



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

INCIDENCIA DE LA CATEPSINA D CON FUNCIÓN
DE ENZIMA DIGESTIVA EN LOS CRUSTÁCEOS
DECÁPODOS

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta

DIANA MARTÍNEZ ALARCÓN

La Paz, Baja California Sur, Agosto de 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 12 del Mes de Agosto del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"INCIDENCIA DE LA CATEPSINA D CON FUNCIÓN DE ENZIMA DIGESTIVA EN LOS CRUSTÁCEOS DECÁPODOS"


Presentada por el alumno:

Diana Martínez Alarcón

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

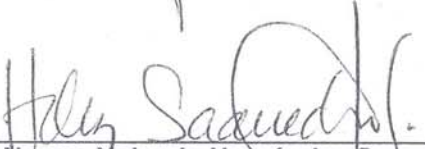
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


Dr. Fernando García Carreño
DIRECTOR DE TESIS


Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
CO-TUTOR


Dr. Arturo Sánchez Paz
CO-TUTOR


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
ENCARGADA DEL DESPACHO DE LA DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR DE TESIS

Dr. Fernando L. García Carreño

Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dra. Adriana Muhlia Almazán

Cotutor

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Dr. Arturo Sánchez Paz

Cotutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Unidad Hermosillo

MIEMBROS DEL JURADO DE LA DEFENSA DE TESIS

Dr. Fernando L. García Carreño

Dra. Adriana Muhlia Almazán

Dr. Arturo Sánchez Paz

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta (suplente)

Incidencia de la catepsina D con función de enzima digestiva en los Crustáceos Decápodos

Resumen

En los crustáceos decápodos, las proteasas digestivas más comúnmente descritas son de la clase serino, sin embargo, estudios recientes reportan la presencia de otras clases de enzimas como las cisteíno proteasas en especies de decápodos Carideos y más recientemente proteasas ácido aspárticas en Astacideos. Dichos hallazgos son evidencia de las diversas estrategias evolutivas de especies del Orden Decápoda para hidrolizar la proteína proveniente de alimento. La presencia de la catepsina D en el jugo gástrico de las langostas del Infraorden Astacidea, suscita preguntas acerca de los procesos de selección que influyeron para que una aspártico proteasa lisosomal participe en la hidrólisis proteica fuera de las célula, y si esto es un rasgo exclusivo del Infraorden Astacidea, o es un rasgo compartido con otros infraórdenes del Orden Decápoda. Dichas preguntas son de interés para entender la evolución del sistema digestivo en decápodos y así mismo conocer más sobre las estrategias digestivas que han utilizado las especies que conforman este orden para sobrevivir a los cambios ambientales durante su historia evolutiva. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la incidencia de la aspártico proteasa catepsina D, con una posible participación en la digestión enzimática de la proteína proveniente del alimento, entre varias especies de decápodos filogenéticamente cercanos al Infraorden Astacidea. La cuantificación de la actividad de esta enzima en varios tejidos y en el jugo gástrico, sugiere que la participación de esta aspártico proteasa en el sistema digestivo no es un rasgo exclusivo del Infraorden Astacidea. Los resultados indican que especies pertenecientes a otros infraórdenes también tienen actividad de catepsina D, la cual es estadísticamente mayor en glándula digestiva y jugo gástrico, lo que sugiere su participación en el sistema digestivo de dichas especies. Por otro lado, las secuencias parciales de ADNc obtenidas a partir de glándula digestiva de las especies analizadas, muestran que la catepsina D está altamente conservada en especies de los Infraórdenes Astacidea y Caridea. Se sugiere que dicha proteína mutó cuando estos dos infraórdenes tuvieron un ancestro en común, lo cual de acuerdo al árbol filogenético propuesto por Porter en el 2005, fue hace aproximadamente 400 millones de años, en el periodo Devoniano de la Era Paleozoica. Sin embargo, debido a que la actividad de catepsina D en glándula digestiva y jugo gástrico de la langosta *Homarus americanus* es estadísticamente mayor a la de otras especies, se sugiere que en esta especie, otros factores postraduccionales y/o pH del jugo gástrico favorecen su elevada actividad.

Palabras clave: catepsina D, evolución, decápodos, enzimas digestivas.



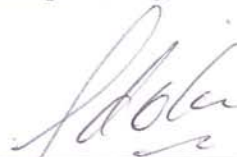
VoBo. Dr. Fernando García Carreño

Incidence of Cathepsin D as a digestive enzyme in Crustacean Decapods

Abstract

In decapod crustaceans, the most described proteases of the digestive system are serine proteases. However, recent studies indicate different strategies for food protein hydrolysis in some caridean decapods, which suggest an important role of other proteases, such as cysteine proteases, in the digestive process of these species. Recently, aspartic proteases have been found in some species of the Infraorder Astacidea. These evidences open questions about the selection processes that may have influenced the presence of a lysosomal aspartic protease, "cathepsin D", in the digestive system of astacidean lobsters, and if the aforementioned condition is unique to the Infraorder Astacidea or is a shared feature among other decapods. These questions are of great interest in order to understand the evolution of digestive system in decapods and increase our knowledge about the different digestive strategies that have been used by decapods to survive environmental changes during their evolutionary history. The main purpose of the current research was to evaluate the distribution of the aspartic protease cathepsin D, associated with a possible digestive function, among decapod crustaceans closely related to the Infraorder Astacidea. Monitoring of cathepsin D activity in three tissues, i.e., midgut gland, muscle and gills, and gastric fluid of 11 decapod species suggest that participation of the aspartic protease cathepsin D in the extracellular digestion is not unique of Astacidea. The results suggest that species from other infraorders have cathepsin D activity. This activity is statistically higher in the midgut gland and gastric fluid than in muscle and gills, and therefore, we suggest participation of the cathepsin D in the digestive system of these species. Additionally, the partial sequences obtained from the midgut gland indicate that cathepsin D is highly conserved in Astacidea and Caridea, but not in other infraorders. These results suggest that cathepsin D could have changed its sequence of nucleotides when these two infraorders had a common ancestor about 400 MYA in the Devonian Period of the Palaeozoic Era, according with the phylogeny proposed by Porter in 2005. However, activity in the digestive gland and gastric fluid of *Homarus americanus* is statistically higher than in the other species that were tested. Therefore, we propose that post-translational modifications, as well as the acid pH of the gastric fluid, should be favouring the activity of cathepsin D in *Homarus americanus*.

Keywords: cathepsin D, evolution, decapods, digestive enzymes.



VoBo. Dr. Fernando García Carreño

A mi papá Oscar Martínez por enseñarme que todo es posible

Agradecimientos:

Agradezco a CONACyT por el financiamiento al proyecto titulado “Las proteinasas ácidas digestivas e intracelulares de crustáceos” número 000000000177954, sin el cual esta investigación no hubiera sido posible, así como por la beca de maestría número 487864.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. como institución receptora de los estudios de Posgrado.

A mi director de tesis el Dr. Fernando García Carreño por su asesoría durante toda mi maestría y por la oportunidad de conocer la ciencia en un ámbito internacional, así como a mis asesores la Dra. Adriana Muhlia Almazán y el Dr. Arturo Sánchez Paz por su apoyo y guía y sembrar en mi nuevas dudas en el trascurso de la investigación.

Parte de este proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Alfred Wegener Institute en Bremerhaven, Alemania, por lo cual también quiero agradecer, y a los apoyos proporcionados por el CIBNOR con el proyecto POSG capítulo 43901 para el boleto de avión del 8 al 31 de Marzo del 2013, así como a la beca Mixta por parte de CONACyT con número de solicitud 201303477.

Al Dr. Reinhard Saborowski por su asesoría constante y abrirme las puertas de su laboratorio.

A la Dra. Liliana Rojo Arreola porque sin ser parte de mi comité tutorial me brindo su asesoría invaluable y se mantuvo en contacto en todo momento.

A la Técnico María de los Ángeles Navarrete del Toro porque me brindo las herramientas para poder trabajar en otros laboratorios y me brindo un abrazo aquellos días en los que más lo necesite.

Al técnico Kristine Reuter por su apoyo en mis estancias en AWI y por su amistad.

A Ira Fogel por su asesoría con el inglés, pero sobre todo por su apoyo durante mi maestría.

A Patricia Hernández por mostrarme un poco del mundo de la biología molecular, a Julio Córdova por brindarme la herramienta para escribir esta tesis.

A Iván porque me recuerda la emoción que se siente entrar en el mundo de la ciencia.

A Claudia, Betsi, Balam y Maggy por que juntos compartimos momentos difíciles y aprendimos de la vida.

A mis amigos Javier, Coral, López, Luis, Jessika, Ivett por que en los momentos difíciles siempre han estado a mi lado y parte de mis logros se los debo a ellos.

A Paloma, Paulina, Anita, Adrian, José, Emiliano, Tania y Paty por su amistad y por permitir que mi estancia en la Paz fuera placentera.

A Lauris, Nelly, Georgina, Iara, Gonzalo, Roi, Bennit, Roman y Kim por su Amistad y por compartir momentos tan maravillosos en Bremerhaven.

A Ruben y Rosalia Martinez porque sin su apoyo nada de esto sería posible.

A mi mamá y a mis hermanas, Nadia y Dania, porque son lo más importante de mi vida.

A Christopher Castellani, por sus contantes asesorías en estadística y filogenia, pero sobre todo por apoyarme en cada paso que doy y hacerme tan feliz.

CONTENIDO	
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE TABLAS.....	III
LISTA DE FORMULAS.....	III
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Síntesis de la catepsina D.....	4
2.2 Los Decápodos.....	5
2.3 Sistema digestivo de los Crustáceos.....	6
2.4 Pregunta científica.....	10
3. JUSTIFICACIÓN.....	10
4. OBJETIVO GENERAL.....	10
4.1 Objetivos específicos.....	11
5. HIPÓTESIS.....	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
6.1 Obtención de muestras.....	11
6.2 Cuantificación de actividad de la catepsina D.....	13
6.3 Detección del ARNm de la catepsina D1 en la glándula digestiva, músculo y branquias.....	14
6.4 Secuenciación de fragmentos del ADNc de catepsina D.....	16
6.5 Análisis estadísticos.....	16
6.6 Análisis de agrupación de secuencias parciales de ADNc por cladograma.....	16
7. RESULTADOS.....	17
7.1 Actividad de la catepsina D en diferentes tejidos de decápodos.....	17
7.2 Expresión génica de la catepsina D en diferentes tejidos de decápodos.....	20
7.3 Secuencias parciales del ADNc de catepsina D de glándula digestiva.....	22
7.4 Secuencias parciales del ADNc de catepsina D de músculo y branquias.....	24
8. DISCUSIÓN.....	28
8.1 Actividad de catepsina D en diferentes tejidos de decápodos.....	28
8.2 Expresión génica de catepsina D en diferentes tejidos de decápodos.....	30
8.3 Análisis de las secuencias parciales del ADNc de la catepsina D en la glándula digestiva de decápodos y de sus relaciones filogenéticas.....	31
8.4 Análisis de secuencias parciales de ADNc de catepsina D en músculo y branquias de decápodos y de sus relaciones filogenéticas.....	32
9. CONCLUSIONES.....	33
10. LITERATURA CITADA.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Puentes de hidrógeno y la molécula de agua involucrados en la catálisis de las proteasas ácido aspárticas.....	2
Figura 2. Representación gráfica del proceso de maduración de la catepsina D de humano.....	4
Figura 3. Representación gráfica de la participación de enzimas en el proceso de maduración de la catepsina D en humanos.....	5
Figura 4. Árbol filogenético de los decápodos propuesto por Porter en el 2005.....	6
Figura 5. Inhibición de cisteino y serino proteasas en glándula digestiva de decápodos.....	8
Figura 6. Actividad enzimática a pH 3, en jugo gástrico de decápodos.....	9
Figura 7. Identificación tejido-específica de los transcritos de catepsina D1 y D2 en tejidos de las langostas <i>H. gammarus</i> y <i>H. americanus</i>	9
Figura 8. Obtención de muestras en la langosta <i>P. interruptus</i>	13
Figura 9. Actividad de la catepsina D en diferentes tejidos de decápodos, comparación entre especies.....	18
Figura 10. Actividad de la catepsina D en tejidos y jugo gástrico de decápodos, comparación entre tejidos.....	19
Figura 11. Transcritos de catepsina D1 y catepsina D2 en glándula digestiva, músculo y branquias de decápodos.....	21
Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias de catepsina D de la glándula digestiva.....	23
Figura 13. Cladograma construido con las secuencias parciales de la catepsina D de la glándula digestiva.....	24
Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencia de la catepsina D1 de <i>H. americanus</i> con las secuencias parciales de la catepsina D de músculo de las especies estudiadas.....	25
Figura 15. Cladograma construido con las secuencias parciales de ADNc de la catepsina D de músculo de las especies estudiadas y glándula digestiva de <i>H. americanus</i>	26
Figura 16. Alineamiento múltiple de secuencia de la catepsina D1 de <i>H. americanus</i> con las secuencias parciales de la catepsina D de branquias de las especies estudiadas.....	27
Figura 17. Cladograma construido con las secuencias parciales de ADNc de la catepsina D de branquias de las especies estudiadas y glándula digestiva de <i>H. americanus</i>	27

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Resumen de especies muestreadas.....	12
Tabla II. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para los análisis de PCR y para la secuenciación de ADNc de la catepsina D1.....	15
Tabla III. Porcentaje de similitud entre secuencias obtenidas y la secuencia de <i>H. americanus</i>	28

LISTA DE FORMULAS

Formula (1). Para calcular las unidades de catepsina D.....	14
Formula (2). Para calcular la actividad de catepsina D.....	14

1. INTRODUCCIÓN

Los cambios evolutivos son resultado de la selección natural, en donde aquellos individuos que cuentan con la combinación más apropiada de caracteres para interactuar con el medio ambiente, serán los que tengan una mayor oportunidad de sobrevivir y por lo tanto heredar dichos caracteres a su descendencia (Mayr, 1978).

Actualmente se cuenta con varias propuestas sobre la filogenia de los decápodos, las cuales están basadas en la morfología de las especies y más recientemente en marcadores moleculares (Porter et al., 2005; Tsang et al., 2008) o en ambas (Bracken-Grissom et al., 2014; Bracken-Grissom et al., 2013). Sin embargo, la información sobre enzimas digestivas durante la historia evolutiva de los decápodos es muy escasa, desconociéndose si se han producido cambios en este subfilo sobre la síntesis y expresión de las enzimas digestivas. Surgiendo preguntas como: ¿si al estar presentes en un ancestro común, las enzimas digestivas de crustáceos han mantenido la estructura y función a medida que las especies han divergido o se han modificado junto con las especies? ¿Han ocurrido eventos de duplicación y divergencia durante el proceso evolutivo de dichas enzimas, tal como ha sucedido en las serino proteasas de algunos grupos taxonómicos de eucariotas? (Neurath, 1984)

Si bien no se sabe con certeza cuando surgieron las proteasas digestivas, se presume que estas aparecieron por vez primera en fases tempranas de la evolución biológica, ya que incluso los organismos unicelulares debieron requerir de ellas para la obtención de aminoácidos del ambiente y para el metabolismo de sus propias proteínas. Debido a que la evolución biológica ocurre de manera continua modificando formas simples a complejas, se podría esperar que durante el curso de la evolución aquellas proteasas que en un principio tenían una función simple, con el paso del tiempo han adquirido tareas más específicas y complejas en la regulación de la fisiología (Neurath, 1984). Esta investigación se basa en el estudio de una aspártico proteasa intracelular, que se asume en algún momento de la evolución de los decápodos adquirió una nueva función como enzima digestiva. El objetivo de este trabajo fue estudiar la incidencia de la aspártico proteasa, catepsina D, con una posible participación en la hidrólisis de proteína del alimento, en especies de decápodos relacionadas filogenéticamente a las langostas queladas *Homarus americanus* (Milne-Edwards, 1837) y

Homarus gammarus (Linnaeus, 1758). El alcance de este proyecto y la información aquí generada servirá para incorporar nuevo conocimiento sobre la evolución del sistema digestivo de los decápodos.

Las proteasas (EC 3.4.21-24 y 3.4.99) son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, estas incluyen proteinasas y peptidasas en cuyos sitios catalíticos ciertos aminoácidos cumplen la función de nucleófilos y otros como donadores de protones (Saxena, 2004).

Las proteasas ácido aspárticas comprenden un grupo pequeño en comparación a otros grupos como las serino-, cisteino- y metalo-proteasas (Ghosh, 2009). En el humano se sabe que existe un total de 553 proteasas, 21 son aspártico, 176 serino, 143 cisteino y 186 metalo (Puente et al., 2003). Las aspártico proteasas se caracterizan por tener un mecanismo enzimático en el que la unión con el sustrato involucra de 7 a 8 aminoácidos, el sitio activo está localizado en la interface en donde los dominios N-terminal y C-terminal se encuentran. En dicha interface están los dos residuos de ácido aspártico (Asp) del sitio catalítico, en los motivos consenso Asp-Thr / Ser-Gly-Thr /Ser. Los grupos carboxilo de los dos residuos de Asp se encuentran próximos y están unidos entre sí por una molécula de agua en el mismo plano (Figura 1) (Wlodawer et al., 2013).

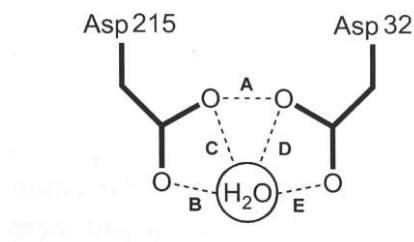


Figura 1. Puentes de hidrógeno y la molécula de agua involucrados en la catálisis de las proteasas ácido aspárticas.

Gracias a su capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos, las proteasas ácido aspárticas participan en diversos procesos fisiológicos como la activación de precursores de proteínas catalíticas y no catalíticas (Jeffrey-Tri, 2008), la hidrólisis de proteína proveniente del

alimento, la regulación de apoptosis, y el procesamiento de activadores e inhibidores de enzimas (Benes et al., 2008).

El término catepsina del griego *Kathepsin* (khata y hepsein), que significa digerir, fue introducido en 1929 para designar de manera general a las proteasas intracelulares que son activas a pH ácido (Fusek et al., 2013). Posteriormente, el término catepsina D fue introducido en 1960 para designar a una peptidasa intracelular formada por dos cadenas polipeptídicas que hidroliza proteínas a un pH de 3.5 a 5.0; esta enzima tiene un mecanismo catalítico y estructura tridimensional similar a la pepsina, por ende pertenece a la misma familia y se encuentra de manera constante en los lisosomas. Al igual que otras proteínas celulares, las proteasas lisosomales son reguladas a fin de permitir a la célula responder a los cambios fisiológicos (Brix, 2005). En los humanos, la catepsina D se considera la principal aspártico proteasa en lisosomas (Laurent-Matha et al., 2006) y se cree desempeña un papel importante en la fisiología y en la patología (Fusek et al., 2013). Inicialmente, a la catepsina D se le atribuía únicamente función en la digestión intracelular, sin embargo, esto ha cambiado durante la última década debido a la evidencia acumulada que sugiere que la catepsina D también desempeña un papel en la digestión extracelular de las langostas del género *Homarus* (Rojo et al., 2010a).

2. ANTECEDENTES

2.1 Síntesis de catepsina D

La catepsina D es sintetizada como precursor que requiere ser activado por hidrólisis limitada para adoptar su forma madura. Una vez sintetizado en el retículo endoplasmático rugoso, el precursor de la catepsina D se dirige al complejo de Golgi gracias al prepro péptido que pierde, el cual se conoce como péptido señal. En el complejo de Golgi, aún como propéptido o zimógeno, adquiere una manosa-6-fosfato (M6P) (Figura 2) (Nicotra et al., 2010) que auxiliará posteriormente a los endosomas a que la conduzcan a los lisosomas en donde, bajo demanda, adoptará su forma madura. Una vez en los lisosomas, y por acción de las cisteíno proteasas catepsina B o catepsina L, se obtiene una enzima madura de dos cadenas, la cual consiste en un dominio amino-terminal de 14 kDa (o cadena ligera) y un dominio carboxilo-terminal de 34 kDa (o cadena pesada), en esta última etapa también participan amino y carboxil peptidasas para remover algunos aminoácidos de la cadena pesada (Figura 3) (Laurent-Matha et al., 2006).

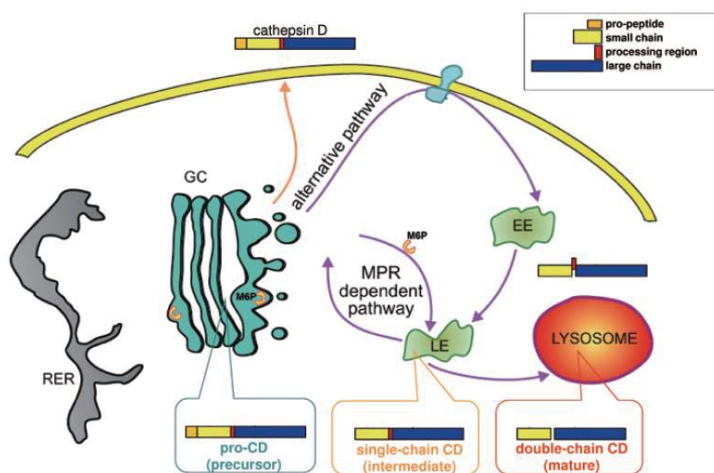


Figura 2. Representación gráfica del proceso de maduración de la catepsina D de humanos (Nicotra et al., 2010).

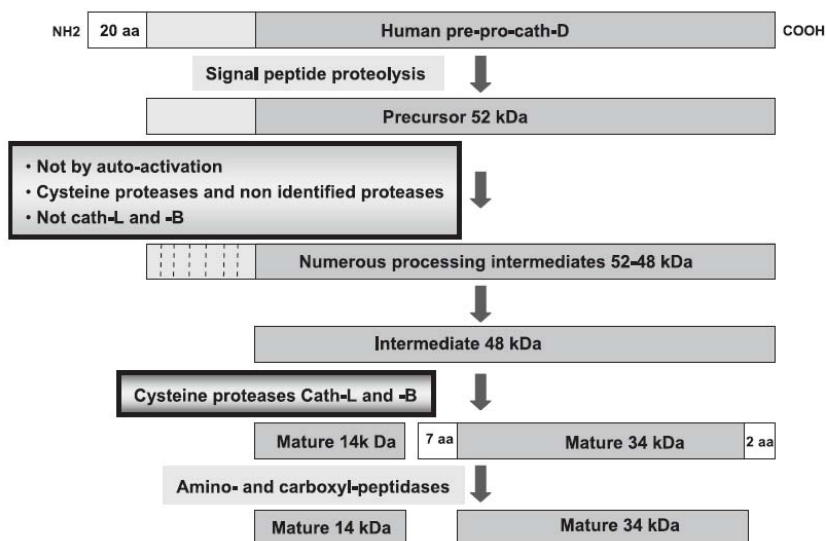


Figura 3. Representación gráfica de la participación de enzimas en el proceso de maduración de la catepsina D en humanos (Laurent-Matha et al., 2006).

2.2 Decápodos

Los decápodos son crustáceos que poseen órganos digestivos anatómicamente similares. En el orden de los decápodos se ha descrito 8,500 especies, lo cual representa el 33% de las especies conocidas de crustáceos (Barnes, 1987). Los decápodos tienen una extensa distribución geográfica (Holthuis, 1980, 1991) y cuentan con una amplia variedad de estrategias para la ingestión y digestión del alimento disponible (Rojo, 2010). Las especies del Orden Decápoda se clasifican a su vez en subórdenes e infraórdenes. En cuanto a su historia evolutiva, se han descrito varias propuestas en donde se examinan las relaciones filogenéticas entre crustáceos. Dichas propuestas están basadas en características morfológicas y más recientemente en marcadores moleculares como el reportado por (Porter et al., 2005), quienes proponen un tiempo de divergencia para los diferentes infraórdenes (Figura 4). Sin embargo, y pese al esfuerzo de varias líneas de investigación, no se ha logrado alcanzar un consenso respecto a la historia evolutiva de los decápodos. Actualmente se considera que el proceso de diversificación de los crustáceos comenzó en el periodo Cámbrico (Burmester, 2001), no obstante, los cambios que ha tenido este subfilo, en lo relativo a la estructura y función de proteínas, han sido escasamente estudiados. Existen reportes de proteínas de crustáceos que

derivan de un ancestro común por evolución divergente, como es el caso de las hemocianinas (Burmester, 2001) o proteínas fluorescentes (Shagin et al., 2004), este pudiera ser también ser el caso de las proteasas aspárticas.

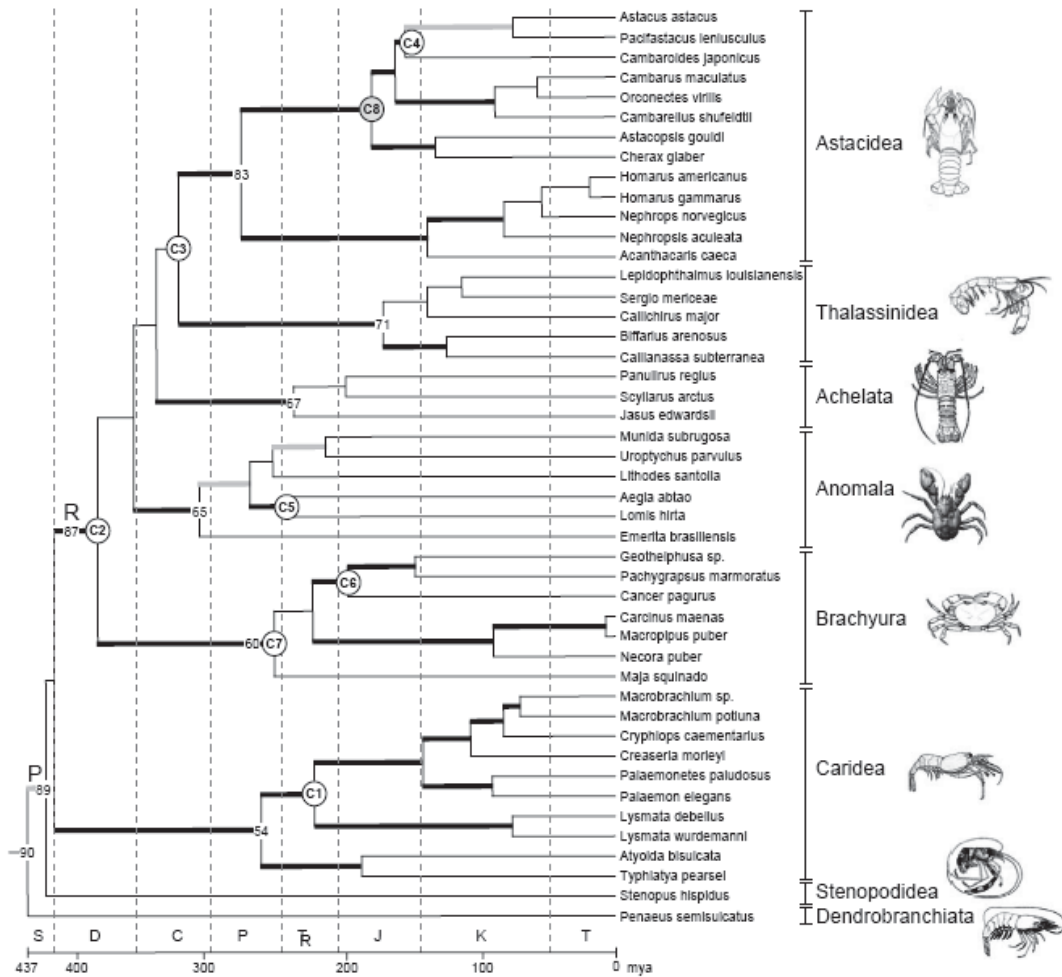


Figura 4. Árbol filogenético de los decápodos (Porter et al., 2005). Especies (izquierda) y el infraorden al que pertenecen (derecha).

2.3 Sistema digestivo de los crustáceos

En los decápodos, la glándula digestiva, o hepatopáncreas, tiene la función de absorción y almacenamiento de nutrientes, así como la síntesis de enzimas digestivas (Vogt, 1994). En este órgano se encuentran células especializadas con diferentes funciones, por ejemplo, los nutrientes son absorbidos por las células R, mientras que las células F y B participan en la síntesis y secreción holocrina de enzimas, por lo que el contenido celular es vertido en el lumen del hepatopáncreas. Las enzimas digestivas son sintetizadas en las células F y almacenadas en vacuolas, posteriormente las células F se convierten en células B cuando las vacuolas son lo suficientemente grandes. Las células B son las que secretan el contenido vacuolar rico en enzimas, las cuales pasan a formar parte del jugo gástrico (Loizzi, 1970).

Las enzimas proteolíticas hidrolizan proteína proveniente del alimento, estas enzimas son secretadas como respuesta al estímulo producido por la ingesta de alimento (Muhlia-Almazan y García-Carreño, 2003). Los decápodos sintetizan enzimas digestivas complementarias como exoproteasas y endoproteasas, las cuales utilizan para obtener aminoácidos de la proteína proveniente de los alimentos. Las endoproteasas han recibido mayor atención debido a que, además de ser digestivas, están involucradas en el metabolismo general (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997). En los decápodos, las proteasas digestivas más comúnmente descritas son de la clase serino, como la tripsina y la quimotripsina, sin embargo, en la última década se ha reportado la presencia de cisteíno proteasas en decápodos Astacideos (Laycock et al., 1989), y más recientemente en decápodos Carideos (Teschke y Reinhard, 2005), mientras que en decápodos pertenecientes a los Infraórdenes Branchyura y Euphausiacea predominan las serino proteasas (Figura 5).

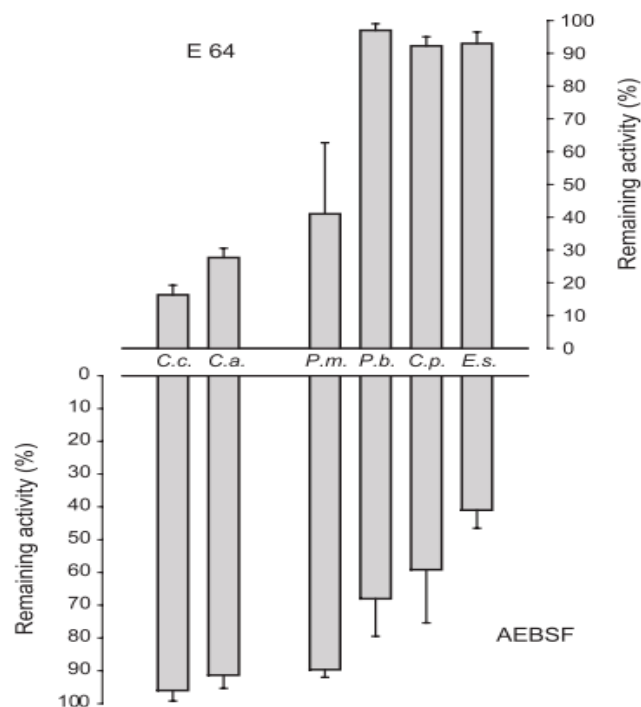


Figura 5. Actividad residual de cisteino y serino proteasas en glándula digestiva de decápodos, usando el inhibidor E64 específico para cisteino proteasas y el inhibidor AEBSF específico para serino proteasas (Teschke y Reinhard, 2005).

Una evidencia más que muestra que los decápodos crustáceos utilizan diferentes estrategias para hidrolizar proteína proveniente del alimento, es la presencia de proteasas con actividad a pH ácido de la clase aspártico en langostas del género *Homarus* (Figura 6) (Navarrete del Toro et al., 2006). Lo anterior ha generado un gran interés en la identificación de estas enzimas y en conocer el papel que desempeñan fuera de la célula. Varios estudios se han realizado, con el objetivo de purificar e identificar las proteasas aspárticas provenientes del jugo gástrico de las langostas *H. americanus* y *H. gammarus*; los resultados obtenidos de la comparación de las secuencias amino terminal de la proteína y de la proteína deducida de la secuencia de ADNc confirmaron que se trata de una enzima tipo catepsina D (Rojo, 2010). En dicho trabajo se obtuvieron las secuencias completas del ADNc de dos isoenzimas

aspártico proteasas, la catepsina D isoenzima 1 (CatD1; GenBank: CN852987) y la catepsina D isoenzima 2 (CatD2; GenBank: FD483089). El ARNm de la catepsina D1 se detectó únicamente en glándula digestiva de ambas especies de langostas, lo cual sugiere su función como enzima digestiva, mientras que el ARNm de la catepsina D2 se detectó tanto en glándula digestiva como en gónadas y músculo (Figura 7). Esta información confirmó la presencia de dos isoenzimas de catepsina D en las langostas del género *Homarus* (Rojo et al., 2010a).

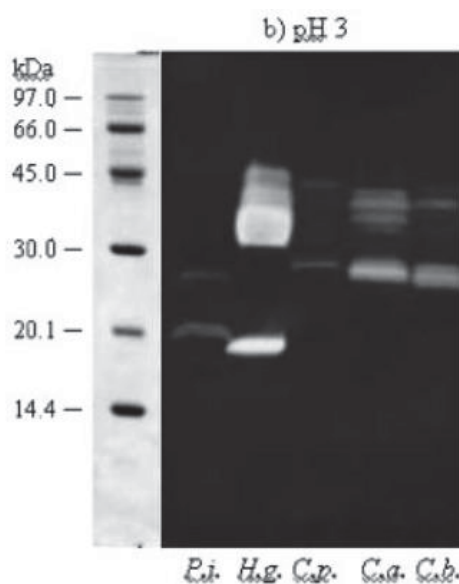


Figura 6. Actividad enzimática a pH 3, de las langostas *Panulirus interruptus* (*P.i.*), *H. gammarus* (*H.g.*) y los cangrejos *Cancer pagurus* (*C.p.*), *Callinectes arcuatus* (*C.a.*), *Callinectes bellicosus* (*C.b.*) en jugo gástrico (Navarrete del Toro et al., 2006).

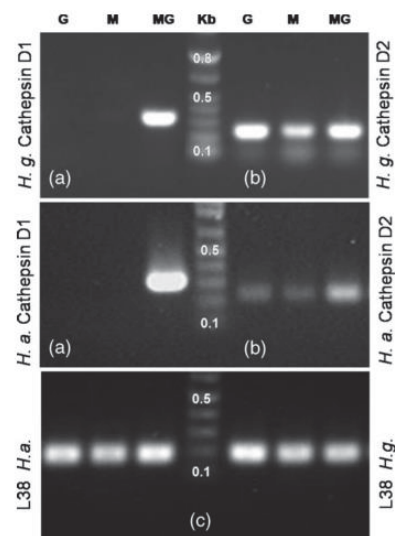


Figura 7. Identificación tejido específico de los transcritos de catepsina (a)D1 y (b)D2 en la gónada, el músculo y la glándula digestiva de *H. gammarus* (*H.g.*) y *H. americanus* (*H.a.*) (Rojo et al., 2010a).

Los genes de la catepsina D1 y la catepsina D2 son parálogos (Rojo, 2010), resultado de una duplicación y mutación de uno. La duplicación de genes es uno de los principales eventos de la evolución genómica y puede dar como resultado la aparición de nuevas funciones (Koonin, 2005). Un proceso de duplicación de genes y posteriores mutaciones fue lo que pudo dar lugar a la aparición de una aspártico proteasa en el sistema digestivo de las langostas queladas (Rojo, 2010). La presencia de esta aspártico proteasa en el jugo gástrico suscita preguntas

acerca de los procesos de selección que pudieron haber influido en la participación de esta enzima en el sistema digestivo de las langostas queladas (Rojo et al., 2010a).

El objetivo del presente trabajo es investigar si la aspártico proteasa catepsina D, participa en la hidrólisis de proteína proveniente del alimento, en crustáceos decápodos filogenéticamente cercanos al Infraorden Astacidea, o si este es un rasgo único en el género *Homarus*. Con la información generada en esta investigación se pretende conocer más sobre la evolución del sistema digestivo de los decápodos, así como incrementar el conocimiento sobre las estrategias digestivas que han utilizado los miembros de este Orden para sobrevivir a cambios ambientales durante su historia evolutiva.

2.4 Pregunta científica

¿Existen otros infraórdenes pertenecientes al Orden Decápoda, además del Astacidea, que expresen la catepsina D con funciones digestivas?

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a su importancia económica y a la gran diversidad biológica que presenta el grupo de los decápodos, en las últimas décadas se les ha considerado un modelo de estudio muy recurrente. Sin embargo, aún no se han desarrollado estudios que aporten conocimiento sobre la evolución del sistema digestivo, o sobre el uso de enzimas proteolíticas utilizadas por este taxón a través de su historia evolutiva. La investigación aquí planteada pretende aportar información sobre la evolución del sistema digestivo en decápodos, mediante el estudio de la fisiología y la bioquímica de la digestión de proteínas, lo que contribuirá en el entendimiento de algunos aspectos ecológicos y evolutivos de este taxón.

4. OBJETIVO GENERAL

Investigar la incidencia de la catepsina D con función digestiva en el Orden Decápoda.

4.1 Objetivos específicos

- Cuantificar la actividad de catepsina D en la glándula digestiva, el jugo gástrico, el músculo y las branquias de especies pertenecientes al Orden Decápoda.
- Detección del ARNm de catepsina D1 en la glándula digestiva, el músculo y las branquias de especies pertenecientes al Orden Decápoda.

5. HIPÓTESIS

Si la aspártico proteasa, catepsina D, participa como enzima digestiva en especies del Infraorden Astacidea, entonces decápodos que comparten un ancestro común, presentaran la misma característica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de muestras

La obtención de muestras se logró gracias a las facilidades provistas por el Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste (CIBNOR, La Paz, BCS, México) y el Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research (AWI, Bremerhaven, Alemania). Se incluyeron 11 especies de decápodos de las cuales el camarón *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758), la langosta *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758), el cangrejo de río europeo *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758), el cangrejo de puerto *Liocarcinus depurator* (Linnaeus, 1758), el camarón rosado *Pandalus montagui* (Leach, 1814), el cangrejo ermitaño *Pagurus bernhardus* (Linnaeus, 1758) y el cangrejo café *Cancer pagurus* (Linnaeus, 1758) fueron colectadas por el barco de pesca del Alfred Wegener Institute en Septiembre del 2013, el cual los obtuvo en un área próxima a la isla Helgoland en Alemania (Mar del Norte, 54°11'N, 7°55'E). Los especímenes fueron inmediatamente transferidos al laboratorio para su muestreo. Por su parte, el camarón patiblanco *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) y la jaiba *Callinectes bellicosus* (Stimpson, 1859) se obtuvieron en la costa del Pacífico Mexicano y

en el Golfo de California en Agosto y Septiembre del 2013 con ayuda del personal de CIBNOR. Los especímenes de la langosta roja de California *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) y la langosta americana *H. americanus* se obtuvieron a través de una casa comercial en Febrero y Mayo del 2014, respectivamente (Tabla I).

Tabla I. Resumen de especies muestreadas

Subórden	Infraórden	Especie	Origen	Fecha de muestreo
Dendrobranchiata	Penaeid	<i>Penaeus vannamei</i> (P.v)	Pacifico, BCS, México	Oct. 2013
Pleocyemata	Caridea	<i>Pandalus montagui</i> (P.m)	Mar del Norte, Alemania	Sep. 2013
Pleocyemata	Caridea	<i>Crangon crangon</i> (C.c)	Mar del Norte, Alemania	Sep. 2013
Pleocyemata	Brachyura	<i>Liocarcinus depurator</i> (L.d)	Mar del Norte, Alemania	Sep. 2013
Pleocyemata	Brachyura	<i>Callinectes bellicosus</i> (C.b)	Golfo de Cal, BCS, México	Sep. 2013
Pleocyemata	Anomura	<i>Pagurus bernhardus</i> (P.b)	Mar del Norte, Alemania	Sep. 2013
Pleocyemata	Anomura	<i>Cancer pagurus</i> (C.p)	Mar del Norte, Alemania	Sep. 2013
Pleocyemata	Palinura	<i>Panulirus interruptus</i> (P.i)	Pacifico, BCS, México	Feb. 2014
Pleocyemata	Astacidea	<i>Astacus astacus</i> (A.a)	Mar del Norte, Alemania	Sep. 2013
Pleocyemata	Astacidea	<i>Nephrops norvegicus</i> (N.n)	Mar del Norte, Alemania	Sep. 2013
Pleocyemata	Astacidea	<i>Homarus americanus</i> (H.a)	Costa atlántica de Canadá	May 2014

Para la obtención del jugo gástrico se utilizó una jeringa desechable con una sonda de plástico flexible en lugar de aguja. La sonda se introdujo por la boca hasta la cámara gástrica, en donde se extrajo el jugo gástrico por succión. El jugo gástrico se almacenó en microtubos a -80 °C para su posterior uso.

Una vez obtenido el jugo gástrico, se disectaron los siguientes tejidos: glándula digestiva, músculo y branquias (Figura 8). Las muestras se dividieron en dos microtubos, en el primero se colocó la porción de las muestras destinadas a la evaluación de la actividad enzimática y en el segundo microtubo, el cual contenía 500 µL de RNAlater, se colocaron las muestras destinadas a extracción de ARN.

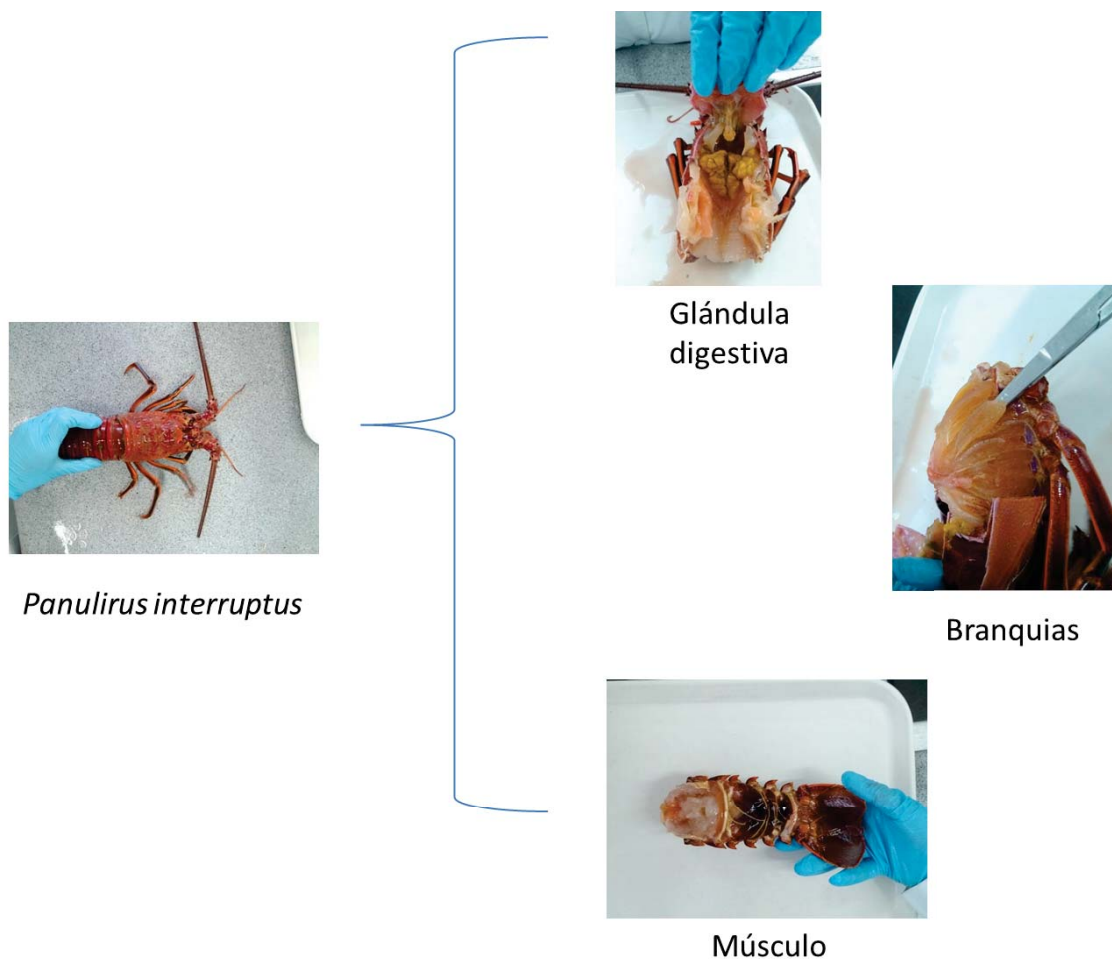


Figura 8. Muestreo de tejidos en la langosta roja de California *P. interruptus*.

6.2 Cuantificación de actividad de catepsina D

Las muestras de jugo gástrico se descongelaron y centrifugaron a 10,000 x g por 30 min a 4 °C para separar los sólidos. El sobrenadante se dividió en submuestras y una de ellas se utilizó para el ensayo de actividad, el resto de las muestras se almacenó a -80 °C.

Las muestras de la glándula digestiva, músculo y branquias se descongelaron, y el tejido se homogeneizó utilizando un sonicador. Posteriormente, el extracto celular se centrifugó a 10,000 x g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante, con el extracto enzimático, se transfirió a un

tubo nuevo. El contenido de proteína se cuantificó por el método de (Bradford, 1976). Una vez hecho esto se almacenaron las muestras a -80 °C.

Para cuantificar la actividad proteolítica de la catepsina D se utilizó el sustrato fluorogénico 7-methoxycoumarin-4-acetyl-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-amide (M0938, Sigma-Aldrich, Alemania) en amortiguador 50 mM de acetato de sodio a pH 4.0. La tasa de hidrólisis fue registrada por el incremento en unidades relativas de fluorescencia (RFU) a longitud de onda de excitación y emisión de 320 y 380 nm, respectivamente. Se construyó una curva de calibración midiendo la fluorescencia de concentraciones conocidas del fluorocromo 7-methoxycoumarin-4-acetic acid (MCA) (235199, Sigma-Aldrich, USA) y se graficaron las unidades relativas de fluorescencia contra la concentración del MCA. Una vez hecho esto, se calcularon las unidades de catepsina D presentes en la muestra con la fórmula (1). La actividad de catepsina D se expresó en nmol de MCA liberados por min por mg de proteína (2).

$$\frac{units}{ml} = \frac{FLU}{T} * \frac{D}{Venz} * \frac{1}{FLU(1nmol)}$$

Formula (1). Ecuación para calcular las unidades de catepsina D

$$\text{Actividad de catepsina D} = (\text{units/ml})/\text{mg de proteína}$$

Formula (2). Ecuación para calcular la actividad de catepsina D

6.4 Detección del ARNm de catepsina D1 en la glándula digestiva, el músculo y las branquias

Se obtuvieron 30 mg de cada uno de los tejidos almacenados en RNAlater y se homogeneizaron utilizando el kit Precellys keramik-kit 1.4 (91-PCS-CKM, PEQLAB, Alemania). A continuación, las muestras se centrifugaron a 13,000 x g por 3 min. Del sobrenadante obtenido se extrajo el ARN total usando el Kit RNeasy Mini Kit Spin Columns (7410, QIAGEN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ARN

total se cuantificó espectrofotométricamente a través de la absorbancia a 260 nm y la pureza se midió con la relación 260/280. Posteriormente, el ADN genómico fue removido utilizando el kit DNAsa-I (AMPD1, Sigma-Aldrich, USA) 15 μ L a 25 °C por 15 min.

Un μ g de ARN total se usó para la síntesis del ADN complementario (ADNc) utilizando el sistema de transcripción reversa (A3500, Promega, WI), y un oligo-dT, siguiendo las recomendaciones del fabricante en reacciones de 20 μ L. La presencia del ARNm de las catepsinas D1 y D2 fue evaluada mediante PCR punto final. Las muestras de ADNc fueron usadas como templado (1 μ L) en las reacciones de PCR, con oligonucleótidos específicos diseñados con base en las secuencias reportadas de catepsina D1 y D2 (tabla II) (Rojo et al., 2010a). La amplificación del ADNc por PCR se llevó a cabo en reacciones con un volumen final de 12 μ L usando la mezcla GoTaq® Green Master Mix (M7122, Promega, USA). El programa de síntesis consistió en 2 min a 94 °C, 35 ciclos con 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de alineación a 59 °C y 30 s de extensión a 68 °C, con una extensión final adicional a 68°C por 5 min. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa 1.5% bajo luz UV.

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para obtención de la secuencia parcial de transcritos.

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA 5' A 3'	GEN
CATD 1 FORWARD	CTCAGTACTACGGCCCCATC	Catepsina D1
CATD 1 REVERSE	CCSAGGATGCCGTCYAACTT	Catepsina D1
CATD 2 FORWARD	AAAATGGGGAAATCGAGGAC	Catepsina D2
CATD 2 REVERSE	TGGATGGCAAATCAGTTCC	Catepsina D2

6.4 Secuenciación de fragmentos del ADNc de catepsina D

A partir de los productos de PCR obtenidos anteriormente, se hizo la extracción de fragmentos de ADNc con el Kit peqGold (12-2500-02, PEQLAB, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se verificó la pureza y concentración del ADNc espectrofotométricamente. Con la intención de obtener fragmentos de diferentes longitudes para su posterior secuenciación, se realizó un segundo PCR, utilizando el kit BigDye Terminador V 3.1 Cycle sequencing (4336923, Applied Biosystems, USA), el cual contiene dNTPs y ddNTPs “dideoxynucleotides” marcados fluorescentemente. Debido a la falta del OH en el carbono 3 prima, una vez añadidos estos ddNTPs, ningún otro dNTP puede ser incorporado a la cadena. Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados para CatD1 forward y reverse (Tabla II). El programa de síntesis consistió en 1 min a 96 °C, 30 ciclos con 10 s de desnaturalización a 96 °C, 5 s de alineación a 50 °C y 4 min de extensión a 60 °C finalizando con 15 °C por 5 min. Los productos fueron tratados con el Kit DyeEx (QIAGEN, 63204, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante para remover los terminadores dye que no se incorporaron y finalmente se almacenó la muestra a -20 °C. Los productos obtenidos se secuenciaron en el departamento de Chemical Ecology en el Alfred Wegener Intitute en Bremerhaven, Alemania.

6.5 Análisis estadísticos

Mediante la prueba de Levene se verificó que los datos de actividad obtenidos tuvieran una distribución normal y homogeneidad de varianzas. Se hicieron análisis para determinar si había diferencias significativas en actividad enzimática entre las especies o entre los tejidos estudiados. Se utilizaron el ANOVA cuando el supuesto de homocedasticidad se cumplió, y la prueba paramétrica de Welch cuando este supuesto no se cumplió. Posterior a ello se realizó la prueba de diferencias de medias de Tukey. Todo lo anterior se realizó en el software PAST, versión 3.0. Se consideró que hay significancia estadística cuando $p < 0.05$.

6.6 Análisis de agrupación de secuencias parciales de ADNc por cladograma

Se utilizó el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1990) para conocer la identidad de las secuencias obtenidas. El alineamiento de las secuencias fue realizado en el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)(Larkin et al., 2007). En base a esta comparación se realizó un análisis filogenético de las especies estudiadas usando el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013). Se construyeron cladogramas con las secuencias parciales aplicando el método “Máxima verosimilitud” basado en el modelo descrito por Jukes y Cantor (1969). El árbol inicial de la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando los algoritmos “Neighbor-joining y BioNJSe”. Lo anterior fue soportado estadísticamente por un análisis “bootstrap” basado en 10,000 réplicas.

7. RESULTADOS

7.1 Actividad de catepsina D en diferentes tejidos de decápodos

Se evaluó la actividad de la catepsina D con el sustrato fluorogénico en la glándula digestiva, el músculo y las branquias de las especies enlistadas (Tabla I), y en el jugo gástrico de *H. americanus*, *A. astacus*, *C. pagurus*, *L. depurator*, *P. bernhardus*, *C. bellicosus* y *P. interruptus*. Cuando se analizaron los datos obtenidos de actividad en jugo gástrico y glándula digestiva en las diferentes especies, se observó una distribución normal, sin embargo el supuesto de homocedasticidad no se cumplió por lo que los datos fueron analizados con la prueba de Welch, seguido por una prueba de Tukey. Al analizar los diferentes tejidos en cada una de las especies, los datos obtenidos mostraron distribución normal y si se cumplió el supuesto de homocedasticidad por lo tanto se utilizó un ANOVA seguido por una prueba de Tukey.

En la Figura 9 se representa la actividad de catepsina D en: (a) el jugo gástrico, (b) la glándula digestiva, (c) el músculo y (d) las branquias de la especie antes mencionadas, de manera que se puede hacer una comparación. En las Figuras 9a y 9b podemos observar que todas las especies analizadas tiene actividad de catepsina D en el jugo gástrico y la glándula digestiva. La actividad en *H. americanus* es estadísticamente mayor en comparación con las otras especies en el jugo gástrico y en la glándula digestiva ($p < 0.05$), sin embargo, en el músculo y las branquias la actividad registrada es casi nula en esta especie de langosta. Las Figuras 9c y 9d muestran la actividad de catepsina D en el músculo y branquias, en donde de manera general, las unidades de actividad son aproximadamente dos ordenes de magnitud menores en comparación con lo registrado en el jugo gástrico, lo cual indica una actividad menor en órganos no digestivos. Las branquias muestran mayor actividad que músculo, sin embargo esta diferencia no es significativa estadísticamente.

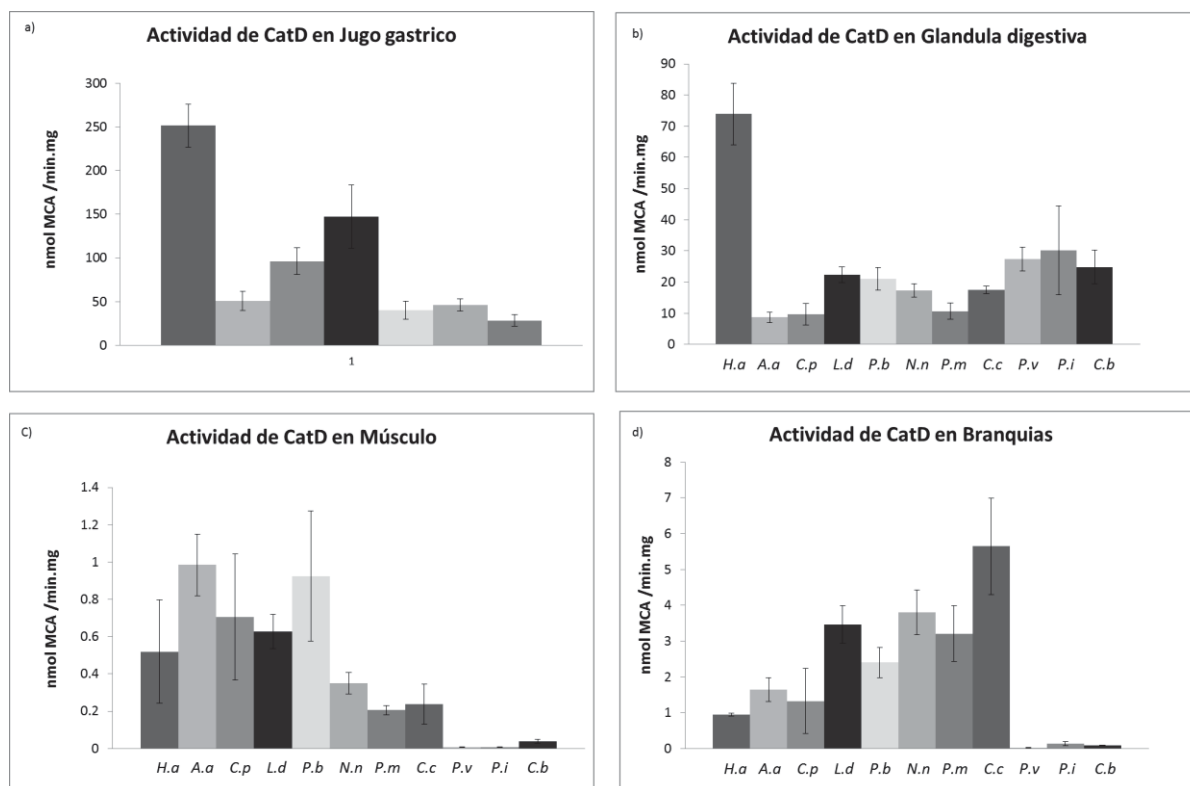


Figura 9. Actividad de catepsina D en: el jugo gástrico (a), la glándula digestiva (b), el músculo (c) y las branquias (d) de las especies: *H. americanus* (H.a), *C. crangon* (C.c), *C. pagurus* (C.p), *P. bernhardus* (P.b), *N. norvegicus* (N.n), *P. montagui* (P.m), *A. astacus* (A.a), *L. depurator* (L.d), *P. vannamei* (P.v), *C. bellicosus* (C.b) y *P. interruptus* (P.i).

En la Figura 10 se compara la actividad de catepsina D entre los tejidos de cada una de las especies estudiadas. En las especies de las que se pudo obtener jugo gástrico, se observó actividad de catepsina D tanto en glándula digestiva como en jugo gástrico, la cual fue estadísticamente mayor a la que se evaluó en branquias y músculo ($p < 0.05$). En las especies en las que no se obtuvo jugo gástrico, la actividad enzimática obtenida de glándula digestiva es estadísticamente mayor a la que se obtuvo en músculo y branquias ($p < 0.05$).

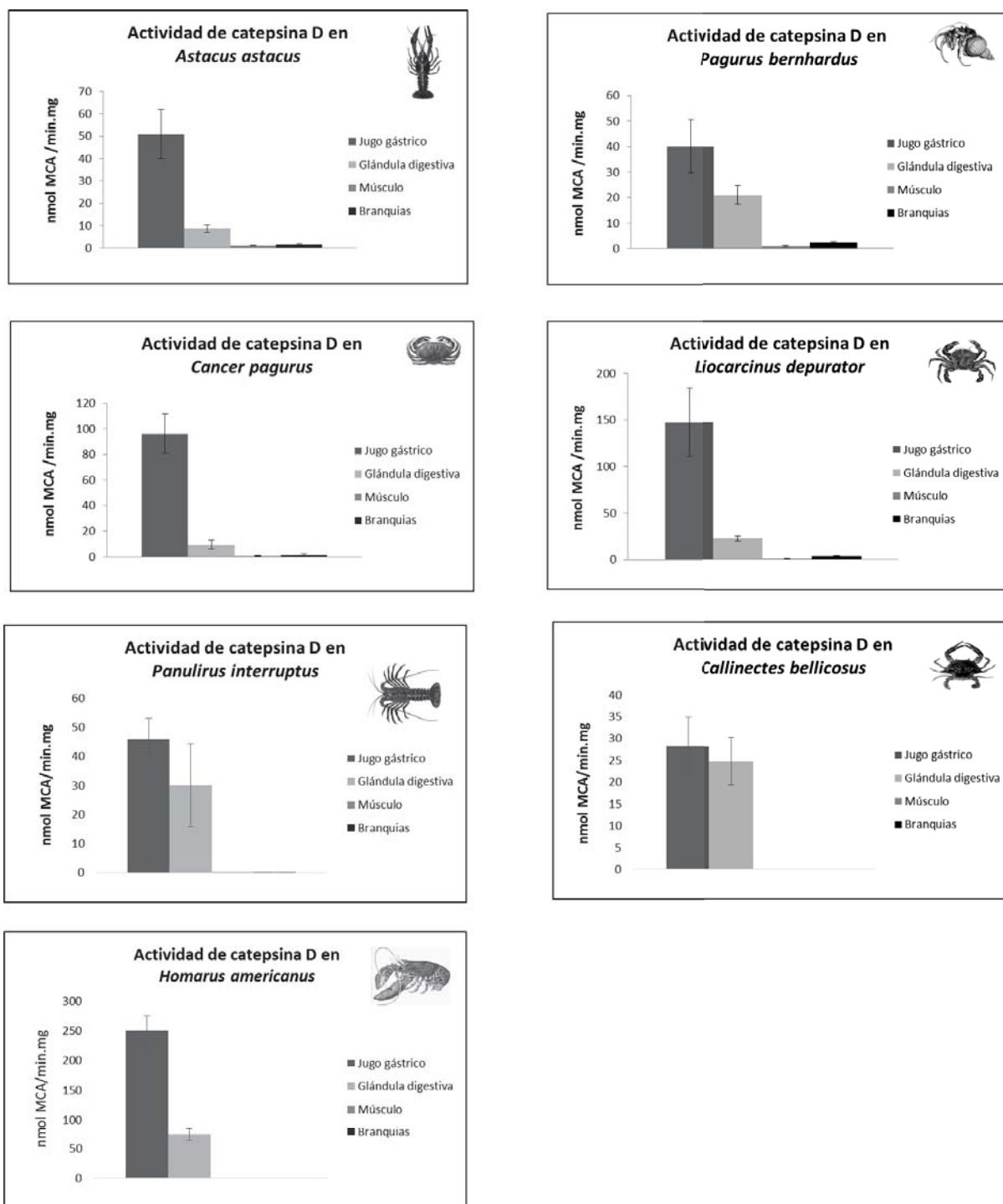
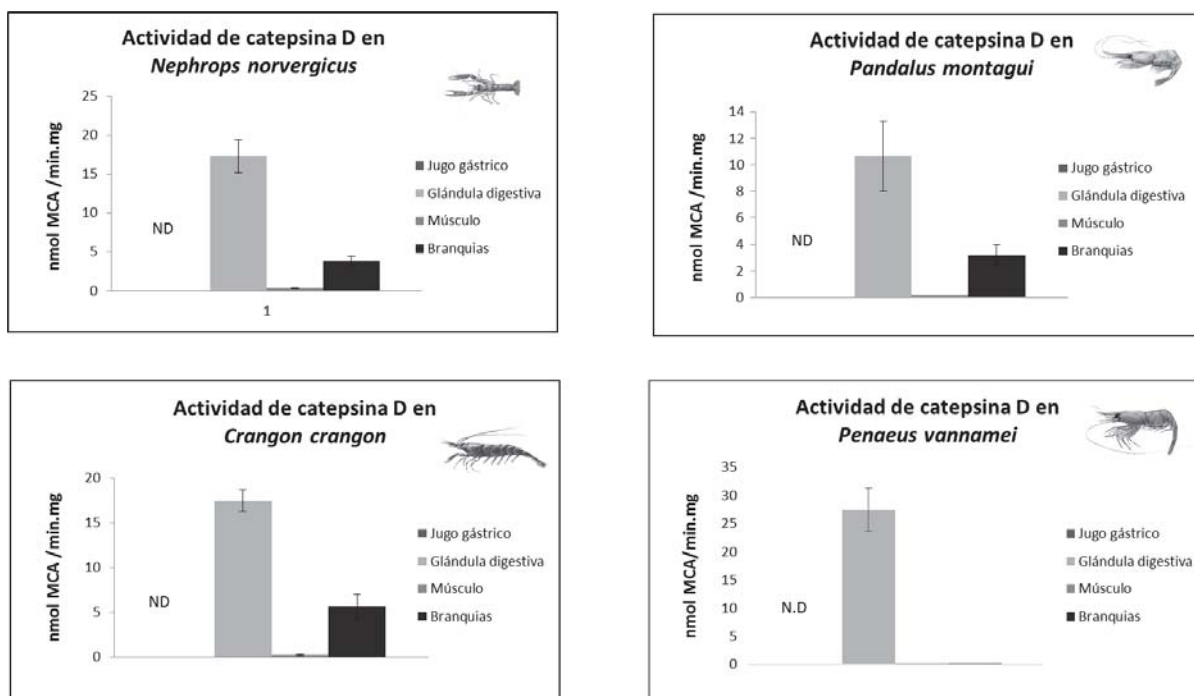


Figura 10. Actividad de catepsina D en jugo gástrico, glándula digestiva, branquias y músculo de: *C. pagurus*, *P. bernhardus*, *A. astacus*, *L. depurator*, *C. bellicosus*, *P. interruptus*, *H. americanus*, *C. crangon*, *P. montagui*, *A. astacus*, *N. norvegicus* y *P. vannamei*.



Continuación de figura 10.

7.2 Expresión génica de la catepsina D en diferentes tejidos de decápodos

Se examinó la expresión de transcritos de catepsina D en glándula digestiva, músculo y branquias de las especies enlistadas en la tabla I. Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados para las dos isoformas de catepsina D, catepsina D1 y catepsina D2 encontradas en las langostas queladas (Rojo et al., 2010a).

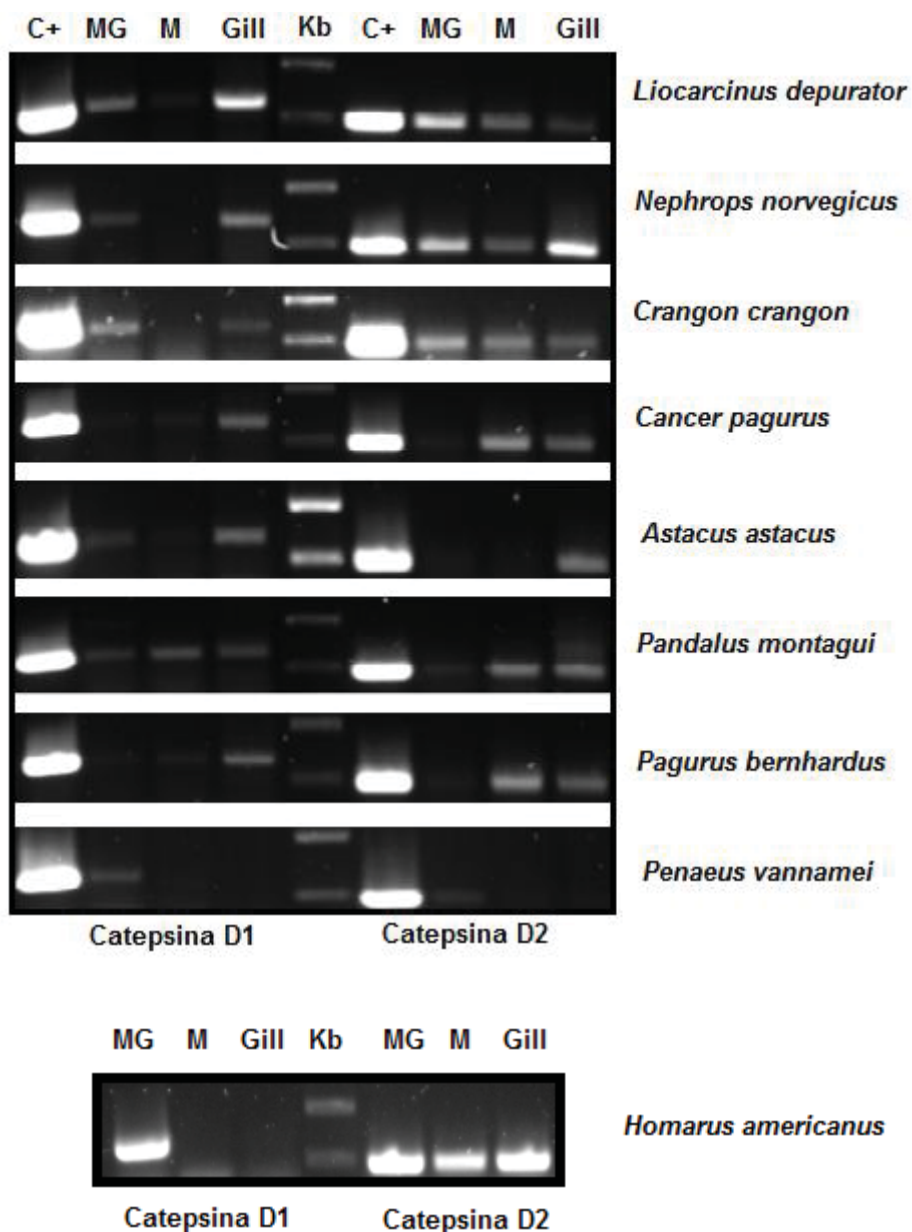


Figura 11. Transcritos de catepsina D1 y catepsina D2 en glándula digestiva (MG), músculo (M) y branquias (Gills) en: *L. depurator*, *N. norvegicus*, *C. crangon*, *C. pagurus*, *A. astacus*, *P. montagui*, *P. vannamei*, *P. bernhardus* y *H. americanus*. El carril marcado como control positivo (C+) pertenece a los transcritos obtenidos de la glándula digestiva de *H. americanus*, el segundo, tercer y cuarto carril corresponden a glándula digestiva, músculo y en branquias de las especies estudiadas (Tabla I).

Se obtuvieron transcritos de catepsina D1 a partir de glándula digestiva en *L. depurator*, *N. norvergicus*, *C. crangon*, *C. pagurus*, *A. astacus*, *P. montagui*, *P. vannamei*, *P. bernhardus*, *H. americanus* en branquias de *L. depurator*, *N. norvergicus*, *C. crangon*, *C. pagurus*, *A. astacus*, *P. montagui*, *P. bernhardus* y en músculo de *C. pagurus*, *P. bernhardus*, *P. montagui* y *L. depurator*. No se obtuvieron transcritos de catepsina D2 en todas las especies ni en todos los tejidos, a pesar de que se ha reportado que esta catepsina D es intracelular en *H. americanus* y por lo tanto se encuentra en todos sus tejidos (Rojo et al., 2010a).

7.3 Secuencias parciales del ADNc de catepsina D de glándula digestiva.

Con el objetivo de confirmar si los transcritos obtenidos de la glándula digestiva son de catepsina D y la similitud de la secuencia parcial de nucleótidos entre las especie estudiadas, los productos de PCR se secuenciaron y compararon en un alineamiento múltiple (Figura 12). Se hizo un análisis de las secuencias parciales de ADNc en ambos sentidos de la doble cadena amplificada, posterior a ello, con los resultados del Blastx, se obtuvo información sobre los dominios conservados de los fragmentos secuenciados y se confirmó su identidad de acuerdo a los dominios de la catepsina D. Una vez confirmada la identidad se hizo el alineamiento de dichas secuencias (Figura 12). Se identificaron en las secuencias analizadas los nucleótidos que codifican a un Asp del sitio catalítico así como posibles sitios de glicosilación.

```

A.a_M.g      TCTCAGTACTACGGCCCCATCACCATCGGGACACCTGGACAGGGATTTCGATGTGATCTTC 60
C.c_M.g      TCTCAGTACTACGGCCCCATCACCATCGGGACACCTGGACAGGGATTTCGATGTGATCTTC 60
H.a_M.g      -----GGCCCCATCACCATCGGGACACCTGGACAGGGATTTCGATGTGATCTTC 48
P.m_M.g      TCTCAGTACTACGGCCCCATCACCATCGGGACACCTGGACAGGGATTTCGATGTGATCTTC 60
N.n_M.g      -CTCAGTACTACGGCCCCATCACCATCGGGACACCTGGACAGGGATTTCGATGTGATCTTC 59
P.v_M.g      TCTCAGTACTACGGCCCCATCTCCATTGGCACTCCACGTCAGTCCTTCCGAGTGGTATTT 60
L.d_M.g      -----GGCCCCATCTCCATTGGCACTCCACGTCAGTCCTTCCGAGTGGTATTT 48
P.b_M.g      -CTCAGTACTACGGCCCCATCTCCATTGGCACTCCACGTCAGTCCTTCCGAGTGGTATTT 59
C.p_M.g      -----GGCCCCATCTCCATTGGCACTCCACGTCAGTCCTTCCGAGTGGTATTT 48
                *****  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

A.a_M.g      GATACGGGGTCTCCAATCTGTGGATTCCCTCAGAGAAGTGTTCATCCTCAACTTAGCC 120
C.c_M.g      GATACGGGGTCTCCAATCTGTGGATTCCCTCAGAGAAGTGTTCATCCTCAACTTAGCC 120
H.a_M.g      GATACGGGGTCTCCAATCTGTGGATTCCCTCAGAGAAGTGTTCATCCTCAACTTAGCC 108
P.m_M.g      GATACGGGGTCTCCAATCTGTGGATTCCCTCAGAGAAGTGTTCATCCTCAACTTAGCC 120
N.n_M.g      GATACGGGGTCTCCAATCTGTGGATTCCCTCAGAGAAGTGTTCATCCTCAACTTAGCC 119
P.v_M.g      GACACGGGCTCTCCAATTTGTGGTTCATCCAAGCAGTGCCTCTATACCAACATTGCC 120
L.d_M.g      GACACTGGCTCTCCAACCTGTGGGTGCCATCCAAGCAGTGCCTCTATACCAACATTGCC 108
P.b_M.g      GACACAGGCTCTCCAACCTCTGGGTCCATCCAAGCAGTGCCTCTATACCAACATTGCC 119
C.p_M.g      GATACGGGCTCTCCAACCTGTGGGTGCCATCCAAGCAGTGCCTCTATACCAACATTGCC 108
                * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

A.a_M.g      TGCCGACTTCATAACCGATACGATTCTACCAAGTCTTCAACCTACATTGAGAACGGCACA 180
C.c_M.g      TGCCGACTTCATAACCGATACGATTCTACCAAGTCTTCAACCTACATTGAGAACGGCACA 180
H.a_M.g      TGCCGACTTCATAACCGCTACGATTCTACCAAGTCTTCAACCTACATTGAGAACGGCACA 168
P.m_M.g      TGCCGACTTCATAACCGCTACGATTCTACCAAGTCTTCAACCTACATTGAGAACGGCACA 180
N.n_M.g      TGCCGACTTCATAACCGCTACGATTCTACCAAGTCTTCAACCTACATTGAGAACGGCACA 179
P.v_M.g      TGTCTCCTTCAACAAGTATGACTCCCGCAAGTCGTCCACCTTCAAGAAGAAATGGAACA 180
L.d_M.g      TGTCTCCTTCAACAAGTATGACTCCCGCAAGTCGTCCACCTTCAAGAAGAAATGGAACA 168
P.b_M.g      TGTCTGATCCACAACAAGTATGACTCCCGCAAGTCGTCCACCTTCAAGAAGAACGGGACA 179
C.p_M.g      TGTCTCCTTCAACAAGTATGACTCTAGGAATCATCAACCTACAAGAAGAACGGCACA 168
                * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

A.a_M.g      ACCTTCGACATACAGTATGGCTCTGGTGCCCTTCACGGCTTCCCTCTAGCGACAACGTG 240
C.c_M.g      GCCTTCGACGTACAGAATGGCTCTGGTGCCCTTCACGGCTTCCCTCTAGCGACAACGTG 240
H.a_M.g      GCCTTCGACATACAGTATGGCTCTGGTGCCCTTCACGGCTTCCCTCTAGCGACAACGTG 228
P.m_M.g      GCCTTCGACATACAGTATGGCTCTGGTGCCCTTCACGGCTTCCCTCTAGCGACAACGTG 240
N.n_M.g      GCCTTCGACATACAGTATGGCTCTGGTGCCCTTCACGGCTTCCCTCTAGCGACAACGTG 239
P.v_M.g      GAGTTTGCCATCCAGTATGGCTCTGGCTCCCTCTC----- 215
L.d_M.g      GAGTTTGCCATCCAGTATGGCTCTGGCTCCCTCTCCTGTTACCTCTCCACCGACACTGTG 228
P.b_M.g      GAGTTTGCCATCCAGTACGGCTCTGGCTCTCTCCTCGGCTACCTCTCCACCGACACAGTC 239
C.p_M.g      GACTTTGCCATCAAGTACGGCTCTGGCTCCCTTCCCGGCTACCTCTCCACTGACACTGTG 228
                * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

A.a_M.g      GAGATGGGCGGCGTGAATGCCATGGGCCAAACCTTCGCTGAGGC-CACACAGGAGCCTGG 299
C.c_M.g      GAGATGGGCGGCGTGAATGCCATGGGCCAAACCTTCGCTGAGGC-CACACAGGAGCCTGG 299
H.a_M.g      GAGATGGGCGGCGTGAATGCCATGGGCCAGACCTTCGCTGAGGC-CACACAGGAGCCTGG 287
P.m_M.g      GAGATGGGCGGCGTGAATGCCATGGGCCAGACCTTCGCTGAGGC-CACACAGGAGCCTGG 299
N.n_M.g      GAGATGGGCGGCGTGAATGCCATGGGCCAGACCTTCGCTGAGGC-CACACAGGAGCCTGG 298
P.v_M.g      ----- 215
L.d_M.g      GCTGTGGCGTCCATTGCCGTGAAGGAGCAGACGTTTCGCTGAGGCTCGTGAGTGAACCCGG 288
P.b_M.g      ACGGTTGCCTCCCTATCGGTCAAGAACCAGACCTTTGCAGAGGCC- TGAGTGAGCCTGG 298
C.p_M.g      GCGATTGGGCTGTGTGACGTGAAGAGCCAGACCTTTGCCGAGGCAC-TGAGTGAGCCGG 287

A.a_M.g      TCTCGCCTTCATCATGGGTAAGTTGACGGC----- 330
C.c_M.g      TCTCGCCTTCATCATGGGTAAGTTAGACGGCATCCTGGGA 339
H.a_M.g      TCTCGCCTTCATCATGGGTAAGTTAGAC----- 315
P.m_M.g      TCTCGCCTTCATCATGGGTAAGTTAGACGGCATCCTGGGA 339
N.n_M.g      TCTCGCCTTCATCATGGGTAAGTTAGACGGCATCCTGGGA 338
P.v_M.g      ----- 315
L.d_M.g      CCTGGCTTTTGTGTGCTAAGTTAGACGGCATCCTGGG- 327
P.b_M.g      CTTGGCCTTCGTGGCGGCAAGTTAGACGGCATCCTGGGA 338
C.p_M.g      CCTGGCCTTTGTGTGCTGCAAGTTAGACGGCATCCTGGGA 327

```

Figura 12. Alineamiento múltiple de las secuencias de la catepsina D de glándula digestiva de las especies estudiadas. Los nucleótidos que codifican para los residuos de ácido aspártico del sitio catalítico están dentro de un rectángulo. Los nucleótidos que codifican para los residuos de asparagina, potenciales para glicosilación están en negritas. Los nucleótidos conservados están señalados con un asterisco.

Basados en los resultados obtenidos con el alineamiento múltiple de las secuencias, se construyó un cladograma (Figura 13), el cual se divide en dos ramas principales. La primera de ellas (rama izquierda), está conservada en más del 98% de los nucleótidos con la catepsina D1 de *H. americanus* y agrupa a las especies de los Infraórdenes Astacidea y Caridea. Por su parte la segunda rama, menos conservada (rama derecha), agrupa a las secuencias de los Infraórdenes, Anomala, Brachyura y Penaeidea que tienen entre un 60 y 70 % de similitud con la catepsina D1 de *H. americanus*. Los porcentajes de similitud de las secuencias con la secuencia de *H.americanus* se resumen en (Tabla III).

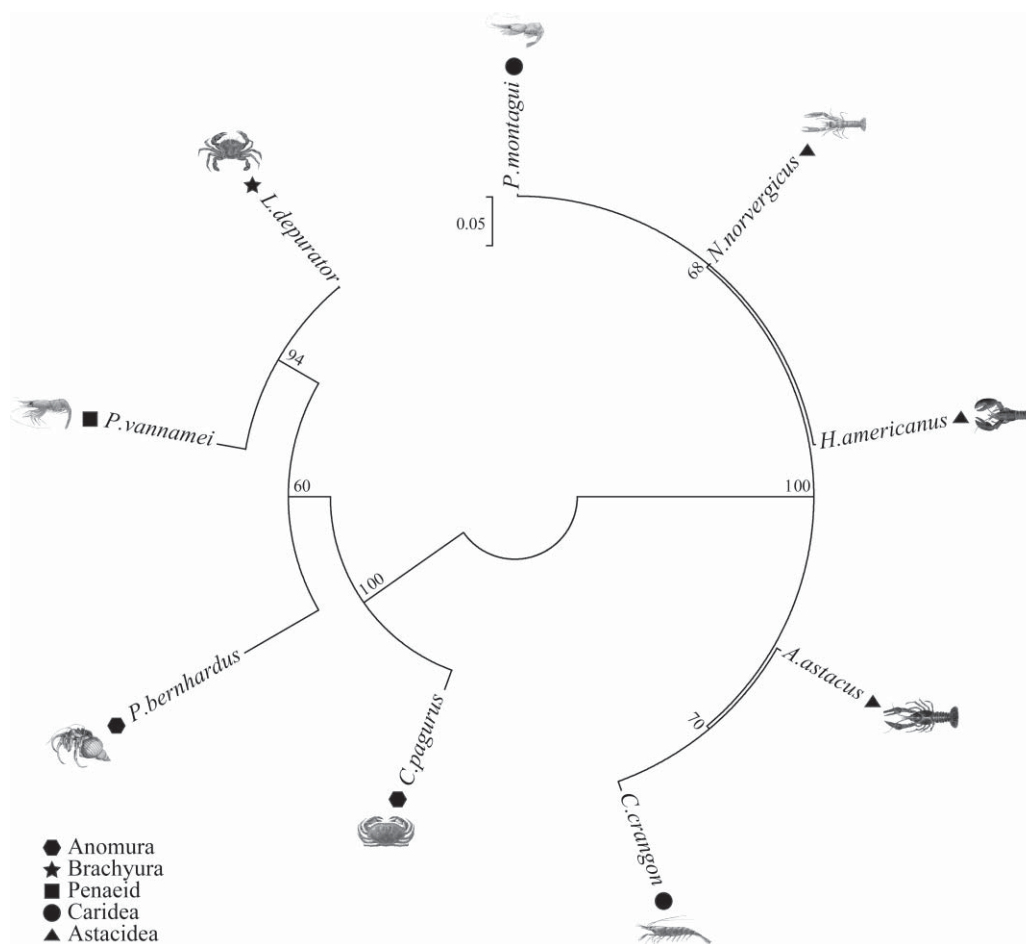


Figura 13. Cladograma construido con las secuencias parciales del transcrito de la catepsina D de la glándula digestiva de diferentes especies de decápodos. El número indicado en las ramas del cladograma se refiere al porcentaje de árboles filogenéticos que dieron ese resultado, dicha conformación de ramas esta soportada estadísticamente por un análisis “bootstrap” basado en 10,000 réplicas.

7.4 Secuencias parciales del ADNc de catepsina D de músculo y branquias.

Los transcritos de branquias en *C. crangon*, *C. pagurus*, *P. bernhardus*, *N. norvegicus*, *P. montagui*, *A. astacus*, *L. depurator* y de músculo en *C. pagurus*, *P. bernhardus*, *P. montagui*, *L. depurator* se secuenciaron y se analizó su similitud con la catepsina D1 de *H. americanus* (Figura 14), finalmente se construyó un cladograma (Figuras 15 y 16).

```

P.m_Muscle      GGTCTCAGTACTACGGCCCCATCTCCATTGGCACTCCACCTCAGTCCCTCCGAGTGGTAT 60
L.d_Muscle      --TCTCAGTACTACGGCCCCATCTCCATTGGCACTCCACCTCAGTCCCTCCGAGTGGTAT 58
P.b_Muscle      --TCTCAGTACTACGGCCCCATCTCCATCGGCACTCCTCCCCAGTCTTCCGTGTGGTGT 58
H.a_M.g         -----GGCCCCATCACCATCGGGACACCTGGACAGGGATTTCGATGTGATCT 46
C.p_Muscle      --TCTCAGTACTACGGCCCCATCACCATCGGGACACCTGGACAGGGATTTCGATGTGATCT 58
                ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

P.m_Muscle      TTGACACTGGCTCCTCCAACCTGTGGGTGCCATCCAAGCAGTGCCACTATACCAACATTG 120
L.d_Muscle      TTGACACTGGCTCCTCCAACCTGTGGGTGCCATCCAAGCAGTGCCACTATACCAACATTG 118
P.b_Muscle      TTGACACAGGCTCCTCCAACCTCTGGGTCCATCCAAGCAGTGTCATTTACCAACATTG 118
H.a_M.g         TCGATACGGGGTCTCCAATCTGTGGATTCCCTCAGAGAAGTGTTCATCCTCAACTTAG 106
C.p_Muscle      TCGATACGGGGTCTCCAATCTGTGGATTCCCTCAGAGAAGTGTTCATCCTCAACTTAG 118
                * [ ] * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

P.m_Muscle      CCTGTCTCTCCACAACAAGTATGACTCCCAGTCTGCCACCTCAAGAAGAATGGAA 180
L.d_Muscle      CCTGTCTCTCCACAACAAGTATGACTCCCAGTCTGCCACCTCAAGAAGAATGGAA 178
P.b_Muscle      CCTTTTGATCCACAACAAGTATGACGCTCGCAAGTATCCACCTCAAGAAGAACGGGA 178
H.a_M.g         CCTGCCACTTCATAACCGCTACGATTCTACCAAGTCTTCAACCTACATTGAGAACGGCA 166
C.p_Muscle      CCTGCCACTTCATAACCGCTACGATTCTACCAAGTCTTCAACCTACATTGAGAACGGCA 178
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

P.m_Muscle      CAGAGTTTGCCATCCAGTATGGGTCTGGCTCCCTCTCTGGTTACCTCTCCACCGACACTG 240
L.d_Muscle      CAGAGTTTGCCATCCAGTATGGGTCTGGCTCCCTCTCTGGTTACCTCTCCACCGACACTG 238
P.b_Muscle      CAGAGTTTGCCATCCAGTACGGCTCTGGCTCTCTCTCCGGCTACCTCTCCACCGACACAG 238
H.a_M.g         CAGCCTTCGACATACAGTATGGCTCTGGTGCCTTCACGGCTTCTCTCTAGCGACAACG 226
C.p_Muscle      CAGCCTTCGACATACAGTATGGCTCTGGTGCCTTCACGGCTTCTCTCTAGCGACAACG 238
                *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

P.m_Muscle      TGGCTGTGGCGACCATTCGCCGTGAAGGAGCAGACGTTTCGCTGAGGCTCTGAGTGAACCCG 300
L.d_Muscle      TGGCTGTGGCGTCCATTGCCGTGAAGGAGCAGACGTTTCGCTGAGGCTCTGAGTGAACCCG 298
P.b_Muscle      TCACGGTTGCCTCCCTATCGGTCAAGAACCAGAC-CTTGCAGAGGCCCTGAGTGAACCCG 297
H.a_M.g         TGGAGATGGCGGGCGTGAATGCCATGGGCCAGACCTTCGCTGAGGCCACACAGGAGCCTG 286
C.p_Muscle      TGGAGATGGCGGGCGTGAATGCCATGGGCCAGACCTTCGCTGAGGCCACACAGGAGCCTG 298
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

P.m_Muscle      GCCTGGCTTTTGTG----- 315
L.d_Muscle      GCCTGGCTTTTGTGCTGCTAAGTTAGACGGCATCCTGGG-- 338
P.b_Muscle      GCTTGGCCTTCGTGGCGGCAAGTTAGACGGCATCCTGGGAA 339
H.a_M.g         GTCTGCCTTCATCATGGGTAAGTTAGAC----- 315
C.p_Muscle      GTCTGCCTTCATCATGGGTAAGTTAGACGGCATCCTGGGA- 339
                * * * * * * *

```

Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencia de la catepsina D1 de *H. americanus* con las secuencias parciales de la catepsina D de músculo de las especies estudiadas. Los nucleótidos que codifican para los residuos de ácido aspártico del sitio catalítico están dentro de un rectángulo. Los nucleótidos que codifican para los residuos de asparagina, potenciales para glicosilación están en negritas. Los nucleótidos conservados están señalados con un asterisco.

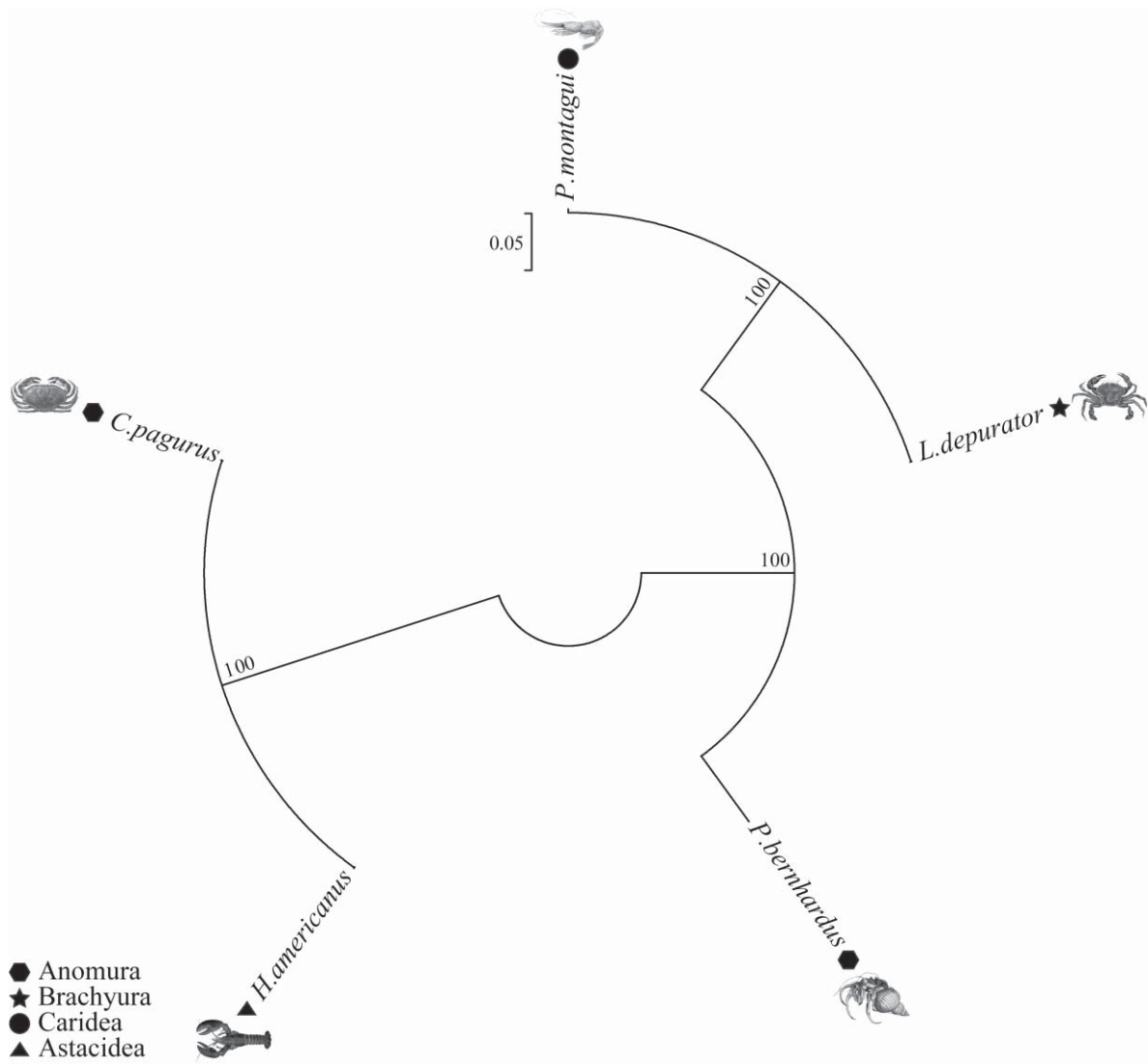


Figura 15. Cladograma construido con las secuencias parciales de ADNc de la catepsina D, obtenidas a partir de músculo de las especies estudiadas y glándula digestiva de *H. americanus*. El número indicado en las ramas del cladograma se refiere al porcentaje de árboles filogenéticos que dieron ese resultado, dicha conformación de ramas esta soportada estadísticamente por un análisis “bootstrap” basado en 10,000 réplicas.

```

C.p_Gill -----CCACAGTCCTCCGTTGGTGT 24
P.b_Gill -----
H.a_M.g -----GGCCCCATCACCATCGGGACACCTGGACAGGGATTGATGTGATCTTC 48
L.d_Gill -----GGCCCCATCTCCATTGGCACTCCACCTCAGTCCTCCGAGTGGTATTT 48
P.m_Gill TCTCAGTACTACGGCCCCATCTCCATTGGCACTCCACGTACGTTCATCCGAGTGGTATTT 60

C.p_Gill GATACTGGCTCCTCCAACCTGTGGGTGCCGTCCTCAAGCAGTGCCACTACACCAACATTGCT 84
P.b_Gill -----TTCACCAACATTGCC 15
H.a_M.g GATACGGGGTCTCCAATCTGTGGATTCCCTCAGAGAAGTGTTCATCCTCAACTTAGCC 108
L.d_Gill GACTACTGGCTCCTCCAACCTGTGGGTGCCATCCAAGCAGTGCCACTATACCAACATTGCC 108
P.m_Gill GACACGGGCTCCTCCAATTTGTGGGTGCCATCCAACAATGCCACTATACTACATTGCC 120
          ** * **

C.p_Gill TGTCTCCTTCCACAACAAGTATGACTCTAGGAAATCATCAACCTACAAGAAGAACGGCACA 144
P.b_Gill TGTTTGATCCACAACAAGTATGACGCTCGCAAGTCATCCACCTCAAGAAGAACGGGACA 75
H.a_M.g TGCCGACTTCATAACCGCTACGATTTACCAAGTCTTCAACCTACATTGAGAACGGCACA 168
L.d_Gill TGTCTCCTCCACAACAAGTATGACTCCCGCAAGTCGTCCACCTCAAGAAGAATGGAACA 168
P.m_Gill TGTCTCCTCCACAACAAGTATGACTCCCGCA-GTCCTTCACCTTCAATAAAAATGGAACA 179
          ** * ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

C.p_Gill GACTTTGCCATCAAGAACGGGCTCTGGCTCCCTGTCCGGCTACCTCTCCACTGACACTGTG 204
P.b_Gill GAGTTTGCCATCCAGTACGGCTCTGGCTCTCTCCTCCGGCTACCTCTCCACCGACACAGTC 135
H.a_M.g GCCTTCGACATACAGTATGGGCTCTGGTCCCTTCACGGCTTCCTCTAGCGACAACGTG 228
L.d_Gill GAGTTTGCCATCCAGTATGGGCTCTGGCTCCCTCTCTGGTTACCTCTCCACCGACACTGTG 228
P.m_Gill AAGCTTGCCATCCCATATGGGCTGGGTCCT----- 211
          * * * * * * * * * * * * * *

C.p_Gill GCGATTGGGTCTGTGTCAGTGAAGAGCCAGACCTTTGCCGAGGCACTGAGTGAGCCGGGC 264
P.b_Gill ACGGTTGGCTCCCTATCGGTCAAGAACCAGACCTTTGCAGAGGCCCTGAGTGAGCCTGGC 195
H.a_M.g GAGATGGGCGGCGTGAATGCCATGGGCCAGACCTTCGCTGAGGCCACACAGGAGCCTGGT 288
L.d_Gill GCTGTGGCGTCCATTGCCGTGAAGGAGCAGACGTTCCGCTGAGGCTCGGAGTGAACCCGGC 288
P.m_Gill -----

C.p_Gill CTGGCCTTTGTTGCTGCCAAGTTAGACGGCATCC----- 298
P.b_Gill TTGGCCT----- 202
H.a_M.g CTCGCCTTCATCATGGGTAAGTTAGAC----- 315
L.d_Gill CTGGCCTTTGTTGCTGCTAAGTTAGACGGCATCCTGGGA 327
P.m_Gill -----

```

Figura 16. Alineamiento múltiple de secuencia de la catepsina D1 de *H. americanus* con las secuencias parciales de la catepsina D de branquias las especies estudiadas. Los nucleótidos que codifican para los residuos de ácido aspártico del sitio catalítico están dentro de un rectángulo. Los nucleótidos que codifican para los residuos de asparagina, potenciales para glicosilación están en negritas. Los nucleótidos conservados están señalados con un asterisco.

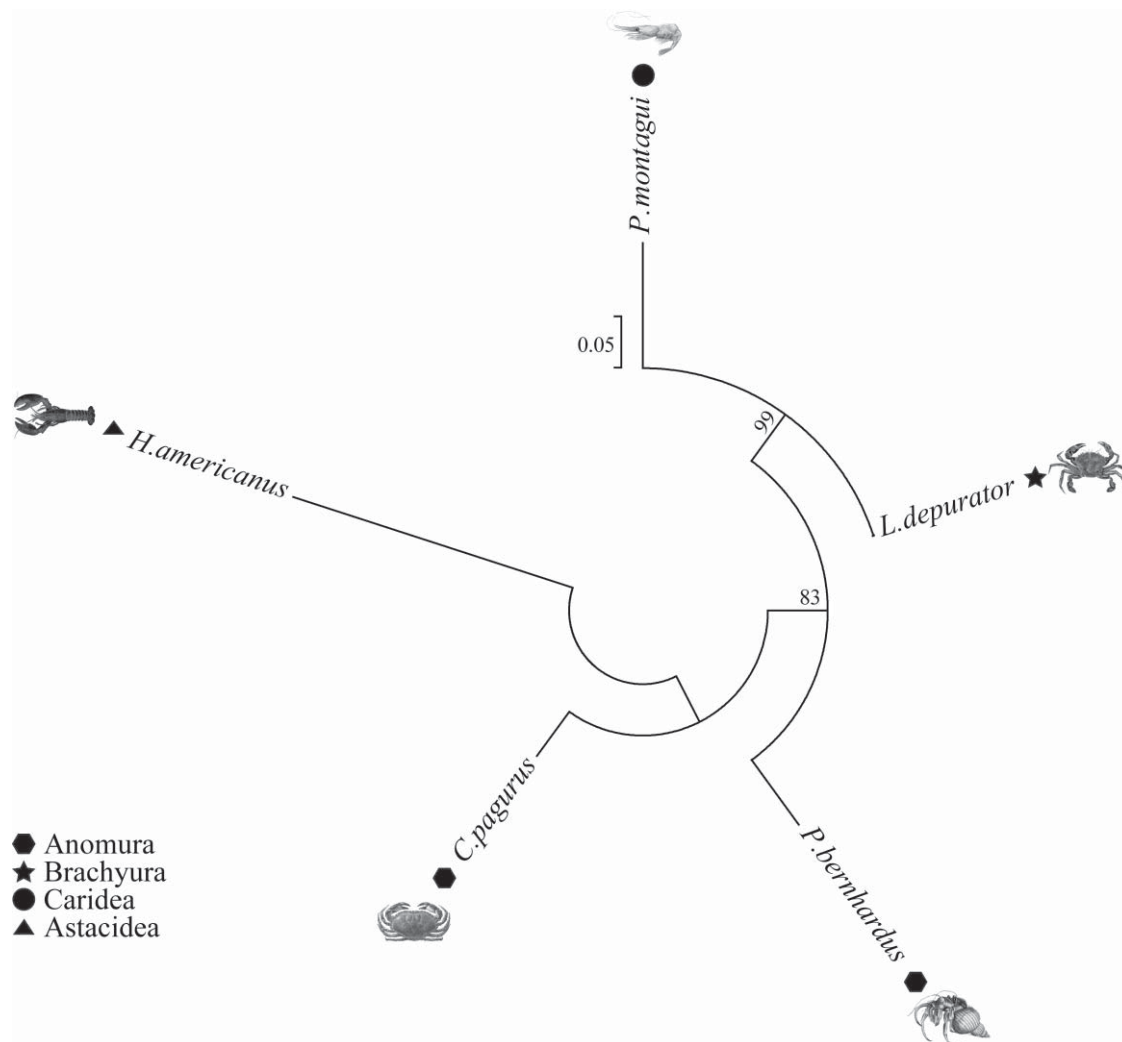


Figura 17. Cladograma construido con las secuencias parciales de ADNc de la catepsina D, obtenidas a partir de branquias de las especies estudiadas y glándula digestiva de *H. americanus*. El número indicado en las ramas del cladograma se refiere al porcentaje de árboles filogenéticos que dieron ese resultado, dicha conformación de ramas esta soportada estadísticamente por un análisis “bootstrap” basado en 10,000 réplicas.

En la tabla III se muestran los porcentajes de similitud entre la catepsina D1 de *H. americanus* y las catepsinas D obtenidas a partir de las especies estudiadas, dichos porcentajes de

similitud se obtuvieron con el alineamiento de cada una de las secuencias parciales con la de *H. americanus* en el programa ClustalW2.

Tabla III. Porcentaje de similitud entre secuencias obtenidas y la secuencia de *H. americanus*.

Especie	% de similitud con <i>H. americanus</i>		
	Glándula digestiva	Músculo	Branquias
<i>A. astacus</i>	98.73	-	-
<i>C. crangon</i>	98.73	-	-
<i>P. montagui</i>	99	65.08	70.14
<i>N. norvegicus</i>	99	-	-
<i>P. bernhardus</i>	69.21	66.67	72.77
<i>C. pagurus</i>	67.62	99	64.77
<i>P. vannamei</i>	66.51	-	-
<i>L. depurator</i>	68.89	69.21	69.21

8 DISCUSIÓN

8.1 Actividad de catepsina D en diferentes tejidos de decápodos

La síntesis de enzimas es un proceso complejo que requiere la traducción de nucleótidos a aminoácidos, y que va acompañado de eventos postraduccionales. En el caso de la catepsina D de humanos se sabe que antes de adoptar su forma madura, debe perder el péptido señal, ser glicosilada, perder el pro-peptido y además requiere la acción de otras proteasas que la hidrolizan para formar una enzima madura de dos cadenas (Laurent-Matha et al., 2006; Nicotra et al., 2010), lo que limita el relacionar una secuencia de nucleótidos con la proteína funcional. En el presente trabajo se obtuvieron secuencias parciales de ADNc de la catepsina D en decápodos y se midió la actividad de la enzima madura, con lo cual se logró obtener información sobre la incidencia de esta proteasa con una posible participación en la hidrólisis de proteína proveniente del alimento en diferentes especies de decápodos.

Debido a que se detectó actividad de catepsina D en la glándula digestiva y el jugo gástrico de las especies estudiadas, y esta actividad es estadísticamente mayor a la actividad en

músculo y branquias, se sugiere su participación en la digestión enzimática de proteína del alimento. Estos resultados concuerdan con los reportados por (Ke-Jin y Pak-Chow, 2004) quienes sugieren la misma función para la catepsina L y más recientemente los reportados por (Stephens et al., 2012) para la catepsina B en el camarón blanco *P. vannamei*. Investigaciones adicionales podrían aportar información sobre el porcentaje de actividad de la catepsina D en comparación con la actividad proteolítica total. Como los estudios reportados por (Teschke y Reinhard, 2005), los cuales muestran que entre un 30 y 40% de la actividad total de proteasas en *P. bernhardus* y *C. pagurus* corresponde a las serino proteasas, y en *C. crangon* al menos el 70% de la actividad total corresponde a las cisteino proteasas.

Por otro lado, tanto en el jugo gástrico como en la glándula digestiva, la actividad de catepsina D en *H. americanus* es estadísticamente mayor a las otras especies (Figura 9a). Esto sugiere que dicha actividad se podría ver favorecida debido a que el pH ácido del jugo gástrico de las langostas queladas es muy cercano al pH óptimo de la catepsina D (Rojo, 2010). El pH de jugo gástrico de las diferentes especies evaluadas, es al parecer una variable importante a considerar. Se sabe que el jugo gástrico de *P. interruptus* tiene un pH aproximado de 6.0, mientras que el de *H. gammarus* es de 4.7, y en *C. pagurus* es de 5.8 (Navarrete del Toro et al., 2006). Adicionalmente, *C. pagurus* muestra el máximo de actividad total de proteasas en un rango de pH 5.0 a 7.0 (Saborowski et al., 2004), *P. interruptus* a pH 7.0, *H. gammarus* a pH 3.0 y *C. bellicosus* en un rango de pH de entre 6.0 y 9.0 (Navarrete del Toro et al., 2006). Dicha información resalta la variación en el pH del jugo gástrico entre especies. En este estudio la actividad de la catepsina D se evaluó a pH 4.0, y, por lo tanto, se sugiere que en estudios adicionales, se realice el ensayo de actividad al pH del jugo gástrico de cada especie.

Otro aspecto que salta a la vista, es que en todas las especies estudiadas la actividad de catepsina D en branquias es mayor que en músculo (Figuras 10 y 11), sin embargo, la diferencia no es significativa estadísticamente. Por otro lado, en un análisis de actividad de catepsina D en 11 tejidos diferentes de *H. americanus* (datos no incluidos), las branquias no muestran diferencia significativa en comparación a otros tejidos no relacionados al sistema

digestivo, por lo que se sugiere que tanto en branquias como en los otros tejidos no relacionados al sistema digestivo, la catepsina D, desempeña una función intracelular.

8.2 Expresión génica de catepsina D en diferentes tejidos de decápodos

Debido a que en *H. americanus* se obtuvo producto amplificado de catepsina D1 en glándula digestiva y de catepsina D2 en glándula digestiva, músculo y branquias, se sustenta lo reportado por (Rojo et al., 2010a). La catepsina D2 en *H. americanus* es ubicua en todos los tejidos por lo que podría ser la catepsina intracelular, mientras que la catepsina D1 por estar únicamente en glándula digestiva, podría estar participando en la digestión extracelular. Sin embargo, en las especies *L. depurator*, *N. norvegicus*, *C. crangon*, *C. pagurus*, *A. astacus*, *P. montagui*, y *P. bernhardus* también se encontró transcrito de la catepsina D1 en branquias y en *C. pagurus*, *P. bernhardus*, *P. montagui* y *L. depurator* en músculo. Estos resultados sugieren que la catepsina D1, a diferencia de lo observado en *H. americanus*, no es exclusiva de la glándula digestiva en estas especies.

Por otro lado, no se obtuvo un producto amplificado de catepsina D2 en todas las especies o en todos los tejidos, por lo que estos resultados sugieren que, si bien la catepsina D2 es ubicua en los tejidos estudiados de *H. americanus*, *N. norvegicus* y *C. crangon*, no es así en todas las especies, ya que en algunas la presencia del transcrito fue tejido-específica. Esto se podría deber a que los requerimientos de degradación celular varían dependiendo el tipo de tejido, la edad y las condiciones ambientales (Sardiello et al., 2009). Adicionalmente esto puede deberse a que los oligonucleótidos al ser diseñados en base a las secuencias de *H. americanus* no amplifican la catepsina D2 en todos los tejidos o en todas las especies estudiadas. Se sugiere que en futuras investigaciones se contemple hacer un estudio en todos los tejidos de *H. americanus* para comprobar que la catepsina D2 se encuentre en todos los tejidos y de esta manera poder sustentar que sea la catepsina intracelular. También, se sugiere secuenciar la catepsina D2 de las diferentes especies para analizar la similitud entre especies, tejidos y con la catepsina D1 de las mismas especies.

Una complicación que se presentó al estudiar tan diversas especies, fue que los oligonucleótidos al ser diseñados con base a regiones de la catepsina D en *H. americanus*, no

amplificaron la catepsinas D de *C. bellicosus* y *P. interruptus*. Sin embargo, se sabe que estas especies si tienen catepsina D en glándula digestiva, debido a los resultados de actividad. Se sugiere que en futuros estudios, a partir de secuencias de otros decápodos aquí reportadas, se diseñen nuevos oligonucleótidos con el objetivo de obtener la catepsina D responsable de la actividad en glándula digestiva de estas especies.

8.3 Análisis de las secuencias parciales del ADNc de la catepsina D en la glándula digestiva de decápodos y de sus relaciones filogenéticas

Se comprobó, mediante Blastx que los fragmentos de ADNc obtenidos de la glándula digestiva de las diferentes especies presentan dominios conservados de catepsina D y muestran similitud a la catepsina D de las langostas *H. americanus* (GenBank: EU687261), *H. gammarus* (GenBank EU822806) del camarón *Penaeus monodon* (GenBank: EF213114), así como a catepsinas D de otros grupos taxonómicos como por ejemplo: el pez *Hippoglossus hippoglossus* (GenBank: DQ912663) y el pez plano *Scophthalmus maximus* (GenBank: EU077233), entre muchos otros (datos no incluidos).

En base a los resultados de las secuencias parciales de ADNc de la catepsina D, aquí se sugiere que especies del Infraorden Astacidea presentan mayor identidad con las catepsinas D del Infraorden Caridea en comparación con otros infraórdenes más cercanos filogenéticamente. Debido a que ambos infraórdenes, así como sus componentes moleculares incluidas las enzimas, comparten un ancestro común, es decir, están relacionados por evolución divergente, este rasgo pudiera ser el resultado de una duplicación del gen del antecesor de la catepsina D antes de la separación de ambos infraórdenes; dicho gen pudo haberse mantenido en Caridea y Astacidea, pero con sucesivas mutaciones se pudo perder en Anomala, Brachyura y Penaeidea. Algo parecido se piensa que ocurrió con las proteínas fluorescentes en algunos crustáceos (Shagin et al., 2004), o en proteínas Irx, las cuales participan en el desarrollo de algunos invertebrados (Kerner et al., 2009).

Para enriquecer esta investigación, se recomienda que en futuras investigaciones se considere el análisis de las secuencias completas de la catepsina D1, de tal forma que se pueda analizar la región “polyproline loop”. Se sugiere que la ausencia de tres residuos de prolinas en el

“polyproline loop” es lo que contribuye con la función digestiva a diferencia de las catepsinas D lisosomales que tienen tres residuos de prolinas (Rojo, 2010). De esta manera, además de poder comparar el área “polyproline loop”, se podría comparar las secuencias completas y determinar su porcentaje de similitud.

8.4 Análisis de secuencias parciales de ADNc de catepsina D en músculo y branquias de decápodos y de su respectivos cladogramas

Las secuencias parciales de ADNc de la catepsina D de branquias de *C. pagurus*, *P. bernhardus*, *P. montagui* y *L. depurator* no guardan similitud con la catepsina D1 de *H. americanus*; lo cual sugiere que aunque estas especies poseen un gen que codifica la catepsina D en branquias, no es la catepsina D1. Por otro lado, aunque si fue posible comparar las secuencias parciales de ADNc obtenidas a partir de glándula digestiva en todas las especies, esta comparación no fue posible en branquias de *A. astacus*, *C. crangon* y *N. norvegicus*. Esto se puede deber a que los oligonucleótidos diseñados no son específicos para catepsina D en todas las especies; por lo que los productos amplificados no son siempre constantes, de tal manera que se obtienen más de dos señales en cada uno de los nucleótidos. Debido a los resultados obtenidos en esta investigación, ahora es posible diseñar mejores oligonucleótidos para catepsina D con base a la secuencia de glándula digestiva de cada una de las especies, con esto se tendrá una mayor oportunidad de obtener la secuencia parcial del transcrito de branquias. Por otro lado, se observó que en la mayoría de los casos, la fracción amplificada de catepsina D1 de branquias es similar a la de músculo de la misma especie, excepto en *C. pagurus*, la cual, en músculo guarda mayor similitud con la catepsina D1 en *H. americanus* (Figura 15).

En esta investigación se acepta la hipótesis planteada, que sugiere que la catepsina D también participa en la hidrólisis de proteína proveniente del alimento, en especies de decápodos que comparten un ancestro común con el Infraorden Astacidea. Debido a que la catepsina D también participa en la digestión extracelular de otras especies de decápodos, sugerimos que

este rasgo o característica “función extracelular de la catepsina D” no es exclusivo del Infraorden Astacidea.

9 CONCLUSIONES

- Se demostró que hay actividad de catepsina D en jugo gástrico y glándula digestiva de las especies estudiadas. Dicha actividad es estadísticamente mayor a la de otros tejidos no involucrados con la digestión, lo cual sugiere su participación en la hidrólisis de proteína proveniente del alimento.
- Las secuencias parciales de catepsina D, obtenidas a partir de glándula digestiva de las especies pertenecientes a los Infraórdenes Astacidea y Caridea, son homólogas a la catepsina D1 caracterizada por (Rojo et al., 2010b). Sin embargo, las secuencias parciales de los Infraórdenes Anomala, Brachyura y Penaeidea sólo muestran entre un 60 y 70% de similitud con la catepsina D1 de *H. americanus*.
- La actividad de catepsina D en *H. americanus* es estadísticamente superior a la actividad en especies que comparten un 99% de su secuencia parcial, por lo que se sugiere que parte de la secuencia no obtenida tiene diferencias en estructura primaria de la proteína, además procesos postraduccionales, así como el pH ácido del jugo gástrico, deben estar favoreciendo la actividad de catepsina D en *H. americanus*.

10 LITERATURA CITADA

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.

Barnes, R.D., 1987. *Zoología de los invertebrados*. Nueva editorial interamericana, Mexico D.F. 4ta edición., 759.

- Benes, P., Vetvicka, V., Fusek, M., 2008. Cathepsin D—Many functions of one aspartic protease. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 68: 12-28.
- Bracken-Grissom, H., Ahyong, S., Wilkinson, R., Feldmann, R., Schweitzer, C., Breinholt, J., Bendall, M., Palero, F., Chan, T., Felder, D., Robles, R., Chu, K., Tsang, L., Kim, D., Martin, J., Crandall, K., 2014. The Emergence of Lobsters: Phylogenetic Relationships, Morphological Evolution and Divergence Time Comparisons of an Ancient Group (Decapoda: Achelata, Astacidea, Glypheidea, Polychelida). *Systematic Biology*, 1-23.
- Bracken-Grissom, H., Cannon, M., Cabezas, P., Feldmann, R., Schweitzer, C., Ahyong, S., Felder, D., Lemaitre, R., Crandall, K., 2013. A comprehensive and integrative reconstruction of evolutionary history for Anomura (Crustacea: Decapoda). *BMC Evolutionary Biology*, 13: 1-28.
- Bradford, M.M., 1976. A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem*, 72: 248-254.
- Brix, K., 2005. Lysosomal Proteases. *Eurekah Bioscience*, 259-264.
- Burmester, T., 2001. Molecular Evolution of the Arthropod Hemocyanin Superfamily. *Mol. Biol. Evol.* 18: 184-195.
- Fusek, M., Mares, M., Vetvicka, V., 2013. Chapter 8 - Cathepsin D, in: N.D. Rawlings, G. Salvesen (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, 54-63.
- García-Carreño, F., Navarrete del Toro, M., 1997. Classification of Proteases Without Tears. *Biochemical Education*, 25: 161-167.
- Ghosh, A., 2009. Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets. *Methods and Principles in Medical Chemistry* 45.
- Holthuis, L.B., 1980. Shrimps and prawns of the world FAO species catalogue 1.
- Holthuis, L.B., 1991. Marine lobsters of the world. FAO species catalogue 13.
- Jeffrey-Tri, N., 2008. Design of Potent Aspartic Protease Inhibitors to Treat Various Diseases. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*, 341: 523-535.
- Ke-Jin, H., Pak-Chow, L., 2004. Shrimp cathepsin L encoded by an intronless gene has predominant expression in hepatopancreas, and occurs in the nucleus of oocyte. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 137: 21-33.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism*, 21-132.

Kerner, P., Ikmi, A., Coen, D., Vervoort, M., 2009. Evolutionary history of the iroquois/lrx genes in metazoans. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 1-14.

Koonin, E., 2005. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics. *Annu. Rev. Genet*, 39: 309-338.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.

Laurent-Matha, V., Derocq, D., Pre'bois, C., Katunuma, N., Liaudet-Coopman, E., 2006. Processing of Human Cathepsin D Is Independent of Its Catalytic Function and Auto-Activation: Involvement of Cathepsins L and B. *J. Biochem*, 139: 363-371.

Laycock, M., Hiramata, T., Hasnain, S., Watson, D., C. Storer, A., 1989. Purification and characterization of a digestive cysteine proteinase from the American lobster (*Homarus americanus*). *Biochem. J.*, 463-444.

Loizzi, R., 1970. Interpretation of Crayfish Hepatopancreatic Function Based on Fine Structural Analysis of Epithelial Cell Lines and Muscle Network. *Z. Zellforsch*, 113: 420-440.

Mayr, E., 1978. *Evolution* Scientific American, 239: 47-55.

Muhlia-Almazan, A., García-Carreño, F., 2003. Digestion physiology and proteolytic enzymes of crustacean species of the Mexican Pacific Ocean Contributions to the Study of East Pacific Crustaceans, 2: 77-91.

Navarrete del Toro, M.A., García-Carreño, F., Díaz, M., Celis-Guerrero, L., Saborowski, R., 2006. Aspartic Proteinases in the Digestive Tract of Marine Decapod Crustaceans. *Journal of Experimental Zoology*, 305A: 645-654.

Neurath, H., 1984. Evolution of Proteolytic Enzymes. *Science*, 224: 350-356.

Nicotra, G., Castino, R., Folloa, C., Peracchio, C., Valenteb, G., Isidoroa, C., 2010. The dilemma: Does tissue expression of cathepsin D reflect tumor malignancy? The question: Does the assay truly mirror cathepsin D misfunction in the tumor? *Cancer Biomarkers*, 7: 47-64.

Porter, M., Pérez-Losada, M., Crandall, K., 2005. Model-based multi-locus estimation of decapod phylogeny and divergence times. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 355-369.

Puente, X., Sánchez, L., Overall, C., López-Otín, C., 2003. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach *Nature review genetics*, 4: 544-557.

Rojo, L., 2010. Proteinases aspárticas digestivas de las langostas queladas *Homarus gammarus* y *Homarus americanus*: Caracterización bioquímica y molecular.

- Rojo, L., Muhlia-Almazan, A., Saborowski, R., García-Carreño, F., 2010a. Aspartic Cathepsin D Endopeptidase Contributes to Extracellular Digestion in Clawed Lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*. *Mar Biotechnol*, 12: 696-707.
- Rojo, L., Sotelo-Mundo, R., García-Carreño, F., Gráf, L., 2010b. Isolation, biochemical characterization, and molecular modeling of American lobster digestive cathepsin D1. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 157: 394-400.
- Saborowski, R., Sahling, G., Navarette del Toro, M., Walter, I., García-Carreño, F., 2004. Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30: 109-118.
- Sardiello, M., Palmieri, M., Di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., Ballabio, A., 2009. A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. *Science*, 325: 473-476.
- Saxena, R., 2004. *Handbook of Fungal Biotechnology Second Edition* ed. Macel Dekker, New York U.S.A.
- Shagin, D., Barsova, E., Yanushevich, Y., Fradkov, A., Lukyanov, K., Labas, Y., Semenova, T., Ugalde, J., Meyers, A., Nunez, J., Widder, E., Lukyanov, S., Matz, M., 2004. GFP-like Proteins as Ubiquitous Metazoan Superfamily: Evolution of Functional Features and Structural Complexity. *Mol. Biol. Evol.* 21: 841-850.
- Stephens, A., Rojo, L., Araujo-Bernal, S., García-Carreño, F., Muhlia-Almazan, A., 2012. Cathepsin B from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* : cDNA sequence analysis, tissues-specific expression and biological activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 161: 32-40.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Teschke, M., Reinhard, S., 2005. Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of *Crangon crangon* and *Crangon allmani* (Decapoda: Caridea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316: 213-229.
- Tsang, L.M., Ma, K.Y., AhYong, S.T., Chan, T.Y., Chu, K.H., 2008. Phylogeny of Decapoda using two nuclear protein-coding genes: Origin and evolution of the Reptantia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48: 359-368.
- Vogt, G., 1994. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology*, 114: 83-101.
- Wlodawer, A., Gustchina, A., James, M.N.G., 2013. Chapter 2 - Catalytic Pathways of Aspartic Peptidases, in: N.D. Rawlings, G. Salvesen (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, 19-26.