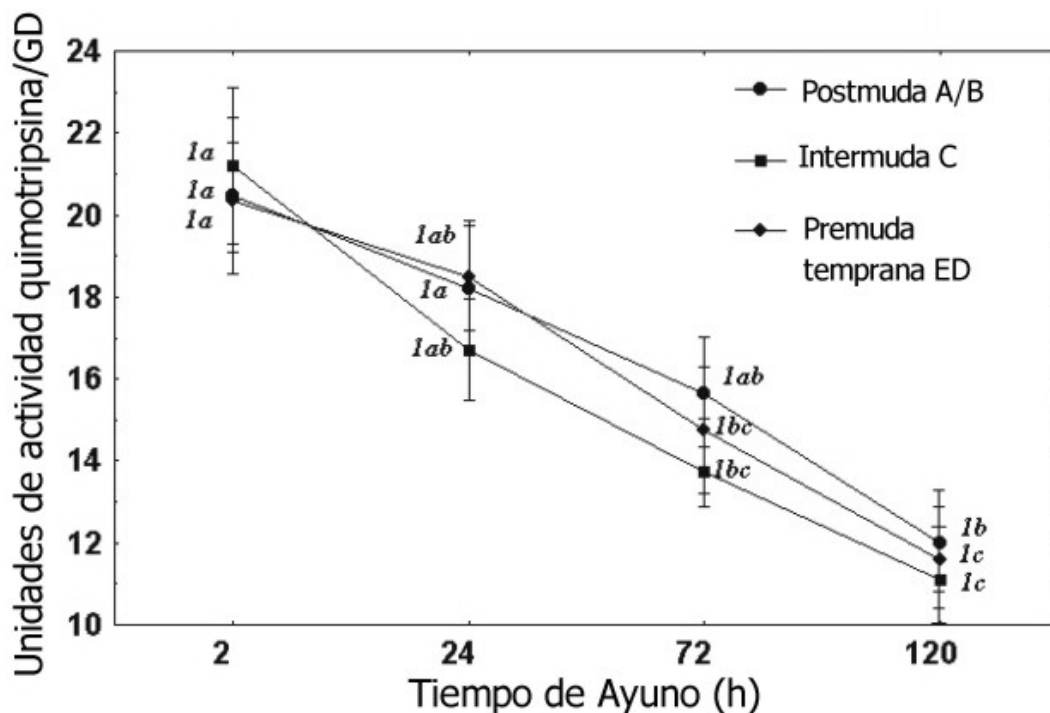


Figura 9. Efecto del ayuno y el estadio de muda en la actividad quimotripsina de la glándula digestiva de *P. vannamei*. Letras itálicas muestran diferencias estadísticas por efecto del ayuno entre grupos del mismo estadio de muda ($P < 0.05$). Números itálicos muestran diferencias significativas por efecto de la muda entre grupos del mismo tiempo de ayuno ($P < 0.05$).

Las bandas de actividad inhibidas con TLCK y PMSF fueron consideradas tripsina, mientras que aquellas bandas inhibidas sólo por PMSF fueron evidencia de actividad quimotripsina de acuerdo a Lemos et al. (1999). En el ensayo de inhibición (Fig. 11), se observó que todas las bandas que fueron inhibidas por PMSF (que no están identificadas como tripsinas o quimotripsinas) corresponden a otras enzimas proteasas que también se encuentran presentes en glándula digestiva del camarón.

Hasta cuatro bandas correspondientes a tripsina fueron encontradas en los extractos enzimáticos con pesos moleculares de 17.7, 19.4, 20.7 y 22.0 kDa (estadio ED a las 120 h de ayuno). En el estadio A/B se observó el mismo número de bandas correspondientes a tripsina a lo largo del tiempo de ayuno evaluado, pero en los estadios C, ED y LD, se observaron cambios en el

número de bandas dentro de cada estadio de muda, aparentemente debido al tiempo de ayuno. Sin embargo, no se observó una correlación entre el número de bandas, el estadio de muda y el tiempo de ayuno como se observa en la fig. 10. En el caso de la quimotripsina se observaron dos bandas tanto de proteína como de actividad, con pesos moleculares entre 24 y 30 kDa, y no se observaron cambios en el número de bandas en ninguno de los grupos experimentales (Fig. 10).

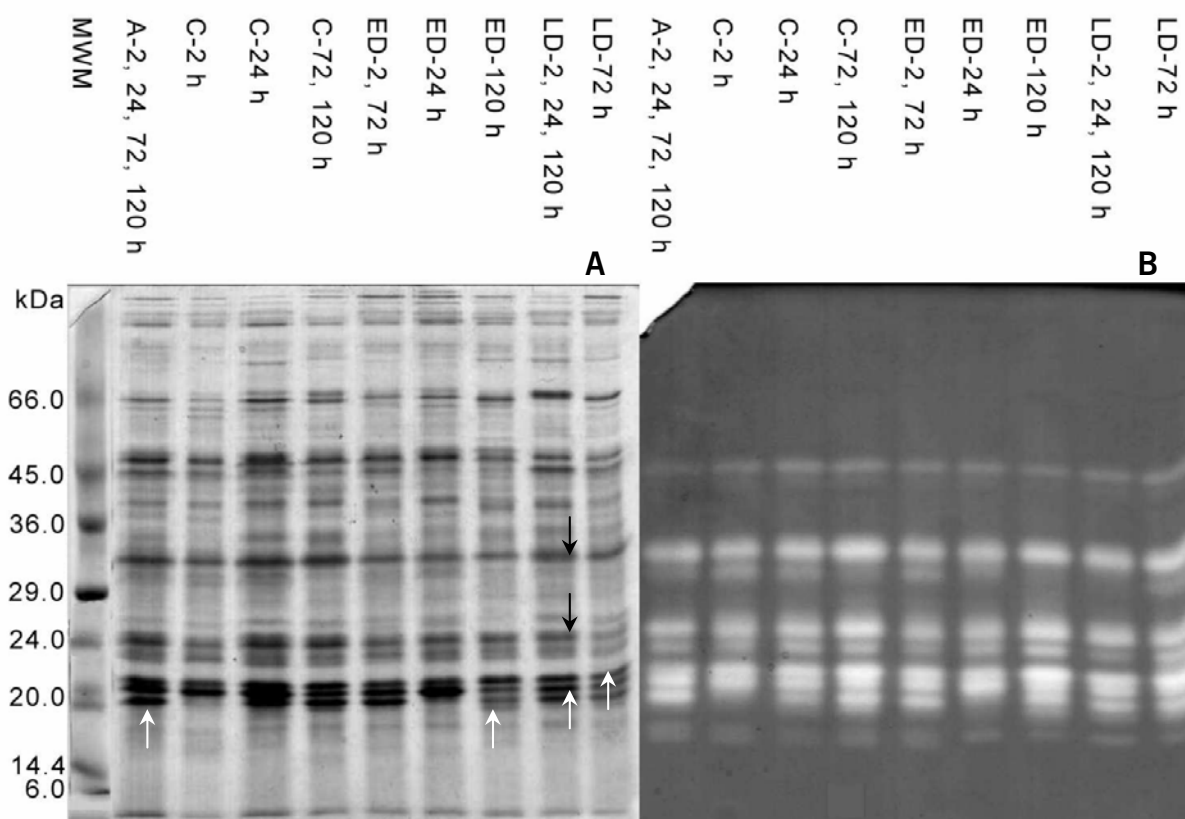


Figura 10. SDS-PAGE de extractos de la glándula digestiva de *P. vannamei* en diferentes estadios de muda y tiempos de ayuno. Las letras indican el estadio de muda (A/B= postmuda; C= intermuda; ED= premuda temprana) y los números indican el tiempo de ayuno. (A) patrón de bandas de proteínas de los extractos evaluados; (B) patrón de bandas con actividad de los extractos. Flechas blancas indican bandas de tripsina y flechas negras indican bandas de quimotripsina.

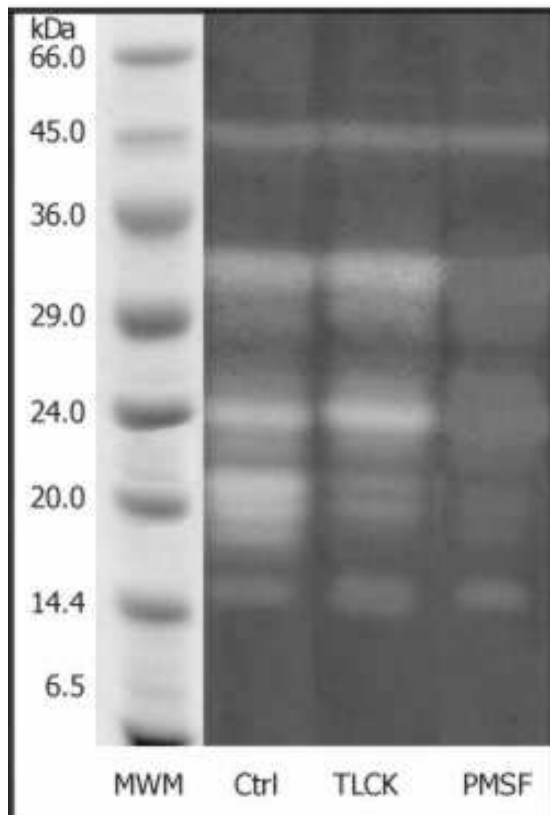


Figura 11. SDS- PAGE del extracto enzimático de la glándula digestiva de *P. vannamei*, ensayo de inhibición. Carril 1: muestra control (extracto enzimático); Carril 2: extracto incubado con TLCK; Carril 3: extracto incubado con PMSF.

Parte II. Efecto del ayuno a corto plazo en la actividad proteolítica de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei* (metodología en el anexo I)

Dada la importancia del ayuno en el ciclo de vida de los camarones en el ambiente natural, se realizó una nueva evaluación obteniendo mediciones puntuales en periodos de tiempo reducidos después de la ingesta, y se evitó el efecto de la muda, puesto que todos los organismos experimentales fueron previamente seleccionados en el estadio de intermuda (C).

No se observó efecto del ayuno (48 h), en el peso corporal de los organismos, ni en el peso de la glándula digestiva. El peso de la glándula digestiva mostró dos valores máximos a las 2 y 6 h después de la ingesta, y conforme el tiempo de ayuno incremento, y hasta las 48 h, no se observaron cambios. El índice hepatosomático tampoco mostró variaciones significativas en el periodo de ayuno evaluado (datos no mostrados).

El contenido de proteína de la glándula digestiva tampoco mostró diferencias significativas entre las 0.5 y 48 h después de la ingesta, excepto por un valor máximo observado a las 6 h que mostró diferencias significativas respecto a los valores mínimos observados después de 12, 18 y 36 h de ayuno ($P < 0.05$; Fig. 12).

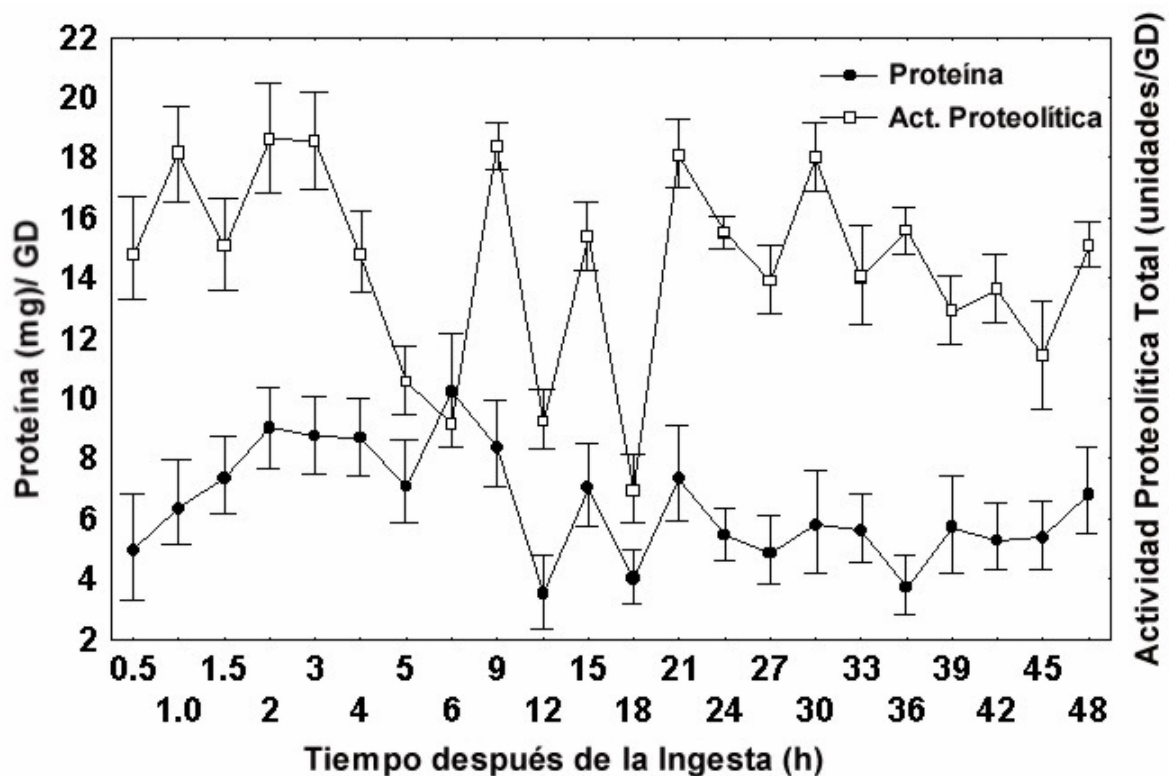


Figura 12. Contenido de proteína y actividad proteolítica total de la glándula digestiva de *P. vannamei* después de la ingesta.

A su vez, la actividad proteolítica total de la glándula tampoco mostró diferencias entre las 0.5 y 48 h después de la ingesta, pero se observó un patrón similar al observado en el contenido de proteína de la glándula digestiva con un valor mínimo a las 18 h ($P < 0.05$; Fig. 12).

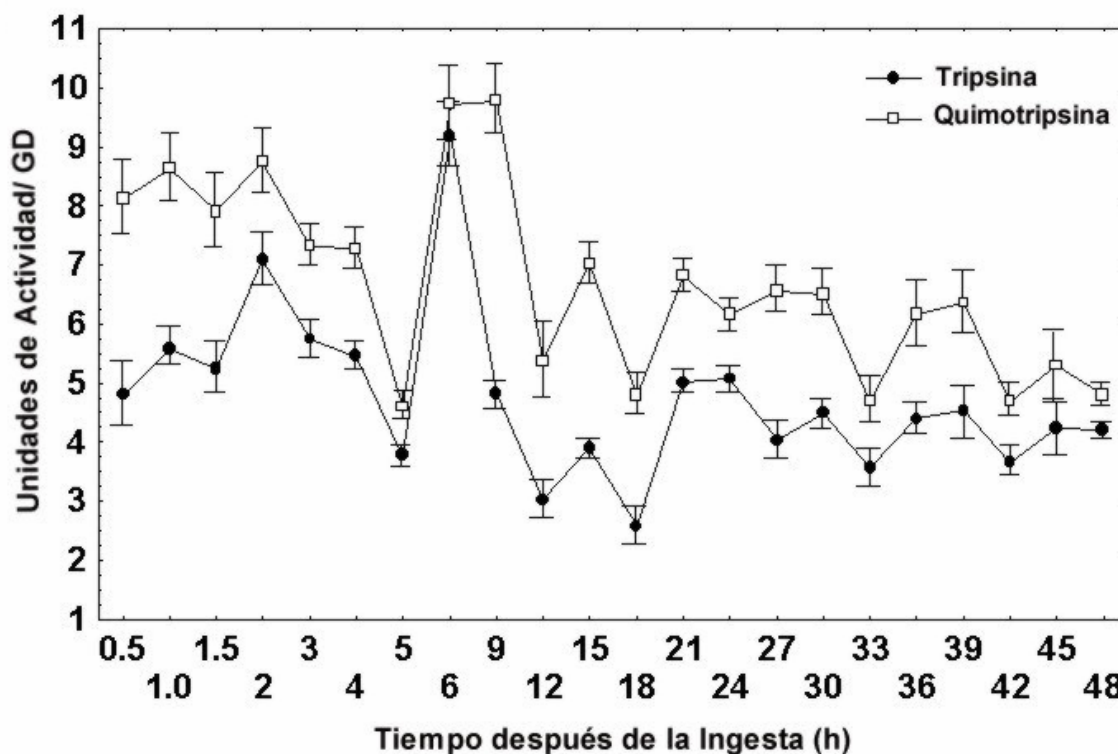


Figura 13. Actividad de tripsina y quimotripsina en la glándula digestiva de *P. vannamei* después de la ingesta.

La actividad tripsina mostró algunas variaciones significativas a lo largo de las 48 h de ayuno. Después de la ingesta se observaron dos valores máximos a las 2 y 6 h, los cuales mostraron ser estadísticamente diferentes a dos valores mínimos observados a las 12 y 18 h después de la ingesta (Fig. 13). La actividad quimotripsina mostró un patrón de variación similar al de la tripsina con algunas diferencias significativas a lo largo del periodo de 48 h ($P < 0.05$). Un valor mínimo fue observado a las 5 h, el cual mostró ser estadísticamente diferente a dos valores

máximos observados a las 6 y 9 h después de la ingesta, posteriormente se observó un decremento (Fig. 13).

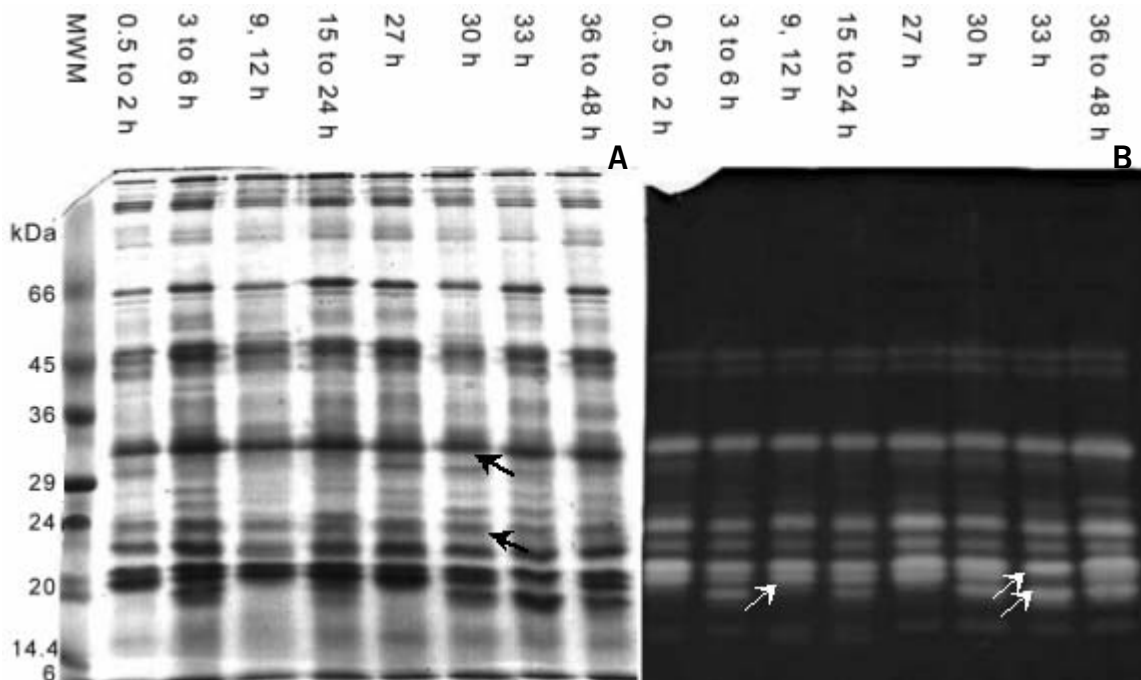


Figura 14. SDS-PAGE de extractos enzimáticos de la glándula digestiva de *P. vannamei* después de la ingesta. Los números indican el tiempo después de la ingesta. (A) patrón de bandas de proteínas de los extractos evaluados; (B) patrón de bandas con actividad de los extractos. Flechas blancas indican bandas de tripsina. Flechas negras indican bandas de quimotripsina.

El análisis electroforético de las muestras fue individual. Los extractos enzimáticos se procesaron individualmente con el fin de encontrar las diferencias en el número de bandas de tripsina y quimotripsina. Se observaron cambios en el número de bandas tanto de proteína como de actividad tripsina en los diferentes tiempos evaluados después de la ingesta. Dos y tres bandas de tripsina se observaron con pesos moleculares de 19.4, 20.7 y 22.0 kDa. No se observaron cambios en el número de bandas correspondientes a quimotripsina, las dos bandas observadas mostraron pesos moleculares entre los 24 y 30 kDa (Fig. 14). No se observó una correlación entre el número de bandas observadas y el tiempo de ayuno evaluado.

Parte III. Efecto de la concentración de proteína del alimento en la concentración relativa de ARNm de tripsina y en la actividad proteolítica de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei* (metodología en el anexo II)

Alimento y organismos experimentales

Se evaluaron tres alimentos isocalóricos formulados con concentraciones de proteína de 15, 30 y 50% (Tabla VI).

Tabla VI. Composición de los alimentos experimentales para *P. vannamei*

Proteína en el alimento (%)	Húmedad (%)	Proteína * (%)	Lípidos (%)	Ceniza (%)	Fibra Cruda (%)	ELN**	Energía (Cal/gr)
15	14.3 ± 0.2	15.2 ± 0.25	3.06 ± 0.08	5.82 ± 0.09	2.77 ± 0.07	73.11	4562 ± 13.0
30	12.7 ± 0.05	31.8 ± 0.02	4.49 ± 0.07	6.41 ± 0.15	5.79 ± 0.09	51.49	4461 ± 8.79
50	17.2 ± 0.08	49.8 ± 0.26	5.65 ± 0.21	10.6 ± 0.21	6.26 ± 0.24	27.59	4602 ± 24.3

* La fuente de proteína principal fue harina de pescado (70.3% de proteína). **Extractos libres de nitrógeno

Al finalizar el periodo experimental de tres semanas, el peso corporal de los organismos varió entre 8.32 y 9.36 g. Los organismos alimentados con 50% de proteína mostraron los pesos mas altos y aquellos alimentados con 15% de proteína mostraron los pesos más bajos con una diferencia de 11% entre ambos tratamientos ($P < 0.05$). El peso de la glándula digestiva no mostró diferencias entre los tres grupos experimentales ($P > 0.05$; Tabla VII).

Tabla VII. Peso corporal, peso de la glándula, contenido de proteína y actividad proteolítica total de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei*

Proteína en el alimento (%)	Peso Corporal (g)	Peso de la GD (g)	Contenido de Proteína (mg/ml)	Actividad Proteolítica (U/mg proteína)
15	8.32 ± 1.2 a	0.305 ± 0.07 a	4.99 ± 1.4 a	0.80 ± 0.16 a
30	8.51 ± 1.1 ab	0.297 ± 0.07 a	7.14 ± 1.3 b	0.83 ± 0.15 a
50	9.36 ± 1.1 b	0.340 ± 0.04 a	11.01 ± 1.5 c	0.61 ± 0.10 a

GD= glándula digestiva. Letras itálicas muestran diferencias estadísticas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Actividad Enzimática

El contenido de proteína de la glándula digestiva mostró un incremento significativo, conforme el contenido de proteína en el alimento incremento (Tabla VII). Los organismos alimentados con 50% de proteína mostraron un contenido de proteína 54% mayor que aquellos alimentados con 15%. La actividad proteolítica de dicha glándula no mostró diferencias entre los tres grupos experimentales, pero se observó un valor promedio mayor (unidades de actividad/mg de proteína) en los organismos alimentados con 30% de proteína (Tabla VII).

La actividad de tripsina de la glándula digestiva de los camarones mostró cambios significativos entre los organismos alimentados con 30 y 50% de proteína con una diferencia del 30% entre ambos grupos (Fig. 15A). Por otro lado la actividad quimotripsina fue alterada por la concentración de proteína en el alimento, siendo 35% mayor en los organismos alimentados con 30% que en aquellos alimentados con 50% de proteína ($P < 0.05$; Fig. 15B).

El análisis electroforético de los extractos enzimáticos mostró diferencias en el número de tripsinas parálogas de acuerdo a la concentración de proteína del alimento. Al igual que en los experimentos previos, las bandas de actividad inhibidas con TLCK (inhibidor específico de tripsina) y PMSF fueron consideradas tripsinas, mientras que aquellas inhibidas únicamente con PMSF fueron consideradas quimotripsinas de acuerdo a Lemos et al. (1999) (Fig. 11).

El número de bandas tanto de proteína como de actividad, de cada organismo experimental, fueron analizadas observándose patrones comunes en el número de isoformas de tripsina y quimotripsina en organismos del mismo grupo experimental. Los organismos alimentados con 30% de proteína mostraron tres isoformas de tripsina de 19.4, 20.7 y 22.0 kDa, mientras que los organismos alimentados con 15 y 50% de proteína sólo mostraron dos isoformas de 20.7 y 22.0 kDa (Fig. 16). Se observaron dos bandas con actividad de quimotripsina constantemente en los tres grupos experimentales, con pesos moleculares entre 24 y 30 kDa (Fig. 16).

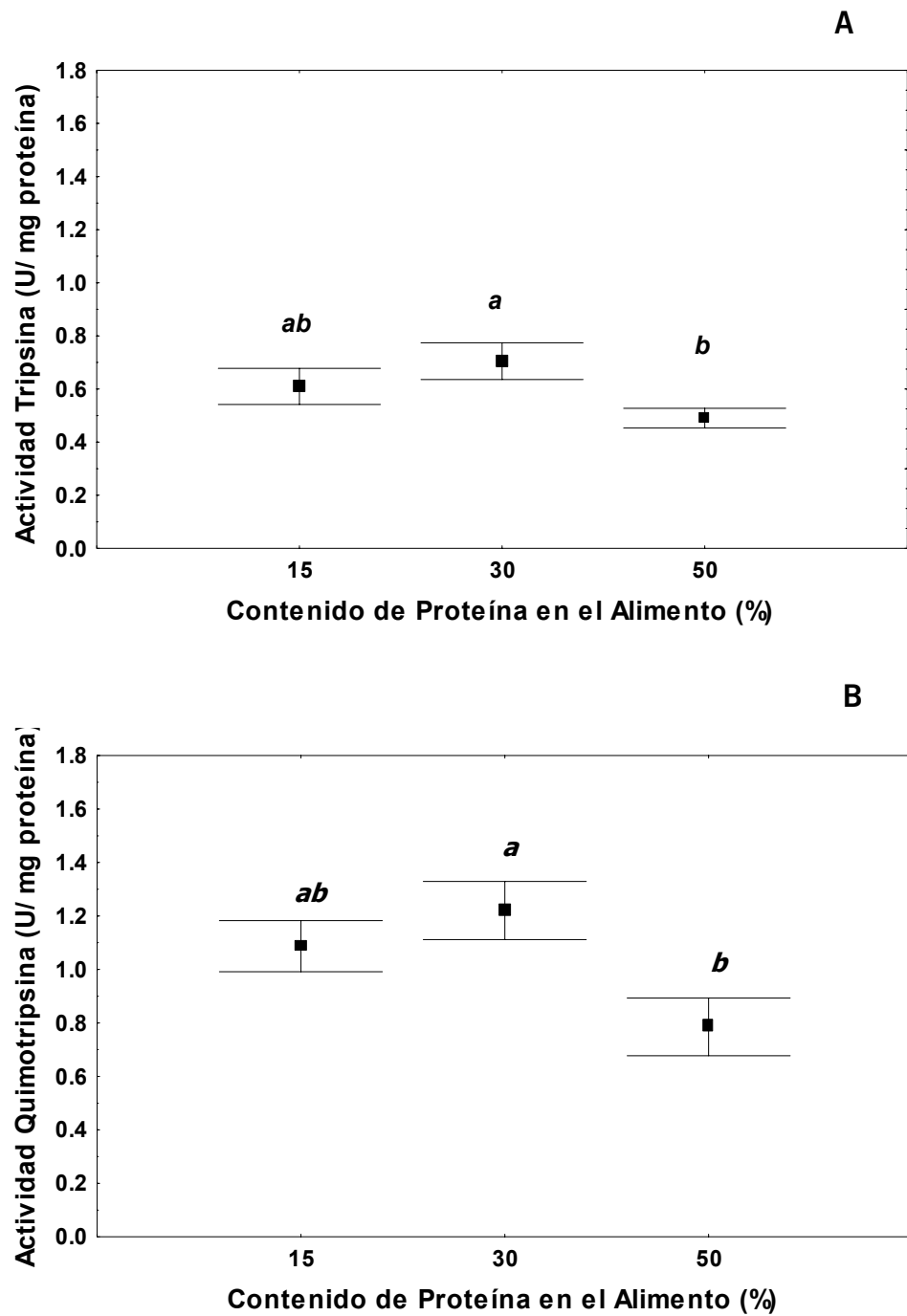


Figura 15. (A) Actividad de tripsina y (B) quimotripsina (U/mg proteína) de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei* alimentado con diferentes concentraciones de proteína. Letras itálicas muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

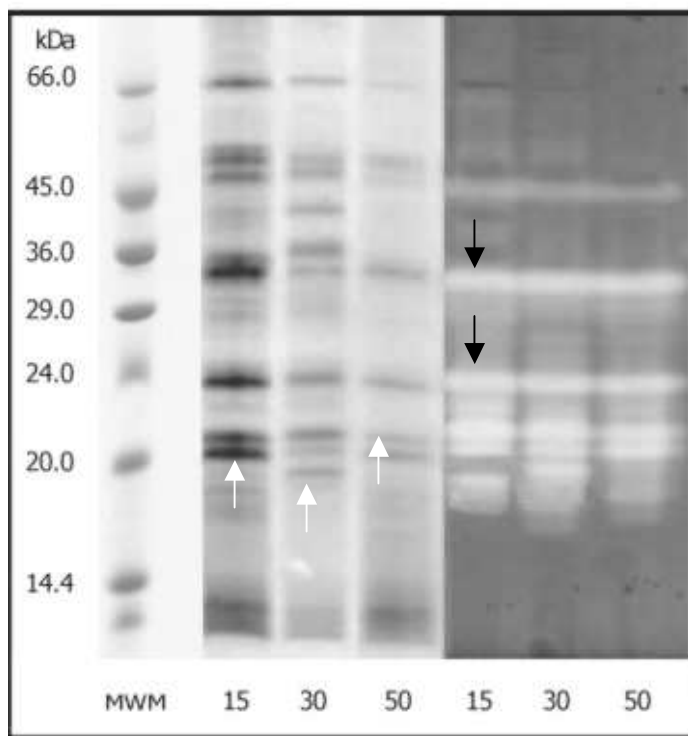


Figura 16. SDS-PAGE de extractos enzimáticos de la glándula digestiva de *P. vannamei* alimentados con diferentes concentraciones de proteína. MWM= marcador de peso molecular. Carriles 1-3: bandas de proteína de los organismos alimentados con 15, 30 y 50% de proteína; Carriles 4-6: bandas de actividad de los organismos alimentados con 15, 30 y 50% de proteína. Flechas blancas muestran bandas de tripsina; flechas negras muestran bandas de quimotripsina.

Concentración relativa del ARNm de tripsina y L21

La amplificación de fragmentos internos de los genes de tripsina y L21 (proteína ribosomal, Gene Bank AN BE188654) por el método de RT-PCR, produjo fragmentos de 410 y 517 pares de bases (pb), respectivamente (Fig. 17). La digestión por enzimas de restricción y la secuenciación de dichos fragmentos confirmó su identidad (datos no mostrados).

Para estimar el efecto de diferentes concentraciones proteicas del alimento en los niveles relativos de ARNm de tripsina en la glándula digestiva, se evaluó la concentración de los fragmentos producidos por el método de transcripción reversa

(RT-PCR) tanto para tripsina como para la proteína ribosomal L21 (utilizada como gen constitutivo) (ver metodología en anexos, artículo 2).

Se calcularon las relaciones tripsina/L21, de los valores de los productos obtenidos por RT-PCR, con el fin de normalizar el efecto observado en la transcripción, y se obtuvo: 0.57, 0.95, y 0.91 para los tratamientos de 15, 30, y 50% de proteína en el alimento (Fig. 18B, escala relativa). Estos valores indican una mayor concentración relativa de ARNm de tripsina en los organismos alimentados con 30 y 50% de proteína, los cuales fueron 40 y 37% mayores respecto a los valores observados en los organismos alimentados con 15% de proteína (Fig. 18B).

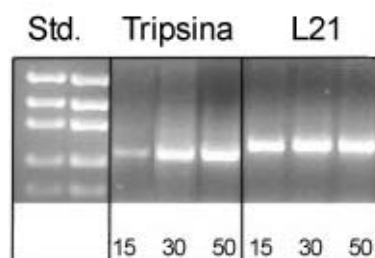


Figura 17. Productos de RT-PCR de tripsina y L21 de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei*.

Se calculó el índice actividad tripsina/(concentración relativa de ARNm tripsina/L21) con el fin de obtener mayor información de la relación entre los cambios observados en ambas variables. El índice calculado para las tres concentraciones de proteína en el alimento fue de 0.78, 0.89, y 0.51 para los tratamientos de 15, 30, y 50% de proteína, respectivamente (Fig. 19). Los valores mas altos se observaron en el grupo alimentado con 30% de proteína, mientras que este índice bajó para los organismos alimentados con 50% de proteína de forma similar a lo observado en los resultados de actividad.

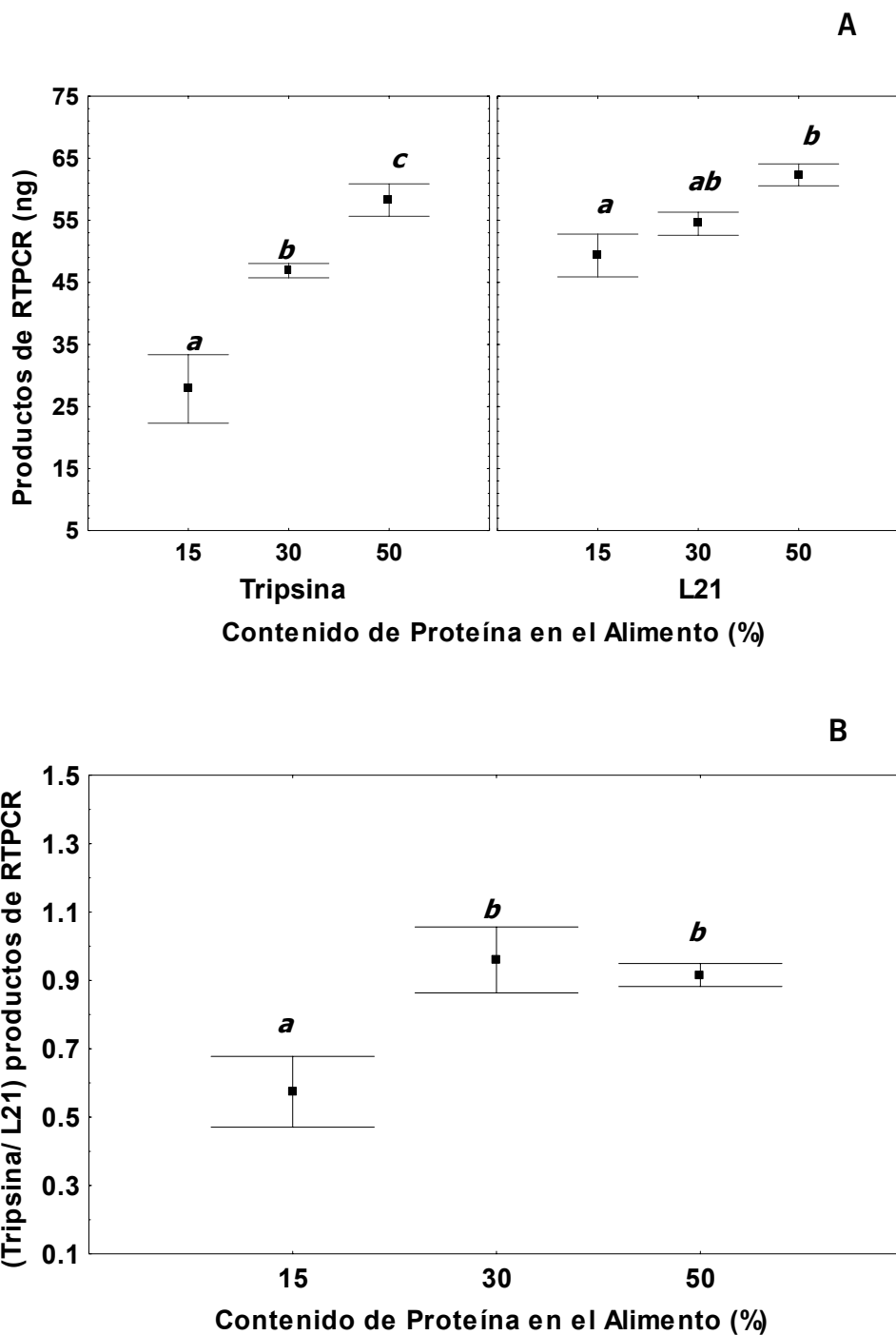


Figura 18. Concentraciones del ARNm de (A) Tripsina y L21, (B) Tripsina/L21 en la glándula digestiva de *P. vannamei* usando la técnica de RT-PCR. La cantidad de ADN en los productos de PCR (ng) fue calculada usando curvas estándar como se explica en el texto. Letras itálicas muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

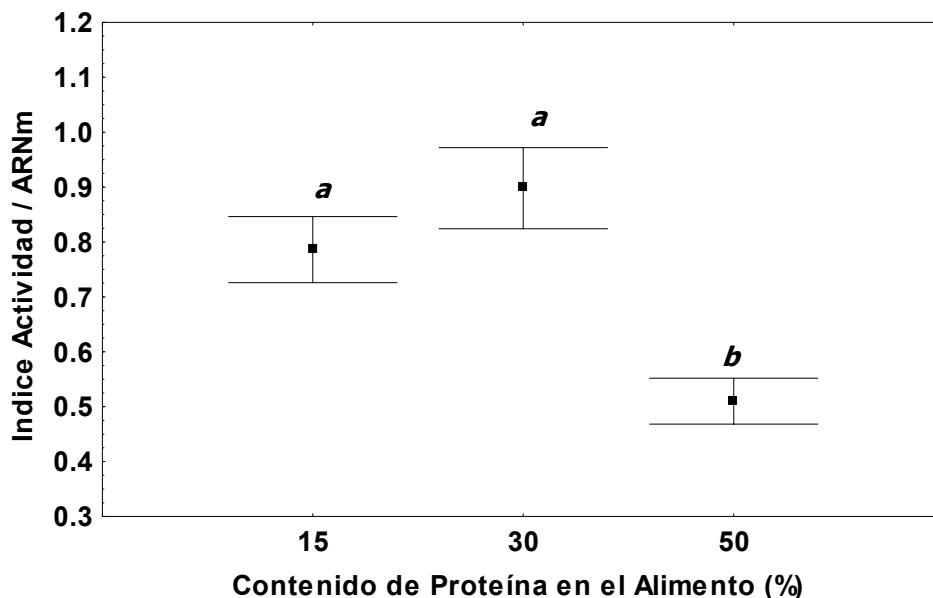


Figura 19. Índice actividad/concentración relativa de ARNm de tripsina/L21 en la glándula digestiva de *P. vannamei*. Letras itálicas diferentes muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Discusión

Parte I

A pesar de la complejidad que presenta el modelo de estudio de esta investigación debido a un ciclo de muda relativamente frecuente, a los efectos de la muda en los procesos fisiológicos asociados y al alto grado de polimorfismo reportado en esta especie (Klein et al., 1998), se logró hacer una contribución importante al conocimiento de los mecanismos de regulación de la síntesis enzimática en la glándula digestiva de peneidos, así como conocer la influencia de algunos factores que actúan como inductores, en la búsqueda de respuestas fisiológicas que permitan incrementar el conocimiento acerca de estos mecanismos de regulación.

El ciclo de muda además de ser un proceso cíclico íntimamente relacionado con el crecimiento de los organismos, es un proceso asociado con cambios fisiológicos de gran importancia como lo es la digestión, entre otros. A lo largo del ciclo de muda

el ayuno se presenta de forma natural cuando el organismo, debido a la pérdida de su exoesqueleto, es incapaz de manipular y, por lo tanto, de ingerir el alimento, aún cuando éste se encuentre disponible. A pesar de que estos periodos de ayuno tienden a ser constantes, de acuerdo al ciclo de muda del organismo, no suelen sobrepasar las 72 – 120 h. De ahí que la evaluación de periodos de ayuno no mayores a las 120 h, tomando en cuenta los cambios asociados a cada uno de los estadios de muda, permitió entender los efectos aislados y los efectos de la interacción de cada uno de estos factores sobre la síntesis y actividad de las dos principales enzimas proteolíticas de la glándula digestiva: la tripsina y la quimotripsina.

El efecto del ayuno (72 y 120 h) tanto en el peso corporal como en el peso de la glándula digestiva observado en el presente estudio, confirma los estudios de Cuzon et al. (1980) y Barclay et al. (1983) en *P. japonicus* y *P. esculentus*, respectivamente. El peso corporal de los peneidos decrece, según Barclay et al. (1983), debido a que la proteína del músculo abdominal es la fuente energética principal durante el ayuno. A su vez, El Haj et al. (1996) reportaron cambios importantes en la tasa de síntesis de proteína del músculo abdominal de la langosta americana *Homarus americanus* durante los diferentes estadios del ciclo de muda, correspondiendo el valor más bajo a la premuda tardía, que es el estadio en el cual la ingesta de alimento baja, e incluso desaparece.

El peso de la glándula digestiva fue también afectado significativamente por el ayuno debido a que este es un órgano de reserva energética cuyo peso varía de acuerdo al estado nutricional del organismo, independientemente del estadio de muda en que se encuentre el organismo. Los cambios observados en los pesos corporales y de la glándula digestiva por efecto del tiempo de ayuno se vieron a su vez reflejados en el índice hepatosomático, cuyos resultados son confirmados con las observaciones de Jussila (1999), quien no encontró diferencias en este índice entre diferentes estadios de muda para la langosta de agua dulce *Cherax teniومانus*.

En 1983, Barclay et al. sugirieron que el efecto del ayuno no puede ser aislado fácilmente del efecto de la muda en organismos que como los peneidos, mudan

frecuentemente. En este estudio se tuvo dificultad para el muestreo de organismos en premuda tardía (LD) después de 120 h de ayuno. La falta de una muestra representativa dada por el reducido número de organismos muestreados, no permitió su comparación con los otros estadios. La falta de organismos a las 120 h de ayuno va de acuerdo con las observaciones de Cuzon et al. (1980), quienes establecen que después de periodos de ayuno prolongado, el proceso de muda disminuye e incluso cesa.

El decremento en el peso de la glándula digestiva durante el ayuno implica a su vez la pérdida de agua y proteína del órgano, pues estos son los principales componentes del mismo, siendo la proteína la fuente energética principal (Dall et al., 1990). En este estudio, el contenido de proteína decreció después de 72 – 120 h de ayuno confirmando las observaciones realizadas por Cuzon et al. (1980) y Barclay et al. (1983). Además del cambio en el peso de la glándula digestiva, su contenido de proteína también muestra cambios durante el ciclo de muda (Al-Mohanna y Nott, 1989). A pesar de que en el presente estudio no se observaron diferencias en el contenido de proteína de la glándula digestiva entre diferentes estadios de muda, los organismos en estadios con alimentación activa como la intermuda (C) y la premuda temprana (ED), mostraron valores promedio mayores respecto a aquellos organismos en postmuda (A/B), estadio en el cual no hay alimentación activa. Esto puede significar que los organismos en intermuda (C) y premuda temprana (ED) iniciaron el periodo de ayuno experimental con mayor contenido de proteína en sus glándulas digestivas, que aquellos que no se estaban alimentando normalmente (postmuda A/B) (ver tabla V).

A pesar de que los experimentos preliminares realizados durante esta investigación mostraron que la muda ejerce un efecto significativo tanto en el contenido de proteína como en la actividad proteolítica total de la glándula digestiva, los resultados del presente ensayo mostraron que la actividad proteolítica total de la glándula digestiva disminuyó significativamente sólo en los organismos en premuda temprana con un tiempo de ayuno de 120 h, y no se observaron diferencias entre los

diferentes estadios de muda. Estudios previos en otras especies de Peneidos ya han reportado diferencias significativas entre organismos en diferente estadio de muda tanto en el contenido de proteína como en la actividad proteolítica total de la glándula digestiva (Leung et al., 1990), de donde, nuestras observaciones nos llevan a concluir que la magnitud del efecto del estadio de muda aunque existente, se enmascara frente al efecto del ayuno, bajo las condiciones evaluadas.

La actividad específica de tripsina fue significativamente afectada tanto por el ayuno como por la muda. Estas observaciones corresponden con los hallazgos de Cuzon et al. (1980), quienes evaluaron la actividad tripsina en peneidos sometidos a ayuno prolongado. Esta baja en la actividad tripsina puede explicarse como una baja en la cantidad de enzimas proteolíticas sintetizadas en la glándula digestiva y consecuentemente una baja en la actividad de estas debido a la ausencia de alimento, dato que corresponde con la disminución de la actividad proteolítica total antes mencionada. Sin embargo, esta baja de actividad no coincide con el incremento en la actividad tripsina observado en *P. japonicus* por Rodríguez et al. (1994), cuando los organismos fueron alimentados con bajo contenido proteico en el alimento. Lo anterior pudiera sugerir que esta baja de actividad esta también asociada a la falta del estímulo mecánico que representa la ausencia de alimento, mientras que en presencia de alimento, aún con un contenido bajo de proteína, se registra una actividad de tripsina mayor. De lo anterior se puede concluir que la actividad de la tripsina de la glándula digestiva puede ser afectada tanto por las características del alimento, como por la ausencia de este.

En este estudio, los organismos evaluados en el estadio de postmuda (A/B) no mostraron diferencias en la actividad tripsina de sus glándulas digestivas durante el periodo de ayuno al que fueron sometidos, esta observación es consistente con lo observado en el contenido de proteína y en la actividad proteolítica total de la glándula digestiva. Lo anterior sugiere que en este estadio de muda, en el cual no se observa una alimentación activa, los mecanismos de síntesis de esta enzima en la glándula digestiva son menos evidentes.

En este experimento además del efecto del ayuno, se observó un efecto significativo del estadio de muda en la actividad tripsina de la glándula digestiva. Los resultados muestran que los valores promedio de la actividad tripsina registrados en los organismos en premuda temprana (ED) e intermuda (C), que son los estadios en los cuales el organismo si se alimenta activamente, son mayores que en los organismos en postmuda (A/B), en donde no hay alimentación. Estas observaciones coinciden con los resultados reportados por Klein et al. (1996), quienes observaron los valores mas altos de actividad tripsina durante la premuda temprana y los valores mas bajos durante la postmuda en la misma especie.

La actividad quimotripsina de la glándula digestiva también se mostró afectada por el ayuno, sin embargo, el efecto de la muda se vuelve a enmascarar. La actividad de esta enzima parece ser un poco menos afectada que la actividad tripsina por el estrés que provoca la falta de alimento puesto que entre los organismos ayunados 2 y 120 h, se observó una diferencia en la actividad de tripsina de un 40%, mientras que esta diferencia entre los valores de la actividad quimotripsina se reduce a un 35%. La diferencia en la magnitud de las respuestas observadas entre ambas enzimas, tripsina y quimotripsina, pudieran estar relacionadas con el hecho de que aparentemente están reguladas por diferentes mecanismos como lo sugieren Klein et al. (1996).

Es importante remarcar que a pesar de que no se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de la glándula digestiva entre estadios de muda en todas nuestras evaluaciones, los organismos evaluados en estadios de no-alimentación, mostraron en general valores de actividad promedio menores a los observados en aquellos estadios en donde los animales se alimentaban activamente. De donde, la selección de los organismos experimentales en un mismo estadio de muda se hace necesaria cuando se pretende evaluar la actividad enzimática de la glándula digestiva para evitar cualquier tipo de sesgo en los resultados por influencia del ciclo de muda. Dall et al. (1990) y Lemos et al. (1999), sugieren que la intermuda (C), parece ser el estado fisiológico mas prolongado y estable, que

comprende del 8 al 30% del ciclo de muda total y es además un estadio en el cual los organismos se alimentan activamente.

El análisis electroforético de los extractos mostró cambios en el número de isoformas de tripsina observadas de acuerdo al tiempo de ayuno y estadio de muda. Se observaron hasta 4 isoformas con actividad tripsina, una de las cuales tiene un peso de 17.7 kDa y únicamente se presentó en organismos en los estadios de intermuda (C) y premuda (ED), en los tratamientos de 72 y 120 h de ayuno. Dicha proteína no se observó en ninguno de los extractos analizados en los experimentos siguientes realizados en este trabajo.

Los resultados de la actividad enzimática de la glándula digestiva obtenidos en este estudio, concuerdan con los reportados por Sánchez-Paz (2001), quién evaluó las concentraciones de ARNm de tripsina en dicha glándula de la misma especie y bajo las mismas condiciones que el presente estudio. Este autor observó las mayores concentraciones de ARNm de tripsina después de 24h de ayuno en los estadios de premuda temprana (ED) e intermuda (C). Nuestros resultados muestran, a su vez, un valor de actividad de tripsina máximo en la premuda temprana (ED), después de 24 h de ayuno. Estas observaciones concuerdan a su vez con los reportes de Klein et al. (1996) en la misma especie, quienes observaron un pico máximo de ARNm de tripsina durante la premuda y un pico máximo de actividad de esta enzima durante este mismo estadio. La correlación en los patrones de cambio entre la actividad tripsina y la expresión del ARNm de la misma, sugieren que la regulación de la síntesis de estas proteínas esta dada a nivel transcripcional (Klein et al., 1996).

Basándonos en los cambios observados tanto en la actividad enzimática de la glándula digestiva, como en el número de isoformas con actividad tripsina, que es la enzima que contribuye en mayor porcentaje a la hidrólisis de la proteína del alimento, podemos sugerir la existencia de un fenómeno de adaptación enzimática inducido por factores externos como lo es la falta de alimento ó ayuno y, por factores internos como el es proceso fisiológico de la muda.

Parte II

El efecto del ayuno evaluado en este estudio en un periodo de tiempo mas corto (48 h), con intervalos menores, permitió entender las variaciones de la actividad enzimática después de la ingesta y, por lo tanto, sugerir la existencia de una relación entre las respuestas observadas en este ensayo y los hábitos alimenticios de los organismos. Debido al corto tiempo de ayuno evaluado, ni el peso corporal, ni el peso de la glándula digestiva mostraron cambios significativos, lo cual confirma lo observado en el experimento anterior en aquellos organismos en intermuda (C) antes de las 72 h de ayuno (Tabla IV).

A pesar de que en el primer ensayo se observaron diferencias en el contenido de proteína de la glándula digestiva hasta las 72 h de ayuno en los organismos en intermuda (C), la evaluación frecuente de este contenido de proteína después de la ingesta, nos permitió observar algunos cambios que mostraron valores máximos 6 h después de haber ingerido el alimento, lo cual coincide con los valores máximos observados en las actividades tripsina y quimotripsina en este mismo experimento, como se muestra más adelante. La actividad proteolítica total de la glándula digestiva también mostró cambios que no pudieron observarse en el experimento anterior (en un periodo de 120 h), la variación de la actividad proteolítica a lo largo de las 48 h, mostró valores mínimos entre las 5 y 6 h, coincidiendo con uno de los valores mínimos observados en las actividades tripsina y quimotripsina 5 h después de la ingesta. Adicionalmente se observaron bajas en el contenido de proteína, actividad proteolítica total y actividades tripsina y quimotripsina a las 12 y 18 h.

La actividad de la tripsina en este ensayo también mostró variaciones no registradas en el primero, antes de las 72 h de ayuno. Valores máximos de la actividad tripsina de la glándula digestiva se observaron a las 2 y 6 h después de la ingesta, lo cual pudiera sugerir la posible expresión de al menos dos genes diferentes que codifican para tripsina en la glándula digestiva del camarón. A su vez, la actividad de la quimotripsina también mostró cambios, pues se observaron valores de actividad máxima entre las 6 y 9 h. La correlación que muestra el patrón de variación de ambas enzimas, tripsina y quimotripsina, sugiere que las respuestas de la síntesis enzimática

en la glándula digestiva después de la ingesta, son dependientes y secuenciales. Aparentemente la respuesta de la tripsina aparece antes que la de la quimotripsina, lo cual refuerza la hipótesis de que ambas enzimas están reguladas por mecanismos diferentes. La correlación del patrón de variación mostrado por las actividades de ambas enzimas ha sido también observada en modelos vertebrados como la rata, y estudios recientes, sugieren que los mecanismos de regulación son desplegados por procesos diferentes (Lhoste et al., 1994). Sin embargo, Le Moullac et al. (1996) en un estudio con juveniles de *P. vannamei* no observaron esta correlación entre ambas actividades.

Los resultados de estos dos ensayos mostraron valores mayores de actividad quimotripsina que de actividad tripsina, lo cual confirma lo reportado por Ezquerro et al. (1999) y Hernández et al. (1999). Este fenómeno puede estar asociado con la mayor o menor afinidad que muestran dichas enzimas por el sustrato sintético utilizado en cada caso, sin embargo, confirma también la importancia de la actividad quimotripsina en la glándula digestiva del camarón, representando un porcentaje importante de la actividad proteolítica total llevada a cabo en éste órgano (van Wormhoudt et al., 1995).

La variación observada en el número de bandas de tripsina, tanto de proteína como de actividad, es consistente con lo reportado por Ezquerro et al. (1999). Estos cambios en el número de bandas sugieren que en la glándula digestiva del camarón blanco existen hasta cuatro proteínas como máximo y dos proteínas como mínimo con actividad tripsina, las cuales se activan ó inactivan, dependiendo de las necesidades del organismo para llevar a cabo la hidrólisis de la proteína del alimento. En el caso de la quimotripsina, a pesar de que se registraron cambios significativos en los ensayos de actividad y diferencias en la intensidad de las bandas con actividad quimotripsina en los geles de poliacrilamida, no se registró cambio en el número de bandas observadas, sugiriendo que existen al menos dos isoformas de la enzima expresadas constantemente en la glándula digestiva del camarón. Lo anterior confirma las observaciones de van Wormhoudt et al. (1995) de dos isoenzimas quimotripsinas

expresadas constantemente a lo largo del ciclo de muda del organismo, sugiriendo la posibilidad de que sean otros factores inductores los que provoquen cambios en la expresión de dicha enzima. Varios estudios sobre la calidad y cantidad del alimento tampoco han reportado cambios en el número de bandas con actividad quimotripsina en *P. vannamei*, sin embargo, se requiere de mayores esfuerzos para entender el mecanismo de regulación de esta enzima.

El número de bandas tanto de tripsina como de quimotripsina observadas en el análisis electroforético de las muestras del primer ensayo en los organismos en intermuda (C), correspondió positivamente con el número de bandas observadas en el segundo ensayo de ayuno, en donde los organismos fueron también seleccionados en intermuda (C). Lo anterior refuerza la reproducibilidad de la técnica electroforética, la importancia de evaluar las muestras individualmente y, sobre todo, la posibilidad de observar patrones constantes en el número de bandas de las enzimas estudiadas, a pesar de la gran variabilidad observada entre organismos de esta misma especie.

Los resultados analizados en este experimento confirman, lo ya sugerido en el primer ensayo acerca de la existencia del fenómeno de adaptación enzimática en la glándula digestiva de Peneidos. A su vez, estos resultados nos permiten resaltar el corto plazo en el que esta adaptación enzimática esta dada como respuesta a la ingesta del alimento, lo cual pudiera estar relacionado con el hecho de que estos organismos son consumidores frecuentes, lo cual les obliga a presentar respuestas adaptativas en lapsos de tiempo menores.

Parte III

Además del estadio de muda y el ayuno como inductores de cambios en las tasas de síntesis enzimática en la glándula digestiva de los camarones y tomando en cuenta la importancia del alimento suministrado a los organismos y su relación con las necesidades nutricias del propio organismo, se realizó un tercer ensayo que nos permitió evaluar las respuestas del organismo frente alimentos de diferente calidad

(considerando de mejor calidad, a los alimentos con una concentración de proteína mayor).

Los crustáceos cuando son alimentados con alta concentración proteica en el alimento, tienden a mostrar mejor sobrevivencia y crecimiento, pues se sugiere, toman ventaja del contenido de proteína en el alimento para el mantenimiento de tejidos y abundantes reservas energéticas para sus funciones metabólicas (Koshio et al., 1993; Le Moullac and van Wormhoudt, 1994). Los resultados obtenidos durante este ensayo mostraron que de acuerdo a lo esperado, después de tres semanas de experimentación el incremento en el peso corporal de los organismos alimentados con un mayor porcentaje de proteína en el alimento (30 y 50%), fue mayor que en los alimentados con 15% de proteína, esto va de acuerdo con la idea de que los crustáceos alimentados con mayor cantidad de proteína, crecen mas rápido. Estos resultados concuerdan con lo observado por Carreira et al. (1996) en el páncreas de la rata, quienes compararon tres alimentos con concentración de proteína de 0, 22, y 64%. Estos autores no encontraron diferencias entre el peso corporal de las ratas alimentadas con 22 y 64% de proteína, mientras que en los organismos alimentados con 0% de proteína, el peso corporal decreció significativamente.

A pesar de la diferencia observada en el peso corporal de los camarones evaluados, el peso de la glándula digestiva no mostró cambios entre los grupos de organismos experimentales. Existen reportes que sugieren que el peso de esta glándula, en crustáceos, está influenciado por varios procesos fisiológicos que incluyen el ciclo de muda y el ayuno durante los estadios en los que hay ausencia de alimentación activa (Al- Mohanna y Nott, 1989; Fernández-Gimenez et al., 2001). Adicionalmente, es posible que las diferencias en la concentración de los ingredientes utilizados en la formulación de los alimentos experimentales, además de la proteína, como lo son los extractos libres de nitrógeno (Tabla VI), principalmente carbohidratos, afecten otros procesos bioquímicos no evaluados en este estudio y que pueden influenciar el peso de la glándula digestiva.

En este ensayo se observó un incremento significativo en el contenido de proteína soluble (mg/ml) de la glándula digestiva conforme la concentración proteínica del alimento incrementó. Estos cambios se correlacionan positivamente con los cambios observados en el peso corporal de los organismos. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos por Le Moullac y van Wormhoudt (1994) en larvas de *P. vannamei*, sugiriendo que cuando existe una alta concentración de proteína disponible en el alimento, excediendo cierto límite ó umbral, este órgano es capaz de almacenar reservas energéticas para enfrentar procesos fisiológicos como lo es la muda, el crecimiento y la reproducción del organismo.

Las actividades proteolíticas total, y las de tripsina y quimotripsina de este ensayo siguieron un patrón de variación diferente al del contenido de proteína de la glándula digestiva. Las actividades más altas se observaron en los organismos alimentados con un 30% de proteína, mientras que las actividades más bajas se registraron en los organismos alimentados con un 50% de proteína. Estos resultados confirman los reportes de Le Moullac et al. (1996) en *P. vannamei*, sugiriendo que la disminución en la tasa de síntesis de estas enzimas es consecuencia de una alta concentración de proteína (caseína) en el alimento, la cual a su vez, debe estar relacionada con la alta concentración de aminoácidos detectada en la hemolinfa.

A pesar de que los resultados de la actividad proteolítica total siguen este mismo patrón, no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales. Sin embargo, sabemos que la actividad proteolítica total es el resultado de todas las proteasas activas en la glándula digestiva del organismo incluyendo tripsinas, quimotripsinas, carboxi- y amino-peptidasas, catepsina y colagenasas. De tal manera que se asume que aunque la tripsina y la quimotripsina son las proteasas principales en la glándula digestiva del camarón, la actividad de otras proteasas no permite detectar cambios significativos debidos a la concentración proteica del alimento.

Los análisis electroforéticos de los extractos enzimáticos mostraron una banda de proteína adicional con actividad tipo tripsina en aquellos organismos alimentados

con un 30% de proteína (Fig. 16). Esto sugiere que aún cuando los organismos crecen mejor cuando consumen más proteína, la síntesis de las tres isoformas activas de tripsina (observadas en la glándula digestiva del camarón), puede ser inducida sólo cuando los organismos son alimentados con un 30% de proteína. Consecuentemente, la presencia de esta tercera tripsina parece ser inducida, una vez que se ha detectado cierto límite de proteína en el alimento y desaparece más allá de dicho límite. Sin embargo, la contribución de esta tripsina en la actividad total permanece aún desconocida, por lo que se requieren investigaciones posteriores para determinar el mecanismo de regulación de la síntesis de dicha molécula.

Como se observó en los experimentos anteriores, en este ensayo se confirma la correlación entre las actividades tripsina y quimotripsina (Fig. 15), siendo a su vez corroborada con las observaciones realizadas en algunos vertebrados. Corring et al. (1989) sugieren que la biosíntesis de enzimas pancreáticas en la rata es modificada por el contenido de proteína del alimento, y que existe una correlación positiva observada en el incremento de tripsinógeno y quimotripsinógeno, cuando se incrementa el porcentaje de proteína en el alimento. A su vez, Giorgi et al. en 1985, observaron una correlación positiva entre la concentración del ARNm del tripsinógeno I y el quimotripsinógeno B, cuando la concentración de proteína del alimento incrementó del 15 al 25%. Algunos estudios de activación de la tripsina y la quimotripsina en especies de insectos como el mosquito *A. gambiae*, sugieren que ambas enzimas son componentes de una cascada de activación, en donde la activación de una promueve la activación de otra, de tal manera que su actividad cambia siguiendo un mismo patrón de respuesta a la ingestión de alimento aunque sus respuestas estén dadas en tiempos diferentes y por mecanismos diferentes (Muller et al., 1995; Vizioli et al., 2001).

Nuestros resultados muestran que el incremento de la proteína en el alimento corresponde a un incremento en la concentración relativa de ARNm de tripsina y L21 en la glándula digestiva del camarón (Fig. 18A), lo que sugiere un probable efecto positivo general en la transcripción. Sin embargo, cuando las concentraciones relativas

de ARNm de tripsina son normalizadas respecto a un gen expresado constitutivamente, como la proteína ribosomal L21, el incremento del contenido proteico del alimento al 50%, resulta en la disminución de la concentración relativa de ARNm de tripsina/L21, casi al mismo nivel que el observado en los organismos alimentados con 30% de proteína, de tal forma que el valor mas alto de ARNm de tripsina se observó en los organismos alimentados con 30% de proteína (Fig. 18B). Los cambios en las concentraciones relativas de ARNm de tripsina, coinciden con los resultados de Klein et al. (1996) quienes sugieren que los genes de tripsina de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei* están regulados a nivel transcripcional.

Debido a la correlación observada entre la actividad tripsina y la concentración relativa de ARNm de tripsina, se calculó la relación actividad/concentración relativa de ARNm de tripsina/L21 (Fig. 19) y los valores obtenidos sugieren a su vez que existe, cuando menos de forma parcial, la regulación a nivel transcripcional de los genes de tripsina y que una vez que se ha sintetizado un número adecuado de transcritos, el proceso de transcripción declina independientemente del incremento de proteína en el alimento, con un correspondiente decremento en la actividad de la enzima. En los camarones, la síntesis de tripsina parece ser proporcional a la concentración de proteína en el alimento hasta cierto nivel, esto difiere con las observaciones de Noriega et al. (1994) acerca de la inducción de la transcripción de los genes de tripsina en el mosquito *A. aegypti*, en donde la concentración de ARNm de tripsina incrementa significativa y proporcionalmente después de la ingesta de sangre.

Los mecanismos de regulación relacionados con los cambios en la concentración del ARNm y la actividad de la tripsina observados en este estudio, sugieren una relación íntima con los hábitos alimenticios de las especies. Varios estudios en vertebrados e invertebrados, han demostrado una correlación entre los hábitos alimenticios y la magnitud de las respuestas reguladas (Secor, 2001). Algunas especies de insectos hematófagos como el mosquito *A. aegypti* (Noriega y Wells, 1999), el cual es un consumidor no-frecuente, muestra respuestas regulatorias del

proceso digestivo muy extremas. Esto es aún mas pronunciado dada la cantidad de la ingesta de sangre ó el tamaño de la presa, según sea el caso, que suele sobrepasar el peso del depredador y deben ser digeridas después de una sola ingesta. En el caso de los peneidos que son consumidores frecuentes, las respuestas regulatorias observadas son modestas cuando se les compara con aquellas de mosquitos. Lo anterior sugiere que la activación o inactivación de los genes de tripsina en la glándula digestiva del camarón supone un beneficio probablemente relacionado a un costo energético promedio reducido como lo propone Secor (2001).

De acuerdo a nuestros resultados, en los peneidos la transcripción de los genes de tripsina puede llevarse a cabo aún cuando los organismos ingieren un alimento con baja proteína (15%), sin embargo, la correlación entre la actividad, la concentración relativa del ARNm de tripsina (en los tres grupos experimentales) y la tercera banda con actividad tripsina observada en el grupo de organismos alimentados con 30% de proteína, refuerzan la hipótesis de que los cambios en las concentraciones relativas de ARNm determinan estrechamente los cambios observados en la actividad implicando que cuando menos existe un sitio de regulación efectivo durante la transcripción. A pesar de lo anterior, no se debe eliminar la posibilidad de que existan otros factores que tengan efecto a otro nivel de regulación de la tripsina de acuerdo a las sugerencias de Noriega et al. (1994). Lo anterior corresponde con las observaciones de van Wormhoudt et al. (1996) quienes reportaron una correlación positiva entre la actividad y la concentración de ARNm de tripsina (evaluada por el método de dot-blot) en *P. vannamei*; sin embargo, estos autores no encontraron diferencias en el número de isoformas expresadas de tripsina.

El uso de genes constitutivos (housekeeping genes) como controles internos en la evaluación de la expresión de genes blanco, se apoya en la premisa de que exhiben una tasa de transcripción basal constante en todos los tipos de células nucleadas, siendo estos genes consistentes, no-regulados, e independientes de cualquier proceso fisiológicos (Thellin et al., 1999). Las proteínas ribosomales comúnmente son usadas comunmente como estandares debido a la baja variacion que presentan sus niveles de

ARNm; varios estudios realizados en insectos han reportado con éxito, el uso de estas proteínas (Salazar et al., 1993; Dimopoulos et al., 1998; Barillas-Mury et al., 1999). En el caso de los crustáceos, además de los cambios ligados al ciclo celular, es necesario considerar cuidadosamente la alta variabilidad observada en el estado nutricional de los organismos y los procesos de muda debido a que estos parámetros son difíciles de controlar entre organismos individuales (Sánchez-Paz, 2001).

Aparentemente los mecanismos de regulación que presenta el camarón son del tipo de los consumidores frecuentes como es el caso de la rata ó el humano. Estudios recientes hacen suponer la existencia de un tripsinógeno y de inhibidores específicos de tripsina en la glándula digestiva del camarón blanco (Klein et al., 1996; García-Carreño, 1996; Lehnert y Johnson, 2002) lo cual sugiere a su vez, la presencia de otros mecanismos de regulación de la tripsina en crustáceos.

Consideraciones finales

De acuerdo a lo observado en este estudio, en la glándula digestiva de los peneidos existe el proceso de adaptación enzimática, el cual esta dado por mecanismos que le permiten a los organismos regular la síntesis de las enzimas proteolíticas como la tripsina y la quimotripsina. Dentro de los inductores exógenos que producen cambios en la síntesis enzimática de dicha glándula están el ayuno y el contenido proteico del alimento. A su vez, en esdtos organismos, un inductor endógeno de gran importancia en los cambios detectados en la síntesis de proteasas digestivas, es el ciclo de la muda.

En el presente estudio se mostró que la cantidad y actividad de las enzimas tripsina y quimotripsina en la glándula digestiva del camarón blanco está regulada, aparentemente, por mecanismos distintos. A su vez se establece que el modelo utilizado es adecuado para este tipo de evaluaciones y que es factible desarrollar futuras investigaciones para el estudio de los mecanismos de regulación de la actividad enzimática en el sistema digestivo de los decápodos. Los inductores

evaluados en la presente investigación, que provocan cambios tanto en la actividad proteolítica como en la concentración del ARNm de la tripsina de la glándula digestiva, se encuentran asociados por una característica común: el estrés alimenticio. Sin embargo, se hace necesaria la búsqueda de nuevos factores y/o inductores que permitan observar cambios en el número de proteínas con actividad tripsina y especialmente quimotripsina.

La posibilidad de la evaluación individual de cada una de las tripsinas de la glándula digestiva reportadas en este estudio, tanto de proteína como de expresión génica, permitirá establecer conclusiones más claras acerca de la contribución de cada una de estas enzimas en la degradación de la proteína del alimento y permitirá a su vez, el mejor entendimiento de los mecanismos que regulan la actividad de cada una de estas enzimas. Experimentos preliminares llevados a cabo durante la presente investigación, proveen herramientas básicas para el desarrollo de investigaciones posteriores, como el diseño y evaluación de oligonucleótidos que permiten la amplificación individual, mediante PCR, de las tres tripsinas de la glándula digestiva del camarón y el diseño de oligonucleótidos que permiten la amplificación del factor de elongación II, como posible gen constitutivo en crustáceos.

Referencias Bibliográficas

Al-Mohanna, S.Y., Nott, J.A., Lane, D. 1985. Mitotic E- and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). J. Mar. Biol. Ass. UK. 65: 901-910.

Al-Mohanna, S.Y. y Nott, J.A. 1989. Functional cytology of the hepatopancreas on *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the molt cycle. Mar. Biol. 101: 535-544.

Arnon, R. y Neurath, H. 1969. An immunological approach to the study of evolution of trypsins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 64(4): 1623-1628.

Ayala, F.J. y Kiger, J.A. 1984. *Genética Moderna*. Ed. Fondo Educativo Interamericano. México. 839 pp.

Barclay, M.C., Dall, W., Smith, D.M. 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn *Penaeus esculentus* Haswell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 68: 229-244.

Barillas-Mury, C.V., Graf, R., Hagedorn, H.H., Wells, M.A. 1991. cDNA and deduced amino acid sequence of a blood meal-induced trypsin from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem.* 21: 825-831.

Barillas-Mury, C.V. y Wells, M.A. 1993. Cloning and sequencing of the blood meal-induced late trypsin gene from the mosquito *Aedes aegypti* and characterization of the upstream regulatory region. *Insect Mol. Biol.* 2: 7-12.

Barillas-Mury, C.V., Noriega, F.G., y Wells, M.A. 1995. Early trypsin activity is a part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 241-246.

Barillas-Mury, C., Han, Y. S., Seeley, D. y Kafatos, F. C. 1999. *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.* 18(4): 959 - 967.

Bennet, G.W. y Owens, J.M. 1986. *Advances in urban pest management*. Van Nostrand. NY. 458 pp.

Blumberg, B. e Izpisúa-Belmonte, J.C. 1999. Subtractive hybridization and construction of cDNA libraries. *Method Molec. Biol.* 97: 555-574.

Carreira, S., Fueri, C. Chaix, J.C., Puigserver, A. 1996. Dietary modulation of the mRNA stability of trypsin isozymes and the two forms of secretory trypsin inhibitor in the rat pancreas. *Eur. J. Biochem.* 239: 117-123.

Chan, S.M., Rankin, S.M., Keeley, L.L. 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: Setogenesis and haemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biol. Bull.* 175: 185-192.

Charfi-Cheikhrouha, F. 1994. Esterase and amylase: two biochemical markers in the polytypic *Idotea chelipes* (crustacea, isopoda valvifera). Arch. Inst. Pasteur Tunis. 71(1-2): 13-20.

Christie, A.E., Baldwin, D., Turrigiano, G., Graubard, K., Marder, E. 1995. Immunocytochemical localization of multiple cholecystokinin-like peptides in the stomatogastric system of the crab *Cancer borealis*. J. Exp. Biol. 198: 263-271.

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

Corring, T. Juste, C. y Lhoste, E. 1989. Nutritional regulation of pancreatic and biliary secretions. Nutr. Res. 2: 161-180.

Cowell, I.G. 1994. Repression versus activation in the control of gene transcription. TIBS. 19: 38-42.

Craik, C.S., Choo, Q.L., Swift, G.H., Quinto, C., MacDonald, R.J. y Rutter, W.J. 1984. Structure of two related rat pancreatic trypsin genes. J. Biol. Chem. 259(22): 14255-14264.

Cuzon, G., Cahu, C., Aldrin, J.F., Messenger, J.L., Stephan, G., Mevel, M. 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. Proc. World Maricul. Soc. 11: 410-423.

Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C., Sharples, D.J. 1990. The Biology of Penaeidae. In: Blaxter, J.H.S., Southward, A.J. (Eds.). Advances in Marine Biology. Vol. 27. Academic Press. London. 489 p.

Darnell, J. E. Jr. 1982. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. Nature. 297(3) : 365-371.

de Albuquerque-Cavalcanti, C., Muhlia-Almazán, A., Hernández-Cortés, P. y García-Carreño, F. 2001. Proteinases from marine organisms. In: Recent advances in Marine Biotechnology. Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi. Vol 6.

de Albuquerque-Cavalcanti, C., García-Carreño, F., y Navarrete del Toro, M.A. 2002. Trypsin and trypsin inhibitors from penaeid shrimp. J. Food Biochem. (26): 233-251.

De Haen, C., Neurath, H. y Teller, D.C. 1975. The phylogeny of trypsin-related serine proteases and their zymogens. New methods for the investigation of distant evolutionary relationships. *J. Mol. Biol.* 93: 225-259.

Díaz-López, M. y García-Carreño, F.L. 2000. Applications of fish and shellfish enzymes in food and feed products. In: Haard, N., and Simpson, B. *Seafood Enzymes*. Chap. 21. NY. Marcel Dekker: 571-618.

Dimopoulos, G., Seeley, D., Wolf, A., Kafatos, F. C. 1998. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *EMBO J.* 17(21): 6115-6123.

Dionysius, D.A., Hoek, K.S., Milne, J.M., Slattery, S.L. 1993. Trypsin-like enzyme from sand crab (*Portunus pelagicus*): purification and characterization. *J. Food Sci.* 58: 780-792.

Dixon, M. y Webb, E. 1979. *Enzymes*. Academic Press. USA. 1116 pp.

Duve, H., Rehfeld, J.F., East, P.D., Thorpe, A. 1994. Localisation of sulfakinin neuronal pathways in the blowfly *Calliphora vomitoria*. *Cell Tissue Res.* 275(1): 177-186.

Duve, H., Thorpe, A., Scott, A.G., Johnsen, A.H., Rehfeld, J.F., Hines, E., East, P.D. 1995. The sulfakinins of the blowfly *Calliphora vomitoria*. Peptide isolation, gene cloning and expression studies. *Eur. J. Biochem.* 232(2): 633-640.

Eckert, R., Randall, D. y Augustine, G. 1990. *Fisiología Animal. Mecanismos y Adaptaciones*. 3a. edición. Interamericana- McGraw-Hill. Madrid, España. 683 pp.

Edgar, K.A., Noriega, F.G., Bonning, B.C y Wells, M.A. 2000. Recombinant juvenile hormone esterase, an effective tool for modifying juvenile hormone-dependent expression of the early trypsin gene in mosquitoes. *Insect Mol. Biol.* 9(7): 27-31.

Eguchi, M. e Iwamoto, A. 1982. Comparison of three alkaline proteases from digestive fluid of the silkworm *Bombyx mori* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B(4): 663 – 668.

Eguchi, M. y Kuriyama, K. 1985. Purification and characterization of membrane-bound alkaline proteases from midgut tissue of the silkworm, *Bombix mori*. J. Biochem. Tokyo 97(5): 1437-1445.

Eguchi, M., Itoh, M., Nishino, K., Shibata, H., Tanaka, T., Kamei-Hayashi, K., Hara, S. 1994. Aminoacid sequence of an inhibitor from the silkworm (*Bombyx mori*) hemolymph against fungal protease. J. Biochem. Tokyo. 115(5): 881-884.

El Haj, A., Clarke, S.R., Harrison, P., Chang, E.S. 1996. In Vivo muscle protein synthesis rates in the american lobster *Homarus americanus* during the moult cycle and in response to 20-hydroxyecdysone. J. Exp. Biol. 199: 579-585.

Ezquerro, M., García-Carreño, F. L., Arteaga, G., Haard, N. 1999. Effect of feed on aminopeptidase activities from the hepatopancreas of the white shrimp. J. Food Biochem. 23: 59-74.

Favrel, P., van Wormhoudt, A., Studler, J.M., Bellon, C. 1987. Immunochemical and biochemical characterization of gastrin/cholecystokinin-like peptides in *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda): intermolt variations. Gen. Comp. Endocrinol. 65(3): 363-372.

Favrel, P., Kegel, G., Sedlmeier, D., Keller, R., van Wormhoudt, A. 1991. Structure and biological activity of crustacean gastrointestinal peptides identified with antibodies to gastrin/cholecystokinin. Biochimie. 73(9): 1233-9.

Fernández-Gimenez, A.L., García-Carreño, F.L., Navarrete del Toro, M.A., Fenucci, J.L. 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. Comp. Biochem. Physiol. 130B(3): 331-338.

Fletcher, T.S., Alhadeff, M., Craik, C.S., Langerman, C. 1987. Isolation and characterization of a cDNA encoding rat cationic trypsinogen. Biochemistry. 26: 3081-3086.

Galgani, M.L., Benyamin, Y. and Ceccaldi, H.J., 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forsk.) : A comparison with *Penaeus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. 78B: 355-361.

Galgani, F. G. 1985. Regulation de l'activite des proteases digestives de *Penaeus japonicus* Bate en relation avec la temperature. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 94: 11-18.

García-Carreño, F.L. 1991. Proteases in food technology. Biochem. Educ. 2(4): 150-153.

García-Carreño, F. 1992. Protease inhibition in theory and practice. Biotech. Educ. 3: 145-150.

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

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

García-Carreño, F. L. 1996. Proteinase inhibitors. Trends Food Sci. Technol. 7: 197-204.

García-Carreño, F.L. y Hernández, C.P. 1996. Enzimas del sistema digestivo del camarón I. Estado del arte y tendencias de investigación en digestión de proteínas. In: Taller de Trabajo: La investigación científica en Peneidos de Iberoamérica. Calderón, J.V., Magallón, F., Andratta, E. y Sánchez, R. Editores. Ecuador. 88 pp.

García-Carreño, F.L. y Navarrete del Toro, M. A. 1997. Classification of proteases without tears. Biochem. Educ. 25(3): 161-167.

García-Carreño, F.L. 1998. Control of digestive functions in shrimp. I. An inhibitor of trypsin activity in the hepatopancreas. Proceedings of the 4th. International Crustaceans Congress.

García-Carreño, F.L. 2002. Regulation of synthesis and activity of digestive proteinases in penaeids. 8th Coloquium Crustacea Decapoda Mediterranea. Corfu, Greece.

Gibson, R. y Barker, P. 1979. The decapod hepatopancreas. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 17: 197-204.

Giorgi, D., Renaud, W., Bernard, J-P., Dargon, J-C. 1985. Regulation of proteolytic enzyme activities and mRNA concentrations in rat pancreas by food content. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127(3): 937-942.

Gorell, T.A. y Gilbert, L.I. 1979. Stimulation of protein and RNA synthesis in the crayfish hepatopancreas by crustecdysone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 13(2): 308-310.

Graf, R. y Briegel, H. 1989. The synthetic pathway of trypsin in the mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) and in vitro stimulation in isolated midguts. *Insect Biochem.* 19: 29-137.

Graf, R., Valeri, F., Gassmann, R., Hailemariam, S., Frick, T.W., Bimmler, D. 2000. Adaptative response of the rat pancreas to dietary substrates: paralell regulation of trypsinogen and pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Pancreas.* 21(2): 181-190.

Hammock, B.D. 1985. Regulation of juvenile hormone titer degradation. In: Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. (eds). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* Pergamon press. NY. 431 – 472 pp.

Harsman, L. G. y James, A.A. 1998. Diferential gene expression in insects: transcriptional control. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 671-700.

Henning, R., Panagiotis, B.K., Friess, H., Adrian, T.E., Buchler, M.W. 2002. Pancreatic polypeptide in pancreatitis. *Peptides.* 23: 331-338.

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

Hernández- Cortés, P., Cerenius, L., García-Carreño, F.L., y Soderhall, K. 1999. Trypsin from *Pacifastacus leniusculus* hepatopancreas: Purification and cDNA cloning of the synthesized zymogen. *Biol. Chem.* 380: 499-501.

Hochachka, P. y Somero, G. 1984. *Biochemical Adaptation.* Princeton University Press. USA. 537 pp.

Holbrook, G.L., Armstrong, E., Bachmann, J., Deasy, B.M., Schal, C. 2000. Role of feeding in the reproductive 'group effect' in females of the German cockroach *Blattella germanica* (L.) J. Insect Physiol. 46(6): 941-949.

Honjo, I., Kinura, S., Nonaka, M. 1990. Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp *Penaeus indicus*. Nippon Suisan Gakk. 56(10): 1627-1634.

Horler, E. y Briegel, H. 1997. Chymotrypsin inhibitors in mosquitoes: activity profile during development and after blood feeding. Arch. Insect Biochem. Physiol. 36: 315-333.

Icely J.D. y Nott J.A. 1992. Digestion and absorption: Digestive system and associated organs, In: Harrison, F.W. (Ed.) Microscopic anatomy of invertebrates. Wiley-Liss Inc. Pub. New York. 10: 147-202.

Jiang, Q., Hall, M., Noriega, F.G., Wells, M.A. 1997. cDNA cloning and pattern of expression of an adult, female-specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. Insect Biochem Mol. Biol. 27(4): 283-289.

Johnsen, A.H., Duve, H., Davey, M., Hall, M., Thorpe, A. 2000. Sulfakinin neuropeptides in a crustacean. Isolation, identification and tissue localization in the tiger prawn *Penaeus monodon*. Eur. J. Biochem. 267(4): 1153-1160.

Jussila, J. 1999. Comparison of selected condition Indices between intemolt and post-molt marron, *Cherax tenuimanus* of different feeding status raised under intensive culture conditions. J. Appl. Aquac. 9(3): 57-65.

Kalhok, S.E., Tabak, L.M., Prosser, D.E., Brook, W., Downe, A.E.R. y White, B.N. 1993. Isolation, sequencing and characterization of two DNA clones coding for trypsin-like enzymes from the midgut of *Aedes aegypti*. Insect Mol. Biol. 2(2): 71-79.

Katsuura, G., Asakawa, A., Inui, A. 2002. Roles of pancreatic polypeptides in regulation of food intake. Peptides. 23: 323-329.

Keil, B., Dlouha, V., Holeysovsky, V. y Sorm, F. 1968. Hypothesis of three-dimensional arrangement of polypeptide chains in trypsin. Coll. Czch. Chem. Comm. 33: 2307- 2315.

Kitamoto, Y., Yuan, X., Wu, Q., McCourt, D.W., Sadler, J.E. 1994. Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7588-7592.

Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D. y Van Wormhoudt, A. 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28(5): 551-563.

Klein, B., Sellos, D. y van Wormhoudt, A. 1998. Genomic organisation and polymorphism of a crustacean trypsin multi-gene family. *Gene.* 216: 123-129.

Klimova, O. A., Borukhov, S.I., Solovyeva, N.I., Balaevskaya, T.O. y Strongin, A. Y. 1990. The isolation and properties of collagenolytic proteases from crab hepatopancreas. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 166(3): 1411-1420.

Krem, M. M. y Di Cera, E. 2002. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *TRENDS Biochem. Sci.* 27(2): 67-73.

Koshio, S., Teshima, S., Kanazawa, A., Watase, T. 1993. The effect of dietary protein content on growth, digestion efficiency and nitrogen excretion of juvenile kuruma prawns, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture.* 113: 101-114.

Ladenheim, E.E., Wohn, A., White, W.O., Schwartz, G.J., Moran, T.H. 1999. Inhibition of gastric emptying by bombesin-like peptides is dependent upon cholecystokinin-a receptor activation. *Regul. Pept.* 84 (1-3): 101-6.

Larson, B.A., Vigna, S.R. 1983. Species and tissue distribution of cholecystokinin/ gastrin-like substances in some invertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50(3): 469-475.

Lee, P.G. y Lawrence, A. L. 1982. A quantitative analysis of digestive enzymes in Penaeid shrimp: influence of diet, age and species. *Physiologist.* 25: 241.

Lee, P., Smith, L. y Lawrence, A. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture.* 42: 225-239.

Lee K., Watson R. D., Roer R. D. 1998. Molt-Inhibiting hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 624-627.

Lehane, M.J., Blakemore, L.D., Williams, S., Moffatt, M.R., 1995. Regulation of digestive enzyme levels in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 110B: 285- 289.

Lehane, S.M., Assinder, S.J., Lehane, M.J. 1998. Cloning, sequencing, temporal expression and tissue-specificity of two serine proteases from the midgut of the blood-feeding fly *Stomoxys calcitrans*. *Eur. J. Biochem.* 254: 290-296.

Lehnert, S. A. y Johnson, S. E. 2002. Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 133B: 163-171.

Le Huerou-Luron. I, Lhoste, E., Wicker-Planquart, C. , Dakka, N. , Toullec, R., Corring, T., Guilloteau, P. y Puigserver, A. 1993. Molecular aspects of enzyme synthesis in the exocrine pancreas with emphasis on development and nutritional regulation. *P. Nutr. Soc.* 52: 301-313.

Lemos D., Hernández-Cortés M. P., Navarrete A., García-Carreño F. L., Phan V. N. 1999. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larvae and postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Mar. Biol.* 135: 653-662.

Le Moullac, G. 1994. Adaptation des enzymes digestives á l'alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Diplome EHPE. Paris Sorbonne 120 pp.

Le Moullac, G., y van Wormhoudt, A. 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Living Resour.* 7: 203-210. AQUACOP.

Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D. y Van Wormhoudt, A. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amilase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 208: 107-125.

Leung K. M., Chen H. L., Chu K. H. 1990. Effects of starvation on biochemical composition and digestive enzymes activities in the hepatopancreas of the shrimp *Metapenaeus ensis*, In: Hirano R., Hanyu I. (Eds.). The Second Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society. Manile, Philippines. 991 p.

Lewin, B. 1994. Genes V. Oxford University Press.U.S.A. 1272 pp.

Lhoste, E.F., Fislewicz, M., Gueugneau, A.M., Corring, T. 1994. Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: Effect of the nature of protein and rat enzyme activities and messenger RNA levels. J. Nutr. Biochem.5: 84-93.

Liddle, R. A. 1994. Regulation of cholecystokinin synthesis and secretion in rat intestine. J. Nutr. 124: 1308S-1314S.

Liddle, R. A. 1997. Cholecystokinin cells. Annu. Rev. Physiol. 59: 221-42.

Light, A., y Janska, H. 1989. Enterokinase (enteropeptidase): comparative aspects. TIBS. 14: 110-112.

Lovett, D.L., y Felder, D.L. 1989. Ontogeny of gut morphology in the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae). J. Morph. 201: 253-272.

Lovett, D.L. y Felder, D.L. 1990. Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (crustacea, decapoda, penaeidae). Biol. Bull. 178: 160-174.

Maeda-Martínez, A., Obregon-Barboza, V., Navarrete del Toro, M.A., Obregon-Barboza, H. y García-Carreño, F.L. 2000. Trypsin-like enzymes from two morphotypes of the 'living fossil' Triops (Crustacea: Brachiopoda: Notostraca). Comp. Biochem. Physiol. 126B: 317-323.

Maestro, J.L., Aguilar, R., Pascual, N., Valero, M., Piulachs, M., Andreu, D., Navarro, I., Belles, X. 2001. Screening of antifeedant activity in brain extracts led to identification of sulfakinin as a satiety promoter in German cockroach. Eur. J. Biochem. 268: 5824-5830.

Male, R., Lorens, J.B., Somalas, A.O., y Torrissen, K.R. 1995. Molecular cloning and characterization of anionic and cationic variants of trypsin from Atlantic salmon. Eur. J. Biochem. 232: 677-685.

Mars, B., Delagrave, S., Murphy, D. 1999. Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 241-245.

Merali, Z., McIntosh, J., Anisman, H. 1999. Role of bombesin-related peptides in the control of food intake. *Neuropeptides.* 33(5): 376-386.

Miyasaka, K., Guan, D.F., Liddle, R. A., Green, G.M. 1989. Feedback regulation by trypsin: evidence for intraluminal CCK-releasing peptide. *Am. J. Physiol.* 257(2 Pt 1): G175-81.

Moffat, M. R., Lehane, M.J. 1990. Trypsin is stored as an inactive zymogen in the midgut gland of *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochem.* 20(7): 719-723.

Muller, W.E., Pancer Z., Rinkevich, B. 1994. Molecular cloning and localization of a novel serine protease from the colonial tunicate *Botryllus schlosseri*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3(2): 70-7.

Muller, H. M., Catteruccia, F., Vizioli, J., della Torre, A., Crisanti, A. 1995. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Anopheles gambiae*. *Exp. Parasitol.* 81(3): 371-385.

Muhlia-Almazán, A. y García-Carreño, F.L. 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.* 133B(3): 383-394.

Muhlia-Almazán, A. García-Carreño, F. L. Sánchez-Paz, J. A., Yepiz-Plascencia, G. y Peregrino-Uriarte, A.B. Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiology. B.* (Aceptado).

Nachman, R. J., Holman, G. M., Haddon, W.F., Vensel, W.H. 1991. An active pseudopeptide analog of the leucokinin insect neuropeptide family. *Int. J. Protein Res.* 37(3): 220-223.

Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science.* 224: 350-357.

Neurath, H. 1989. The diversity of proteolytic enzymes, in: Beynon, R., Bond, J. (Eds.) Proteolytic enzymes. A practical approach. IRL Press. NY. 1-14pp.

Nichols, R. y Lim, I.A. 1996. Spatial and temporal immunocytochemical analysis of drosulfakinin (Dsk) gene products in the *Drosophila melanogaster* central nervous system. Cell Tissue Res. 283(1): 107-116.

Noriega, F.G., Barillas-Mury, C., Wells, M.A. 1994. Dietary control of late trypsin gene transcription in *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. 24(6): 627-631.

Noriega, F.G., Pennington, J.E., Barrillas-Mury, C.V., Wang, X.Y., Wells, M.A. 1996. Early trypsin, an *Aedes aegypti* female specific protease, is post-transcriptionally regulated by the blood meal. Insect Mol. Biol. 5: 25-29.

Noriega, F.G., Shah, D., Wells, M. A. 1997. Juvenile hormone regulates early trypsin gene expression. Insect Mol. Biol. 6: 63-66.

Noriega, F.G. y Wells M. A. 1999. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. J. Insect Physiol. 45: 613-620.

Noriega, F.G., Edgar, K.A., Goodman, W.G., Shah, D.K., Wells, M.A. 2001. Neuroendocrine factors affecting the steady-state levels of early trypsin mRNA in *Aedes aegypti*. J Insect Physiol. 47: 515 – 522.

Olli, J.J., Hjelmeland, K., Krogdahl, A. 1994. Soybean trypsin inhibitors in diets for atlantic salmon (*Salmo salar*,. L): Effects on nutrient digestibilities and trypsin in pyloric caeca homogenate and intestinal content. Comp. Biochem. Physiol. 109A(4): 923-928.

Omondi, J.C. y Stark, J.R. 2001. Studies on digestive proteases from midgut glands of a shrimp *Penaeus indicus*, and a lobster, *Nephrops norvegicus*. Part 1. Proteolytic activity. Appl. Biochem. Biotechnol. 90(2): 137-153.

Pancer, Z., Lenck, J., Ronkevick, B. Steffen, R. Muller, I. y Muller, W.E. 1996. Molecular cloning and sequence analysis of two cDNAs coding for putative anionic

trypsinogens from the colonial urochordate *Botryllus schollosseri* (Ascidiacea). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5(4): 326-33.

Pasternak, A., Ringe, D. y Hedstrom, L. 1999. Comparison of anionic and cationic trypsinogens: The anionic activation domain is more flexible in solution and differs in its mode of BPTI binding in the crystal structure. *Prot. Sci.* 8: 253-259.

Péres, A., Zambonino-Infante, J.L., y Cahu, C. 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 19: 145-152.

Peterson, A.M., Fernando, J.P.G. y Wells, M. 1995. Purification, characterization and cDNA sequence of an alkaline chymotrypsin from the midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25(7): 765-774.

Pfleiderer G., Linke, R., Reinhardt, G. 1970. On the evolution of endopeptidases. 8 Cross-reactions of trypsin and chymotrypsins of different species. *Comp. Biochem. Physiol.* 33B(4): 955-967.

Reed, G. 1993. Introduction. In: Nagodawithana, T. and Reed, G. (eds.) *Enzymes in Food Processing*. Academic Press. San Diego. 1-5 pp.

Resch-Sedlmeier, G. y Sedlmeier, D. 1999. Release of digestive enzymes from the crustacean hepatopancreas: effect of vertebrate gastrointestinal hormones. *Comp. Biochem. Physiol.* 123B: 187-192.

Roach, J.C., Wang, K., Gan, L, Hood, L. 1997. The molecular evolution of the vertebrate trypsinogens. *J. Mol. Evol.* 45: 640-652.

Rodríguez, A., Le Vay, L., Mourente, G., Jones, D.A. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Mar. Biol.* 118: 45-51.

Rodríguez, S.G. 1999. Generalidades. In: *Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología*. Prado, B.R., Huerta, O.S., Rodríguez, S. G. y Saucedo, C.G. Editores. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 367 pp.

Rosas, C., Bolognaro-Crevenna, A., Sánchez, A., Gaxiola, G., Soto, L., Escobar, E. 1995. Digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. Biol. Bull. 189: 168-174.

Ryan, C. A. 1965. Chicken chymotrypsin and turkey trypsin. Part 1: Purification. Archs. Biochem. Biophys. 110: 169-174.

Saborowski, R. 2002. Marine Biotechnology Course. CIBNOR. México.

Sahin-Tóth, M. 2000. Human cationic trypsinogen. J. Biol. Chem. 275(30): 22750-22755.

Salazar, C. E., Mills-Hamm, D., Kumar, V., y Collins, F. H. 1993. Sequence of a cDNA from the mosquito *Anopheles gambiae* encoding a homologue of human ribosomal protein S7. Nucleic Acids Res. 21: 41-47.

Sanchez-Paz, J. A. 2001. Regulación adaptativa del mRNA de tripsina del hepatopáncreas del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) bajo condiciones de stress alimenticio. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México. 62 pp.

Secor, S., y Diamond, J. 1998. A vertebrate model of extreme physiological regulation. Nature. 395: 659-662.

Secor, S.M. 2001. Regulation of digestive performance: a proposed adaptative response. Comp. Biochem. Physiol. 128A: 565-577.

Sellos, D. y van Wormhoudt, A. 1992. Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda) FEBS Letters. 309: 219-224.

Serviere E., Navarrete A., García-Carreño, F.L. 1997. Protein hydrolyzing enzymes in the digestive system of the adult mexican blue abalone. Aquaculture. 157: 323-332.

Sevilla, C. y Lagarrigue, J. G. 1975. Comparison of the zymograms of isopod (Crustacea, Peracarides) digestive tubes. CR. Acad. Sci. Hebd. 281(11): 715-718.

Sitniewska, E.M. 2001. Secretin. New views on the oldest digestive system hormone. *Pol. Mercuriusz Lek.* 10(55): 42-45.

Snow, N.D., Prpic, V., Mangel, A.W., Sharara, A.I., McVey, D.C., Hurst, L.J., Vigna, S.R., Liddle, R. A. 1994. Regulation of cholecystokinin secretion by bombesin in STC-1 cells. *Am. J. Physiol.* 267 (5Pt 1): G859-65.

Suárez, N.C., Alazard, D., Ramírez, V.F., Monroy, H.O., Linares, L.F. 2002. Las enzimas termoestables y sus aplicaciones industriales. *BioTecnología.* 7(1): 7-23.

Terra, W.R. 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 181-200.

Terra, W. R. y Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B(1): 1-62.

Titani, K., Sasagawa, T. Woodbury, R.G., Ericsson, L.H., Dorsamm, H., Kraemer, M., Neurath, H. y Zwilling, R. 1983. Amino acid sequence of crayfish (*Astacus fluviatilis*) trypsin. *Biochemistry.* 22: 1459-1465.

Tsai, I., Liu, H.C., y Chuang, K. 1986. Properties of two chymotrypsins from the digestive gland of prawn *Penaeus monodon*. *FEBS letters.* 203: 257-261.

Tsai, I., Lu, P.J., Chuang, J.L. 1991. The midgut chymotrypsins of shrimps (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*). *Biochim. Biophys. Acta.* 1080(1): 59-67.

van Wormhoudt, A., Favrel, P. y Guillaume, J. 1989. Gastrin/ cholecystokinin-like post-prandial variations: Quantitative and qualitative changes in the haemolymph of penaeids (Crustacea Decapoda). *J. Comp. Physiol.* 159B: 269-273.

van Wormhoudt, A., Le Chavalier, P., Sellos, D. 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine protease with chymotrypsin and collagenolytic activities in a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 103B(3): 675-680.

van Wormhoudt, A., Sellos, D., Donval, A., Plaire-Goux, S. y Le Moullac, G. 1995. Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea; Decapoda). *Experientia.* 51: 159-163.

van Wormhoudt, A., Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., 1996. Caracterización de las tripsinas y amilasas de *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda: Adaptación a la composición del régimen alimenticio. In: Cruz-Suarez, E., Rique, M.D., Mendoza, A.R. (Eds.), Avances en Nutrición Acuicóla III. Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuicóla. 11- 13 Nov. Univ. Auton. Nuevo Leon, Mexico.

Vizioli, J., Catterucia, F., della Torre, A., Reckmann, I. y Muller, H.M. 2001. Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. Eur. J. Biochem. 268: 4027-4035.

Vundla, R.M. y Whitehead, D.L. 1985. An enterokinase in the gut of pharate adult of *Glossina morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae). Acta Trop. 42(1): 79-85.

Ward, C.W. 1975. Properties and specificity of the major anionic trypsin-like enzyme in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. Biochim. Biophys Acta. 23. 391(1): 201-11.

Waterman, T.H. 1960. The physiology of crustacea. In: Metabolism and Growth. Vol.I Academic Press. 669 pp.

Wei, Z., Baggerman, G., Nachman, R.J., Goldsworthy, G., Verhaert, P., De Loof, A., Schoofs, L. 2000. Sulfakinins reduce food intake in the desert locust *Schistocerca gregaria*. J. Insect Physiol. 46(9): 1259-1265.

Whitaker, J.R. 1994. Principles of enzymology for the food science. Marcel Dekker Inc. N.Y. 27pp.

Wicker, C., Puigserver, A. y Scheele. 1984. Dietary Regulation of levels of active mRNA coding for amylase and serine protease zymogen in the rat pancreas. Eur. J. Biochem. 139(2): 381-387.

Xiong, B. y Jacobs-Lorena, M. 1995. The black fly *Simulium vittatum* trypsin gene: characterization of the 5'-upstream region and induction by the blood meal. *Environ. Parasitol.* 81: 363-370.

Yamada, H., Chen, D., Monstein, H.J., Hakanson, R. 1997. Effects of fasting on the expression of gastrin, cholecystokinin, and somatostatin genes and of various housekeeping genes in the pancreas and upper digestive tract of rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 835-838.

Yan, J., Cheng, Q., Li, Ch.-B., Aksoy, S. 2001. Molecular characterization of two serine proteases expressed in gut tissue of the African trypanosome vector, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Mol. Biol.* 10(1): 47-56.

Yuang, X., Zheng, X., Lu, D., Rubin, D.C., Pung, C.Y.M. y Sadler, J.E. 1998. Structure of murine enterokinase (enteropeptidase) and expression in small intestine during developmen. *Am. J. Physiol.* 274 (Gastrointest. Liver Physiol. 37): G342-G349.

Zamolodchikova, T. S., Sokolova, E. A., Lu, D. y Sadler, J. E. 2000. Activation of recombinant proenteropeptidase by duodenase. *FEBS Letters.* 466: 295-299.

Zambonino-Infante, J.L. y Cahu, C. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass. *Fish Physiol. Biochem.* 12: 399-408.

Zwilling, R. y Neurath, H. 1981. Invertebrate proteases. *Methods Enzymol.* 80: 633-664.

Zhu, Y.C. y Baker, J.E. 1999. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhizopertha domenica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29(12): 1053-63.

Zhu, Y.C., Kramer, K.J., Dowdy, A.K. y Baker, J.E. 2000. Trypsinogen-like cDNAs and quantitative analysis of mRNA levels from the indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 30(11): 1027-35.