



Programa de Estudios de Posgrado

**Tripsinas de Crustáceos: Caracterización y
Modulación.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales

(Orientación en: Biotecnología)

p r e s e n t a

Juan Carlos Sainz Hernández

La Paz, B. C. S., Marzo-2004

Comité tutorial

Dr. Fernando García Carreño
Dra. Patricia Hernández Cortés
Dr. Felipe Ascencio Valle
Dr. Fernando Noriega
Dr. Rogerio Sotelo Mundo

Comité revisor de tesis

Dr. Fernando García Carreño
Dra. Patricia Hernández Cortés
Dr. Fernando Noriega
Dr. Rogerio Sotelo Mundo
Dr. Pedro Cruz Hernández
Dra. Adriana Muhlia Almazán

Jurado de examen de grado

Dr. Fernando García Carreño
Dra. Patricia Hernández Cortés
Dr. Fernando Noriega
Dr. Rogerio Sotelo Mundo
Dr. Pedro Cruz Hernández
Dra. Adriana Muhlia Almazán
Suplente
Dr. Julio Humberto Córdoba Murueta

Dedicatoria

A mi hija Isabel

Agradecimientos

A mis padres y hermanos quienes me han permitido amarlos.

A los doctores Fernando García Carreño y Martha Patricia Hernández Cortes, directores de la presente tesis. Gracias por darme la oportunidad de expresar mis inquietudes en su laboratorio, por sus comentarios, por su apoyo constante en la revisión de los documentos que conciernen a esta tesis y por su apoyo en los trámites administrativos durante mi estancia en el CIBNOR.

A los doctores Fernando Noriega, Felipe Ascencio Valle y Rogerio Sotelo Mundo, por sus comentarios, y por su apoyo en la revisión de los documentos que conciernen a esta tesis.

A mi familia, Susana, Victoria e Isabel, por su tolerancia y apoyo en todo momento.

A Arturo Sierra Beltrán, porque siempre estuvo dispuesto a discutir en forma muy rigurosa los planes, estrategias, experimentos y los avances de esta tesis.

A María de los Ángeles Navarrete, por sus consejos porque fue la puntual surtidora de todos los materiales utilizados durante este trabajo.

A Laura E. Celis Guerrero, Julio Córdova Murueta y Julio Antonio Hernández porque compartimos todos los esfuerzos, voluntades, triunfos y fracasos en esta travesía.

A la doctora Ana Maria Ibarra y al Dr. Pedro Cruz Hernández, porque compartimos una experiencia muy original durante el desarrollo de la tesis.

Agradezco también a todos mis compañeros en el Posgrado y a todas las personas que se tomaron un momento para hacerme una observación o un comentario sobre este trabajo.

Al CIBNOR porque en sus aulas y laboratorios aprendí a respetar y admirar los recursos marinos y porque en cada una de sus áreas encontré apoyo, respuestas y orientación.

Al Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología por su apoyo indiscutible a través de los Proyectos J33750-N y 27371-B, además de su apoyo a travez de la beca con expediente, expediente 153559.

Índice

Comité tutorial	I
Comité revisor de tesis.....	I
Jurado de examen de grado	I
Dedicatoria.....	II
Agradecimientos.....	III
Índice.....	IV
Lista de Figuras.....	VII
Lista de Tablas	VIII
Lista de publicaciones.....	IX
Abstract.....	X
Resumen.....	XII
Glosario.....	XIV
Abreviaturas	XVIII
Introducción general.....	1
Hipótesis.....	5
Justificación	6
Objetivo General.....	8
Objetivos particulares	8
Parte 1	9
1.0 Identificación y localización del tripsinógeno.....	9
<i>1.1 Introducción.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2 Objetivos particulares.....</i>	<i>12</i>
<i>1.3 Materiales y métodos</i>	<i>13</i>
1.3.1 Preparación de haptenos	13
1.3.2 Producción de anticuerpos	14
1.3.3 Muestras de la glándula digestiva.....	15

1.3.4 Inmunobloting.....	15
1.3.5 Inmunohistoquímica	16
<i>1.3 Resultados</i>	<i>18</i>
1.3.1 Producción de anticuerpos	18
1.3.2 Inmunobloting.....	18
1.3.3 Inmunohistología	19
<i>1.5 Discusión</i>	<i>23</i>
<i>1.6 Conclusión</i>	<i>26</i>
Parte 2	27
2.0 Purificación y caracterización de tripsinas	27
<i>2.1 Introducción</i>	<i>27</i>
<i>2.2 Objetivos particulares</i>	<i>29</i>
<i>2.3 Materiales y métodos</i>	<i>30</i>
2.3.1 Obtención de la proteína soluble a partir de la glándula digestiva	30
2.3.2 Purificación	30
2.3.3 Características moleculares.....	31
2.3.3.1 Análisis electroforético	31
2.3.3.2 Masa molecular	31
2.3.3.3 Punto isoeléctrico.....	32
2.3.3.4 Análisis de la secuencia NH ₂ -terminal	32
2.3.3.5 Glicoproteínas	32
2.3.4 Características Bioquímicas.....	33
2.3.4.1 Actividad específica de la tripsina	33
2.3.4.2 Efecto de la temperatura y del pH.....	33
2.3.4.3 Efecto del calcio e inhibidores sobre la actividad de tripsina	34
2.3.5 Variables cinéticas K _M , k _{cat} y K _{cat} / K _M	34
<i>2.4 Resultados</i>	<i>35</i>
2.4.1 Características moleculares.....	35
2.4.1.1 Purificación y peso molecular.....	35
2.4.1.2 Punto Isoeléctrico.....	36
2.4.1.3 NH ₂ terminal	37
2.4.1.4 Glicosilación	37
2.4.2 Características bioquímicas	38
2.4.2.1 Efecto de la temperatura y del pH sobre la actividad de la tripsina.....	38
2.4.2.2 Efecto del calcio e inhibidores sobre la actividad de la tripsina	39
2.4.3 Parámetros cinéticos	40
<i>2.5 Discusión</i>	<i>42</i>
<i>2.6 Conclusiones</i>	<i>46</i>
Parte 3	47

3.0 Genotipo y modulación de las tripsinas	47
3.1 <i>Introducción</i>	47
3.2 <i>Objetivos particulares</i>	49
3.3 <i>Materiales y método</i>	50
3.3.1 Evaluación del fenotipo de las tripsinas.....	50
3.3.2 Evaluación del genotipo y segregación mendeliana	51
3.3.3 Fenotipo durante un ciclo digestivo.....	51
3.3.4 Fenotipo de las tripsinas en heces.....	53
3.4 <i>Resultados</i>	55
3.4.1 Información genotípica a partir de análisis electroforético.....	55
3.4.2 Fenotipo durante un ciclo alimenticio.....	57
3.4.3 Fenotipo de las tripsinas en heces.....	58
3.5 <i>Discusión</i>	59
3.6 <i>Conclusiones</i>	62
Discusión general	63
Perspectivas	68
Bibliografía citada.....	71
Anexo I.....	81

Lista de Figuras

Fig 1.1 Representación de los péptidos utilizados como antígenos.

Fig 1.2 Identificación del tripsinógeno utilizando SDS-PAGE y Western blot.

Fig 1.3 Identificación del tripsinógeno en cortes seriados de la región proximal de la glándula digestiva de *P. vannamei* alimentados.

Fig. 1.4 Identificación del tripsinógeno en cortes seriados de la región proximal de la glándula digestiva de *P. vannamei* no alimentados.

Fig 1.5. Inmunohistoquímica de la glándula digestiva de *P. vannamei* mostrando los gránulos de zimógenos dentro de las células B.

Fig. 2.1 Tripsinas purificadas de la glándula digestiva de *P. vannamei*.

Fig. 2.2 PAGE mostrando el punto isoeléctrico de las tres isoformas.

Fig. 2.3. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de las tripsinas.

Fig. 2.4. Efecto de las concentraciones de CaCl_2 e inhibidores sobre la actividad de las tripsinas.

Fig 3.1 Fenotipos observados y genotipos inferidos en la glándula digestiva de diferentes organismos del género *P. vannamei*.

Fig. 3.2 Actividad específica de tripsina y de proteinasas totales en diferentes muestras tomadas durante un ciclo de alimentación.

Fig 3.3 Fenotipos de tripsina en heces y glándula digestiva de *P. vannamei*.

Lista de Tablas

Tabla 1.1 Composición proximal del alimento comercial.

Tabla 2.1. Presencia de glucósidos en la isoformas de tripsina purificadas.

Tabla 2.2 Resumen del proceso de purificación de las tres isoformas de tripsina.

Tabla 2.3 Secuencia NH₂- terminal de las isoformas de tripsina puras.

Tabla 2.4 Comparación de los valores cinéticos de las tripsinas aisladas y tripsinas de diferente origen.

Tabla 3.1 Tiempos seleccionados para el muestreo durante un periodo de digestión de 24 h.

Tabla 3.2 Frecuencias fenotípicas de las tripsinas obtenidas de 20 familias.

Tabla 3.3 Frecuencias fenotípicas observadas en diferentes periodos durante un ciclo de alimentación.

Lista de publicaciones

1. Sainz J.C., García-Carreño F., Sierra-Beltrán A and Hernández-Cortés M.P. (Aceptado) 2004. Trypsin synthesis and storage as zymogen in the digestive gland of the shrimp *Penaeus vannamei*. Journal of Crustacean Biology
2. Sainz J.C., García-Carreño FL. and Hernández-Cortés MP. (Aceptado) *Penaeus vannamei* isotrypsins: Isolation and characterization. Comparative Biochemistry and Physiology.
3. Sainz J.C., Cruz-Hernández P., Cordova-Murueta J.H. and García-Carreño F.L (Enviado) *Penaeus vannamei* isotrypsins: Genotype and Modulation. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.

Abstract

Knowledge of the physical, chemical, and biological conditions of the digestive system of crustaceans has generated important information for promoting better utilization of food for growth and survival of the cultured shrimp. In this thesis further understanding of digestive enzymatic system, in particular the post-translational modifications of digestive trypsins in white shrimp *Penaeus vannamei* is explored.

In *Penaeus vannamei*, trypsin has three isoforms, which were studied to determine if they are stored as zymogens and in which cells or tissues. Also determined were the kinetic constants of each isoform, isoform genotypes, phenotype modulation, and advantages of having one or another phenotype in an organism.

The trypsin isoforms were labeled A, B, and C and were stored as zymogens in B-cells in the digestive gland. Histological analysis revealed that B-cells release their contents into the lumen, where they contact chyme. The isoforms were purified to study their individual characteristics and compare them with trypsins of different origins. The amino-terminus sequences of the three isoforms are identical to the sequences obtained previously. They are glycoproteins by their positive reaction with Schiff reagent and contain N-galactosamine and N-glucosamine.

Optimum pH and temperature for the isoforms was determined, as well as the effect of calcium and residual activity when incubated with proteinase inhibitors. Only calcium had a significant effect on proteinase activity. Isoform C required more calcium in the reaction solution than isoforms A and B. The Michaelis constant K_M for the three trypsins is lower than the constant for trypsins from other organisms and they have higher catalytic efficiency. Isoform C has the lowest K_M and the highest catalytic efficiency.

Isoenzyme analyses of individual shrimp show that three phenotypes exist: ABC, AB, and AC. After genetic experiments by mating typed shrimps and after segregation analysis, the three isoforms were determined to be the

product of two loci, one monomorphic and the other polymorphic. Offsprings from 20 families showed that trypsins are inherited according to Mendelian segregation. This means that the isoforms are inherited in defined proportions and they are not influenced by internal and external factors.

In conclusion, the *P. vannamei* digestive system is similar to other frequent feeder organisms, and the synthesis of trypsin does not start as a result of the stimulus of ingestion. *P. vannamei* is always enzymatically ready to digest ingested protein. Isoform C belongs to the monomorphic gene loci, and appears to be the most efficient of the three trypsins. It is synthesized in all specimens. Therefore, it appears that differences between isoforms A and B define advantages in a phenotype. Because the digestive tract is short and food residence time is 2 hr, the low K_M and high catalytic efficiency of the three isoforms are likely to be part of a digestive strategy to extract nutrients from food.

Resumen

Los esfuerzos realizados para entender el sistema digestivo de crustáceos han generado avances importantes. Una buena cantidad de experimentos han sido dirigidos para conocer las condiciones físicas, químicas y biológicas que promueven un mayor aprovechamiento del alimento, un mayor crecimiento, supervivencia y menores costos en la alimentación. En apoyo a estos esfuerzos, en esta tesis se analiza una parte del sistema enzimático, en particular, los eventos postraduccionales y las características de la tripsina que permiten la digestión de proteína en el sistema digestivo del camarón *Penaeus vannamei*.

En este organismo, la tripsina está compuesta por tres isoformas, las cuales fueron estudiadas para conocer si se almacenan como zimógenos y en que células lo hacen, así como las características bioquímicas y cinéticas de cada isoforma, también se estudió el genotipo, la modulación del fenotipo, y las ventajas que presenta cada uno de los fenotipos distribuidos en la población.

Las isoformas A, B y C, se almacenan como zimógeno en las células B de la glándula digestiva. En cortes histológicos se observó que las células B son las que vierten su contenido al lumen donde entran en contacto con el quimo. Las tres isoformas fueron aisladas para estudiarlas en forma individual y compararlas entre ellas y tripsinas de diferentes orígenes. La secuencia amino-terminal de las tres isoformas coincide con las secuencias deducidas obtenidas por otros investigadores y confirma que ellas son moléculas diferentes.

Las tres glicoproteínas fueron estudiadas para conocer la concentración óptima de calcio, temperatura, pH óptimo de actividad y la actividad residual al incubarse con inhibidores. Las características cinéticas encontradas, muestran que el K_M de las tres isoformas es mucho menor que el de las tripsinas de diferente origen y tienen una mayor eficiencia catalítica. La isoforma C presenta el menor K_M y la mayor eficiencia catalítica. Las tres

isoformas se distribuyen formando tres fenotipos: fenotipos ABC, BC y AC. Realizando experimentos con cruza entre individuos de los diferentes fenotipos, se determinó que las tres isoformas son el producto de 2 loci, 1 monomórfico y otro polimórfico con dos alelos. Las frecuencias fenotípicas en diferentes familias analizadas se ajustaron a lo esperado para una segregación Mendeliana, en las cuales los caracteres (en este caso las isoformas) se segregan en proporciones definidas y no son influenciadas por factores externos e internos.

En conclusión, el sistema digestivo de *P. vannamei* es propio de un organismo que se alimenta en forma frecuente. La síntesis de la tripsina no es iniciada por efecto de la ingestión, *P. vannamei* siempre está listo enzimáticamente para digerir proteína que ingrese al tracto digestivo. La isoforma C, la cual pertenece al locus génico monomórfico parece ser la tripsina más eficiente de las tres, esta isoforma se sintetiza en todos los organismos por lo que las diferencias entre las isoformas A y B son las que podrían generar alguna ventaja por tener uno u otro fenotipo. El bajo K_M y la alta eficiencia catalítica de las tres isoformas pueden ser parte de la estrategia digestiva debido a que el organismo tiene un intestino muy corto y la digestión se realiza en menos de 2 h después de la ingestión.

Palabras clave: tripsina, tripsinógeno, *Panaeus vannamei*, caracterización, genotipo, modulación, polimorfismo.

Glosario

Adyuvante. Una sustancia que cuando se adiciona a algún medicamento, acelera o mejora su acción.

Alelo. Una de dos o más formas alternativas de un gen, cada una con una secuencia de nucleótidos única.

Aloenzima. Variante de una enzima que es codificada por un alelo diferente

Amino ácido. Una clase de molécula orgánica que contiene un grupo amino y se puede combinar en un arreglo lineal para formar proteínas.

Anticuerpos. Son las moléculas de origen proteico producidas por los linfocitos B como una defensa primaria del sistema inmune.

ADNc. ADN que es sintetizado a partir de templados de ARN mensajero, la hebra sintetizada es comúnmente utilizada como sonda en mapeos para localizar un gen o puede ser clonada en forma de doble hebra.

Cinética enzimática. Monitoreo continuo o frecuente de los datos que arroja una reacción para determinar su velocidad.

Digestión. La conversión de alimento en el estómago e intestinos, en productos solubles y difundibles capaces de ser absorbidos por la sangre.

Dominio de activación. Parte de una molécula o estructura que participa en el sitio catalítico de la misma.

Eficiencia catalítica. Es la eficiencia con la cual una enzima cataliza una reacción en particular.

Electroforésis. Separación de moléculas cargadas en un campo eléctrico por la migración diferencial a través de un gel de acuerdo a su tamaño y su carga iónica.

Enzima. Biomolécula, proteína o RNA que cataliza la reacción química de sustratos sin ser autodestruida o alterada al final de la reacción

Epítope. Parte de una molécula antigénica contra la cual responden los receptores de las células T. Un sitio sobre una molécula grande contra el cual un anticuerpo será producido y al cual se unirá.

Fenotipo. Características desplegadas por un organismo bajo factores ambientales particulares. Es el resultado de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente.

Gen. Unidad hereditaria que contiene información genética (ADN) que es transcrita a ARN y traducida a una cadena polipeptídica (proteína). En el genoma de un organismo, es una secuencia de nucleótidos a la que se le puede asignar una función específica.

Genoma. Término utilizado para referirse a todos los genes (información genética) contenida en un solo gameto, es decir un representante de cada cromosoma.

Genotipo. La constitución genética de un organismo, que estará dada por la información heredada por ambos padres. Específicamente para un solo locus, el genotipo estará dado por los alelos heredados por ambos padres y es distinto de los caracteres expresados o fenotipo.

Glicoproteína. Es una proteína con unidades de azúcares enlazadas covalentemente via el grupo OH de la Serina y Treonina o a través del grupo amida de la Asparagina.

Heredado. Deriva de un código genético preformado y que está presente en los padres. Contrasta con lo adquirido.

Heterocigoto. Un organismo diploide que ha heredado diferentes alelos en uno o más de sus loci.

Hidrólisis. La partición de un compuesto en fragmentos por la adición de agua, el grupo hidroxilo incorporado en un fragmento y el átomo de hidrógeno en el otro.

Homocigoto. Un organismo que ha heredado el mismo alelo de ambos padres para un determinado locus.

Inhibidor. Una molécula con capacidad e reprimir o prevenir que dos moléculas activas (enzima sustrato) comiencen una reacción enzimática.

Isoenzimas. Múltiples formas de un enzima que catalizan la misma reacción pero que difieren una de otras en su secuencia de aminoácidos, pueden ser distinguibles utilizando técnicas de electroforesis.

K_M . Es la concentración de sustrato que resulta en la mitad de la velocidad máxima para la reacción enzimática.

Locus. La posición que un gen tiene en un cromosoma o dentro de un segmento de ADN genómico. Por convencionalismo, se aplica el término para referirse a genes aun cuando no se conozca su lugar en el genoma.

Loci. Plural de locus.

Masa molecular relativa (Mr). Es la masa relativa a los Daltons y no tiene unidades.

Mendel, leyes de. 1. Ley de la segregación. Los factores de un par de caracteres son segregados. En términos modernos, se refiere a la separación de los dos alelos de un individuo diploide en diferentes gametos y por ende segregación en la progenie. 2. Ley de la distribución independiente. Los miembros de diferentes pares de factores se distribuyen independientemente.

Nucleótido. Unidad monomérica del ADN y ARN, conformados por una base nitrogenada (purina o pirimidina) una pentosa (desoxirribosa o ribosa) y un grupo fosfato.

Péptido. Dos o más aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos.

Peso molecular. Es la suma de los pesos atómicos de todos los átomos que constituyen la molécula; la masa de una molécula con respecto a la masa de un átomo estándar Carbono 12.

Polimorfismo. Ocurrencia de diferentes variantes alélicas para un locus específico en una población. Se considera que un locus es polimórfico cuando en la muestra poblacional la frecuencia del alelo más común no rebase el 95-99%.

Proteína. Macromolécula compuesta por una o varias cadenas polipeptídicas de más de 100 amino ácidos, cada una de las cuales tiene una secuencia característica de aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos. Las proteínas ceden sus amino ácidos tras una hidrólisis, para ser asimilados y ayudar a la reconstrucción de proteína en los ribosomas de las células corporales.

Proteína desnaturalizada. Proteína que ha perdido su conformación nativa por exposición a un agente desestabilizante, tal como el calor.

Proteinasas. Es una enzima que corta las proteínas en posiciones internas de una cadena peptídica. Formalmente, las enzimas son peptidil péptido hidrolasas.

Punto Isoeléctrico. Es el pH en el cual una proteína pierde toda su carga eléctrica. El punto isoelectrico es muy importante en la purificación de

proteína porque este es el pH en el cual la solubilidad es mínima y en donde la movilidad en un sistema de electroenfoque es cero. Es el punto en el que la proteína se puede acumular.

Purificación. Es el aislamiento de una proteína a partir de un extracto crudo con el fin de estudiar o utilizar las características propias de esa proteína.

Secreción. Es el proceso de elaborar un producto específico como resultado de la actividad de una glándula.

Secuenciación. Establecimiento del orden de los amino ácidos (secuencia) en una cadena peptídica.

Sustrato. Compuesto específico sobre el que actúa una enzima.

Traducción. El proceso que ocurre en los ribosomas, en donde la información contenida en el mRNA es utilizada para especificar la secuencia de amino ácidos en una cadena peptídica.

Western blot. Término utilizado para referirse a la transferencia de proteína de una membrana. Las moléculas son inmovilizadas en la membrana en donde son detectadas comúnmente con anticuerpos.

Zimógeno. Precursor inactivo de un enzima (p.e.: pepsinógeno, precursor de pepsina).

Zimograma. Geles o tiras de papel en donde se evidencian y se localizan las enzimas separadas electroforéticamente.

Abreviaturas

A.O.A.C.	Asociación Oficial de Química Analítica
BAPNA	Benzoil-Arginina <i>p</i> -Nitroanilina
BSA	Albúmina de suero bovino
EDTA	Ácido etilenediamino-tetraacético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbed Assay
GD	Glándula digestiva
HRP	Peroxidasa de rábano
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Punto isoelectrico
IPT	Péptido interno de la tripsina
kDa	Kilo-Daltons
K_M	Constante de Michaelis y Menten
mA	Miliamperes
M_r	Masa relativa
PAGE	Electroforésis en geles de poliacrilamida
PBS	Buffer de fosfatos salino
PI	Alimento de PIASA
PMSF	Fenilmetilsulfonil Fluoride
PVDF	Polyvinylindano Fluoride
SBTI	Inhibidor de tripsina de Soya
SC	Alimento Silver Cap
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio

TAP	Péptido de activación de la tripsina
TLCK	Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona
TPCK	Tosil-L-Fenilalanina Clorometil Cetona
ZPCK	Carbobenzoxi-Fenil Clorometil Cetona

Introducción general

La vida es una forma de organización de la materia caracterizada por determinados procesos físicos y químicos. Esta organización le permite a los seres vivos autoregularse para obtener energía del medio, materiales para su mantenimiento, crecimiento, reproducción y sobrevivir en un ambiente cambiante.

Entre los organismos heterótrofos existe una gran variedad de sistemas que le permiten obtener energía y elementos nutricionales a partir de las plantas y animales. Los herbívoros tienen mecanismos que permiten la obtención, ingestión, digestión, absorción y excreción de los diferentes materiales que componen las plantas. Los heterótrofos carnívoros requieren de mecanismos que les permite hacer lo mismo que los herbívoros. Sin embargo, las peculiaridades de cada alimento como la estacionalidad, disponibilidad, movilidad y características propias del alimento como tamaño, consistencia del tejido y la defensa hacen que sus predadores tengan las estructuras anatómicas apropiadas para la captura, ingestión, digestión y excreción, además de la modulación estratégica para el funcionamiento enzimático antes, durante y después de la digestión (Hochachka y Somero, 1984).

La velocidad y cantidad de alimento a digerir están condicionadas por factores internos como el ciclo reproductivo, si son homeotermos, hábitos alimenticios, hábitat y estado de salud. Todos los factores que requieren energía y materiales influyen la capacidad digestiva de los organismos (Hochachka y Somero, 1984).

Cuando se toma en cuenta la frecuencia alimenticia, los heterótrofos se dividen en dos grandes grupos: los consumidores frecuentes y los no frecuentes (Secor, 2001). Los consumidores frecuentes están siempre preparados para ingerir alimento y aprovecharlo al máximo, esto implica una preparación previa de todos los componentes que toman parte. Por ejemplo, la rata (Fukuoka et al., 1986) y el cangrejo *Pagurus bernhardus* (Babu y Manjulatha, 1995) producen tripsina en forma de zimógenos. Estas son las formas inactivas de las enzimas

que son almacenadas y activadas en un proceso particular. La ventaja de sintetizar enzimas como zimógenos es precisamente tener la posibilidad de que haya enzimas listas para digerir alimento y mientras están almacenadas no causen daño a los tejidos (Lonsdale-Accles et al., 1978).

La enzima proteolítica más abundante en el sistema digestivo de organismos heterótrofos es la tripsina (E.C.3.4.21.4) (de Dios et al., 1999). Además, la tripsina es una proteinasa que activa los zimógenos de otras proteinasas como las quimotripsinas, carboxipeptidasas, y aminopeptidasas (Kitamoto et al., 1994) y se encuentra en el sistema digestivo de la mayoría de los organismos heterótrofos (Martínez et al., 1988, Johnston et al., 1995). Los estudios donde se han analizado las secuencias de aminoácidos de las tripsinas de organismos inferiores y superiores muestran una moderada cantidad de aminoácidos conservados (30-40%), la mayoría de estos se encuentran en sitios funcionales de la enzima como el sitio catalítico, el sitio de especificidad, los puentes disulfuro y la secuencia amino terminal (Rypniewski et al., 1984). Las sustituciones en la secuencia de aminoácidos debido a las mutaciones en los nucleótidos durante el proceso evolutivo han ocurrido en sitios que no son de vital importancia para el funcionamiento de las tripsinas (Neurath et al., 1967). Sin embargo, estas sustituciones tienen efectos importantes en varios aspectos como son diferencias en sus capacidades cinéticas y bioquímicas, las cuales están relacionadas con la forma de vida del organismo en el que se sintetizan (Hochachka y Somero, 1984).

En organismos que son producidos por técnicas de zootecnia se han estudiado las tripsinas digestivas con el fin de relacionarlas con los hábitos alimenticios en busca de la optimización de la digestión del alimento (Secor y Diamond, 2000). Otros estudios se han enfocado en la participación de las tripsinas en la eliminación de microbios transmisores de enfermedades como el mosquito *Aedes aegypti* (Noriega y Wells, 1999) y también en la búsqueda de enzimas con capacidad de ser integradas en procesos biotecnológicos (Haard, 1992).

Entre las especies, las enzimas se generan con diferente número de isoformas las cuales representan una ventaja a los organismos (Hartl y Clark, 1997). *P. vannamei* presenta 3 isoformas de tripsina que en principio hacen lo mismo, pero que sin embargo, sus capacidades diferenciales tienen que ser evaluadas en forma individual y en los diferentes fenotipos para dilucidar las ventajas de poseer uno u otro, como ocurre en algunas especies fitófagas en las cuales algunas de sus isoformas son resistentes a inhibidores (Broadway, 1997) o en el salmón donde con diferentes isoformas de tripsina se obtiene una mejor digestión *in vitro* y un mejor crecimiento de los organismos (Schulte et al., 2000).

Las isoformas de otras enzimas se han analizado con electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para estudiar la expresión de alelos que codifican para enzimas en varias especies o en híbridos (Frankel, 1989; Weck y Brandon, 2000), la estructura de la población (Fujino, 1978; Brown, 1991), la variabilidad genética para implementar programas de pie de cría (Brown, 1991; Rebordinos et al., 1999), análisis de genética de poblaciones para observar el nivel de subdivisión de poblaciones y entrecruzamiento (Hamm y Burton, 2000) y analizar una posible funcionalidad diferencial relacionada con cierto fenotipo (Bassompierre et al., 1998, Schulte et al., 2000).

La tesis está dividida en tres partes: en la primera parte se evaluó la presencia del tripsinógeno utilizando anticuerpos que reconocen el péptido de activación del tripsinógeno el cual fue deducido previamente por técnicas de biología molecular (Klein et al., 1996) y también se evaluó su sitio de almacenamiento en la glándula digestiva. En la segunda parte se reporta la purificación de las tres isoformas de tripsina y la evaluación de sus propiedades como masa molecular, punto isoeléctrico y glicosilación, se evaluaron sus características bioquímicas como máxima actividad a diferente pH, temperaturas y concentraciones de CaCl_2 y la actividad en presencia de inhibidores de proteinazas. Por último se analizaron sus constantes cinéticas K_M , k_{cat} y k_{cat} / K_M . En la tercera parte se realizó un estudio para observar el número de loci génicos que codifican para las tres isoformas de tripsina de la glándula digestiva, la forma en que se heredan y la modulación del fenotipo. Al final se

hace un análisis general de las tres partes y se discuten las perspectivas del trabajo.

Hipótesis

1. Las isoformas de tripsina de la glándula digestiva de *Penaeus vannamei* se sintetizan y se almacenan como Zimógeno y poseen diferente secuencia amino terminal.
2. Las tres isoformas de tripsina purificadas de la glándula digestiva de *P. vannamei* tienen diferencias en sus características bioquímicas y cinéticas.
3. Las tres isoformas de tripsina de la glándula digestiva de *P. vannamei* están organizadas en 2 loci génicos.
4. Las tres isoformas de tripsina de la glándula digestiva de *P. vannamei* presentan segregación mendeliana.

Justificación

El camarón blanco *Penaeus vannamei*, es el crustáceo más cultivado y rentable en el Pacífico oriental (Rosenberry, 1995). Sin embargo, aún existen deficiencias en el proceso del cultivo, razón por la cual muchos grupos de investigación se encuentran trabajando en la búsqueda de factores modulables que permitan aminorar estas deficiencias y mejorar el producto.

Como resultado de las investigaciones previas se conocen ya algunos aspectos fisiológicos en diferentes ambientes (Hewitt y Duncan 2001, Rosas et al., 2001), los requerimientos nutricionales en los diferentes estadios de vida (Lee et al., 1984, Chen et al., 1985) y durante la reproducción (ACUACOP 1977, Kanazawa, 1983). En nutrición, se reportan concentraciones apropiadas de proteína en el alimento (Piedad-Pascual, 1990; Akiyama et al., 1991) y la contribución de los suplementos (Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002). Por otro lado, también se han estudiado algunos componentes antinutricionales en las diferentes fuentes de proteína (Ezquerria et al., 1997). Estos hallazgos son importantes porque han tenido una aplicación directa en el manejo de los alimentos en los cultivos. Sin embargo, se mantiene sin esclarecer los procesos internos que permiten que un alimento, la calidad en el proceso de ese alimento y una concentración en particular, tengan mejores resultados en términos de mayor digestibilidad, ganancia en peso y supervivencia que otros. La mejor manera de explicar este hecho, que además nos puede llevar a optimizar aun más lo ya descrito, es describiendo y conociendo la modulación de las partes que conectan el alimento con la disponibilidad de los materiales resultantes de la digestión en el torrente sanguíneo (Dittrich 1992). Esta parte se refiere a la digestión en la que participan principalmente las enzimas digestivas.

La digestión de proteína en *P. vannamei* la realizan una serie de endoproteinasas como la tripsina y la quimotripsina (Le Moullac et al., 1994) y exoproteinasas como las carboxipeptidasas y aminopeptidasas (Lee et al.,

1984). De ellas al momento solo se ha aislado y caracterizado la quimotripsina (Hernández-Cortés et al., 1997). La tripsina no había podido ser purificada a pesar de algunos esfuerzos y de la necesidad de describir sus características, las cuales son una ayuda para el entendimiento del proceso digestivo (Klein et al., 1996).

Objetivo General

Dilucidar aspectos postraduccionales de las isoformas de tripsina de la glándula digestiva del camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*. Confirmar la existencia del tripsinógeno e identificar las células que lo almacenan, purificar y caracterizar las tres isoformas, definir el genotipo y su modulación.

Objetivos particulares

1. Generar anticuerpos que detecten el péptido de activación de las isoformas de tripsina y un péptido interno de la tripsina.
2. Analizar si la secuencia deducida del péptido de activación se encuentra en las moléculas de tripsina desnaturalizada utilizando los anticuerpos generados en el objetivo 1.
3. Analizar si el tripsinógeno se encuentra almacenado en la glándula digestiva y en que células lo hace.
4. Purificar las tres isoformas de la tripsina de la glándula digestiva de *P. vannamei* sin alterar sus capacidades bioquímicas y cinéticas.
5. Realizar una caracterización bioquímica, cinética y molecular de las tres isoformas purificadas.
6. Comparar las características de las tres isoformas con tripsinas de otros organismos.
7. Definir cuantos loci génicos y sus respectivas variantes alélicas están involucradas en el genotipo de las tripsinas.
8. Definir si en las tripsinas de *P. vannamei* ocurre una segregación mendeliana.
9. Definir si factores externos como el alimento y factores internos como fluctuaciones en la actividad de tripsina y el ciclo de muda, modulan el fenotipo de las tripsinas.

Parte 1

1.0 Identificación y localización del tripsinógeno

1.1 Introducción

En Mamíferos, las enzimas digestivas son secretadas a través del ducto pancreático al duodeno en el intestino delgado en respuesta a una señal hormonal cuando el alimento pasa al estómago. Sin embargo, las enzimas no son sintetizadas en su forma activa porque las proteinasas libres podrían digerir el tejido pancreático (Light y Janska, 1989). Las enzimas son sintetizadas con un péptido del lado NH₂-terminal el cual desestabiliza la molécula y la mantiene catalíticamente inactiva, a estas moléculas se les llama zimógenos. Para generar la enzima activa, los zimógenos deben ser hidrolizados enzimáticamente en el intestino (San Roman et al., 1995).

En mamíferos, la serin proteinasa enteropeptidasa es el activador fisiológico del tripsinógeno y tiene la especificidad por la secuencia (Asp)₄-Lys-Ile. En su forma activa, la tripsina cataliza la conversión de otros zimógenos a su forma activa por cortes proteolíticos específicos. De hecho, una vez que la tripsina es activada, esta activará otras moléculas de tripsinógeno en un proceso autocatalítico (Light y Janska, 1989; Kitamoto et al., 1994).

El tripsinógeno y la tripsina esencialmente tienen una estructura similar en un 85%, el 15% restante de la molécula es el llamado dominio de activación. Este dominio está parcialmente o totalmente desordenado en el tripsinógeno a temperatura fisiológica. En la molécula de tripsina, donde el residuo NH₂-terminal es Ile-16, el dominio de activación está bien ordenado, por lo que se ha sugerido que el tripsinógeno representa una tripsina con plegamientos incompletos, con variabilidad estructural y deformada en el dominio de activación (Brungler et al., 1987).

Al tripsinógeno a sido posible purificarlo ha partir de sistemas digestivos de diversos organismos como el avestruz (Bodley et al., 1995), en humanos

(Sahin-Tóth y Tóth, 2000), en ratas Wistar (de Dios et al., 1995), en el cerdo de Guinea (San Román et al., 1995) y en la *Anguilla japonica* (Yoshinaka et al., 1984). Aunque en otros organismos no se ha aislado el tripsinógeno, éste se ha detectado con técnicas inmunológicas en el lenguado *Paralichthys olivaceus* (Kurokagua y Suzuki, 1995) y en el insecto *Stomoxys calcitrans* (Moffat y Lehane, 1995). En crustáceos utilizando técnicas bioquímicas se han detectado células secretoras de gránulos de zimógenos en los cangrejos *Pagurus bernhardus* y *Clibanarius longitarsus* (Babu y Manjulatha, 1995). Por otro lado, de acuerdo a la secuencia deducida, se ha inferido que la tripsina tiene el péptido de activación del tripsinógeno en organismos como *Penaeus vannamei* (Klein et al., 1996), *Penaeus monodon* (Lehnert y Johnson, 2002), en el insecto *Lygus lineolaris* (Zeng et al., 2002) y en el coleoptero *Ryzopertha dominica* (Zhu y Baker, 1999). Sin embargo, de estos últimos no es claro si este péptido se traduce y si es funcional.

El control de la secreción y activación del tripsinógeno tiene consecuencias importantes en términos de la formación de un jugo pancreático compuesto de proteinasas y peptidasas. Se han desarrollado técnicas que permiten detectar la secreción de tripsinógeno del páncreas basadas en métodos que consisten en medir la actividad de tripsina en jugos recién secretados, después activando el tripsinógeno con enteropeptidasa y midiendo la actividad nuevamente, la diferencia entre las actividades es proporcional a la concentración del tripsinógeno (Mithofer et al., 1995; San Roman et al., 1995).

Realizando estudios con citometría de flujo, de Dios et al. (1999) demostraron que la hormona colecistoquinona estimula la secreción de tripsinógeno, pero no la de amilasa en ratas. También observaron que esta hormona estimula la secreción por contacto directo con los gránulos de zimógeno sin necesidad de segundos mensajeros. En crustáceos se conoce la estimulación de la secreción de enzimas cuando los organismos son tratados con la hormona hiperglucémica de crustáceos (Sedlmeier, 1988). Sin embargo, el mecanismo no está del todo claro.

La detección del péptido de activación (TAP) ha sido posible en mamíferos utilizando anticuerpos contra este hexapéptido. Sin embargo, solo es posible detectar el TAP hidrolizado de la tripsina, cuando éste está unido para formar el tripsinógeno, el TAP no se detecta (Fernández-del castillo et al., 1992). En el mercado se encuentra un producto llamado TAPKit el cual es un marcador sensible de la activación del tripsinógeno. El kit es un inmunoensayo que mide el TAP en orina, plasma y otros fluidos corporales.

En crustáceos, no ha sido posible la detección del tripsinógeno por medios bioquímicos, ni siquiera se sabe si éste existe almacenado en su glándula digestiva (Klein et al., 1996). En nuestra experiencia, las mismas unidades de actividad son detectadas antes y después de tratar los extractos con tripsina bovina y con diferentes tiempo de incubación. Lo que se sabe, es que toda la batería (en términos de unidades de actividad) de tripsinas de la glándula digestiva permanece constante desde la obtención del extracto. Estudios realizados con técnicas de biología molecular han mostrado que las moléculas de tripsina se transcriben y presentan en el lado NH₂-terminal un péptido de 14 aminoácidos con características de péptido de activación (Klein et al., 1996). Aunque este hecho sugiere la probabilidad de que se traduzca el péptido y que sea funcional, podría no ocurrir, como sucede en el mosquito hematófago *Aedes aegypti* (Noriega et al., 1996) y en el cual se ha detectado el péptido de activación del tripsinógeno en la secuencia de nucleótidos, sin embargo, no hay evidencia de que se traduzca y si lo hace, rápidamente es hidrolizado para que la enzima realice sus funciones.

En este trabajo utilizamos una técnica inmunológica para detectar el presunto TAP del tripsinógeno de *P. vannamei* y se analizó si el tripsinógeno existe almacenado en células de la glándula digestiva.

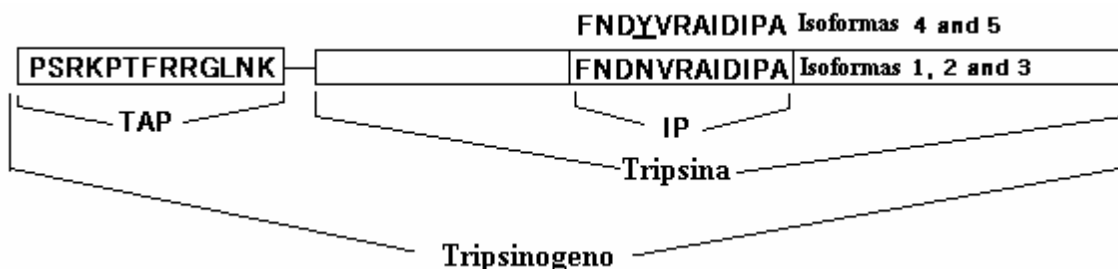
1.2 Objetivos particulares

1. Generar anticuerpos que detecten el péptido de activación de las isoformas de tripsina y un péptido interno de la tripsina.
2. Analizar si la secuencia deducida del péptido de activación se encuentra en las moléculas de tripsinógeno desnaturalizado utilizando los anticuerpos generados en el objetivo 1.
3. Analizar si el tripsinógeno se encuentra almacenado en la glándula digestiva y en que células lo hace.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Preparación de haptenos

Con el fin de generar anticuerpos que nos permitan detectar específicamente las moléculas de tripsina en extractos inmovilizados con la técnica de Western blot o inmunohistoquímica, se sintetizaron dos péptidos de acuerdo a la secuencia deducida de las variantes de tripsina reportadas por Klein et al. (1996) para *Penaeus vannamei*. Los péptidos que fueron sintetizados en la compañía “ResGen” Huntsville, AL, US son el péptido de activación del tripsinógeno (TAP), el cual se compone de 13 amino-ácidos y un péptido interno (IPT) que incluye 12 amino-ácidos correspondientes a los residuos 135-146 de la variable mas larga que codifica para el tripsinógeno de la tripsina (Fig. 1.1). Las secuencias fueron tomadas de la base de datos SWISSPROT con el código de acceso [TRYP-PENVA] o en la base de datos para nucleótidos EMBL con los códigos de acceso Y15039, Y15040 y Y15041. La Figura 1 muestra las secuencias de los péptidos escogidos. Los criterios para escoger el IPT fueron: localización en la superficie de la molécula y su antigenicidad (Von-Heijne, 1987). Los residuos que forman el IPT forman un loop expuesto el cual fue deducido por la comparación con otras tripsinas como la de bovino [TRYC-bovine], bacteria [TRYP-Strgr], y de un hongo [TRYP-Fusox] (Ripniewski et al., 1994). Las secuencias y las estructuras tridimensionales fueron detectadas con el programa Cn3D, el cual está disponible en el National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov (Hogue, 1997).



Representación de los péptidos utilizados como antígenos. Se indican las secuencias, posiciones relativas y variantes, se indican también las diferencias entre las isoformas.

Para incrementar la antigenicidad, los péptidos fueron acoplados a una molécula acarreadora (Dyberg y Oldstone, 1986). Cada uno de los péptidos en una concentración 7M fue incubado durante 2 h con 10% glutaraldehído, 5% de glicerol y dialisado contra un buffer de fosfatos (PBS): 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.2. Cada péptido fue mezclado con una solución 0.2 M de albúmina de suero bovina (BSA) (Harlow y Lane, 1988). Teóricamente, la relación péptido-BSA permite un complejo de 30-35 determinantes antigénicos por molécula acarreadora. Para confirmar la eficiencia en el acoplamiento, el complejo se sometió a un análisis electroforético en condiciones no reducidas como se menciona en el apartado de electroforésis.

1.3.2 Producción de anticuerpos

Los anticuerpos fueron generados en conejos machos *Oryctolagus cuniculus* de 3.5 kg. Los conejos fueron mantenidos en el bioterio del Centro de Investigaciones Biológicas en donde se les suministró alimento y agua *ad libitum*. Los complejos TAP-BSA o IPT-BSA en concentración de 1mg ml⁻¹ en PBS fueron diluidos en adyuvante de Freund completo e inyectados intradérmicamente en la espalda de los animales en intervalos de 3 semanas. Como control también fueron generados anticuerpos contra BSA . Las muestras de sangre fueron tomadas antes de la primera inmunización (suero normal) y 10 días después de cada inmunización.

La sangre fue colectada de la vena marginal de la oreja e incubada a 10 °C durante 12 h. El suero fue separado del coágulo sanguíneo y centrifugado durante 20 min a 2000 g. El suero fue colectado y etiquetado como anticuerpos anti-TAP, anti-IPT o controles. La titulación de los anticuerpos se realizó con el método de ELISA usando anticuerpos anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) como segundo anticuerpo (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA). También con la técnica de ELISA los anticuerpos fueron examinados en cuanto a su especificidad utilizando antígenos homólogos (BSA, extracto de glándula digestiva, IPT y TAP) y antígenos heterólogos (Péptidos IPT y TAP cruzados y quimotripsina bovina).

1.3.3 Muestras de la glándula digestiva

Organismos del género *Penaeus vannamei*, fueron mantenidos en el laboratorio húmedo del Centro de Investigaciones Biológicas en tanques de fondo plano a 28 °C, 30 ‰ de salinidad y saturación de oxígeno. Los organismos fueron alimentados dos veces al día, a las 8:00 y a las 17:00 con alimento de la Promotora Industrial de Acuasistemas S.A. (PIASA) (Tabla 1.1). Los organismos utilizados en estos experimentos estuvieron en estadio de intermuda (Chan et al., 1988).

Tabla 1.1 Composición proximal del alimento comercial.
SC alimento de Silver Cup, PI alimento de PIASA.

Alimento	Agua (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Cénizas (%)	Fibra cruda (%)	Energía kJ/g
SC	6.5 ± 0.06	46.6 ± 0.1	7.2 ± 0.07	11.5 ± 0.02	1.9 ± 0.03	18.8 ± 0.04
PI	6.9 ± 0.06	36.8 ± 0.2	4.9 ± 0.04	7.4 ± 0.02	1.9 ± 0.09	19.4 ± 0.05

Con el objetivo de detectar el tripsinógeno por la técnica de Western blot, los organismos fueron decapitados, la glándula digestiva extirpada y homogenizada en acetona 1:2 (P:V) a 4 °C para precipitar la proteína. El precipitado fue disuelto en 20 mM de ácido etilendiamino-tetracético (EDTA) en PBS, desnaturalizado en buffer de muestra de Laemmli (1970) y analizado inmediatamente.

1.3.4 Inmunoblotting

Para este análisis, un grupo de 40 organismos fue mantenido en ayuno durante 24 hr y otro grupo de 40 organismos fue sacrificado 3 hr después de alimentarse. Se analizaron por cuadruplicado los extractos de glándula digestiva en SDS-PAGE 12% acrilamida en condiciones reductoras (Laemmli, 1970). Un gel con las muestras fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250. Las tres replicas restantes fueron transferidas por Western blot a membranas de

polivinilideno de fluoruro (PVDF). La eficiencia de la transferencia fue evaluada con la tinción de Ponceau. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada (0.2% Tween 20 y 5% leche descremada en PBS a pH 7.2) durante 2 h. Las membranas se sumergieron en una solución diluida 1:3000 de anticuerpos anti-TAP, anti-IPT o controles en PBS adicionado con 0.2% Tween 20. Los anticuerpos bloqueados con su respectivo antígeno fueron utilizados como control. Las membranas fueron lavadas 3 veces por 20 min en PBS-Tween 20 y se incubaron 1 h con anticuerpos anti-IgG de conejo acoplada a la HRP 1:5000 en PBS-Tween. Los péptidos fueron detectados indirectamente utilizando 6 mg/ml de 3,3 diaminobenzamidina en PBS adicionado con NiCl_2 y 0.2% H_2O_2 como sustrato, el cual reacciona colorimétricamente por la acción de la peroxidasa (Harlow y Lane, 1988).

1.3.5 Inmunohistoquímica

Cuarenta glándulas digestivas de organismos alimentados y otras cuarenta de organismos mantenidos durante 24 h en ayuno, fueron disectadas y fijadas durante 36 h en formaldehído diluido al 3.7% con agua de mar. Los tejidos fijados fueron deshidratados en soluciones con concentraciones crecientes de etanol a temperatura ambiente y embebida en parafina. De cada glándula digestiva se realizaron cortes histológicos seriados de 3 μm . Los cortes fueron montados en porta-objetos y secados durante 16 h a temperatura ambiente. Después de retirar la parafina con Xilol los cortes se hidrataron y las secciones fueron tratadas en orden serial para obtener imágenes de células teñidas con Hematoxilina-Eosina, anti-TAP, anti-IPT y los anticuerpos previamente incubados con su antígeno. Los anticuerpos fueron diluidos 1:200 en PBS (Harlow y Lane, 1988). Después de enjuagar las secciones con PBS, fueron incubadas con anticuerpos anti-conejo-HRP, diluido 1:3000 en PBS. Finalmente las secciones fueron lavadas con PBS y sumergidas en el sustrato. La ubicación de las moléculas de tripsinógeno se indica por la reacción cromogénica del HRP (Harlow y Lane, 1988). Las fotos mostradas en los resultados fueron tomadas con una cámara 1.4 megapíxeles CoolSNAP-Pro

cooled CCD utilizando el manejador de imágenes Image-Proplus 4.1 Olympus software.

1.4 Resultados

1.4.1 Producción de anticuerpos

Los anticuerpos generados contra el TAP y el IPT mostraron títulos de 1:3200 contra sus respectivos antígenos. No se observó ninguna reacción cruzada cuando los anticuerpos fueron examinados con los TAP, IPT cruzados y contra quimotripsina. Los anticuerpos reaccionaron negativamente contra los mismos antígenos cuando los anticuerpos se incubaron previamente con su respectivo antígeno.

1.4.2 Immunobloting

La Figura 1.2 carril I, muestra la composición proteica del extracto de la glándula digestiva. El mismo extracto inmovilizado por Western blot y tratado con el anticuerpo anti-TAP mostró tres bandas con una movilidad relativa de 29.7, 30.2 y 32.9 (Fig 1.2 carril II), mientras que la misma muestra tratada con el anticuerpo anti-IPT mostró solo 2 bandas de similar movilidad relativa a las 2 bandas de mayor peso observadas en el extracto tratado con el anticuerpo anti-TAP (30.2 y 32.9) (Fig 1.2 carril III). Los anticuerpos anti-TAP no detectaron ninguna banda de proteína cuando los extractos no fueron preparados con acetona. No hubo reacción positiva cuando el extracto inmovilizado fue tratado con el suero control o cuando los anticuerpos anti-TAP y anti-IPT fueron incubados previamente con su antígeno.

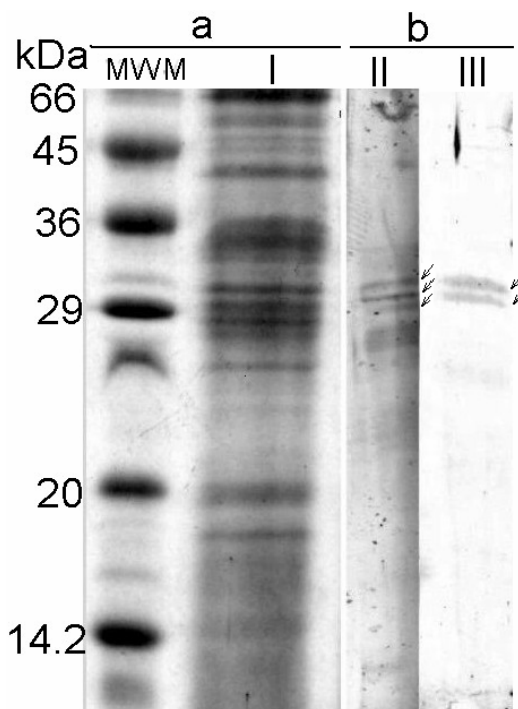


Fig 1.2 SDS-PAGE (a) y Western blot (b) de extractos proteicos de la glándula digestiva de *P. vannamei*. MWM, Marcadores de peso molecular. I, Extracto teñido con Coomassie. II, Extracto tratado con anticuerpos anti TAP. III, Extracto tratado con anticuerpos anti IPT. Las flechas indican las diferentes bandas.

1.4.3 Inmunohistología

Se identificaron diferentes tipos celulares en los cortes histológicos cuando se tiñó con Hematoxilina-Eosina (Figs 1.3 a y 1.4 a). Las figuras muestran cortes seriales en parafina de 3 μm de la glándula digestiva. Los tipos celulares fueron detectados de acuerdo con Bell y Lightner (1988). Las células B contienen una vacuola grande, la superficie de las células es convexa y el núcleo está desplazado hacia la región basal de la célula. Las células F tienen un núcleo basal grande, la célula es de apariencia fibrosa y con un citoplasma altamente basófilo.

Los 80 camarones analizados en los dos grupos alimentados y mantenidos en ayuno, presentaron reacción positiva únicamente en las células B (Figs 1.3 y 1.4). Las figuras muestran áreas equivalentes de los cortes seriales.

Cuando los camarones fueron alimentados (Fig 1.4) fue posible reconocer el alimento en el lumen. Las mismas células B y el alimento en el lumen reaccionaron en forma positiva cuando fueron tratados con los anticuerpos anti-TAP y anti-IPT (Figs 1.4 B y 1.4 C). Los controles con los anticuerpos bloqueados por su respectivo antígeno, mostraron resultados negativos (Figs 1.3 D y 1.4 D).

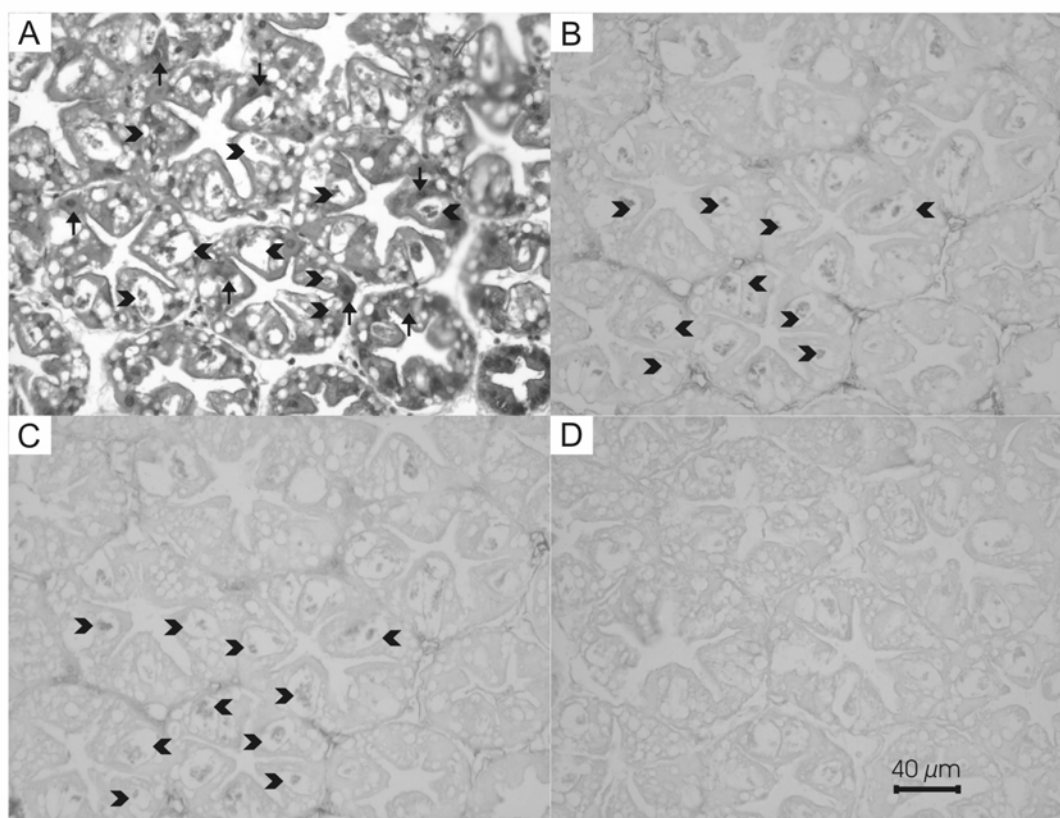


Fig 1.3 Cortes seriados de la región proximal de la glándula digestiva de organismos *P. vannamei* en ayuno. (A) Tinción con Hematoxilina y Eosina, se indican las células B (▲) y células F(↑). (B) Sección tratada con anticuerpos anti TAP. (C) Sección tratada con anticuerpos anti IPT. (D) Sección tratada con anticuerpos anti IPT bloqueados con su antígeno como control.

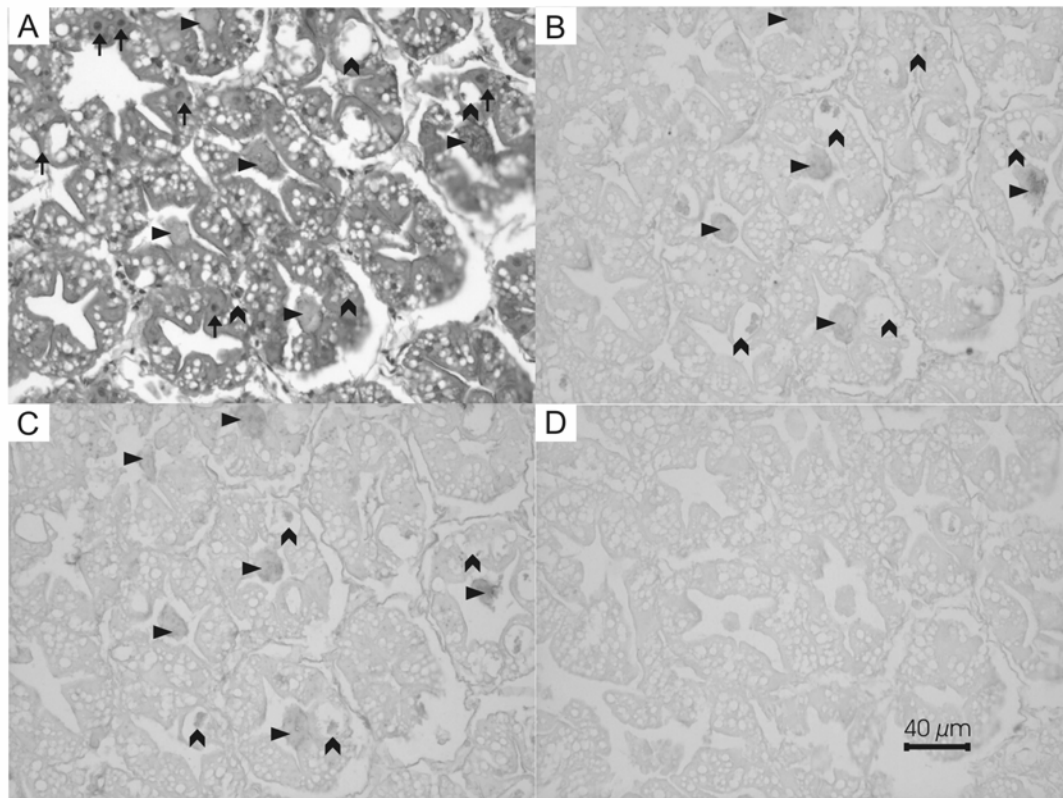


Fig. 1.4 Cortes seriados de la región proximal de la glándula digestiva de organismos *P. vannamei* alimentados. (A) tinción con Hematoxilina y Eosina, se indican las células B (▲) y células F(↑). (B) Sección tratada con anticuerpos anti TAP. (C) Sección tratada con anticuerpos anti IPT. (D) Sección tratada con anticuerpos anti TAP bloqueados con su antígeno como control.

Utilizando un aumento de 40 X, la reacción positiva en las células B, mostró agregados moleculares formando gránulos (fig 1.5). Se observaron células B positivas en diferentes secciones de la glándula digestiva con ambos anticuerpos.

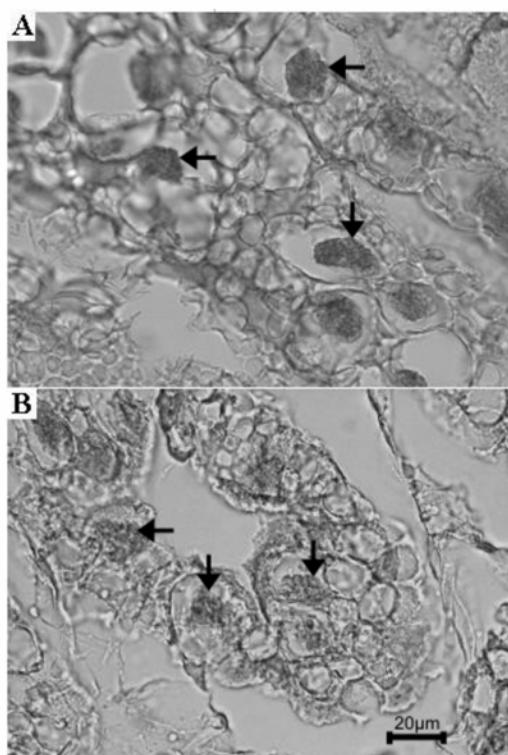


Fig 1.5 Inmunohistoquímica de la glándula digestiva de *P. vannamei* mostrando los gránulos de zimógenos dentro de las células B. (A) Sección longitudinal tratada con anticuerpos anti TAP. (B) Sección transversal tratada con anticuerpos anti IPT. La barra indica 20 µM.

1.5 Discusión

El estudio del sistema digestivo en diversos organismos ha dado como resultado el descubrimiento de un número todavía no determinado de diferentes formas de modulación enzimática para digerir la proteína del alimento.

El conocimiento de las particularidades de la modulación de las tripsinas, ha permitido establecer una relación con los hábitos alimenticios de los organismos (Secor, 2001) y con un mejor aprovechamiento de la proteína en el alimento (Steffens, 1989). Con el fin de conocer si las tripsinas de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei* se regulan postraduccionalmente, en este trabajo nos enfocamos a investigar: si las tripsinas son almacenadas como zimógenos y en que células ocurre el almacenamiento.

Utilizando la técnica de Western blot y un anticuerpo que reconoce específicamente el péptido de activación de la tripsina (TAP) propuesto por Klein et al. (1996), se encontró que el TAP se encuentra en las moléculas de tripsina tratadas con acetona e inhibidores durante la preparación del extracto. Este hallazgo nos permite establecer que la tripsina almacenada contiene este péptido que en teoría le confiere inactividad y por tanto es un zimógeno. Los extractos que no fueron tratados con acetona e inhibidores solo fueron reconocidos por los anticuerpos anti-IPT y no por el anti-TAP, lo que nos sugiere que el TAP fue hidrolizado y totalmente separado de la estructura de la tripsina. Los criterios para identificar las moléculas de tripsinógeno fueron: primero que los anticuerpos anti-TAP y anti-IPT no presentaran reacción cruzada y segundo que el anticuerpo anti-TAP detectara la misma molécula que el anti-IPT por el método de Western blot o por inmunohistología.

La detección del tripsinógeno en *P. vannamei* es difícil porque éste se activa rápidamente, posiblemente por autoactivación (Van Wormhoudt et al., 1995). Para prevenir la activación del tripsinógeno durante la homogenización, además de la acetona se adicionó EDTA, agentes reductores y calor. Este tratamiento elimina la actividad enzimática, no solo de las tripsinas sino también la de otras enzimas que pueden estar involucradas en la activación.

El péptido de activación de las tripsinas es diferente entre las especies. En vertebrados, el péptido es de seis residuos altamente ácidos por la presencia de 4 Asp. La molécula responsable de la hidrólisis de este péptido para convertirla en tripsina es la enteropeptidasa (Light y Janska, 1989). En *P. vannamei* el péptido de activación es de 14 aminoácidos y su composición sugiere que el activador es la misma tripsina (Van Wormhoudt et al., 1995; Klein et al., 1996).

Analizando extractos de la glándula digestiva (GD) con Western blot y anticuerpos (Le Moullac et al., 1996) y con substrato-SDS-PAGE e inhibidores (Lemos et al., 2000) se observó que al menos existen tres isotripsinas. Con los anticuerpos generados contra las secuencias deducidas por Klein et al. (1996), se demuestra que en efecto, la tripsina es traducida en forma de 3 zimógenos, los cuales se almacenan en las células B de la GD.

Klein et al. (1996 y 1998) encontraron que las variantes deducidas conservan la misma secuencia de aminoácidos en el TAP, por lo tanto todos ellos tienen la misma posibilidad de ser detectadas por el anticuerpo anti-TAP. Sin embargo, en el análisis de Western blot con el extracto desnaturalizado se detectaron solo dos bandas. Este hallazgo, el cual confundió en un principio la investigación, fue esclarecido cuando se aislaron las isotripsinas (Parte 2 de la tesis) y se observó que dos de ellas presentaron el mismo corrimiento electroforético, empalmándose uno con la otra, de tal manera que solo se observan dos bandas cuando en realidad son tres.

Con el análisis inmunohistoquímico de la GD de *P. vannamei* se encontró que los anticuerpos anti-IPT y anti-TAP detectan sus respectivos epítopes en los mismos gránulos dentro de las células B de la GD y en los túbulos cuando hay alimento. No se observó ninguna señal en las células E, R y F de las mismas glándulas analizadas. Gibson y Baker (1979) reportaron que las células B están relacionadas con la actividad enzimática y Ceccaldi (1989) observó una función secretora en las mismas células. Estudios con sondas de ARNm para enzimas como la amilasa, cathepsina-L, quitinasa-1 y tripsina en *P. monodon* (Lehnert y Johnson, 2002) y quimotripsina en *P. vannamei* (Le Moullac et al., 1996)

mostraron su señal en el citoplasma de las células F y no se detectó ARNm en las células B. Lehnert y Johnson (2002) sugieren que la transcripción y el almacenamiento de las enzimas digestivas pueden no estar relacionadas.

La síntesis y almacenamiento de las proteinasas digestivas como zimógenos tiene numerosas ventajas para los organismos: se reduce el riesgo de daño en el tejido por efecto de la actividad enzimática y los zimógenos están listos para secretarse y activarse cuando son requeridos (Fukuoka et al., 1986, Brungler et al., 1987).

1.6 Conclusión

1. En este estudio se presentan evidencias de que la secuencia deducida del péptido de activación del tripsinógeno esta presente en las moléculas almacenadas de tripsina.
2. El tripsinógeno se encuentra almacenado en las células B de la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei*.
3. Las tripsinas son reguladas a nivel pos-traduccionaI sintetizando y almacenando tripsinógeno para disponer de ella cuando sea necesaria.

Parte 2

2.0 Purificación y caracterización de tripsinas

2.1 Introducción

La tripsina es una enzima que pertenece a la familia de las serin proteinasas. Esta enzima ha sido encontrada en el tejido pancreático de todas las especies estudiadas, desde invertebrados hasta mamíferos (Martínez et al., 1988) con un alto grado de similitud en su estructura primaria, comparten algunos elementos en su estructura tridimensional y en sus mecanismos de catálisis (Zwilling et al., 1981, Rypniewski et al., 1994). En crustáceos ya han sido estudiadas algunas tripsinas en las que su identificación está basada principalmente en la habilidad de la proteinasa para hidrolizar el lado C-terminal de los residuos Arg o Lys (Johnston et al., 1995). Sin embargo, hay diferencias entre las enzimas de crustáceos y sus equivalentes en mamíferos (Londsdale-Accles et al., 1978, Yoshinaka et al., 1984, Klein et al., 1996).

La importancia de purificar y caracterizar las tripsinas en organismos acuáticos se basa en la necesidad de conocer su participación en la digestión buscando optimizar el manejo del alimento en acuicultura (Haard, 1992). Por otro lado, la industria está en busca de enzimas con características que optimicen sus procesos; por ejemplo, las principales enzimas utilizadas biotecnológicamente en detergentes son proteinasas, lipasas y amilasas, estas enzimas son aisladas principalmente a partir de bacterias (Anwar y Saleemuddin, 1997). Otra alternativa que puede ser un recurso prometedor de proteinasas alcalinas, son los crustáceos. Los desperdicios de la industria de los crustáceos son un recurso barato y abundante de varias enzimas que poseen propiedades catalíticas específicas que pueden ser explotadas en procesos enzimáticos industriales (Haard, 1992).

A pesar de los estudios ya realizados, todavía se carece del conocimiento sobre la diversidad de estas proteinasas en crustáceos y poco se entiende sobre

sus peculiaridades estructurales, capacidades catalíticas que pudieran estar relacionados con sus hábitos alimenticios y que también pudieran mejorar o dar lugar a nuevos procesos biotecnológicos.

En esta parte de la tesis se realizó un estudio de las características de las tripsinas de la glándula digestiva de *P. vannamei*, un crustáceo de amplia distribución, explotado comercialmente a gran escala y con una producción que va en aumento en acuicultura. Se detalla su purificación y una caracterización parcial de su bioquímica, cinética, estructura y por último se compara con otras tripsinas conocidas.

2.2 Objetivos particulares

1. Purificar las tres isoformas de la tripsina de la glándula digestiva de *P. vannamei* conservando sus características funcionales.
2. Realizar una caracterización bioquímica, cinética y molecular de las tres isoformas purificadas.
3. Comparar las características de las tres isoformas con tripsinas de otros organismos.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Obtención de la proteína soluble a partir de la glándula digestiva

Las glándulas digestivas fueron obtenidas de camarones (25 g) de la especie *Penaeus vannamei* cultivados en estanques comerciales en el Centro de Investigaciones Biológicas. Los camarones fueron decapitados y las GDs fueron rápidamente extirpadas y mantenidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una mezcla de GDs fue homogenizada 1:2 en agua destilada utilizando un homogenizador de navajas. El homogenizado fue centrifugado 3 veces por 30 min a $10,000\text{ }g$. El extracto acuoso fue separado de lípidos y sedimentos, al final fue filtrado con una membrana de $0.45\text{ }\mu\text{m}$ para obtener la proteína soluble.

2.3.2 Purificación

La concentración de proteína en los extractos fue medida por el método de Bradford (1976) con albúmina de suero bovino como estándar. Para purificar las tres isoformas de tripsina, las bandas de tripsina fueron hidroeluídas a partir de geles de SDS-PAGE en condiciones no reducidas utilizando geles preparativos de 5 pozos y cargando $150\text{ }\mu\text{g}$ de proteína del extracto en cada carril. Al final de la electroforesis, los carriles con los extractos fueron separados con una navaja y etiquetados para su identificación. A cada carril con los extractos se le cortó longitudinalmente una quinta parte, la cual fue teñida con azul de Coomassie hasta que las bandas de tripsina fueran evidentes. La pieza de gel complementaria de cada carril fue mantenida en refrigeración a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las piezas con las bandas de tripsina teñidas fueron empatadas con su contraparte. Utilizando un cortador múltiple de navajas, las bandas del gel no teñido fueron separadas por corte y sumergidas en forma individual en $100\text{ }\mu\text{l}$ de buffer $20\text{ mM TRIS HCl pH }7.5$. Las bandas separadas fueron incubadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la noche. Para confirmar la presencia de tripsina, se midió la actividad específica de la tripsina (sección 2341). Para confirmar la pureza de las

isoformas, cada banda eluída fue analizada por electroforesis no reductiva y teñida con tinción de plata (Amersham Pharmacia Biotech). Para obtener suficiente muestra se realizaron varias separaciones. Las isoformas perfectamente purificadas fueron agrupadas según su masa relativa (M_r) en electroforesis no reductiva: baja (tripsina C) media (tripsina B) y alta M_r (A). Las fracciones fueron desaladas por cromatografía pasándolas por una columna conteniendo Sephadex G-25. Estas fracciones fueron consideradas como isotripsinas puras.

2.3.3 Características moleculares

2.3.3.1 Análisis electroforético

Las isoformas fueron analizadas bajo dos condiciones electroforéticas: SDS-PAGE (12 .5%) en condiciones reductoras y no reductoras. En condiciones reductoras, las muestras fueron diluidas 1:2 con buffer de carga de Laemmli (1970) (0.125 M TRIS HCl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0.02% azul de bromofenol, pH 6.8, 5%, mercaptoetanol y calentadas 2 min a 100 °C). Para las condiciones no reductoras las muestras fueron diluidas 1:2 en el mismo buffer de carga, pero sin mercaptoetanol y sin calentar. La separación se llevo a cabo aproximadamente en 2 h a 20 mA por gel y a 4 °C. Para observar las bandas, los geles fueron tratados con 0.1% azul de Coomassie (R-250) en 7.5% de ácido acético y 5% de metanol a temperatura ambiente. El gel fue desteñido con 7.5% de ácido acético y 5% de metanol.

2.3.3.2 Masa molecular

Las masas moleculares fueron evaluadas bajo condiciones reductoras de acuerdo al método de Laemmli (1970). Las masas moleculares fueron estimadas por comparación con marcadores de masa molecular estándares (SIGMA Che. Co.).

2.3.3.3 Punto isoelectrico

Los puntos isoelectricos (IP) de las tripsinas purificadas fueron evaluados por un análisis de electroenfoque en un gel de poliacrilamida en capa fina (LKB Ampholine PAGE plate) conteniendo anfollinas en un rango de pH 3-9. Como estándar se utilizó un equipo de calibración para isoelectroenfoque conteniendo 11 proteínas estándar (SIGMA). Las bandas de proteína fueron observadas utilizando tinción de plata.

2.3.3.4 Análisis de la secuencia NH₂-terminal

El análisis de secuencia para las tres isoformas fue realizado por un secuenciador de fase de gases Applied Biosystem 470^a (Foster City, CA) utilizando el programa asignado por el fabricante.

2.3.3.5 Glicoproteínas

El comportamiento electroforético entre las tripsinas nativas y reducidas observado en las tripsinas de *P. vannamei* es similar al de otros organismos donde el principal componente que da lugar a este efecto es la presencia de azucares en la estructura de las enzimas. Por esta razón, las tres isoformas fueron analizadas para evidenciar la presencia de carbohidratos asociados a la superficie de la molécula (forma no reducida) y en toda la estructura de la molécula (forma reducida). Por triplicado, utilizando la técnica de "dot blot" se cargo 1 µg de cada una de las tres isotripsinas en sus 2 formas sobre una membrana de PVDF sumergida previamente durante 20 seg en metanol. Las muestras se secaron a temperatura ambiente.

Las membranas cargadas fueron analizadas con el reactivo de Schiff para detectar carbohidratos covalentemente unidos a las proteínas. Las membranas fueron incubadas 20 min en 15% isopropanol y 10% ácido acético, después se transfirieron a 10% de ácido acético durante 20 min. Las membranas fueron inmersas en 0.5% de ácido periódico en oscuridad por 2 h a 4°C. Después se transfirieron y se incubaron por 20 min en 0.5% de arsenito de sodio, 5% ácido acético, se incubaron dos veces durante 20 min en 0.15 arsenito de sodio y 5%

ácido acético, por último se incubaron durante 10 min en 5% ácido acético. Las membranas fueron transferidas al reactivo de Schiff y se incubaron durante 12 h en oscuridad a 4 °C (Clark, 1973).

El tipo de carbohidratos asociados a las tres isoformas de tripsina fueron evaluados utilizando 8 diferentes lectinas acopladas a fluoresceína (Tabla 2.3). Por triplicado, las tres isotripsinas fueron analizadas en sus dos formas. Las proteínas se fijaron con la técnica de “dot blot” para inmovilizar proteína en membrana. Las membranas fueron incubadas individualmente con las lectinas marcadas por 2 h en oscuridad y a 4 °C, después se lavaron 3 veces durante 20 min en buffer de fosfatos. La interacción con las lectinas fue detectada mediante iluminación con luz ultravioleta y detección de la fluorescencia emitida por el marcaje con fluoresceína

2.3.4 Características Bioquímicas

2.3.4.1 Actividad específica de la tripsina

Todas las mediciones de actividad de tripsina fueron evaluadas para la actividad de amidasa utilizando 1mM Benzoil-Arginina *p*-nitroanilina (BAPNA) en 20 mM TRIS HCl, 20 mM CaCl₂ y pH 7.5 como sustrato (Erlanger et al., 1961). La cantidad de *p*-nitroanilina liberada del BAPNA a pH 7.5 y 35 °C fue cuantificada por el incremento en absorbancia a 410 nm (Coeficiente de extinción = 8800 M⁻¹ cm⁻¹). Una unidad de enzima fue definida como el monto de enzima que hidroliza un μM de BAPNA por minuto bajo las condiciones descritas. La actividad específica fue expresada como unidades de actividad por mg de proteína.

2.3.4.2 Efecto de la temperatura y del pH

Para evaluar el efecto de la temperatura y el pH en la actividad amidasa, la solución de BAPNA se equilibró a temperaturas de entre 10 y 80 °C para después adicionarse a 2 μg de enzima. La reacción fue incubada a la misma temperatura durante 20 min y después se evaluó la actividad específica.

Para la estabilidad a diferentes pHs, 2 μg de tripsina en 10 μL fueron disueltos 1:3 en buffer universal (Stauffer, 1989); 20 mL de la solución stock (57 mM H_3BO_3 , 36 mM ácido cítrico monohidratado, 28 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 310 mL 1N NaOH aforar a 1 L con dH_2O) fueron mezclados con 1N HCl para obtener el pH deseado y se aforó a 100 mL. En éste experimento se incluyeron valores de pH entre pH 3 y 12. Después de incubar durante 1h a 20 °C el pH se tornó a 7.5 adicionando 750 μL de la solución de BAPNA en 50 mM TRIS HCl pH 7.5 y se midió la actividad.

2.3.4.3 Efecto del calcio e inhibidores sobre la actividad de tripsina

El efecto del Ca^{2+} fue examinado como se describe en el ensayo para medir la actividad de tripsina, adicionando 10, 30, 50 y 100 mM CaCl_2 en el sustrato y un control sin CaCl_2 .

Se incubaron durante 1 h a 20 °C volúmenes iguales de inhibidor y la solución de enzimas 0.2 mg/mL, al final se midió la actividad de tripsina. En este estudio se usaron 10 mM Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona (TLCK) para serin proteinasas, 5 mM Tosil-L-Fenilalanina Clorometil Cetona (TPCK) y 5 mM Carbobenzoxi-Fenil Clorometil Cetona (ZPCK) para quimotripsinas, 0.25 mM Inhibidor de tripsina de Soya (SBTI) y 100 mM Fenilmetilsulfonil Floride (PMSF) para tripsinas. Un control sin inhibidor fue incluido.

El análisis estadístico realizado para evaluar las diferencias en las características bioquímicas entre las tres isoformas fue el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis. ($\alpha = 0.05$) (Sokal y Ralf, 1981). Se utilizó el programa de estadística STATISTICA 5.0.

2.3.5 Variables cinéticas K_M , k_{cat} y K_{cat}/K_M

Las variables cinéticas de las tres isoformas aisladas, fueron evaluadas con la gráfica de Lineweaver-Burk (Copeland, 2000), las concentraciones del sustrato BAPNA utilizados para este análisis varió entre 0.0375 y 7 μM .

2.4 Resultados

2.4.1 Características moleculares

2.4.1.1 Purificación y peso molecular

Las isoformas de tripsina de la glándula digestiva de *P. vannamei* bajo condiciones no reductoras en SDS-PAGE se muestran en la figura 2.1. Las bandas pertenecientes a cada una de las tripsinas fueron nombradas isoformas A, B y C con una masa relativa de 21, 22 y 23 kDa. Bajo condiciones reductoras la isoforma C presenta un peso de 30.2 kD, mientras que las isoformas B y C presentan la misma masa molecular (32.9 kD). El rendimiento de la purificación de las tres isoformas se presenta en la tabla 2.1. Utilizando 1 gr de glándula digestiva se recuperaron 0.5 mg de las tres enzimas purificadas. La actividad específica de la isoforma C es 8 veces más alta que la isoforma B y 2.3 veces más alta que la isoforma A.

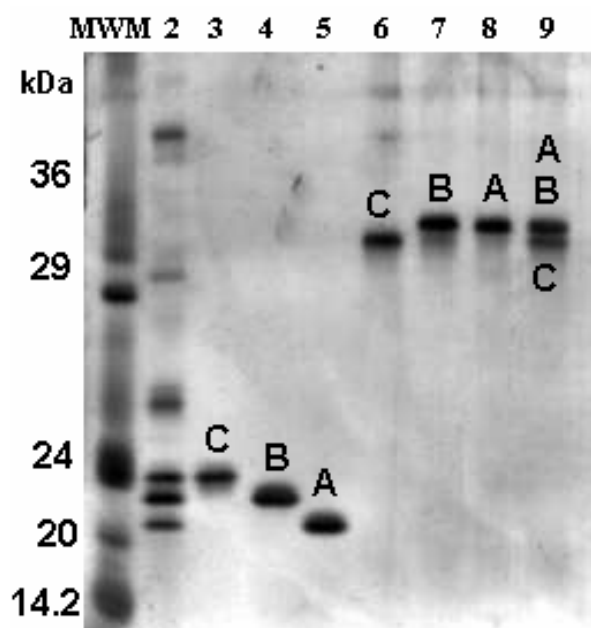


Fig. 2.1 Tripsinas purificadas de la glándula digestiva de *Penaeus vannamei*. Carril 1 = marcadores de peso molecular. 2 = Extracto crudo teñido con Coomassie. 3, 4 y 5 = tripsinas A, B y C en condiciones no reductoras. 6, 7 y 8 = tripsinas A, B y C en condiciones reductoras. 9 = tripsinas A, B y C mezcladas.

Tabla 2.1 Resumen del proceso de purificación de las tres isoformas de tripsina

Muestra	Proteína (mg)	Unidades Totales ($\Delta\text{Abs}_{410}/\text{min}$)	Actividad Específica ($\Delta\text{Abs}_{410}/\text{min}/\text{mg}$)	Factor de Purificación	Rendimiento (%)
Crudo	80	51.8	0.64	1	100
Hidroelución					
Tripsina A	0.013	4.8	369	576	9.3
Tripsina B	0.015	1.6	106	165	3
Tripsina C	0.011	9.37	851	1330	18

2.4.1.2 Punto Isoeléctrico

El análisis de IP mostró que las 3 isoformas tienen un comportamiento aniónico. Las isoformas A, B y C presentan un IP de 3.5, 3 y 4.5 (Fig. 2.2).

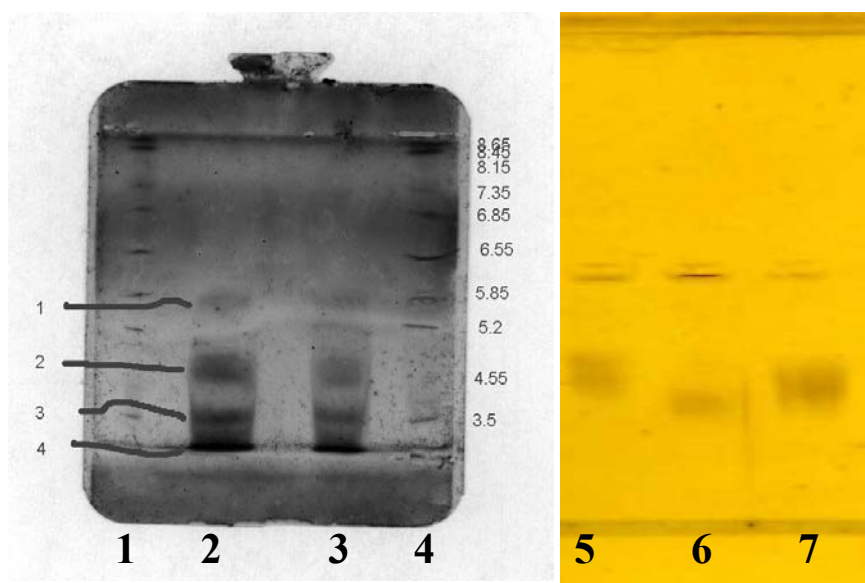


Fig. 2.2 PAGE-IEF mostrando el punto isoeléctrico de las tres isoformas Carriles 1 y 4 = marcadores de IP, carriles 2 y 3 = extracto con las tres isoformas junto con una cuarta enzima desconocida. Carril 5 = isoforma C, carril 6 = isoforma B y carril 7 = isoforma A.

2.4.1.3 NH₂ terminal

La secuencia de aminoácidos del lado amino-terminal se muestra en la tabla 2.2. Se observan substituciones entre las tres secuencias: la tripsina A difiere de la tripsina B en la posición 8, la tripsina A tiene una Thr y la tripsina B una Lys, ambos aminoácidos hidrofílicos pero el último cargado positivamente. La isoforma C difiere de las isoformas A y B en las posiciones 6 y 7, teniendo Glu y Val, ambas substituciones mantienen las mismas características.

Tabla 2.2 Secuencia NH₂- terminal de las isoformas puras.
*Variantes fueron tomadas de Klein et al., 1996 y 1998.

Tripsina	Variante*	Secuencia NH ₂ -terminal													
		2	4	6	8	10	12	14							
A	30	I	V	G	G	T	D	A	T	P	G	E	L	P	Y
B	39/40	I	V	G	G	T	D	A	K	P	G	E	L	P	Y
C	21	I	V	G	G	T	E	V	T	P	G	E	L	P	Y
	42						E	V	T						
	Try Pv III	I	V	G	G	S	D	A	T	P	G	E	L	P	Y

2.4.1.4 Glicosilación

Las tripsinas fueron analizadas para conocer si estaban asociadas a carbohidratos. La reacción con el reactivo de Schiff fue positiva en las tres isoformas en condiciones reducidas y no reducidas. Utilizando diferentes lectinas acopladas con fluoresceína, se analizó el tipo de carbohidratos asociados a las tripsinas. El resultado se muestra en la tabla 2.3. Se identificaron principalmente residuos de glucosamina y oligómeros de galactosamina.

Tabla 2.3. Presencia de glucósidos en las isoformas purificadas. Los glucosidos fueron detectados utilizando lectinas marcadas con fluoresceína.

Lectinas: origen y especificidad	Reacción de las lectinas		
	A	B	C
(PWM) <i>Phytolaca americana</i> N-acetil, β -D-glucosamina- oligomeros	-	-	-
(Jacalina) <i>Artocarpus integrifolia</i> β -D-Gal (1-3) D-Gal Nac	-	-	-
(PHA) <i>Phaseolus vulgaris</i> Aglutinina	+	+	+
(WGA) <i>Triticum vulgaris</i> N-acetil- β -D glucosaminil residuos N-acetil- β -D-glucosamina oligomeros	+++	+++	+++
(Concavalina-A) Jack Bean D-Glucosa y D-Manosa	+	+	+
(LCA) <i>Lens culinaris</i> α -D-manosil y α -D-glucosil residuos	-	-	-
(SBA) Soya N-acetil-D-galactosamina	-	-	-
(WAP) <i>Wisteria floribunda</i> N-acetil-D-galactosamina	+++	+++	+++

2.4.2 Características bioquímicas

2.4.2.1 Efecto de la temperatura y del pH sobre la actividad de la tripsina

La dependencia de la actividad de la tripsina fue evaluada con ensayos de actividad en un rango de 10 a 80 °C (Fig 2.3a). No se observó una respuesta diferencial ($P > 0.05$) en la actividad de tripsina entre las tres isoformas. A temperaturas de 10 y 20 °C, la actividad fue menos del 20% con respecto a la máxima actividad mostrada a la temperatura de 60 °C. Con temperaturas mayores de 60 °C la actividad disminuye. A 80 °C la actividad se perdió totalmente.

El efecto del pH sobre la actividad de la tripsina se muestra en la Fig 2.3b. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las tres isoformas. Las tres isoformas mantuvieron más del 80% de la actividad cuando se ensayaron a pHs de entre 6-10 mostrando el máximo de actividad a pH 6. A pHs de 3, 4 y 12, la actividad de la tripsina fue afectada en más del 50%.

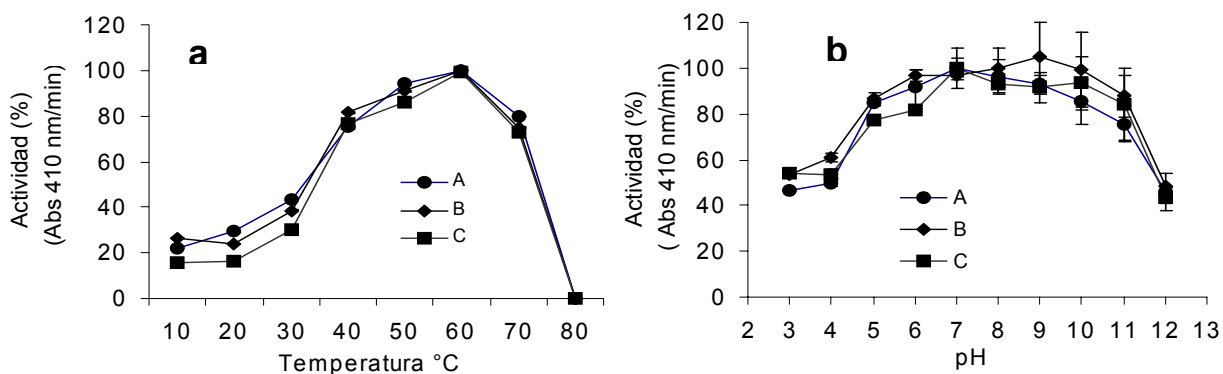


Fig. 2.3. Efecto de la temperatura (A) y el pH (B) sobre la actividad de las tripsinas. No se encontraron diferencias significativas entre las isoformas.

2.4.2.2 Efecto del calcio e inhibidores sobre la actividad de la tripsina

La concentración de Ca^{2+} afectó la actividad de las tres tripsinas. En concentraciones de 10 mM y sin Ca^{2+} la isoforma C mostró significativamente ($P < 0.05$) menor actividad con respecto a las isoformas A y B. La máxima actividad se desarrolló cuando a las isoformas se les adicionó 50 mM de CaCl_2 (Fig 2.4a). La menor actividad fue observada cuando se adicionó 100 mM CaCl_2 .

El efecto de los inhibidores de proteinasas sobre la actividad de tripsina se muestra en la Figura 2.4b. Los inhibidores TLCK, SBTI y el PMSF inhibieron

las tres isoformas de tripsina en un 80-90%. No se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre las tripsinas tratadas con los diferentes inhibidores. Las isoformas tratadas con los inhibidores ZPCK y TPCK no disminuyeron la actividad de las tripsinas y no fueron significativamente ($P>0.05$) diferentes con respecto a los controles sin inhibidores.

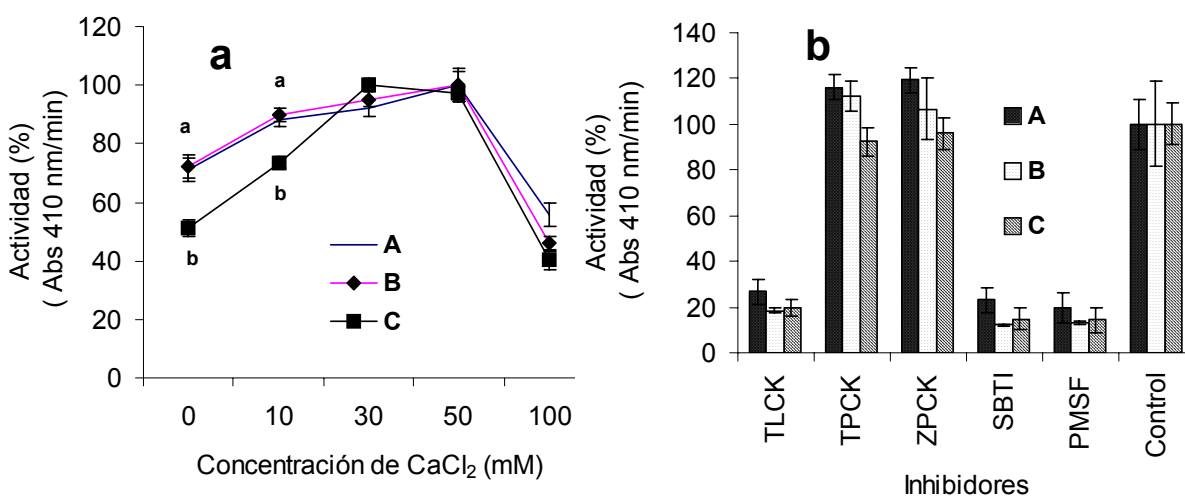


Fig. 2.4. Efecto de las concentraciones de CaCl₂ (A) e inhibidores (B) sobre la actividad de las tripsinas. Las letras diferentes muestran diferencias significativas entre las isoformas ($\alpha = 0.05$).

2.4.3 Parámetros cinéticos

Los valores de K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M de las tres tripsinas de *P. vannamei* son mostradas en la Tabla 2.4. La isoforma C presentó el K_M menor, después la isoforma A y el valor más alto lo presentó la isoforma B. Los valores encontrados para las tres isoformas purificadas son hasta tres ordenes de magnitud más pequeñas comparadas con tripsinas de otros organismos. La isoforma C mostró también una mayor eficiencia catalítica, después la isoforma A y el valor más alto de eficiencia catalítica lo presentó la isoforma B. Comparadas con las

tripsinas de otros organismos, las tres isoformas purificadas son hasta 3 ordenes de magnitud más grandes.

Tabla 2.4 Comparación de los valores cinéticos de las tripsinas aisladas y tripsinas de diferente origen.

Enzima	K_M (mM)	k_{cat} (S^{-1})	k_{cat} / K_M ($S^{-1} mM^{-1}$)	Referencias
Tripsina A	0.000304	0.433	1,424	Este trabajo
Tripsina B	0.000342	0.37	1,081.8	Este trabajo
Tripsina C	0.000272	0.583	2,142.3	Este trabajo
<i>Uca pugilator</i>	0.0069	2.0	290	Grant et al., 1980
<i>Cryprinus carpio</i>	0.039	3.10	79.5	Cao et al., 2000
<i>Penaeus monodon</i>	N.D.	N.D.	20.4	Jiang et al., 1991
<i>Euphausia superba</i>				
Tripsina II	0.04	0.74	18.5	Osnes y Mohr, 1985
<i>Thenus orientalis</i>	0.093	0.91	9.7	Johnston et al., 1995
<i>Engraulis encrasicolus</i>				
Tripsina B	0.66	3.2	4.84	Martínez et al., 1988
<i>Chroristoneura fumiferana</i>	0.025	N.D.	N.D.	Milne y Kaplan, 1993
<i>Gadus ogac</i>	1.25	N.D.	N.D.	Simpson y Haard, 1984

2.5 Discusión

De acuerdo con las secuencias reportadas por Klein et al. (1996,1998) son seis las variantes de tripsina que existen en la GD de *P. vannamei*, ellos las nombraron variantes 30, 39, 40, 42, 21 y Tryp pvIII. Las variantes fueron agrupadas en 3 familias según el número de sustituciones en los nucleótidos. La familia 1 esta compuesta por las variables 30, 39 y 40, la familia 2 por las variantes 21 y 42 y la familia 3 por la Tryp pvIII. Las variantes de la familia 1 difieren en 5 y 7 nucleótidos y la familia 2 difiere en 41 nucleótidos de la familia 1. De acuerdo con las secuencias encontradas en este estudio, la tripsina A concuerda con la variante 30, la tripsina B concuerda con las variantes 39 y 40 y la tripsina C con la variante 21.

Las tres moléculas en su forma nativa se observan bien separadas en SDS-PAGE. Sin embargo, en su forma reducida solo aparecen 2 bandas 10 kDa más pesadas. Este resultado es la consecuencia de que las isoformas A y B presentan la misma movilidad electroforético. El cambio en la movilidad de las tripsinas nativas y reducidas en electroforésis ocurre con otras serin proteinasas como la tripsina del fluido seminal en humanos (Yu et al.,1994), la tripsina digestiva de la langosta espinosa *Thenus orientalis* (Johnston et al., 1995) y la tripsina del mosco hematófago *Stomoxys calcitrans* (Moffat et al., 1995).

La posible causa de esta diferencia en el corrimiento electroforético puede ser explicado por la glicosilación de las tripsinas. El análisis de glicosilación fue cualitativo, por lo que las diferencias en el contenido de galactosamina y glucosamina entre las isoformas no fueron documentadas. Los glucósidos se unen a las proteínas en los residuos Thr, Ser, Asn y Leu (Lehninger, 1993). Analizando las seis secuencias deducidas, se observó que tienen diferencias en estos aminoácidos. La isoforma A tiene una Thr más que la isoforma B. La isoforma C tiene 1 Asn y 2 Ser más y 1 Leu y 2 Thr menos que las variantes A y B.

El contenido de amino ácidos en donde se unen los glúcidos concuerdan con los resultados obtenidos por SDS-PAGE, en los cuales las isoformas A y B

tienen la misma masa molecular y son diferentes de la isoforma C. Sin embargo, la complejidad de las glicoproteínas y las pequeñas diferencias observadas entre las isoformas merece más investigación.

El IP de las tres isoformas es similar a los observados en tripsinas de otros organismos como las tripsinas A y B (IP 4.6 y 4.9) de la anchoveta *Engraulis engrasicholus* (Martínez et al., 1988), 2 tripsinas de *P. monodon* (IP 2.1 y 2.4) (Lu et al., 1990). Las diferencias en el IP entre las tripsinas confirman que son 3 isoformas.

Además de otros factores, la actividad de una enzima esta en función de la temperatura y el pH. En *P. vannamei*, el 80% de la actividad o más es mantenida entre los 40 y 70°C. Tripsinas de otros organismos tienen su máximo de actividad en un rango más estrecho, *P. monodon* entre los 55 y 65°C (Lu et al., 1990), las tripsinas de *Triops* sp. (Maeda-Martínez et al., 2000) se encuentra entre los 50 y 60°C y en el cangrejo de arena *Portunus pelagicus* se alcanza el máximo a los 50°C (Dionysius et al., 1993).

Las tripsinas de *P. vannamei* mantienen más del 80% de actividad entre los pHs 6 y 11, lo cual consideramos es un amplio espectro de pH si tomamos en cuenta que la tripsina digestiva del cangrejo *Portunus pelagicus* (Dionysius et al., 1993) y *P. monodon* (Jiang et al., 1991) es entre los pHs 7 y 8 y en *Triops* sp (Maeda-Martínez et al., 2000) es a pH 8.

El comportamiento de las tripsinas a diferentes pHs y temperaturas, es una característica importante si se busca integrarla en un proceso biotecnológico. Más del 80% de la actividad se mantiene en un amplio rango de estos dos factores, lo que significa que la enzima puede trabajar en forma continua dentro de estos parámetros y además es fácilmente desnaturalizada a 80°C.

La actividad de las isoformas de tripsina de *P. vannamei* se ven afectadas de forma diferente cuando se le adicionan diferentes concentraciones de Ca^{2+} . La isoforma C requiere de concentraciones más altas de Ca^{2+} para alcanzar la misma actividad que las isoformas A y B. La actividad alcanza su máximo cuando se adicionan 30 mM Ca^{2+} a las tres isoformas. Con la presencia de iones

calcio, las tripsinas experimentan un cambio conformacional dando mayor estabilidad a las moléculas (Walsh, 1970) como ocurre con la tripsina del avestruz donde a concentraciones de 10 a 100 mM de CaCl_2 la actividad aumenta en forma proporcional (Bodley et al., 1995).

Los aminoácidos Asp y Glu en sitios específicos son los encargados de la unión al Ca^{2+} (Rypniewski et al., 1994). Las tres tripsinas de *P. vanamei* tienen Glu disponible para la unión con el Ca^{2+} en las posiciones 70, 80 y 230. En las posiciones 21 y 62, la isoforma A tiene Asp y Glu y la isoforma B los tiene al revés Glu y Asp. La isoforma C difiere de las A y B en la posición 68 donde está presente una Ser. El sistema numérico corresponde a la secuencia de aminoácidos de la quimotripsina bovina (Rypniewski et al., 1994). Estas diferencias pueden ser responsables de la actividad diferencial de las tripsinas en diferentes concentraciones de Ca^{2+} . Con este dato, concluimos que 30 mM de Ca^{2+} utilizado en la solución del sustrato es adecuado para asegurar una máxima actividad de las tres enzimas y facilitar su medición.

Las enzimas purificadas muestran propiedades de serin proteinasas porque son inhibidas por los inhibidores TLCK y PMSF, lo cual es consistente con la presencia de His y Ser en el sitio catalítico. La inhibición por SBTI indica que esta serin proteinasa es tripsina. Los inhibidores ZPCK y TPCK no afectaron la actividad de las isoformas (Whitaker, 1994).

Los valores del K_M de las tres isoformas de *P. vannamei* son un poco diferentes entre ellos y son hasta tres ordenes de magnitud menor que tripsinas de otros organismos. El K_M más bajo lo presentó la isoforma C, después la isoforma A y el más alto K_M lo tiene la isoforma B. El K_M promedio de las tres isoformas es 5,566 veces más pequeño que la del bacalao de Groenlandia *Gadus ogac* y 2,157 veces más pequeño que la tripsina B de la anchoveta *Engraulis encrasicolus*. El K_M de las tripsinas del gusano *Chroristoneura fumifera* y del cangrejo *Uca pugilator*, solo son 81 y 22.5 veces mas alto. Los datos muestran que la afinidad de las tripsinas de *P. vannamei* por el sustrato BAPNA es mucho mayor que las tripsinas de otro origen.

La isoforma C presenta el doble de la eficiencia catalítica con respecto a la isoforma B y 0.75 veces más que la isoforma A, lo cual es probablemente debido a las sustituciones de aminoácidos entre las enzimas. Aunque los aminoácidos en el sitio activo, en la bolsa de especificidad, puentes disulfuro y otros importantes residuos son conservados, la isoforma C presenta alta especificidad y ritmo de conversión del substrato a producto. El promedio de la eficiencia catalítica de las tres tripsinas es de 1,549, este es 5.2 veces mayor que el de *Uca pugilator* y 19.5 veces mas que la tripsina de *Cypinus carpio*. Debido a que la eficiencia catalítica es un indicador de competencia enzimática, podemos especular que el corto tiempo de residencia del alimento en el tracto digestivo es compensado por la eficiencia catalítica.

En concreto, tres de las seis variantes deducidas por Klein et al. (1996 y 1998) son traducidas en la GD de *P. vannamei*. Las variaciones en los diferentes parámetros analizados en este estudio se refleja en la secuencia de aminoácidos en el cual las isoformas A y B se encuentran más relacionadas y menos conectadas con las isoforma C. El resultado sugiere una temprana separación evolutiva de la isoforma C de las isoformas A y B.

2.6 Conclusiones

1. Basados en la secuencia NH₂-terminal, punto isoeléctrico y comportamiento electroforético, las isoformas de tripsina que se expresan en la glándula digestiva de *P. vannamei* son tres.
2. Las tres isoformas son muy similares en las características analizadas. Sin embargo, las isoformas A y B son más parecidas entre ellas que con la isoforma C. La secuencia deducida de aminoácidos corrobora este hecho y sugiere una temprana separación evolutiva de la isoforma C con respecto a las isoformas A y B.
3. Las tres isoformas presentan un K_M muy bajo y una eficiencia catalítica muy alta con respecto a tripsinas de diferentes orígenes. Esta característica tiene una connotación biológica importante, capacita al camarón para digerir más moléculas de proteína en menor tiempo. Debido a que el tiempo que transcurre entre la ingestión del alimento y la excreción en este organismo dura menos de 2 hr es factible que exista una conexión entre el poco tiempo de residencia del alimento y la alta capacidad de las tripsinas para digerirlo.
4. Por su alta eficiencia catalítica, su bajo K_M y el que se mantenga el 80% de actividad en un rango amplio de pH y temperatura, las tripsinas de *P. vannamei* pueden ser un buen candidato para ser integradas en un proceso biotecnológico que requiera hidrólisis de proteína.

Parte 3

3.0 Genotipo y modulación de las tripsinas

3.1 Introducción

Los diferentes sistemas metabólicos requieren de controles para que su comportamiento sea óptimo. Los medios para controlar este buen funcionamiento, se basan principalmente en la modulación de la concentración de los componentes que participan en esos sistemas (Hochachka y Somero, 1984).

Le Moullac et al. (1996) observaron que la caseína era el mejor inductor de la actividad de tripsina en la glándula digestiva de *P. vannamei*; ellos reportan que los patrones de las isoformas de tripsina en SDS-PAGE no cambiaron de acuerdo a la concentración de caseína en el alimento y sugieren que la adaptación de las tripsinas a la dieta ocurre a nivel de la síntesis de las enzimas. Muhlia-Almazán y García-Carreño (2002) sugieren un sistema de regulación diferente, ellos observaron que el número de bandas de tripsina cambia junto con la actividad proteolítica durante un experimento de ayuno y con el estadio de muda. Ellos sugieren que las bandas que están presentes o no dependen de la necesidad del organismo para hidrolizar la proteína del alimento.

Hasta ahora queda claro que *P. vannamei*, bajo diferentes condiciones, regula la actividad de la tripsina, modulando la velocidad de síntesis de las isoformas presentes (loci y/o alelos) (Klein et al., 1996). Sin embargo, no está claro si ellas también detienen o comienzan su síntesis para regular la actividad. Este cuestionamiento es el que se responde en esta parte de la tesis.

Después de caracterizar la ocurrencia de tres fenotipos formados por tres isoformas de tripsina en la glándula digestiva de *P. vannamei*, fue importante definir cuantos gene-loci y sus respectivas variantes alélicas estaban involucradas en el genotipo. En los trabajos previos ya mencionados, el patrón

genético o genotipo no pudo ser estudiado porque los organismos evaluados fueron obtenidos a partir de stocks de cultivos con desoves múltiples. La mejor forma para definir el patrón genético (loci y alelos) es evaluando la segregación de las diferentes isoformas en la progenie de diferentes familias (Hartl y Clark, 1997) lo que permite evaluar un posible ajuste de los alelos a una segregación mendeliana.

Hasta ahora no estaba claro si un organismo bajo diferentes condiciones regula la actividad de tripsina, controlando la velocidad de síntesis de las isoformas presentes (loci o alelos) (Le Moullac et al., 1996) o si apagan y prenden la síntesis de algunas isoformas (Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2002). Las 2 hipótesis disponibles para explicar la variación en la actividad de tripsina fueron analizadas en este trabajo.

Para dilucidar sobre el tipo de modulación donde las isoformas de una enzima se prenden y se apagan para regular la actividad enzimática, se decidió realizar un primer experimento para determinar cuantos loci génicos existen para las tripsinas de *P. vannamei* y sus variantes alélicas a partir de los fenotipos (diferentes patrones de isoformas) de la progenie de familias. En caso de presentarse un ajuste a una segregación alélica Mendeliana implicará que la expresión de las isoformas no se ven afectadas por factores internos o externos (de la Loma, 1963, Hartl y Clark, 1997, Strickberger 1998).

Para corroborar si el fenotipo de las tripsinas en estudio permanecía constante bajo diferentes condiciones, se realizaron 2 experimentos: en el primero, se analizó la influencia de los diferentes niveles de actividad de tripsina sobre el fenotipo al evaluar extractos de la GD durante diferentes etapas de un ciclo digestivo. En el segundo experimento se analizaron los posibles cambios en el fenotipo en un mismo individuo al evaluar las tripsinas durante 51 días.

3.2 Objetivos particulares

1. Definir cuantos gene-loci y sus respectivas variantes alelicas están involucradas en el genotipo de las tripsinas.
2. Definir si en las tripsinas de *P. vannamei* se presenta una segregación mendeliana.
3. Definir si factores externos como el alimento y factores internos como fluctuaciones en la actividad de tripsina y el ciclo de muda, modulan el fenotipo de las tripsinas.

3.3 Materiales y método

Se realizaron tres experimentos para lograr los objetivos propuestos en esta parte de la investigación.

Experimento 1

3.3.1 Evaluación del fenotipo de las tripsinas

Para evaluar el fenotipo (Ryman y Utter, 1987) asociada con las isoformas de tripsina, se evaluaron 30 organismos de 3 g del género *P. vannamei* en cada una de 20 familias utilizando SDS-PAGE no reductiva. Las familias fueron originalmente producidas para evaluar parámetros genéticos en un programa de mejoramiento genético como lo describen Perez-Rostro e Ibarra (2003). Brevemente, en la producción de las familias, se obtuvo un espermátforo de un macho y se implantó de manera artificial en la hembra, la progenie de cada familia se mantuvieron separadas. Las familias fueron cultivadas en tanques de fondo plano con una densidad de 400 organismos por M², el agua fue mantenida con aireación constante a una temperatura de 28°C y una salinidad de 37‰. Los organismos fueron alimentados con microalgas durante el estadio larvario. Durante el estadio de post-larva se alimentaron con *Artemia salina* y con alimento de PIASA hasta el día del experimento. Para el análisis, los especímenes fueron decapitados, se extirpó la glándula digestiva y se homogenizó individualmente 1:3 en dH₂O, se centrifugó dos veces durante 30 min a 10,000 g y el sobrenadante se separó del extracto. La concentración de proteína fue medida con el método de Bradford (1976) adaptado para microplaca a 595 nm con albúmina de suero bovino como estándar. Las tripsinas fueron identificadas como lo describen Ezquerra y García-Carreño (1997).

En algunos de los padres no se analizó el fenotipo de las tripsinas porque ellos fueron utilizados en cruza subsecuentes. En las familias en las que se desconoció el fenotipo de los padres, éste fue inferido del fenotipo observado en la progenie.

3.3.2 Evaluación del genotipo y segregación mendeliana

Para determinar si el polimorfismo de las tripsinas es heredado en un orden mendeliano, las frecuencias del fenotipo observado en la progenie fueron comparadas con la distribución Chi cuadrada con las frecuencias esperadas para cada par de fenotipos parentales. La ecuación utilizada y los grados de libertad (g.l.) (Hartl y Clark, 1997) fueron:

$$\text{Chi-cuadrada} = \sum_{i=1}^k (O - E)^2 / E \quad \text{g.l.} = k-1$$

Donde “O” es el número de organismos en la progenie con la clase genotípica “i”, “E” es el número de organismos esperado para la misma clase genotípica y “K” es el número de clases genotípicas en esa familia.

Experimento 2

3.3.3 Fenotipo durante un ciclo digestivo

Con el fin de observar la distribución de los fenotipos de tripsina entre los diferentes estados de actividad de tripsina en un ciclo digestivo en las glándulas digestivas, lo primero que tuvimos que demostrar es que existen diferencias en las unidades de actividad de tripsina durante el ciclo alimenticio. Dichas diferencias son una premisa para pensar en un ajuste del fenotipo dependiendo de las unidades encontradas y la etapa de alimentación. Para esto 300 camarones de 18 g fueron aclimatados durante 30 días previos al experimento en las condiciones descritas y a alimentarse una vez al día con alimento PIASA (Tabla 1.1) durante 4 h: de las 12:00 a las 16:00 hr. Los tanques fueron limpiados a las 16 h para eliminar las heces y el alimento no consumido. Debido a que *P. vannamei* es un organismo translucido, fue posible observar la anatomía del sistema digestivo (Dall, 1966, 1992) y por tanto la entrada y transporte del alimento a través de éste. Para el experimento se formaron dos grupos, 100 organismos fueron utilizados como controles no alimentados y los

restantes 200 fueron utilizados como el grupo alimentado. Los organismos considerados estuvieron en intermuda (Chan et al., 1988). Las muestras fueron tomadas durante las diferentes etapas de pre-ingestión, ingestión and post-ingestión (Table 3.1). Los organismos fueron sacrificados y la glándula digestiva extirpada y mantenida a -20°C hasta su análisis. La cinética de la actividad de tripsina y la frecuencia de fenotipos en los extractos de GD fueron obtenidas en las diferentes etapas de la digestión. Seis organismos fueron evaluados en cada etapa. La actividad de tripsina fue evaluada como se menciona en la sección 2.3.4.1 y los fenotipos fueron obtenidos utilizando SDS-PAGE no reductiva. El análisis estadístico para observar las diferencias en la actividad de tripsina y proteinasas totales entre los diferentes puntos que se muestrearon en los grupos experimental y control, fue realizado por un análisis de varianza no paramétrico (Análisis de Kruskal-Wallis) ($\alpha=0.05$) comparando los valores medios de la actividad de tripsina dentro de cada punto (Sokal y Ralf, 1981). Se utilizó el programa STATISTICA 5.0.

Tabla 3.1 Tiempos seleccionados para el muestreo durante un periodo de digestión de 24 h. DI = después de la ingestión.

	Experimentales alimentados	Controles no alimentados
Digestión	20 h DI Comenzando la ingestión 2 min DI 10 min DI Glándula digestiva llena Intestino lleno 1 hes fecal (largo del intestino) 2 heces fecales Intestino vacío	20 h DI 24 h DI 28 h DI
Pos-digestión	6 h DI 9 h DI 12 h DI	30 h DI 33 h DI 36 h DI
Pre-digestión	15 h DI 18 h DI 21 h DI 22 h DI	39 h DI 42 h DI 45 h DI
Digestión	24 h DI Comenzando la ingestión 2 min DI 10 min DI Glándula digestiva llena Intestino lleno 1 hes fecal (largo del intestino)	48 h DI

Experimento 3

3.3.4 Fenotipo de las tripsinas en heces

Para establecer si ocurren cambios en el patrón de bandas de tripsina como consecuencia del tipo de alimento, ciclo de muda y cambios en la actividad, se obtuvieron diariamente extractos enzimáticos a partir de las heces de camarones durante 51 días. Se analizaron 11 camarones de 8 g en promedio, los cuales fueron colocados individualmente en tanques rectangulares de 70 L. Seis organismos fueron alimentados con alimento Silver Cup (45% proteína) durante todo el experimento, los restantes cinco organismos fueron alimentados con alimento Silver Cup durante 25 días, entonces el alimento fue

substituido por alimento PIASA (35% proteína). Los análisis proximales (Tabla 1.1) fueron realizados utilizando los métodos estándar de A. O. A. C. (1990).

Las heces fueron colectadas diariamente 2 h después de alimentar a los organismos mediante sifoneo al fondo de cada tanque. Las heces fueron enjuagadas con agua destilada para eliminar el exceso de sales y colocadas en tubos eppendor de 1.5 mL. Los tubos fueron mantenidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Los extractos de tripsina a partir de las heces fueron preparados adicionando 200-300 μL de agua destilada dependiendo del volumen de heces colectado. Se homogenizaron y centrifugaron por 10 min a 10,000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante fue decantado y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al final del experimento, la proteína soluble de las respectivas glándulas digestivas fue obtenida y junto con el extracto enzimático de las heces fueron analizados en cuanto a su concentración proteica y la actividad de proteinasas totales. Para detectar la actividad de proteinasas, las muestras se analizaron según el método de García-Carreño et al., (1993).

3.4 Resultados

3.4.1 Información genotípica a partir de análisis electroforético

El análisis electroforético individual de la progenie de 20 familias mostró que la tripsina de la glándula digestiva de *P. vannamei* está representada por 3 fenotipos (Fig. 3.1). En todos ellos se observó que la isoforma C estuvo presente, mientras que las isoformas A y B aparecen solas con la isoforma C o juntas para dar origen a 3 fenotipos.

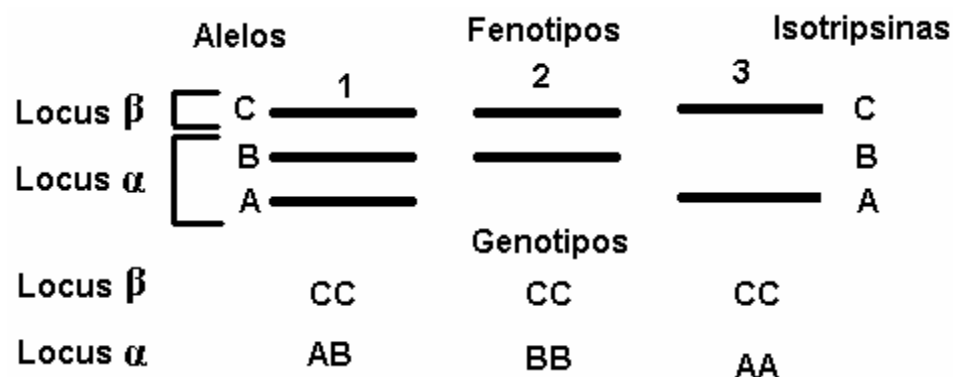


Fig 3.1 Fenotipos observados y genotipos inferidos en la glándula digestiva de diferentes organismos del género *Penaeus vannamei*.

El análisis de segregación mostró que las isoformas son expresadas por 2 loci: locus β el cual es siempre monomórfico (isoforma C) y locus α , el cual es polimórfico con dos alelos (A y B). El análisis Chi-cuadrada en las 20 familias indican que la frecuencia de los fenotipos observados para el locus β no son significativamente diferentes ($P > 0.05$) de las frecuencias esperadas para una segregación mendeliana con 2 alelos (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Frecuencias fenotípicas de las tripsinas obtenidas de 20 familias. Se presentan los valores obtenidos con la Chi cuadrada para frecuencias esperadas en una segregación mendeliana en un locus con dos alelos. Los genotipos entre comillas fueron deducidos de la progenie.

Tipo de apareamiento y Familias	Fenotipo parental "AB"		Número de progenie observada en cada clase fenotípica			Relación esperada	n	Valores Chi	
	♀	♂	AA	AB	BB				
AB X AB	1	AB	AB	5	17	8	1:2:1	30	3.33
	2	AB	"AB"	5	20	5	1:2:1	30	1.13
	3	"AB"	"AB"	8	8	7	1:2:1	23	3.89
AA X AB	4	"AA"	"AB"	14	15		1:1	29	0.03
	5	AA	"AB"	14	16		1:1	30	0.13
AA X BB	6	AA	"BB"		30		1	30	0
	7	AA	"BB"		30		1	30	0
	8	AA	"BB"		30		1	30	0
	9	"AA"	"BB"		22		1	22	0
	10	"AA"	BB		30		1	30	0
AB X BB	11	AB	BB		15	15	1:1	30	0.13
	12	"BB"	"AB"		14	14	1:1	28	0
	13	AB	"BB"		12	18	1:1	30	1.2
	14	"BB"	"AB"		13	9	1:1	22	0.72
	15	BB	"AB"		16	14	1:1	30	0
	16	AB	"BB"		13	13	1:1	26	0
	17	"AB"	"BB"		14	15	1:1	29	0.03
	18	AB	"BB"		14	13	1:1	27	0.03
BB X BB	19	"BB"	"BB"			22	1	22	0
	20	"BB"	"BB"			27	1	27	0

Valores Chi-cuadrada ($P < 0.05$) 3.84 para g.l. = 1, 5.99 para g.l. = 2.

3.4.2 Fenotipo durante un ciclo alimenticio

El análisis de muestras tomadas secuencialmente durante un ciclo alimenticio, muestran que las fluctuaciones en la actividad de tripsina y la actividad de proteinasas totales son similares. Cuando los organismos fueron alimentados una vez al día, la actividad de tripsina mostró diferencias significativamente ($P<0.05$) (Fig. 3.2) entre los diferentes puntos de muestreo.

El análisis electroforético de las muestras seriadas durante el ciclo alimenticio, muestran que los fenotipos de tripsina están distribuidos en todos los puntos muestreados durante el ciclo alimenticio. Observando la distribución de las frecuencias fenotípicas de tripsina entre las diferentes etapas de actividad de tripsina, encontramos que los tres fenotipos están presentes en todas las etapas con frecuencias similares (Tabla 3.3).

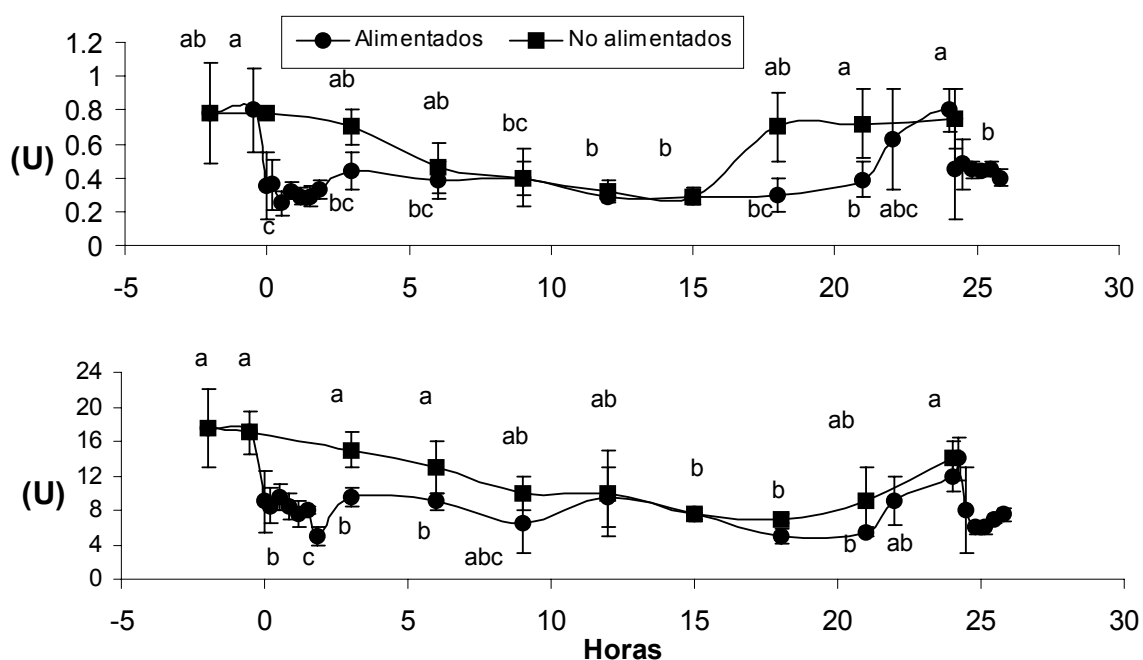


Fig. 3.2 Actividad de tripsina específica (arriba) y de proteinasas totales (abajo) en diferentes muestras tomadas durante un ciclo de alimentación (Tabla 3.1). Las letras diferentes significan diferencias estadísticas significativas ($\alpha=0.05$), $n=6$.

Tabla 3.3 Frecuencias fenotípicas observadas en diferentes periodos durante un ciclo de alimentación. A =Alimentados, NA = No alimentados.

Horario de muestreo	De -3 a 5 h		De 5 a 13 h		De 13 a 23 h		De 23 a 26 h
	A	NA	A	NA	A	NA	A
ABC	60	53	40	35	33.3	63.2	47
BC	40	47	55	65	52.7	36.8	53
AC			5		15		

3.4.3 Fenotipo de las tripsinas en heces

Los tres Fenotipos estuvieron representados en los extractos de heces de los 11 camarones experimentales. El número de organismos por cada Fenotipo 1, 2 y 3 fueron 4, 6 y 1. Un zimograma de cada uno de los fenotipos estudiados en estos organismos se muestran en la Figura 3.3. Las mudas registradas para cada camarón fueron: camarón 1 mudó el día 26, el camarón 2 mudó los días 18 y 33 y el camarón 3 mudó los días 23, 37 y 51. Los 11 organismos muestran permanencia en el fenotipo de las tripsinas en las heces y es igual que el observado en la glándula digestiva.

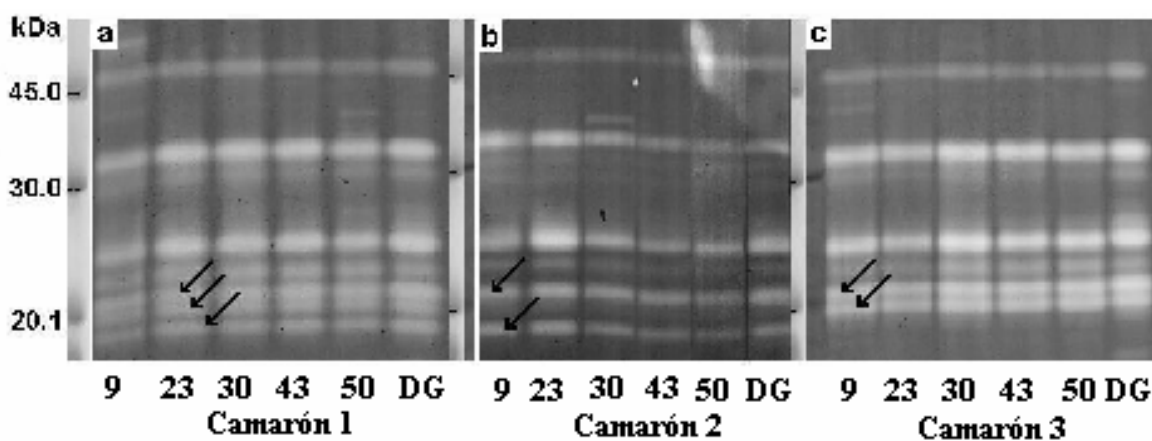


Fig 3.3 Fenotipos de tripsina en heces y glándula digestiva de *P. vannamei*. Las muestras fueron tomadas en los días mostrados en las abscisas. Las flechas indican las diferentes isoformas. (a) Fenotipo ABC, (b) Fenotipo AC y (c) Fenotipo BC.

3.5 Discusión

Hasta este momento de la investigación, se tenía información sobre las características bioquímicas, cinéticas y estructurales de las moléculas de tripsina. Sin embargo, no estaba claro su genotipo, es decir cuantos genes y alelos participaban en los fenotipos observados, tampoco estaba claro porque se traducían unas isoformas y otras no en un organismo y cual es el proceso que las regula. Las técnicas de biología molecular que evalúan el ADNc son herramientas muy útiles, pero carecen de la habilidad para mostrar los procesos que ocurren durante la maduración y traducción del ARNm. Teniendo la secuencia del gen, no significa que se conoce la función y regulación de la proteína. Las enzimas maduras, purificadas en este estudio, muestran que su secuencia NH₂-terminal coincide con tres de las seis secuencias deducidas por Klein et al. (1996). De acuerdo con esto, con las propiedades cinéticas y con el punto isoeléctrico, las tres tripsinas son entes diferentes.

En diferentes estudios con *P. vannamei* se ha demostrado que la actividad de la tripsina varía durante el ciclo diurno (Hernández-Cortes et al., 1999), el ciclo de alimentación y diferentes factores que causan estrés (Klein et al., 1996, Le Moullac *et al.*, 1994). Sin embargo, no se ha establecido si los tres fenotipos formados por las isoformas de tripsina que aparecen en SDS-PAGE son debidos a modificaciones en la síntesis de las isoformas, de tal manera que en ciertas condiciones, una de las isoformas se apaga completamente y en otras condiciones se enciende como mencionan Muhlia-Almazán y García-Carreño (2002) o si el fenotipo de cada uno de los organismos es permanente y solo se regula la velocidad de síntesis de las isoformas como lo menciona Le Moullac et al. (1996). Esta parte de la tesis se enfocó en encontrar la respuesta a esta incógnita.

Utilizando la técnica desarrollada por García-Carreño et al. (1993) para identificar las bandas de tripsina en SDS-PAGE, se observó que en diferentes organismos se presentaban 3 patrones de bandeo con tres y dos isoformas de tripsina, se estableció que la isoforma de mayor peso molecular (isoforma C) la

presentaban todos los organismos analizados. Las isoformas A y B se presentaban en forma individual o las dos juntas. Nuestra hipótesis fue que la isoforma C pertenecía a un locus monomórfico y las isoformas A y B pertenecían a un locus polimórfico. Para corroborar la hipótesis se analizó el locus polimórfico en la progenie de 20 diferentes familias.

El resultado de este análisis muestra que efectivamente existen 2 loci: el locus β el cual es monomórfico y lo conforma la isoforma C y el locus α el cual es polimórfico y lo conforman las isoformas A y B.

El análisis Chi-cuadrada aplicado al locus α en la progenie de 20 familias, indican que las proporciones de los fenotipos observados no son significativamente diferentes de los esperados bajo una segregación mendeliana para dos alelos. La interpretación fisiológica de este resultado es que la producción de las diferentes isoformas no se detiene o comienza de cero por estímulos de factores externos e internos (Hartl y Clark, 1997).

Para corroborar la permanencia en el fenotipo de las tripsinas, se realizaron un segundo y tercer experimentos, en el segundo se analizó el fenotipo de 180 organismos en diferentes etapas durante un ciclo de alimentación junto con sus respectivos controles no alimentados. Los resultados muestran cambios significativos en la actividad proteolítica y de tripsina durante el experimento. Sin embargo, cuando se analizó el fenotipo de las tripsinas en forma individual y por etapas durante el ciclo experimental, los tres fenotipos fueron observados en proporciones similares sin importar la etapa del muestreo. Esto indica que el fenotipo no es afectado por la alimentación o por cambios de alta y baja actividad de tripsina.

En un trabajo previo se encontró que el patrón de bandas de tripsina es detectado también en extractos de heces (Córdova-Murueta et al., 2003). Tomando en cuenta esto se realizó el tercer experimento, donde se analizó el patrón de bandas en SDS-PAGE por individuo durante 51 días y al final se comparó con el patrón de bandas del extracto de glándula digestiva del mismo organismo. En este experimento se analizó el efecto del cambio de alimento, el proceso de muda y el tiempo que transcurrió el experimento sobre el fenotipo.

El patrón de las isoformas representando cada fenotipo por individuo no cambió durante el experimento en cada uno de los organismos, corroborando que el fenotipo de las tripsinas no es afectado por factores internos o externos.

Trabajos previos de clonación molecular y secuenciación de ADNc de las tripsinas en *P. vannamei* (Klein et al., 1996) y la organización genómica y polimorfismo de las familias multi-gene de las tripsinas (Klein et al., 1998), concluyen en que hay seis diferentes secuencias de nucleótidos de tripsina en el genoma de *P. vannamei*, las secuencias fueron agrupadas en tres familias; dos de estas tres familias presentan ARNm en la GD, sugiriendo que al menos dos genes se expresan en este órgano (Klein et al., 1998). Lo observado en este trabajo, dos loci: uno polimórfico y otro monomórfico concuerda con lo sugerido por Klein et al. (1998).

Aunque el valor adaptativo de la presencia de múltiples formas de tripsina no está claro. La presencia de isoformas puede dar ventajas a los organismos, por ejemplo, proveyendo mecanismos eficientes para la digestión de proteínas en especies fitófagas que se alimentan de plantas que contienen inhibidores de proteinasa (Mitton y Grant, 1984, Broadway, 1997).

Los reguladores de la expresión han sido estudiados en diferentes procesos metabólicos. Macronutrientes como el colesterol, glucosa y ácidos grasos, tienen un claro efecto sobre la expresión de los genes. La interacción entre los nutrientes y los genes actúa con una red de señales que permite integrar el funcionamiento celular con el catabolismo del alimento. Esto refleja una respuesta de adaptación a los cambios en el tipo, cantidad y duración del alimento ingerido para un crecimiento eficiente (Jump y Clark, 1999), permitiendo a las células ajustarse a un sistema de prendido y apagado en la expresión de los genes. Sin embargo, este mecanismo no ocurre en las tripsinas de la glándula digestiva de *P. vannamei*, únicamente ocurren cambios cuantitativos en la actividad de las tripsinas.

3.6 Conclusiones

1. Las isoformas de tripsina de la glándula digestiva de *P. vannamei* son tres y se distribuyen en 2 loci: un locus monomórfico con la isoforma C y un locus polimórfico, con las isoformas A y B.
2. La herencia de las isoformas (alelos para cada locus) se apegan a una segregación mendeliana.
3. El fenotipo de las tripsinas no cambia por efecto de factores internos y externos, su regulación es básicamente cuantitativa y no cualitativa.

Discusión general

Los resultados obtenidos en esta investigación aportan datos que nos acercan al entendimiento de como las tripsinas realizan sus funciones en el sistema digestivo del camarón *Penaeus vannamei*. En primera instancia, es notorio que dentro de los hábitos alimenticios de este camarón se encuentra el hábito de alimentarse varias veces al día (Hernández-Cortés et al., 1999), lo que lo coloca como un consumidor frecuente. Este comportamiento tiene implicaciones en la síntesis, almacenamiento, secreción y desecho de las tripsinas.

Para poder digerir la proteína en un ritmo frecuente, la tripsina es sintetizada en un ritmo similar al de la ingesta, esto significa una síntesis continua y permanente de la enzima. En este contexto se observó que la actividad de tripsina se encuentra durante todo el ciclo de alimentación, su producción no se detiene (Hernández-Cortés et al., 1999, Sainz et al., sometido). Por otro lado las tripsinas de *P. vannamei* se encuentran almacenadas en las células B de la glándula digestiva y además en su estructura se encuentra un péptido que por su localización y características es el péptido de activación del tripsinógeno (Sainz et al., 2004). Esto significa que las tripsinas siempre están listas para ser utilizadas en la digestión cuando sean requeridas, a diferencia de los organismos que no son consumidores frecuentes en los cuales las enzimas son sintetizadas por efecto de la ingestión en un proceso que toma tiempo y por consiguiente no conviene a los consumidores frecuentes (Secor, 2001).

El tiempo que transcurre entre la ingesta y la excreción es aproximadamente de 2 h (Sainz et al., sometido), durante este tiempo las tripsinas entran en contacto con el alimento y digieren la proteína, no se sabe si en algún momento las tripsinas son recicladas, solo se tienen datos de que son excretadas en las heces (Cordova-Murueta y García-Carreño, 2003, Sainz et al., sometido) lo que concuerda con una síntesis permanente de tripsinas.

Las tres tripsinas purificadas a partir de extractos de la glándula digestiva fueron nombradas isoformas A, B y C; ellas muestran características similares a

tripsinas de diferentes orígenes; contienen la secuencia IVGG en la parte N-terminal, hidrolizan el lado carboxilo del aminoácido Lys (Zwilling et al., 1981) y son inhibidas por los inhibidores TLCK, SBTI y PMSF (Martínez et al., 1988). La secuencia NH₂-terminal de las tres isoformas analizadas hasta el aminoácido 13, muestra que tienen una secuencia diferente y concuerda con la secuencia deducida por Klein et al. (1996).

Se encontró que las tres isoformas están glicosiladas principalmente por residuos de N-acetil-Galactosamina y N-acetil-Glucosamina. Cuando se analizó el contenido de residuos que ligan azúcares, se encontró que existen menos sustituciones entre las isoformas A y B que éstas con respecto a la isoforma C. El análisis de la presencia de azúcares solo fue cualitativo por lo que no sabemos si existen diferencias entre ellas. La presencia de azúcares posiblemente le confiere a las tripsinas una funcionalidad extra a la de su actividad específica. Esta parte tendrá que ser abordada con más profundidad en el futuro.

Los análisis para determinar la actividad máxima de las tripsinas en diferentes valores de pH y temperatura muestran que no hay diferencias significativas entre ellas, teniendo los valores máximos de actividad a pH de entre 7 y 10, a una temperatura de 60 °C y mantienen más del 80% de actividad entre los 40 y 70 °C. Estos resultados junto con el bajo K_M y la elevada eficiencia catalítica, colocan a estas tripsinas como candidatos para ser integradas en algún proceso biotecnológico. Sin embargo, se requiere optimizar y escalar la técnica de purificación para su producción en las cantidades requeridas en este tipo de procesos.

La actividad de las tres tripsinas se vio afectada por las diferentes concentraciones de Ca²⁺. El calcio genera un cambio conformacional que estabiliza la molécula en las tripsinas de vertebrados (Walsh, 1970). Sin embargo, no todas las tripsinas son estabilizadas por el Ca²⁺, entre ellas muchas tripsinas aisladas de invertebrados marinos (Martínez et al., 1988). El efecto de la estabilidad por el calcio al parecer es una característica que surgió durante la evolución (Martínez et al., 1988), lo que significa que la tripsina de *P. vannamei*

en este aspecto se parece más a la tripsina de mamíferos que a la de otros invertebrados marinos.

Las tres tripsinas tienen similitudes en sus características bioquímicas y cinéticas, las diferencias significativas fueron observadas en la actividad entre las isoformas A y B con respecto a la C cuando se les agregó 10 mM de CaCl_2 y en el análisis de la actividad sin CaCl_2 , lo que nos sugiere diferencias estructurales entre las isoformas (Rypniewski et al., 1994). De igual manera, cuando se analizó el K_M la eficiencia catalítica y la actividad específica, se observó que la isoforma C tiene el K_M más bajo, la eficiencia catalítica y actividad específica más alta de las tres isoformas. El K_M más alto, la menor actividad específica y eficiencia catalítica se observaron en la isoforma B. Estos hallazgos permiten dilucidar que en su historia evolutiva la isoforma C divergió muy temprano de lo que hoy son las isoformas A y B.

Las tres isoformas fueron purificadas a partir de una mezcla de glándulas digestivas. Sin embargo, analizando los extractos de las glándulas independientes, se encontró que en un individuo podría haber uno de tres fenotipos de tripsina, esto es, el fenotipo ABC, el fenotipo BC y el fenotipo AC. La isoforma C la presentaron todos los individuos muestreados y las isoformas A y B aparecieron en forma independiente o en conjunto. Por los resultados de actividad específica, cinéticos y de distribución de isoformas, aparentemente el fenotipo 3 (isoformas AC) tiene ventajas sobre el fenotipo BC porque la isoforma A tiene tres veces mayor actividad específica y 0.4 mayor eficiencia catalítica que la isoforma B. La relevancia de este resultado tendrá que ser evaluado para ver su significancia biológica en los sistemas de producción de este camarón, como ocurre en el Salmón donde con un fenotipo específico de tripsina se obtiene una mejor digestión *in vitro* y un mejor crecimiento de los organismos (Schulte et al., 2000).

Sabiendo que la actividad de tripsina se modifica por diferentes factores, cabía la posibilidad de que bajo diferentes condiciones, un organismo con fenotipo AB generara la otra isoforma para dar lugar al fenotipo ABC y las

variantes posibles entre los fenotipos observados, de manera que la actividad se ajusta a las necesidades y/o a la intensidad de los promotores.

Le Moullac et al. (1996) observaron que en *P. vannamei* los patrones de las isoformas de tripsina en SDS-PAGE no cambiaron de acuerdo a la concentración de caseína en el alimento. Muhlia-Almazán y García-Carreño (2003) proponen un sistema de regulación diferente. Ellos observaron que el número de bandas de tripsina, cambia con el tiempo y sugieren la presencia al menos de dos genes que se prenden y se apagan por efecto del alimento. Hasta ahora queda claro que *P. vannamei* bajo diferentes condiciones, regula la actividad de la tripsina, modulando la velocidad de síntesis de las isoformas presentes (loci y/o alelos). Sin embargo, no está claro si ellas también se prenden y se apagan para regular la actividad.

Después de analizar observaciones en cuanto a la ocurrencia de tres fenotipos formados por las tres isoformas de tripsina en la glándula digestiva de *P. vannamei*, fue importante definir cuantos gene-loci y sus respectivas variantes alelicas estaban involucradas en el genotipo. La mejor forma para definir el patrón genético (loci y alelos) fue evaluando la segregación de las isoformas en la progenie de diferentes familias (Hartl y Clark, 1997) permitiendo evaluar un posible ajuste de los alelos a una segregación mendeliana.

Nuestra hipótesis fue que la isoforma C pertenecía a un locus monomórfico y las isoformas A y B pertenecían a un locus polimórfico. Para corroborar la hipótesis se analizó el locus polimórfico en la progenie de 20 diferentes familias. El resultado de este análisis muestra que efectivamente existen 2 loci: el locus β , el cual es monomórfico y codifica para la isoforma C y el locus α el cual es polimórfico codifica para las isoformas A y B.

El análisis Chi-cuadrada aplicado al locus α en la progenie de 20 familias, indican que las proporciones de los fenotipos observados no son significativamente diferentes de los esperados bajo una segregación mendeliana para dos alelos. La interpretación fisiológica de este resultado es que la producción de las diferentes isoformas no se detiene o comienza de cero por

estímulos de factores externos (de la Loma, 1963, Hartl y Clark, 1997, Strickberger, 1998).

Para corroborar la permanencia del fenotipo de las tripsinas, se realizaron un segundo y tercer experimento, en el segundo se analizó el fenotipo de 180 organismos en diferentes etapas durante un ciclo de alimentación junto con sus respectivos controles no alimentados. Los resultados muestran cambios significativos en la actividad proteolítica y de tripsina durante el experimento. Sin embargo, cuando se analizó el fenotipo de las tripsinas en forma individual y por etapas durante el ciclo experimental, los tres fenotipos fueron observados en proporciones similares sin importar la etapa del muestreo. Esto indica que el fenotipo no es afectado por la alimentación o por cambios de alta y baja actividad de tripsina.

En un trabajo previo se encontró que el patrón de tripsinas es detectado también en extractos de heces (Córdova-Murueta et al., 2003). Tomando en cuenta esto, se realizó el tercer experimento donde se efectuó un análisis del patrón de bandas en SDS-PAGE por individuo durante 51 días y al final se comparó con el patrón de bandas del extracto de glándula digestiva del mismo organismo. Se analizó el efecto del cambio de alimento, el proceso de muda y el tiempo. El patrón de las isoformas representando cada fenotipo por individuo no cambió durante el experimento en cada uno de los organismos, corroborando que el fenotipo de las tripsinas no es afectado por factores internos o externos.

Los datos generados en esta investigación, revelan aspectos estructurales, bioquímicos, cinéticos, del genotipo y su modulación, los cuales describen en forma particular la participación de las tripsinas en la digestión de proteína, y aunque las conclusiones son muy concretas en cuanto a los análisis efectuados, es muy pronto para sugerir los modos de acción de la digestión de proteína y mucho menos de todo el sistema enzimático que permite poner a disposición los elementos que serán absorbidos en el tracto digestivo.

Perspectivas

Los zimógenos y proenzimas han sido descritos en diversos organismos (Walsh, 1970) y procesos metabólicos (Koshikawa et al., 1998). El estudio de estas moléculas ha estado relacionado con enfermedades debidas al mal control de estas formas inactivas como ocurre con la pancreatitis (Fernández del Castillo et al., 1992), en la cual se ha estudiado la activación inapropiada del tripsinógeno, sus causas y los métodos de detección temprana de la enfermedad.

En crustáceos se ha detectado tripsinógeno por medios bioquímicos (Babu y Manjulata, 1995) y utilizando técnicas de biología molecular, se ha detectado el péptido de activación del tripsinógeno en *Penaeus vannamei* (Klein et al., 1996) y *P. monodon* (Lehnert y Johnson, 2002). Estos hallazgos han sido de importancia relevante en cuanto al entendimiento del funcionamiento enzimático en invertebrados y su comparación con los vertebrados. Sin embargo, esta información no ha generado datos que permitan manipular de alguna manera los tripsinógenos para mejorar la eficiencia de los procesos nutricionales de los organismos.

Dado que la propuesta para estudiar el tripsinógeno de *P. vannamei* fue con el objetivo de generar conocimiento que nos permita continuar con la búsqueda de las partes que intervienen en el control del mismo, es necesario incursionar en estudios fisiológicos que nos permitan dilucidar sobre los factores que influyen en la síntesis del tripsinógeno y su relación con el número de células B en la glándula digestiva, también como influye la calidad y la cantidad de alimento sobre la secreción de tripsinógeno, se requiere también conocer quienes son los activadores del tripsinógeno y la velocidad en la conversión tripsinógeno-tripsina. El estudio más importante con respecto al mejor aprovechamiento de las funciones del tripsinógeno en camarones, es precisamente determinar si realmente su manipulación resulta en una mejora en el producto final.

El uso óptimo y la acuicultura de los organismos requieren del conocimiento de aspectos básicos como la nutrición de las especies. Todos los procesos biológicos como la reproducción y el crecimiento entre otros, están basados en mecanismos altamente regulados que dependen de los materiales y la energía obtenida de los alimentos (Secor, 2001). Las enzimas digestivas son elementos básicos en la nutrición porque actúan como mediadores entre la ingestión y la asimilación (Dittrich 1992). Los datos generados en este trabajo proveen de información comprensible sobre los parámetros bioquímicos y cinéticos de las isoformas de tripsina de *P. vannamei*, nos permite entender su participación en forma particular y provee también de bases para realizar estudios en otros crustáceos. Resta establecer las relaciones estructurales entre las tres isoformas, establecer si existe una actividad multiespecífica como ocurre con la quimotripsina de *P. vannamei* que además de tener actividad de quimotripsina, también tiene actividad de colagenasa (Sellos y Van Wormhoudt, 1992) y el resultado de su participación dentro del complejo enzimático bajo diferentes circunstancias.

Estudios anteriores sugieren la posibilidad de que la tripsina de *P. vannamei* está glicosilada. En este trabajo se confirma que las tres tripsinas contienen azúcares asociados a su estructura. En este contexto, es de relevancia obtener información que permita dilucidar la función de estos azúcares asociados a estas proteínas con actividad catalítica. Por último, el bajo K_M , una alta eficiencia catalítica y su actividad en un amplio intervalo de pH y temperatura, aunado a los volúmenes de desechos baratos y abundantes en la industria procesadora de crustáceos, nos anima a proponer la exploración del uso de estas tripsinas o extractos enzimáticos de la glándula digestiva de *P. vannamei* en procesos enzimáticos industriales en lugar de la utilización de proteinasas comerciales.

Aunque las características bioquímicas y cinéticas son muy similares entre las isoformas de tripsina, es necesario establecer la participación cuantitativa de cada una de ellas en el proceso digestivo y se requiere también del estudio sobre la factibilidad de una mejor digestión del alimento por uno u

otro fenotipo. De presentar uno de los fenotipos (AC, BC o ABC) una mayor digestibilidad, se podría evaluar su correlación con el crecimiento y otras características importantes a nivel de producción, pudiendo ser a futuro un criterio para seleccionar los organismos con las mejores características para su cultivo.

Bibliografía citada

ACUACOP. 1977. Reproduction in captivity and growth of *Penaeus monodon* Fabricus in Polynesia. In Proceedings of the 8th Annual Workshop of the World Mariculture Society, edited by J.W. Avault. Louisiana State University Press, Baton Rouge, LA., USA, pp. 927–945.

Akiyama D.M., Dominy W.G. y Lawrence A. 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry: revised. In: Akiyama D.M., Tan R.K.H. (Eds.), Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, September 19– 25. American Soybean Association, Singapore, pp. 80– 97.

Anwar A. y Saleemuddin M. 1997. Alkaline-pH-acting digestive enzymes of the polyphagous insect pest *Spilosoma obliqua*: stability and potential as detergent additives. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 25, 43–46

A.O.A.C. 1990. *Official methods of analysis*, Washington, D.C: Association of Oficial Analytical Chemists, 1094 pp.

Ayala, F.J., y Kigel, J.A., Jr. 1984. *Genética Moderna*. Barcelona: OMEGA, (Chapter 1).

Babu D.E. y Manjulatha 1995. Zimogen secreting cells in the hepatopancreatic duct of *Pagurus bernhardus* (Linnaeus, 1758) and *Clibanarius longitarsus* (De Haan, 1849) (Anomura). *Crustaceana* 68, 617-628.

Bassompierre M., Ostefeld T.H., McLean E. y Torrissen K.R. 1998. *In vitro* protein digestion, and growth of atlantic salmon with different trypsin isozymes. *Aquaculture International* 6, 47-56.

Bell T. A. y Lightner D. V. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society. University of Arizona, USA. 112 pp.

Bodley M.D., Naudé R.J., Oelofsen W., y Pátthy A. 1995. Ostrich trypsinogen: Purification, kinetik properties and characterization of the pancreatic enzyme. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology* 27, 719-728.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Broadway R.M. 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitor. *Journal of Insect Physiology* 43, 855-874.

Brown L.D. 1991. Genetic variation and population structure in the blacklip abalone, *Haliotis rubra*. Australian Journal of Marine and freshwater Research 42, 77-90.

Brüngler A.T., Hubert R. y Karplus M. 1987. Trypsinogen-Trypsin transition: A molecular dynamics study of induced conformational changes in the activation domain. American Chemical Society 26, 5153-5162.

Cao M.J., Osatomi K., Suzuki M., Hara K., Tachibana K. e Ishihara T. 2000. Purification and characterization of two anionic trypsins from the hepatopancreas of carp. Fisheries science 66,1172-1179.

Ceccaldi H. J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture. Advances in Tropical Aquaculture 9, 243-259.

Chan S. M., Ranking S. M. y Keeley L. L. 1988. Characterization of the molt stages in *Litopenaeus vannamei*: Setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. Biological Bulletin 175, 185-92.

Clark G., 1973. Staining procedures used by the biological stain commission, 3rd ed, William and Wilkins Co., Baltimore.

Copeland R.A. 2000. Enzymes: A Practical introduction to structure, mechanism, and data analysis, John Wiley and Sons, Inc. New York, 397 pp.

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

Córdova-Murueta J., García-Carreño F. y Navarrete del Toro M. 2003. Digestive enzymes present in crustaceans feces as tool for biochemical, physiological, and ecological studies. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 297, 43-56.

Dall W. 1966. The functional anatomy of the digestive gland tract of a shrimp *Metapenaeus bennettiae* Racek a Dall (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Australian Journal of Zoology 15, 699-714.

Dall W. 1992. Feeding, digestion and assimilation in penaeidae. Proceedings of the aquaculture Nutrition Workshop 57-62.

de Dios I., Orfao A., García-Montero A.C., Rodríguez A.I. y Manso M.A. 1995. Analysis of isolated zymogen granules from rat pancreas using flow cytometry. Analytical Cellular Pathology 9, 215-228.

de Dios I., García-Montero A.C., Orfao A. y Manso M.A. 1999. Selective exocytosis of zymogen granules induces non-parallel secretion in short-term cholecystokinin-stimulated rats. *Journal of endocrinology* 163, 199-206.

de la Loma J.L. 1963. *Genética General Aplicada*. LIMUSA, México, 752 p.

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

Dittrich B.U. 1992. Live under extreme condition: aspect of evolutionary adaptation to temperature in crustacean proteases. *Polar Biology* 12, 269-274

Dyrberg T. y Oldstone M. B. 1986. Peptides as antigens. Importance of orientation. *Journal of Experimental Medicine* 164, 1344-1349.

Erlanger B.F., Kokowsky N. y Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271-278.

Ezquerria J.M. y García-Carreño F.L. 1997. Effects of feed diet on digestive proteases from the hepatopancreas of the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Journal of Food Biochemistry* 21, 401-419.

Ezquerria J.M., García-Carreño F.L. y Haard N.F. 1997. Digestive proteinases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*) fed with different diets. *Journal of Marine Biotechnology* 5, 36-40.

Fernández-del Castillo C., Schmidt J., Rattner D.W., Lewandrowaki K., Compton C.C. Jehacli A., Patel G., Hermon-Taylor J. y Warshaw A.L. 1992. Generation and possible significance of trypsinogen activation peptide in experimental acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 7, 263-270.

Frankel J.S. 1989. Allelic expression at the sorbitol dehydrogenase and glucosephosphate isomerase loci in an interspecific hybrid ricefish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 92, 529-532.

Fujino K. 1978. Genetic studies of the Pacific abalone, I Inbreeding and overdominance as evidence by biochemical polymorphism in a wild population. *Bulleting of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 44, 357-361.

Fukuoka S.I., Kaguajiri H., Fushiki T., Takahashi K. e Iwa K. 1986. Localization of pancreatic enzyme secretion-stimulating activity and trypsin inhibitory activity in zymogen granule of the rat pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta* 884, 18-24.

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

Gibson R. y Barker P. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology* 17, 285-346.

Grant G.A., Henderson K.O., Eisen A.Z. y Bradshaw R.A. 1980. Amino acid sequence of a collagenolytic protease from the hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Biochemistry* 19, 4653-4659.

Haard, N.F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product and Technology* 1, 17-35

Hamm D.E. y Burton R.S. 2000. Population genetic of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 254, 235-247.

Harlow E. y Lane D. 1988. *Antibodies, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A. 726 pp.

Hartl D.L. y Clark A.G. 1997. *Principles of population genetics*, 3rd. edition. Sinauer Associates. Sunderland, M.A. 542 pp.

Hernández-Cortes P., Whitaker J. R. y Garcia-Carreño F. L. 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Litopenaeus vannamei* (Crustacea:Decapoda). *Journal of Food Biochemistry* 21, 497-514.

Hernández-Cortes P., Quadros-Seiffert W., Navarrete del Toro M.A., Portillo G., Colado G. y García-Carreño F.L. 1999. Rate of ingestion and proteolytic activity in digestive system of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, during continual feeding. *Journal of Applied Aquaculture* 9, 35-45.

Hewitt D.R. y Duncan P.F. 2001. Effect of high water temperature on the survival, moulting and food consumption of *Penaeus* (Marsupenaeus) *japonicus* (Bate, 1888). *Aquaculture Research* 32, 305-312.

Hochachka P.W. y Somero G.N. 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press. N.J. USA. 537p.

Hogue, W. V. 1997. Cn3d: a new generation of three-dimensional molecular structure viewer. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 314-316.

Houng-Yung C., Zein-Elding Z.P. y Aldrich D.V. 1985. Combined effects of shrimp size and dietary protein source on the growth of *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. *Journal of the World Mariculture Society* 16, 288-296.

Jiang S.T., Moody M. y Chen H.C. 1991. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Food Science* 56, 322-326.

Johnston D., Hermans J.M. y Yellowlees D. 1995. Isolation and characterization of a trypsin from the slipper lobster, *Thenus orientalis* (Lund). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 324, 35-40.

Jump, D.B., y Clark, S.D. 1999. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annual Review of Nutrition* 19, 63-90.

Kanazawa A. 1983. Penaeid nutrition. In *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*, edited by G.D. Pruder, C.J. Langdon and D.E. Conklin. World Mariculture Society, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA, Special Publication No. 2, 87-105

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 molt cycle. *Internal Journal of Biochemistry and Cellular Biology* 28, 551-563.

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

Kitamoto Y., Yuan X., Wu Q.Y., Macourt D.W. y Sadler J.E. 1994. Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91, 7588-7592.

Kurokawa T. y Suzuki T. 1995. Structure of the exocrine pancreas of flounder (*Paralichthys olivaceus*): immunological localization of zymogen granules in the digestive tract using anti-trypsinogen antibody. *Journal of Fish Biology* 46, 292-301.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

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

Lehnert S. A. y Johnson S. E. 2002. Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 133, 163-171.

Lehninger A.L. 1993. *Bioquímica*, Ediciones Omega S.A. Barcelona, España, 1117 pp.

Lemos D., Ezquerro J. M. y García-Carreño F. L. 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture* 186, 89-105.

Le Moullac G., Klein B., Sellos D. y Van Wormhoudt. 1996. Adaptation of trypsin chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 208, 107-125.

Le Moullac G., Van wormhoudt A. y AQUACOP. 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fiber levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquatic living Resources* 7, 203-210.

Light A. y Janska H. 1989. Enterokinase (enteropeptidase): comparative aspects. *Trends in Biochemical Sciences* 14, 110-112.

Londsdale-Accles J.D., Neurath H. y Walsh K.A. 1978. Probes of the mechanism of zymogen catalysis. *American Chemical Society*. 17, 2805-2809.

Lu P.J., Liu H.C. y Tsai I.H. 1990. The midgut trypsins of shrimp (*Penaeus monodon*), biology and chemistry, *Hopp-Seyler*, 371, 851-857.

Maeda-Martínez A.M., Obregón-Varboza V., Navarrete-Del Toro, M.A., Obregón-Barboza, H. y García-Carreño F.L. 2000. Trypsin-like enzymes from two morphotypes of the 'living fossil' Tryops (Crustacea: Braciopoda: Notostraca). *Comparative Biochemistry and Physiology* 126, 317-323.

Martínez A., Olsen R.L. y Serra J.L. 1988. Purification and characterization of two trypsin-like trypsin from the digestive tract anchovy *Engraulis encrasicolus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 91, 677-684.

Milne R. y Kaplan H. 1999. Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of δ -endotoxin from *Basillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23, 663-673.

Mithofer K., Fernández-del Castillo C., Mandavilli U., Rattner D.W. y Warshaw A.L. 1995. Quantitative assay of trypsinogen by measurement of cleaved

activation peptide after activation whit enterokinasa. *Analytical Biochemistry* 230, 348-350.

Mitton J.M. y Grant M.C. 1984. Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Annual Review on Ecological System* 15, 479-499.

Moffat M.R., Blakemore D. y Lehane M.J. 1995. Studies on the synthesis and secretion of trypsin in the midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110, 291-300.

Muhlia-Almazán A. y García-Carreño F. 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* 133, 383-394.

Neurath H., Walsh K.A. y Winter W.P. 1967. Evolution of structure and function of proteases: amino acids sequence of proteolytic enzymes reflect phylogenetic relationships. *Science* 158, 1638-1644.

Noriega F.G., Pennington J.P., Barillas-Mury C., Wang X.Y. y Wells M.A. 1996. *Aedes aegypti* midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding. *Insect Molecular Biology* 5, 25-29.

Noriega F. G. y Wells M. A. 1999. Molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* 45, 613-620.

Osnes K. y Mohr V. 1985. On the purification and characterization of three anionic, serine-type peptide hydrolases from antarctic krill, *Euphausia superba*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 82, 607-619.

Perez-Rostro C.I. y Ibarra A.M. 2003. Heritabilities and genetic correlations of size traits at harvest size in sexually dimorphic Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) grown in two environments. *Aquaculture Research* 34, 1079-1085.

Piedad-Pascual, F., 1990. Feeds and feeding of cultured tiger prawns in Southeast Asia. *SEAFDEC Asian Aquaculture* 12, 5-8.

Primavera J.H. 1993. A critical review of shrimp pond culture in the Philippines. *Reviews in Fisheries Science* 1,151-201

Rebordinos L., García P. y Cantoral J.M. 1999. Founder effect, genetic variability, and weight in the cultivated Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Journal of Shellfish Research* 18, 147-153.

Rosas C., Cuzon G., Taboada G., Pascual G., Gaxiola G y Van Wormhoudt A. 2001. Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption,

Haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacean, Decapoda; Penaeidae). *Aquaculture Research* 32, 531-547.

Rosenberry, R. 1995. World shrimp farming annual report. Shrimp News International. San Diego California.

Ryman N. y Utter F. 1987. Genotypic data from electrophoresis. En: Population genetics and fishery management, University of Washington, Washington, DC. 420 pp.

Rypniewski W.R., Perrakis A., Vorgias C.E. y Wilson K.S. 1994. Evolutionary divergence and conservation of trypsin. *Protein Engineering* 7, 57-64.

Sahin-Tóth M., Gráf L. y Tóth M. 1999. Trypsinogen stabilization by mutation Arg117-His: A unifying pathomechanism for hereditary pancreatitis?. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 505-508.

Sainz J.C., García-Carreño F., Sierra-Beltrán A y Hernández-Cortés M.P. (Aceptado) 2004. Trypsin synthesis and storage as zymogen in the digestive gland of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*

Sainz J.C., García-Carreño FL. Y Hernández-Cortés MP. (Aceptado) *Penaeus vannamei* isotrypsins: Isolation and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*.

Sainz J.C., Cruz-Hernández P., Cordova-Murueta J.H. y García-Carreño F.L. (Enviado) *Penaeus vannamei* isotrypsins: Genotype and Modulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

San Román J.I., Tapia J.A., Calvo J.J. y García L.J. 1995. Description of an automated method for the in vitro measurement of trypsinogen secretion from pancreatic segments. *Analytical Biochemistry* 232, 129-132.

Schulte P.M., Glément H.C., Fiebig A.A. y Powers D.A. 2000. Adaptive variation in lactate dehydrogenase-B gene expression: role of a stress-responsive regulatory element. *Proceeding of the National Academy of Science of USA* 97, 6597-6602.

Secor S. M. 2001. Regulation of digestive performance: A proposed adaptive response. *Comparative Biochemistry and Physiology* 128, 565-577.

Secor S.M. y Diamond J.M. 2000. Evolution of regulatory responses to feeding in snakes. *Physiological and Biochemical Zoology* 73, 123-141.

Sedlmeier D. 1988. The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) release amylase from the crayfish midgut gland. *Regulation of Peptides* 20, 91-98.

Simpson B.K. y Haard N.F. 1984. Purification and characterization of trypsin from Greenland cod, (*Gadus ogac*). 1. Kinetic and thermodynamic characterization. *Canadian Journal of Biochemistry and Cellular Biology* 62, 894-900.

Sokal R.R., Rohlf F.L. 1981. *Biometry*, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Stauffer C. 1989. *Enzyme Assays for Food Scientists*, AVI Press, New York. 230 p.

Steffens W. 1989. *Principles of Fish Nutrition*. Halsted Press. N.Y. USA. 384 p.

Strickberger M.W. 1998. *Genética*. OMEGA, España. 869 p.

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, 159-153.

Vargas-Albores F. 2002. Herramientas para Determinar Inmunoestimulación. In: *Avances en Nutrición Acuícola VI* (Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N., Eds),. UANL, Monterrey, pp. 46-53.

Von Heijne G. 1987. Sequence analysis in molecular biology. *Treasure trive or trivial pursuit?*. Academic Press, San Diego, USA.

Walsh K.A. 1970. Trypsinogen and trypsins of various species. *Methods in Enzimology* 19, 41-63.

Weck R.G. y Brandon R.A. 2000. Survival and allozyme expression in laboratory induced hybrids between two species of salamander. *Transactions of the Illinois State Academy of Science* 93, 69-81.

Whitaker J.R. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Second edition, Marcel Dekker, Inc. N.Y. 625 pp.

Yoshinaka R., Sato M., Sato T. y Ikeda S. 1984. Distribution of trypsin and chymotrypsin, and their zymogens in digestive organs of the eel (*Anguilla japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 78, 569-573.

Yu J.L., Chao L. y Chao J. 1994. Prostatin is a novel serine proteinase from seminal fluid-purification, tissue distribution, and localization in prostate gland. *Journal of Biological Chemistry* 269, 18843-18848.

Zeng F., Zhu Y. y Cohen A. 2002. Partial characterization of trypsin-like protease and molecular cloning of a trypsin-like precursor cDNA in salivary glands of *Lygus lineolaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131, 453-463.

Zhu Y.C. y Baker J.E. 1999. Characterization of the midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzoperta dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 1053-1063.

Zwilling R., Doersam H., Torff H., y Rold J. 1981. Low molecular mass protease: Evidence for a new family of proteolytic enzymes. *FEBS Letter* 127, 75-78.