



**CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.**

---

**Programa de Estudios de Posgrado**

**INHIBIDORES DE PROTEASAS DEL  
HEPATOPÁNCREAS DE DECÁPODOS**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de**

**Doctor en Ciencias**

**Uso, manejo y preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación Acuicultura)**

**P r e s e n t a**

**Cristiane de Albuquerque Cavalcanti**

**La Paz, B.C.S.,  
Noviembre, 2001**



## ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:30 horas del día 22 del Mes de NOVIEMBRE del 2001, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

**"INHIBITORS OF PROTEASES FROM THE MIDGUT GLAND OF DECAPODS "**

Presentada por el alumno:

Cristiane de Albuquerque

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

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

LA COMISION REVISORA

Fernando Garcia Kenner Soberhan  
INSERTAR NOMBRE DIRECTOR DE TESIS INSERTAR NOMBRE CO-TUTOR

Elvira Hernandez Dra. Gloria Yoris Pineda  
INSERTAR NOMBRE CO-TUTOR INSERTAR NOMBRE CO-TUTOR

Manuel Diaz Lopez  
INSERTAR NOMBRE CO-TUTOR

DR. SERGIO HERNANDEZ VAZQUEZ,  
DIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Dedico este trabajo:

Bira,

Ciça,

Déo,

Flor e

Helge

## Agradecimientos

Al Dr. Fernando García-Carreño, jefe de mi comité tutorial.

A mi comité tutorial: Dr. Manuel Díaz-López, Dra. Gloria Yepiz-Plascencia, Dra. Patricia Hernández-Cortés por su soporte intelectual. Gracias al Dr. Prof. Kenneth Söderhäll por el entrenamiento en su laboratorio.

A la Dra. So Young Lee, por la supervisión de la investigación hecha en la Universidad de Uppsala.

A Maria de los Angeles Navarrete del Toro, que pacientemente me introdujo a las técnicas enzimáticas.

Al Dr. Ellis Glazier por la edición en inglés de los manuscritos.

A todos mis amigos en todos los continentes. Ahora ustedes hacen parte de mi familia.

A mi familia. No hay palabras que puedan describir la importancia de ustedes en mi vida.

A mi marido Helge, ya que estuvo escrito eternalmente en los aires de los tiempos que nosotros éramos un solo corazón.

A Cavalcanti & Cia., Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Secretaria de Relaciones Exteriores of Mexico(SRE) e Instituto Sueco (SI) por el apoyo financiero durante esta investigación.

## Prefacio

Esta tese es basada en los siguientes artículos.

I. Cristiane de Albuquerque, Adriana Muhlia-Almazán, Patricia Hernández-Cortés, Fernando L. García-Carreño(2001).PROTEINASES FROM MARINE ORGANISMS. In: Recent advances in Marine Biotechnology. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi. Vol 6, subtitled Bio-organic Compounds: Chemistry and Biomedical Applications.

II Cristiane de Albuquerque-Cavalcanti, Fernando L. García-Carreño. and M. Angeles Navarrete del Toro (2002). Trypsin and Trypsin Inhibitors from Penaeid Shrimp. Journal of Food Biochemistry. In press.

## **Indice General**

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
PREFACIO	v
INDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS	2
ÍNDICE DE TABLAS	3
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	
Inhibir o perecer	7
Digestion de proteínas ingeridas en peneidos	11
Métodos para el análisis y purificación de los IPs	12
Purificación e identificación de la actividad IPs	12
Electroforesis	12
Cromatografía	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
CONCLUSIONES	24
LITERATURA CITADA	25
ANEXO 1	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo propuesto de la regulación de la síntesis de CCK. (DBI): inhibidor de unión del diazepam. (LCRF): factor de liberación de la CCK luminal.....	9
Figura 2: SDS-PAGE (A) marcadores de masa molecular. CIEa, (B) <i>P. californiensis</i> , (C) <i>P. monodon</i> , (D) <i>P. stylirostris</i> , y (E) <i>P. vannamei</i> . SDS-PAGE de CIEt, (B) <i>P. californiensis</i> , (C) <i>P. monodon</i> , (D) <i>P. stylirostris</i> , (E) <i>P. vannamei</i> y (F) <i>Pacifastacus leniusculus</i> .....	14
Figura 3: (A) marcadores de masa molecular. Inhibidor-sustrato-SDS-PAGE de CIEa, (B) <i>P. californiensis</i> , (C) <i>P. monodon</i> , (D) <i>P. stylirostris</i> y (E) <i>P. vannamei</i> . . Inhibidor-sustrato-SDS-PAGE de CIEt, (B) <i>P. californiensis</i> , (C) <i>P. monodon</i> , (D) <i>P. stylirostris</i> , (E) <i>P. vannamei</i> y (F) <i>Pacifastacus leniusculus</i> .....	14
Figura 4: SDS-PAGE, condiciones no reductoras, (A) marcadores de masa molecular, IP purificado, (B) <i>P. monodon</i> , (C) <i>P. vannamei</i> (D) <i>Pacifastacus leniusculus</i> . Inhibidor-sustrato-SDS-PAGE de IP purificado de (B) <i>P. monodon</i> , (C) <i>P. vannamei</i> (D) <i>Pacifastacus leniusculus</i> .....	14
Figura 5: SDS-PAGE, Condiciones de no reducción, (A) marcadores de masa molecular, IP purificado de (B) <i>P. monodon</i> , (C) <i>P. vannamei</i> y (D) <i>Pacifastacus leniusculus</i> . SDS-PAGE, condiciones de reducción, (A) marcadores de masa molecular, IP purificado de (B) <i>P. monodon</i> , (C) <i>P. vannamei</i> y (D) <i>Pacifastacus leniusculus</i> .....	15
Figura 6: Estabilidad de los IPs al pH.....	15
Figura 7: Estabilidad de los IPs a la temperatura.....	15
Figura 8: Tasas de inhibición (%) cuando los CIEs fueron incubados con proteasas comerciales, y proteasas de los EESs.....	16
Figura 9: Curva de elusión de las moléculas acopladas a la tripsina bovina inmobilizada. La flecha indica la fracción que presentó actividad de inhibición.....	16
Figura 10: Constante de Michaelis para la tripsina bovina.....	16
Figura 11: Constante de Michaelis para la tripsina bovina y IP de <i>P. monodon</i> .....	17
Figura 12: Constante de Michaelis para la tripsina bovina y IP de <i>P. vannamei</i> .....	17
Figura 13: Constante de Michaelis para la tripsina bovina y IP de <i>Pacifastacus leniusculus</i> .....	17
Figura 14: SDS-PAGE. (A) marcadores de masa molecular. SDS-PAGE del EES de (B) <i>P. californiensis</i> , (C) <i>P. monodon</i> , (D) <i>P. stylirostris</i> , (E) <i>P. vannamei</i> , (F) <i>Pacifastacus leniusculus</i> . Sustrato-SDS-PAGE del EES de (B) <i>P. californiensis</i> , (C) <i>P. monodon</i> , (D) <i>P. stylirostris</i> , (E) <i>P. vannamei</i> , (F) <i>Pacifastacus leniusculus</i> .....	18
Figura 15: (M) marcadores de masa molecular. Sustrato-SDS-PAGE de los EES de péncidos. (C), control; 1, EDTA; 2, PMSF; 3, TLCK. Los controles no fueron incubados con los inhibidores.....	19

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Familias de proteasas.....	8
Tabla 2: Familias de IP de serínproteasas.....	10
Tabla 3: Identificación de los IPs a través de inhibidor-sustrato-SDS-PAGE.....	19
Tabla 4: Masas moléculares de los IPs purificados.....	20
Tabla 5: Tasas de inhibición (%) cuando enzimas comerciales fueron incubadas con los IPs purificados.....	20
Tabla 6: Influencia de la composición del alimento en la estabilidad de los ARNms de tripsinas y PSTIs pancreáticos (Carreira et al., 1996).....	20
Tabla 7: Lista de algunos inhibidores de proteasas con funciones diversas.....	22



## ABREVIATURAS

SBTI	Soybean trypsin inhibitor
TPCK	Tosyl-Phe chloromethyl ketone
CIE	Crude inhibitor extract
CIEa	Acid treated CIE
CIEt	Heat treated CIE
EES	Enzymatic extract
IP	Proteinaceous inhibitor of protease
BPTI	Bovine pancreatic trypsin inhibitor
PSTI	Pancreatic secretory trypsin inhibitor

## RESUMEN

Las proteasas son moléculas esenciales para la homeostasis. Si la actividad catalítica de estas moléculas no está regulada, pueden ocurrir serios daños a los órganos y tejidos. Para controlar esta actividad son cosintetizan con las proteasas, inhibidores proteicos de proteasas (IPs), los cuales forman complejos inactivos o con menor actividad que las proteasas libres. En la presente investigación se identificaron IPs en el hepatopáncreas de cuatro especies de camarones, *Penaeus vannamei*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, y *P. californiensis*, así como del acocil, *Pacifastacus leniusculus*. Los IPs del hepatopáncreas *P. monodon*, *P. vannamei* y *P. Leniusculus* fueron purificados y caracterizados. Los inhibidores purificados tuvieron una masa molecular de 20 kDa y todos inhibieron a tripsina bovina, quimotripsina bovina y subtilisina. Los resultados sugieren que los IPs son moléculas estables, ampliamente distribuidas y tienen una función clave en la homeóstasis de decápodos. La presencia de IPs en los hepatopáncreas de decápodos sugiere una regulación parecida a la de mamíferos. En la presentación se ampliará la discusión de sus características y modos de regulación de estas moléculas.

## ABSTRACT

Proteases are essential molecules for the homeostasis. If the catalytic activity of these molecules is not regulated, can occur serious damages to organs and tissues. To control this activity, proteinaceous inhibitors of proteases (IPs) are cosynthesized with proteases, and form inactive or less active complexes than free enzymes. Were identified in this research, IPs in the midgut gland of four shrimps, *Penaeus vannamei*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, *P. californiensis*, as also crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Were purified and characterized IPs from the midgut gland of *P. monodon*, *P. vannamei* and *P. leniusculus*. The purified inhibitors showed a molecular mass of 20 kDa and all of them inhibited bovine trypsin, bovine chymotrypsin, and subtilisin. The results suggest that IPs are stable molecules, ubiquitous distributed, and have a key function in the homeostasis of decapods. The existence of IPs in the midgut gland of decapods suggests a similar regulation as in mammals. In the presentation will be incremented the discussion of their characteristics and ways of regulation of these molecules.

## INTRODUCCIÓN

### Inhibir o perecer

Las enzimas son moléculas especializadas que catalizan reacciones químicas en sistemas biológicos. Son moléculas específicas esenciales para la comprensión de cómo sobreviven las células ya que su función es acelerar reacciones químicas. Actualmente son consideradas como herramientas importantes en diversas áreas, tales como: medicina, industria química, agricultura, entre otras. La mayoría de las enzimas conocidas son proteínas, con la excepción de algunos ARN (Lehninger, 1993).

Cuando las enzimas fueron descubiertas, sus actividades catalíticas fueron comparadas a los procesos de fermentación de las levaduras. Algunos científicos empezaron a llamar a las enzimas "levadura". Pasteur teorizó que la fermentación era inseparable de las células vivas, mientras que Justus Liebig formuló que la fermentación era causada por la acción química de algunas sustancias (Whitaker, 1994).

La enzimología tuvo sus bases fundamentadas al principio del siglo XIX, cuando Payes y Person demostraron la existencia de la amilasa. Duclaux, en 1898, sugirió el uso del sufijo "asa" después del sustrato sobre el que actúa, este procedimiento se sigue usando hoy en día para el nombre común de la enzima. Hubo un gran desarrollo de la comprensión de las enzimas con la cristalización de la ureasa por Sumner en 1926, así como de la pepsina y la tripsina por Northrop en 1926.

Las proteasas fueron de las primeras enzimas en ser descubiertas debido a su abundancia. Algunas de las proteasas más estudiadas son las presentes en los jugos gástricos (pepsina) y pancreáticos (quimotripsina y tripsina). Estas enzimas fueron ampliamente caracterizadas, se conoce su comportamiento cinético, especificidad, inhibición, secuencia de sus aminoácidos, estructura tridimensional y mutagénesis dirigida. Con esta información fue hecha una clasificación de familias de proteasas (Fersht, 1998).

Las proteasas son hidrolasas, lo que significa que el agua es usada como un segundo sustrato para la ruptura de los enlaces peptídicos en las proteínas. La reacción genérica es:



La Unión Internacional de Bioquímica se encargó de clasificar a las enzimas en base a la reacción que cataliza, para el caso de las proteasas, éstas hidrolizan enlaces peptídicos, siendo así clasificadas como EC 3.4. Aquellas que hidrolizan enlaces peptídicos en los extremos de la proteína, son llamadas exoproteasas y son clasificadas como EC 3.4.11-17.X. Las que hidrolizan enlaces peptídicos internos son las endoproteasas y son clasificadas como EC 3.4.21-24.X (Dixon y Webb, 1979, García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997). La reacción catalizada se relaciona con los aminoácidos en el sitio activo (Whitaker, 1994), para las proteasas pueden ser: serínproteasas (EC 3.4.21.X), cisteínproteasas (EC 3.4.22.X), aspartoproteasas (EC 3.4.23.X) y metaloproteasas (EC 3.4.24.X). También pueden ser clasificadas de acuerdo a la similitud de la secuencia de aminoácidos (Tabla 1).

Las proteasas están involucradas en diversos procesos fisiológicos como digestión de las proteínas ingeridas, coagulación, activación del sistema inmune, cambios ontogenéticos en tejidos, destrucción celular y desarrollo de metástasis (Fersht, 1999). Es evidente que cuando la actividad de las proteasas no es regulada, puede ocurrir proteólisis crónicas, algunos ejemplos de ellas son la pancreatitis y la artrosis.

En el sistema digestivo de mamíferos, los cambios en la secreción pancreática son influenciados por factores como la composición de los alimentos, el medio ambiente y las condiciones de salud.

La regulación de las proteasas digestivas puede ser hecha desde la molécula básica de la información: el ADN (Lhoste et al., 1994). Las proteasas digestivas pueden ser reguladas por péptidos reguladores, como colecistokinina (CCK), secretina, somatostatina, polipéptido

pancreático, polipéptido intestinal vasoactivo, neurotensina y gastrina. Por ejemplo, la CCK es una hormona gastrointestinal producida en las células discretas de la región proximal del duodeno. En vertebrados esta hormona es producida en algunas formas moleculares que son transformadas en procesos postraduccionales (Bragado et al., 2000).

Tabla 1: Familias de proteasas\*

Familia	Enzima	Fuente
Serina I	tripsina	páncreas
	quimotripsina	páncreas
Serina II	subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Serina carboxipeptidase II del trigo		
Serina protease del megalovirus		
Componente proteolítico CipP de la proteasa dependiente del ATP		
Cisteína	papaína	<i>Carica papaya</i>
	quimopapaína	<i>Carica papaya</i>
	ficina	<i>Ficus carica</i>
	bromelina	<i>Ananas comosus</i>
Asparto	pepsina	Jugo gástrico
	catepsina D	Hígado y bazo
Metallo I	carboxipeptidasa	Páncreas bovino
Metallo II	termolisina	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>

\*Modificado de Neurath (1989) y Czapińska and Otlewski (1999).

La CCK interacciona con receptores en la membrana plásmica, células acinares pancreáticas o células del intestino, lo que ocasiona la liberación de mensajeros intracelulares que activarán células intestinales, las cuales, a su vez, liberarán mensajeros que activarán otras moléculas reguladoras, las cuales participarán en procesos como:

- Control de movimientos peristálticos.
- Secreción del páncreas.
- Contracción de la vejiga.
- Relajamiento de esfínter de Oddi.
- Inhibición de vaciamiento gástrico (Owyang, 1994).

Existen también algunas rutas de regulación de la secreción hormonal involucradas en los procesos digestivos. La secreción de la CCK intestinal es estimulada, por ejemplo, por la ingestión de alimentos. Aparentemente la mucosa intestinal ejerce una importante función en el reconocimiento y regulación de la síntesis pancreática (Bozkurt y Haberich, 1985). Ya fue encontrado un péptido liberador de CCK, el cual es sensitivo a la tripsina. Este péptido es secretado en el lumen del duodeno, es desactivado por la tripsina y estimula la liberación de la CCK. La liberación de la CCK muestra evidencias de que es controlada por mecanismos también hormonales y colinérgicos. El modelo de la regulación que fue propuesto se muestra enseguida (Figure 1). La secreción luminal de la gastrina está dada por estimulación eléctrica del nervio vago, bombesina y drogas sulfonúricas (Uvnäs-Wallensten, 1977). La somatostatina puede ser liberada por la ingestión de alimentos, y estimulación colinérgica. Este péptido puede ser detectado en los jugos pancreáticos y gástricos, así como lumen duodenal (Sarfati and Morisset, 1989). La somatostatina reduce la liberación de CCK a través de la inhibición de la secreción del péptido liberado de la CCK (Herzig et al., 1994).



Se ha propuesto que la CCK evolucionó en invertebrados como un péptido neural y en vertebrados como un péptido regulador en el sistema endocrino, gastrointestinal y nervioso (Larson and Vigna, 1983). Fue teorizado que la CCK es una molécula antigua y altamente conservada, ya que la isoforma de mamíferos induce a respuestas fisiológicas en organismos inferiores. En crustáceos hay evidencias de la actividad de la CCK. Esta hormona influye en los procesos de muda en *Palaemon serratus* (Favrel et al., 1987) y ritmo gástrico de ganglios estomatogástricos de *Panulirus interruptus* (Turrigiano et al., 1994). En *Cancer borealis* fue encontrada una familia de isoformas de CCK, las cuales están distribuidas en las neuronas relacionadas con el sistema gástrico nervioso (Christie et al., 1995), en el pedúnculo ocular y en la región inicial del intestino (*foregut*) de *Palaemon serratus* y órganos pericárdicos en *Panulirus interruptus* (Turrigiano et al., 1994).

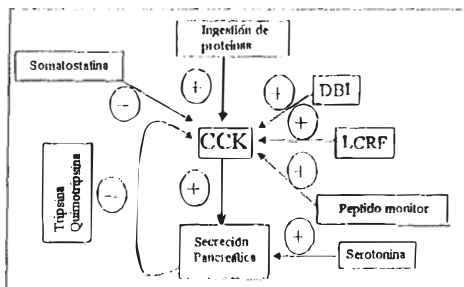


Figura 1: Modelo propuesto de la regulación de la síntesis de CCK. (DBI): inhibidor de unión del diazepam. (LCRF): factor de liberación de la CCK luminal.

Otro nivel de regulación es el postraducciona, está basado en proenzimas, llamadas zimógenos (Palmer, 1995). Estas moléculas permanecen inactivas, mientras no existe alimento para ser degradado, los zimógenos se encuentran almacenados dentro de gránulos pancreáticos. Cuando el estímulo apropiado es recibido (como la entrada del quimo), estas moléculas son rápidamente activadas. La ventaja de este mecanismo es que desde la recepción del estímulo, no es necesario iniciar la síntesis del ARN mensajero. En vertebrados primitivos es conocida la existencia de algunos zimógenos de enzimas digestivas, al igual que en peces (Kurokawa and Suzuki, 1996). En *Penaeus vannamei* fueron encontrados zimógenos putativos para la quimotripsina (Sellos and Van Wormhoudt, 1992) y la tripsina (Klein et al., 1998).

Otro importante mecanismo es obtenido por el control de las enzimas activadas. Esto es alcanzado por proteínas resistentes a la proteólisis (IP). Suena paradójico ya que las proteínas son los substratos naturales para las proteasas. Los IPs son moléculas ubicuas que forman complejos inactivos ó menos activos con sus correspondientes enzimas. La mayoría de estos IPs son proteínas. Hasta hoy, solo en microorganismos fueron encontrados inhibidores no protéicos (Laskowski and Qasin, 2000). Kunitz and Northrop en 1936 aislaron y cristalizaron un inhibidor pancreático bovino (BPTI). Desde entonces una miríada de IPs fueron purificados, caracterizados, secuenciados y tuvieron sus estructuras definidas en tercera dimensión (Laskowski and Qasin, 2000).

Los inhibidores de proteasas tienen una variedad de pliegues polipeptídicos, incluyendo bi ó multi-dominios. La mayoría de los IPs inhiben a enzimas de una sola clase (Whitaker, 1994). Una excepción es el inhibidor de la anémona marina (*Actinia equina*), equistatina. Este inhibidor tiene dos dominios que bloquean la actividad de las isoformas de papaína y catepsina D (Bode and Huber, 2000).

El número de IPs de las serínproteasas es más grande que para las otras clases de proteasas. No está claro si eso es causado por la amplia distribución de serínproteasas en la naturaleza o por una preferencia por parte de los investigadores. Para serínproteasas, en la actualidad, existen por lo menos 25 familias de IPs (Tabla 2).

Las interacciones químicas entre enzimas y sus IPs son comúnmente usadas para clasificar las enzimas. Los inhibidores competitivos son moléculas que se unen reversiblemente al sitio activo

de la enzima y evitan que el sustrato se una a la enzima, el inhibidor y el sustrato compiten por la enzima. Los inhibidores competitivos afectan al  $K_m$  pero no la  $V_{max}$ , ya que el incremento en la concentración del sustrato desplaza el efecto de los inhibidores a las enzimas. El inhibidor no competitivo y el sustrato se unen simultáneamente a la enzima, por lo que el valor de la  $K_m$  no se afecta, pero la  $V_{max}$  es modificada. La inhibición acompetitiva ocurre cuando el inhibidor se une al complejo enzima-sustrato, con ello evita la liberación del producto, en este caso ambos valores se ven afectados.

Tabla2: Familias de IP de scrínproteasas\*

Familia	Tercer dimensión		Estructura	Mecanismo estándar	Numero de dominios
	Libre	Complejo			
Antistatina <sup>a</sup>	Si	Si		Si	1,2
<i>Arrowhead</i> <sup>b</sup>					
Sitio 1	No	No		Probable	1
Sitio 2					
<i>Ascaris</i> <sup>a</sup>	Si	Si		Si	1
<i>Bownam-Birk</i> <sup>b,3</sup>	Si	Si		Si	2,4
Chelonianina <sup>a</sup>	Si	Si		Si	1,2
Ecotina <sup>c</sup>	Si	Si		Si	1
Saltamontes <sup>a</sup>	Si	Si		Si	1,9
<i>Kazal</i> <sup>a</sup>	Si	Si		Si	1,2,3,4,7,9,15
<i>Kunitz</i> (BPTI) <sup>a</sup>	Si	Si		Si	1,2,3,5
<i>Kunitz</i> (STI) <sup>b</sup>	Si	Si		Si	1
Marinostatina <sup>c</sup>	No	No		Si	1
Papa I <sup>b</sup>					
Eglina <sup>c</sup>	Si	Si		Si	1
Inhibidor de tripsina de <i>Cucurbita maxima</i> (CMTI-V)				Si	1
Papa II <sup>b</sup>		Si		Si	1,2,3,4,6
Cereal <sup>b</sup>	Si	No		Si	1
<i>Rapeseed</i> <sup>b</sup>				Si	1
Bicho de la seda <sup>c</sup>					
Inhibidor de protease de hongos (FPI-F)				Si	1
Inhibidor de subtilisina de <i>Streptomyces</i> (SSI) <sup>c</sup>	Si	Si		Si	1
Calabaza <sup>b</sup>	Si	Si		Si	1
<i>Ragi</i>					
<b>Otras familias</b>					
Hirudina		d		d	d
Serpina		d		d	d
Grupo propetido de proteinasa de <i>Streptomyces</i>		d		d	d
Clan de subtilina		d		d	d
Peptido anticuagulante de garrapata (TAP)		d		d	d

<sup>a</sup> animal, <sup>b</sup> planta, <sup>c</sup> microorganismo, d- sin registro, \* modificado de Laskowski Jr. and Qasin, 2000.

### Digestion de proteínas ingeridas en peneidos

Entre invertebrados los crustáceos es un grupo que está ubicado en un estado filogenético avanzado, a pesar de ello, permanecen debajo de los Phyla Echinodermata y Urochordata, en términos evolutivos. Esto se refleja en las características morfológicas, físicas y reproductivas, tales como la presencia de exoesqueleto y la ausencia de memoria inmune. Los camarones de la familia Penaeidae son organismos abundantes en aguas someras cercanas a la costa o poco profundas, de regiones tropicales y subtropicales. Estos organismos muestran morfología y sistema digestivo rudimentarios, comunes para la mayoría de los Decápodos. El registro fósil más antiguo encontrado para los peneidos data del Triásico tardío. (Dall et al., 1990).

El proceso de digestión empieza con la reducción del tamaño del alimento ingerido. Los peneidos poseen mandíbulas asociadas con músculos, las cuales son capaces de quebrar pequeños animales con caparazón. Las partes posteriores bucales trabajan seleccionando y eliminando materiales. Después de estas estructuras, el sistema digestivo puede ser dividido en tres segmentos: una región inicial cuticular (*foregut*), el hepatopáncreas que tiene función digestiva y de absorción (*midgut*), y una región final cuticular (*hindgut*), la cuál constituye principalmente el recto (Dall et al., 1990).

El investigar el hepatopáncreas es un reto para los científicos, ya que esta glándula tiene funciones relacionadas con el hígado, páncreas e intestino de mamíferos. Aún no se conoce la diferenciación de las células en esta estructura, esto es debido a la fragilidad de las células y tejidos. Además, algunas funciones morfológicas y fisiológicas en esta glándula implican en dificultades para el análisis de los resultados encontrados, ya que este órgano secreta enzimas digestivas y al mismo tiempo absorbe y almacena el alimento digerido.

En el hepatopáncreas, las células F son las responsables de la síntesis de los zimógenos de algunas de las enzimas digestivas (Ceccaldi, 1989). La tripsina es la proteasa que más se produce en el hepatopáncreas (Dall et al., 1990). En crustáceos, esta enzima es detectada desde estadios tempranos de la ontogénesis (Lemos et al., 1999; Le Vay et al., 2001). La secreción de la tripsina es generalmente estimulada por la CCK (Lhoste et al. 1994) y alimentos con alta concentración de proteínas (Giorgi et al., 1985). Aún existen resultados contradictorios, ya que Pérez et al. (1998) encontró que el contenido de proteína no afecta la transcripción de tripsina en larvas de peces (*Dicentrarchus labrax*). También se pueden encontrar variaciones entre diferentes líneas genéticas (Lhoste et al. 1994) y estadios del desarrollo ontogenético (Giorgi et al. 1985). De forma general, la secreción de tripsina es incrementada por la disponibilidad de IP en el intestino (Tsuzuki et al. 1991).

Debido a que una proteólisis descontrolada es deletérea a los sistemas fisiológicos, es necesario la existencia de moléculas que regulen la actividad proteolítica en el hepatopáncreas de los crustáceos. Existen algunas evidencias de la existencia de IPs en estos organismos. García-Carreño et al., (1998), y de Albuquerque-Cavalcanti et al., (2002), encontraron dos IPs en algunos peneidos. No se sabe dónde son secretados, pero si se hace una analogía con vertebrados, deberían ser secretados en las células F, junto con los zimógenos.

El objetivo de la actual investigación fue el de elucidar la existencia de IPs en el hepatopáncreas de *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris*, *P. californiensis*, *P. monodon*, y *Pacifastacus leniusculus*, estandarizar una metodología para la purificación de estas moléculas, así como caracterizarlas. El conocimiento acerca de los IPs en el hepatopáncreas de estos organismos facilitará la comprensión de la digestión de proteínas y su regulación. En la presente investigación se demostró la existencia, purificación y caracterización de IPs en el hepatopáncreas de *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris*, *P. californiensis*, *P. Monodon* y *Pacifastacus leniusculus*. Este hallazgo indica la importancia de estas moléculas en la homeostasis del metabolismo en crustáceos.

## **Métodos para el análisis y purificación de los IPs**

Con el fin de analizar la actividad proteolítica y la actividad inhibitoria en los IPs, los hepatopáncreas fueron extraídos de los organismos decapitados (previamente anestesiados en frío) de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), tigre (*P. monodon*) y acocil (*Pacifastacus leniusculus*). El hepatopáncreas fue inmediatamente congelado, posteriormente macerados en Tris-HCl. La fracción soluble del macerado de estas glándulas fue denominada extracto enzimático (EES).

### **Purificación e identificación de la actividad IPs**

La evaluación de la actividad inhibitoria puede hacerse a través del análisis de la reducción de la actividad proteolítica, por métodos espectrofotométricos, radioquímicos, inmunoquímicos, o evidencia de inhibición en geles de electroforesis. (Scopes, 1994).

La desnaturalización es un proceso donde ocurre la destrucción de la estructura terciaria de la proteína y la formación de cadenas polipeptídicas al azar. La desnaturalización selectiva se basa en que la proteína deseada no se desnaturalize totalmente, mientras que los componentes no deseados son precipitados. Los principales factores de desnaturalización de las proteínas son variaciones en la temperatura, pH y por adición de solventes orgánicos. Estos no son independientes, ya que uno puede interferir en el otro. En la presente investigación fueron usados principalmente cambios de temperatura y pH, con el fin de eliminar la actividad proteolítica y el exceso de proteínas indeseables de el EES. El extracto ácido de inhibidores (CIEa) fue obtenido a través de la acidificación del EES con ácido tricloroacético, dando como resultado un valor de pH 2. También fue hecha la precipitación de las proteínas no deseadas del EES a través del calentamiento del EES a 85 °C por 20 min, el sobrenadante de este proceso fue nombrado extracto térmico de inhibidores (CIET).

### **Electroforesis**

Una molécula de proteína en solución, en un pH diferente a su punto isoelectrico, tiene una carga neta. Para separar diferentes proteínas, la electroforesis se basa en esta propiedad. Existen variaciones de esta metodología, como la separación por masa molecular, por punto isoelectrico, o por su conductividad eléctrica.

En esta investigación se hizo electroforesis usando muestras no desnaturalizadas, esto para evidenciar la actividad biológica de estas proteínas. La técnica substrato-SDS-PAGE evidencia la actividad proteolítica de los EES, mientras que la electroforesis inhibidor-substrato-SDS-PAGE evidencia actividad inhibitoria.

### **Cromatografía**

Una metodología comúnmente usada para la separación y purificación de proteínas es la cromatografía. La cromatografía está basada en el retraso de solutos con respecto a un solvente, cuando son aplicados a través de un material poroso. Existe una variedad de adsorbentes propios para proteínas, que trabajan con las características químicas de éstas. Las proteínas pueden ser separadas por fuerzas electrostáticas (intercambio iónico), tamaño (filtración en gel), polaridad e hidrofobicidad (fase reversa), así como por interacciones bioespecíficas (afinidad). La elusión de la columna de la proteína a ser purificada se realiza a través del cambio de las condiciones químicas de la columna, como pH, fuerza iónica, métodos de afinidad y polaridad. En este trabajo, los IPs fueron purificados a través de cromatografía de afinidad, aprovechando la actividad biológica de estas moléculas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido proteico en los alimentos para camarones ha sido una constante preocupación en la acuicultura. La proporción adecuada de proteína en los alimentos ha sido discutida, así como la calidad nutricional de estas (Akiyama et al., 1992, Sudaryono et al., 1995). A pesar de que algunos resultados satisfactorios ya fueron obtenidos en el estudio de la nutrición en peneidos (Cordova-Murueta et al., 2001), aún la mayoría del conocimiento es generado en base a la observación empírica.

Durante el desarrollo ontogenético, los peneidos sufren una metamorfosis, donde ocurren cambios en el comportamiento alimenticio así como en el repertorio enzimático en el hepatopáncreas (Lovett and Felder, 1990, Lemos et al. 1999). Estos cambios siguen durante toda la vida de los peneidos así como en ciclos circadianos (Hernández-Cortés y Seiffert, 1998), lo que indica que los peneidos poseen un reloj biológico en su sistema digestivo, al igual que los mamíferos (Scheving, 2000). Mientras tanto, la fisiología de la digestión en crustáceos no es totalmente comprendida.

Dos metodologías fueron probadas para la precipitación parcial de las proteínas del EES, esto con el fin de obtener los extractos de inhibidores crudos (CIEs). En la primera metodología, se desnaturalizaron proteínas por un valor de pII bajo y la segunda, por una temperatura elevada. Con el primer método fueron obtenidos dos inhibidores de 6 y 20 kDa; para la segunda metodología se obtuvieron más (Tabla 3), esto en peneidos. Para *P. leniusculus* solamente la segunda metodología fue usada. Los CIEs presentaron una cantidad de proteínas 50 veces más grande que los CIEs, presentando también más IPs, con la excepción de *P. californiensis* (Tabla3).

Cuando los CIEs fueron examinados por SDS-PAGE, se encontraron diferentes patrones de proteínas entre CIEa y CIEt (Figura 2). En los CIEs, no se pudo visualizar a los IPs o se observaron bandas con baja intensidad, lo que indica la baja concentración de estas proteínas en el extracto prepurificado. Cuando el mismo análisis fue desarrollado, para CIEt, las bandas de los IPs fueron visualizadas con más intensidad, indicando una selección diferente durante la precipitación de las proteínas por los diferentes factores desnaturalizantes.

Cuando se realizó el análisis por la técnica inhibidor-sustrato-SDS-PAGE, se demostró la existencia de IPs en el hepatopáncreas de todas las especies estudiadas, variando desde 6 hasta 75 kDa (Tabla 3, Figura 3). Fueron purificados IPs de 20 kDa del hepatopáncreas de *P. monodon*, *P. vannamei*, y *P. leniusculus* (Figura 4). Cuando éstos IPs fueron analizados en condiciones reductoras y no reductoras, se encontró una variación de las masas moleculares (Tabla 4, Figura 5). Esto indica la presencia de puentes disulfuro en estas moléculas, lo que es un patrón comúnmente encontrado en los IPs (Laskowski and Kato, 1980).

Los IPs estudiados tanto del CIEs y CIEt y IPs purificados demostraron ser termo y pII-estables (Figuras 6 y 7). Cuando los CIEs fueron incubados con enzimas purificadas comercialmente, en una relación de 1:80 (enzima:CIE), las tasas de inhibición fueron superiores a 70%. Cuando el mismo ensayo fue realizado, pero usando CIEt, fueron encontradas tasas menores de inhibición (Figura 8). Este panorama cambió cuando fueron analizadas las quimotripsinas de los EESs de *P. californiensis* y *P. vannamei*, incubadas con los CIEs endógenos (1:80). Para estas especies se encontraron mayores tasas de inhibición (Figura 8). Los IPs purificados fueron incubados con enzimas comerciales (1:1) e inhibieron aproximadamente 50% de la actividad proteolítica. (Tabla 5). Entre las especies estudiadas, solamente EESs de *P. leniusculus* no presentó actividad de subtilisina y quimotripsina.



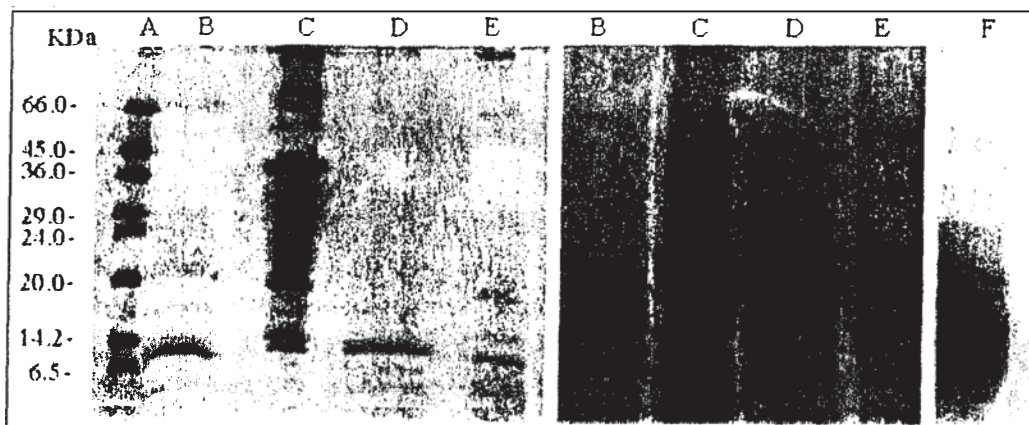


Figura 2: SDS-PAGE (A) marcadores de masa molecular. CIEa, (B) *P. californiensis*, (C) *P. monodon*, (D) *P. stylirostris*, y (E) *P. vannamei*. SDS-PAGE de CIEt, (B) *P. californiensis*, (C) *P. monodon*, (D) *P. stylirostris*, (E) *P. vannamei* y (F) *Pacifastacus leniusculus*.

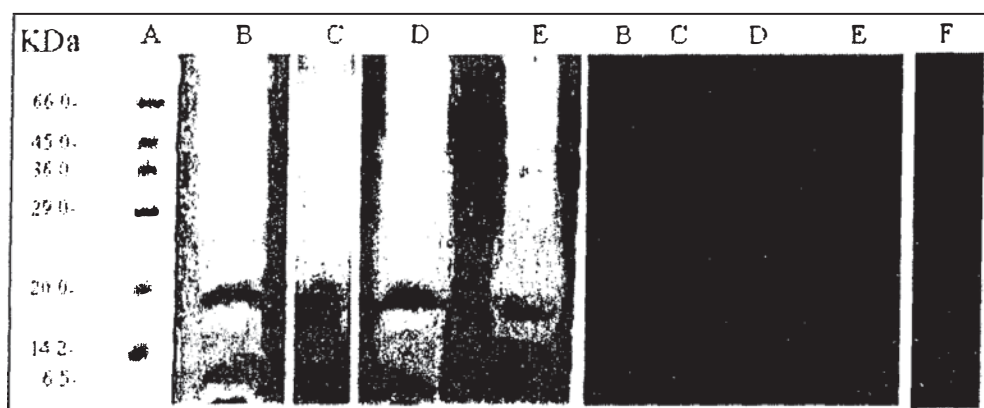


Figure 3: (A) marcadores de masa molecular. Inhibidor-sustrato-SDS-PAGE de CIEa, (B) *P. californiensis*, (C) *P. monodon*, (D) *P. stylirostris* y (E) *P. vannamei*. Inhibidor-sustrato-SDS-PAGE de CIEt, (B) *P. californiensis*, (C) *P. monodon*, (D) *P. stylirostris*, (E) *P. vannamei* y (F) *Pacifastacus leniusculus*.

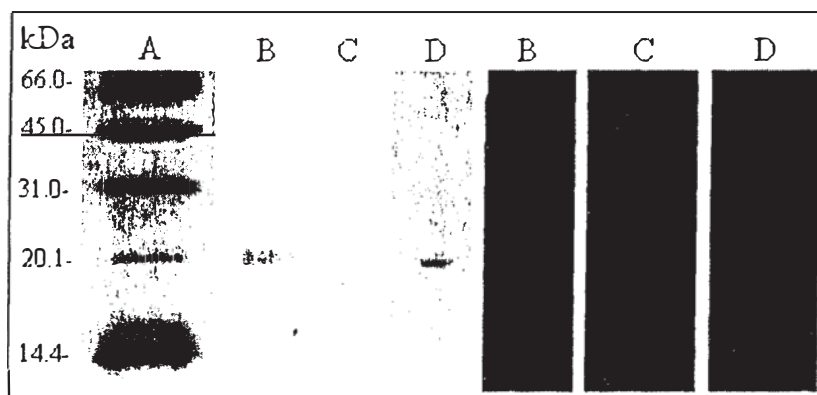


Figure 4: SDS-PAGE, condiciones no reductoras, (A) marcadores de masa molecular, IP purificado, (B) *P. monodon*, (C) *P. vannamei* (D) *Pacifastacus leniusculus*. Inhibidor-sustrato-SDS-PAGE de IP purificado de (B) *P. monodon*, (C) *P. vannamei* (D) *Pacifastacus leniusculus*.

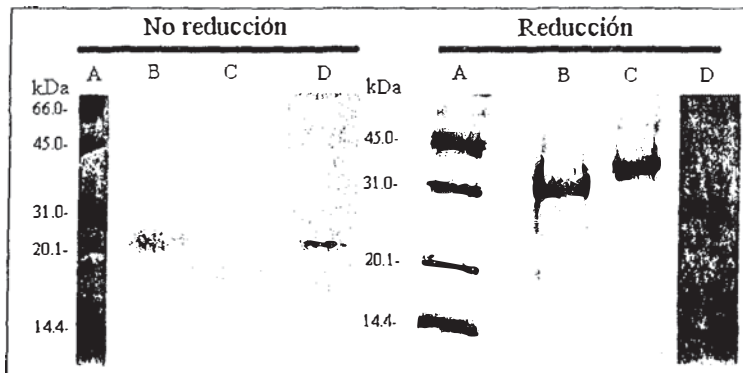


Figure 5: SDS-PAGE, Condiciones de no reducción, (A) marcadores de masa molecular, IP purificado de (B) *P. monodon*, (C) *P. vannamei* y (D) *Pacifastacus leniusculus*. SDS-PAGE, condiciones de reducción, (A) marcadores de masa molecular, IP purificado de (B) *P. monodon*, (C) *P. vannamei* y (D) *Pacifastacus leniusculus*

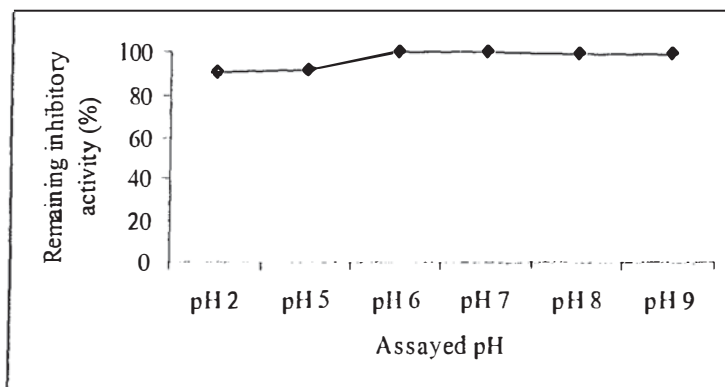


Figura 6: Estabilidad de los IP's al pH

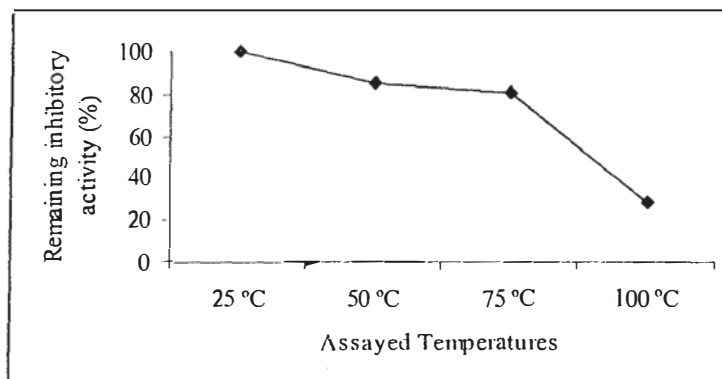


Figura 7: Estabilidad de los IP's a la temperatura.

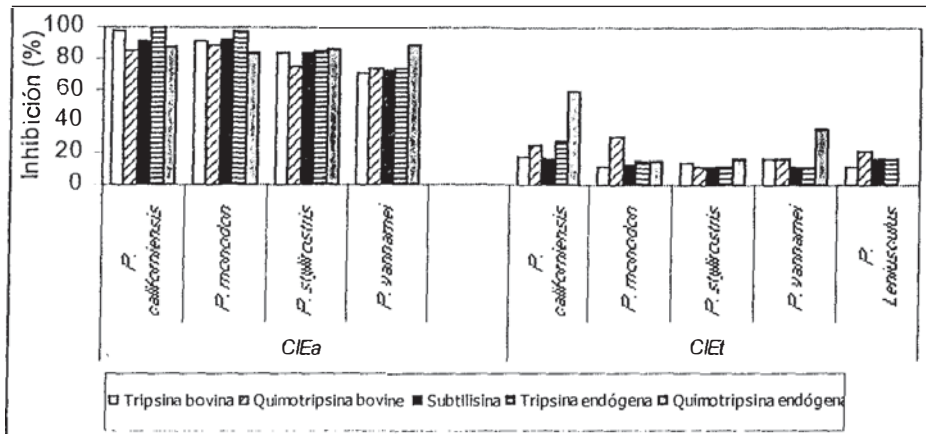


Figura 8: Tasas de inhibición (%) cuando los CIEs fueron incubados con proteasas comerciales, y proteasas de los EESs.

Las tasas de inhibición no fueron estadísticamente diferentes para los IPs purificados de *P. monodon*, *P. vannamei* y *P. leniusculus*. De estos resultados, se calcula que los IPs purificados interaccionan con la tripsina bovina, quimotripsina bovina y subtilisina en una relación de 1:0.5. Los IPs fueron aislados por cromatografía de afinidad (Figura 9). Algunos parámetros cinéticos de la tripsina bovina y los Ips fueron analizados (Figuras 10-13).

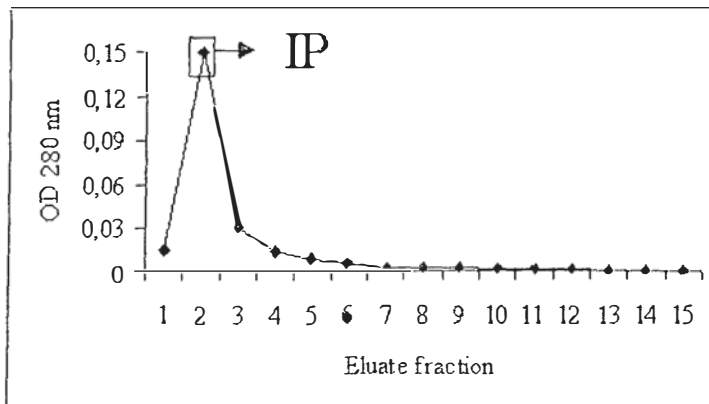


Figura 9: Curva de elución de las moléculas acopladas a la tripsina bovina inmobilizada. La flecha indica la fracción que presentó actividad de inhibición.

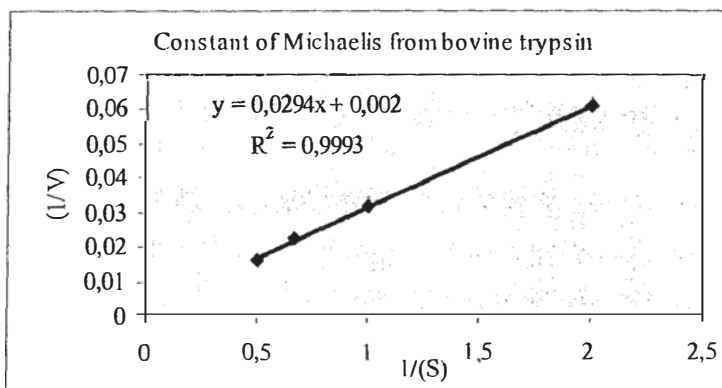


Figura 10: Constante de Michaelis para la tripsina bovina

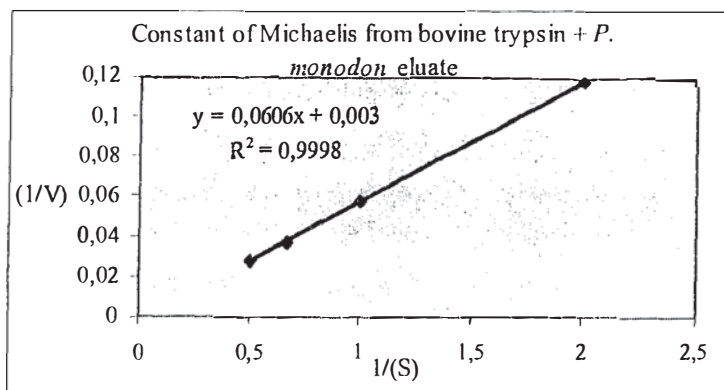


Figura 11: Constante de Michaelis para la tripsina bovina y IP de *P. monodon*

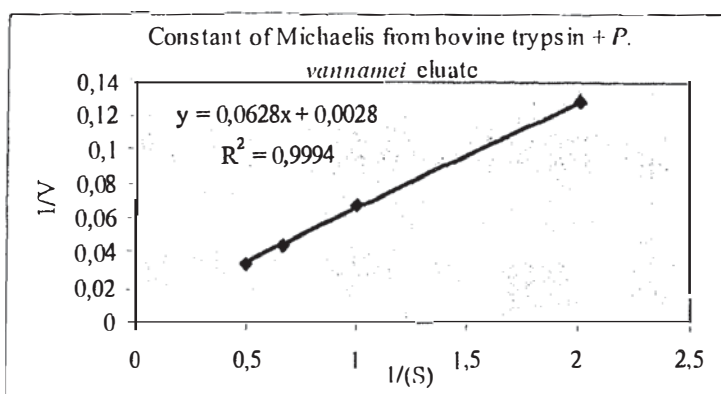


Figura 12: Constante de Michaelis para la tripsina bovina y IP de *P. vannamei*.

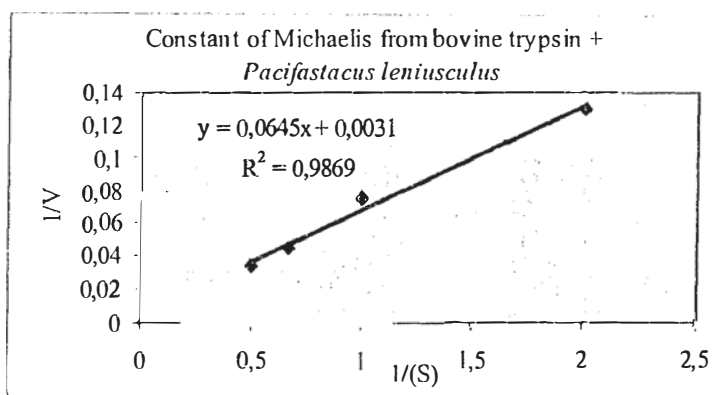


Figura 13: Constante de Michaelis para la tripsina bovina y IP de *Pacifastacus leniusculus*.

Los peneidos y Astacida poseen diferentes historias evolutivas. El ancestral de estas especies habitaba aguas marinas. Durante el supercontinente Pangaea, el ancestro del acocil migró del ambiente marino y colonizó lagos de agua dulce. Hoy en día los peneidos y Astacida están filogenéticamente separados, todavía comparten características como un IP de 20 kDa. Este

resultado indica la importancia de estas moléculas para la regulación de serín proteasas en el metabolismo de crustáceos.

En el hepatopáncreas de peneidos ya fueron demostradas las actividades de tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas y aminopeptidasas (García-Carreño et al. 1994). La secreción de quimotripsina no es una constante entre crustáceos. Galgani y Nagayama (1988), con cangrejos y García-Carreño and Haard (1993), con acocil, no encontraron actividad de quimotripsina, mientras que Tsai et al. (1986), con peneidos, tuvieron respuestas positivas. En la actual investigación, todos los crustáceos estudiados demostraron que la actividad de quimotripsina, con la excepción del acocil (*P. leniusculus*), corroboran los resultados de Hernández-Cortés et al. (1997).

Las isoformas de tripsinas son las proteasas más abundantes en el hepatopáncreas de decápodos (Dall et al. 1990). Sorprendentemente fueron encontrados IPs en el hepatopáncreas de *P. Leniusculus*, que inhiben quimotripsina y subtilisina, pero no fueron detectadas actividades proteolíticas de estas enzimas en esta glándula digestiva. La explicación para este hallazgo no está comprendida. En hemocitos de acocil fue encontrado un inhibidor de subtilisina (Häll and Söderhäll 1982). Surgen con este hallazgo algunas interrogantes, ¿pueden las secreciones de estos IPs ser un mecanismo de defensa contra proteasas no endógenas o de otros órganos y que son dañinas?. Aún es necesario estudiar mucho más.

Los análisis de SDS-PAGE y sustrato-SDS-PAGE demostraron que los patrones de proteínas (Figura 14), son diferentes en concentración y masas moleculares entre las especies estudiadas. Los inhibidores de proteasas y quelantes tuvieron diferentes efectos en las proteasas de los peneidos (Figura 15). Entre los inhibidores comerciales y quelantes, las más altas tasas de inhibición fueron observadas con PMSF y TLCK. Esto demuestra que en el hepatopáncreas de las especies estudiadas, la mayoría de las proteasas son serín proteasa y entre éstas, se destaca la tripsina. Las diferencias en los efectos de los inhibidores a las proteasas puede ser causado por la variedad de isoformas de estas enzimas. Esta característica ocasiona diferentes interacciones entre las isoformas de una misma proteasa y sus inhibidores.

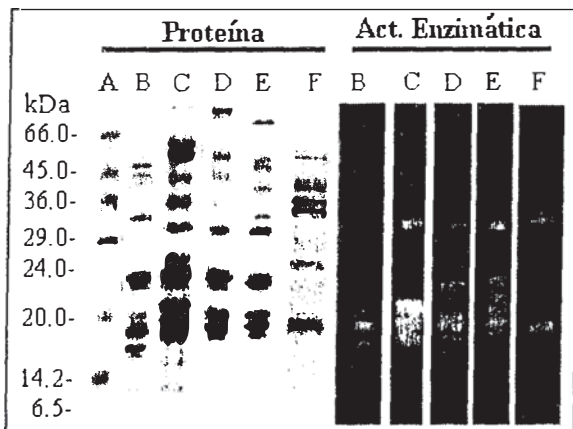


Figura 14: SDS-PAGE. (A) marcadores de masa molecular. SDS-PAGE del EES de (B) *P. californiensis*, (C) *P. monodon*, (D) *P. stylirostris*, (E) *P. vannamei*, (F) *Pacifastacus leniusculus*. Sustrato-SDS-PAGE del EES de (B) *P. californiensis*, (C) *P. monodon*, (D) *P. stylirostris*, (E) *P. vannamei*, (F) *Pacifastacus leniusculus*.



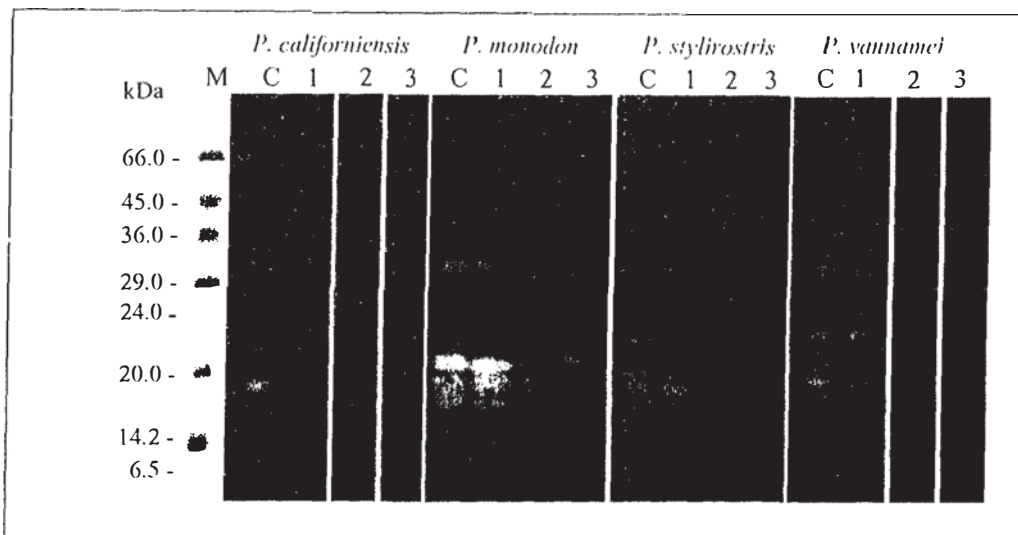


Figura 15: (M) marcadores de masa molecular. Sustrato-SDS-PAGE de los EES de penéidos. (C), control; 1, EDTA; 2, PMSF; 3, TLCK. Los controles no fueron incubados con los inhibidores.

Tabla 3: Identificación de los IPs a través de inhibidor-sustrato-SDS-PAGE

	Masa molecular (kDa)	Desnaturalización de las proteínas del EES
<i>P. californiensis</i>	6	Tratamiento ácido
	19	Tratamiento ácido
<i>P. monodon</i>	6	Tratamiento ácido
	10	Tratamiento térmico
	13	Tratamiento térmico
	20	Tratamiento ácido
	29	Tratamiento térmico
<i>P. stylirostris</i>	60	Tratamiento térmico
	6	Tratamiento ácido
	10	Tratamiento térmico
	14	Tratamiento térmico
	19	Tratamiento ácido
	28	Tratamiento térmico
<i>P. vannamei</i>	75	Tratamiento térmico
	6	Tratamiento ácido
	12	Tratamiento térmico
	20	Tratamiento ácido
	27	Tratamiento térmico
<i>P. leniusculus</i>	75	Tratamiento térmico
	9	Tratamiento térmico
	15	Tratamiento térmico
	20	Tratamiento térmico
	43	Tratamiento térmico
	60	Tratamiento térmico

Tabla 4: Masas moléculares de los IPs purificados

	No-reducción	Reducción
<i>P. monodon</i>	20 kDa	37 kDa 32 kDa 19 kDa 17 kDa
<i>P. vannamei</i>	20 kDa	38 kDa 29 kDa 24 kDa 13 kDa
<i>P. leniusculus</i>	20 kDa	27 kDa 29 kDa

Tabla 5: Tasas de inhibición (%) cuando enzimas comerciales fueron incubadas con los IPs purificados.

	IPs		
	<i>P. monodon</i>	<i>P. vannamei</i>	<i>P. leniusculus</i>
Bovine trypsin	62%	53%	64%
Bovine Chymotrypsin	51%	42%	45%
Subtilisin	47%	44%	42%

En la literatura existen algunas evidencias de que las isoenzimas pueden tener reguladas sus secreciones de diferentes formas. De forma general, en mamíferos, la secreción de enzimas proteolíticas pancreáticas, es influenciada por la concentración y composición de proteínas en los alimentos (Corring et al., 1989). Cuando los organismos son alimentados con proteínas de baja calidad, ocurre una estimulación para la secreción de más proteasas digestivas. Este fenómeno es conocido como compensación y es observado en peneidos (Le Moullac et al., 1996; Lemos and Rodríguez. 1998), insectos (Brodway. 1995), peces (de Albuquerque-Cavalcanti, 1998), y mamíferos (Carreira et al., 1996; Graf et al., 2000) y camarones (Muhlia-Almazan et al., 2000). En larvas de insectos tales como: *Agrotis ipsilon* y *Helicoverpa zea*, la ingestión de inhibidor de tripsina de la soya, ocasiona la inducción de la transcripción de algunas tripsinas del hepatopáncreas. Estas enzimas estimuladas no son inhibidas por los IPs. En ratas fue encontrada la modulación de la media vida de los ARNm de las isoformas de tripsina y dos formas de inhibidores de tripsina (PSTI, Tabla 6). En mamíferos se comprobó la importancia del control de la traducción de los ARNm de las enzimas pancreáticas (Schick et al., 1984).

Tabla 6: Influencia de la composición del alimento en la estabilidad de los ARNm de tripsinas y PSTIs pancreáticos (Carreira et al., 1996).

	Alta concentración de proteína	Alimento sin proteína
Tripsina catiónica	No afectada	No afectada
Tripsina Aniónica I	Aumentó	Aumentó
Tripsina Aniónica II	No afectada	Aumentó
PSTI-I	Disminuyó	Aumentó
PSTI-II	Aumentó	Disminuyó

Una duda surge de estos resultados: ¿por qué existen genes múltiples de tripsina?. En ratas existen 10 genes (Craik et al., 1984), cuatro en *Drosophila melanogaster* (Davies et al. 1985) y

nueve en pollo (Wang et al., 1995). En crustáceos también se encontraron los mismos resultados. En *Penaeus vannamei* existen por lo menos dos familias de genes de tripsina en el hepatopáncreas (Klein et al., 1996), pero no se sabe si los productos de esta transcripción poseen mecanismos reguladores.

Las tripsinas purificadas del hepatopáncreas de peneidos demostraron, *in vitro*, actividad catalíticas superiores cuando fueron comparadas con las isoformas de mamíferos (Lu et al., 1990). Hasta hoy no existen estudios sobre la estructura tridimensional de las tripsinas de peneidos; en peces esta cuestión fue solucionada por medio del análisis usando rayos X. Leiros et al., (2000), encontró que en estos organismos las tripsinas pancreáticas poseen una sustitución de aminoácidos adyacentes al sitio activo. Estos cambios promueven interacciones del tipo Van der Waals, que son débiles, lo que causa mayor flexibilidad en esta región de la molécula, lo que podría causar mayor eficiencia catalítica, pero también menor estabilidad a pH y temperatura. Ya que el hepatopáncreas de organismos mesosfílicos se secretan proteasas con mayor eficiencia catalítica, cuando son comparadas con las de mamíferos, es también esperado que existan mecanismos reguladores más eficientes para estas enzimas. Si esta especulación es verdadera, los IPs deben ser secretados en mayores cantidades o poseer mayor capacidad de inhibir proteasas, comparados con sus homólogos en mamíferos.

Ya fueron encontrados inhibidores de proteasas en invertebrados, como insectos *Rhodnius prolixus* (Friedrich et al., 1993), sanguijuela *Bdellins* (Fink et al., 1986), anémona marina *Actinia equina* (Tschesche et al., 1987), protocordado *Ciona intestinales* (Ødum et al., 1999), y calamar *Todarodes pacificus* (Kishimura et al., 2001). Estos resultados indican que los IPs son moléculas antiguas. En crustáceos algunos IPs ya fueron purificados. Johansson et al., (1994) y Liang et al., (1997) encontraron IPs en células sanguíneas y plasma de acocil *Pacifastacus leniusculus*.

Hasta hoy, la mayoría de los resultados sobre IPs en crustáceos están basados en el sistema inmune. En estos organismos, algunas serín proteasas están relacionadas con la activación de la cascada de la profenoloxidasas, lo que culmina con la melanización de los invasores (Söderhäll et al., 1996). En este proceso, los IPs son cruciales para la regulación de esta cascada. En la librería de ADNc de hemocitos de *Penaeus setiferus* fueron identificados dos IPs. El primero es homólogo a los del tipo Kazal encontrado por Johansson et al., (1994), en acocil. El segundo es homólogo a un inhibidor de proteasa del leucocito. En la librería de ADNc de hemocitos de *P. vannamei*, fueron identificados IPs perteneciendo a las familias de los tipos Kunitz y Serpin (Gross et al., 2001).

La clasificación de los IPs está basada en la distribución y número de puentes disulfuro, así como la posición del sitio reactivo (Laskowski and Kato, 1980). Los inhibidores son proteínas paradójicas, ya que forman complejos estables con las proteasas. Para comprender como ocurre esta asociación estable, es necesario comprender la estructura tridimensional de estos complejos. Tomándose como ejemplo de IP al BPTI, el cual fue estudiado extensivamente como modelo de interacción proteína-proteína. La principal área de contacto del inhibidor está constituida por un epítipo, lo cual se alarga desde P<sub>3</sub> hasta P<sub>3</sub>'. Este epítipo funciona como mecanismo de reconocimiento por su región central altamente expuesta P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>', llamada sitio reactivo. Gran parte de los contactos entre inhibidores-enzimas son debido al residuo P<sub>1</sub> (hasta 50%). Todavía, los aminoácidos alrededor del sitio reactivo pueden contribuir para la energía de asociación. El enlace peptídico del inhibidor puede hasta ser hidrolizado, pero la fuerza de interacción entre inhibidor-proteasa es mayor y mantiene este complejo estable (Krowarsch et al., 1999).

Existe una gran variedad del residuo P<sub>1</sub>, lo que ocasiona un amplio espectro de proteasas susceptibles a la inhibición. Esta variación fue una ventaja adquirida en el proceso evolutivo, donde moléculas originadas de un único ancestro pueden inhibir una variedad de proteasas, que normalmente pertenecen a una sola clase de mecanismo proteólisis.

Existen algunas evidencias de nuevos roles fisiológicos de los IPs. Algunos PSTIs fueron purificados en el páncreas de mamíferos (Matsuda et al., 1995; Iway et al., 1986), por ejemplo, en ratas se encontró estos inhibidores en el duodeno (Bohe et al., 1995) e hígado, como una proteína característica en pacientes en fase aguda de pancreatitis (Uda, 1994). Además de su capacidad de

inhibición, estos peptidos purificados (6-6.5 kDa), poseen un role importante en la secreción de la CCK. Este péptido se asemeja a los inhibidores de tipo Kazal (PSTIs; Iway et al., 1986 y Fukuoka et al., 1986). Este hallazgo sugiere que tanto los genes de PSTI-I y II provienen de un mismo gen. En mamíferos la duplicación de este gen ocurrió recientemente (Horii et al., 1989).

La actual nomenclatura para algunas moléculas, involucradas en la modulación de la secreción pancreática, puede generar dudas. Por ejemplo, los IPs PSTI de tipo Kazal. Fueron encontradas dos moléculas clasificadas primero como PSTI-I y PSTI-II. El primer reporte fue en humanos, sorprendentemente el PSTI-I fue relacionado con el péptido monitor (MP), un peptido sensible a la tripsina y que libera CCK (Mc Vey et al., 1999). Actualmente es conocido que el MP es estructuralmente el mismo peptido PSTI-I o también PSTI-61 (Uda et al., 1994). Hasta hoy no se ha determinado una terminología estándar para esta molécula, lo que causa incertidumbre en los investigadores.

Existen algunos indicios de que PSTI-I también está involucrado en otros procesos, además de la secreción pancreática. Este peptido y su ARNm no fueron detectados en hígados sanos, pero si después de la inducción a inflamación. Los sitios de reconocimiento para el PSTI-I en el hígado, presentan alta afinidad por esta molécula debido a su baja concentración en la sangre. Por el contrario, en intestino, la afinidad por esta molécula es menor debido a la alta concentración de PSTI-I en el jugo pancreático. (Uda et al., 1994). En la tabla 7 se enumeran algunos IPs con roles diferentes al de inhibición.

Existe una miríada de campos donde los IPs pueden ser empleados. Por ejemplo, el ovomucoide de pato tiene propiedades farmacológicas y se está estudiando para tratamientos terapéuticos contra la pancreatitis (Valueva et al., 1992). La aprotinina es ampliamente utilizada en cirugías de corazón abierto, donde este IP evita hemorragias, reduciendo así, la necesidad de transfusiones. La equistatina, de anémona marina, es un IP peculiar, que inhibe tanto papaína como también catepsina D, las cuales pertenecen a diferentes clases de proteasas. Este IP es tóxico para insectos que usan cisteínproteasas en sus sistemas digestivos, lo que constituye un control potencial de plagas (Rogelj et al., 2000).

Tabla 7: Lista de algunos inhibidores de proteasas con funciones diversas\*

Inhibidor	Otra función
STI	Interacción con bacterioides e involucrado en nódulos de senescencia
Albúmina del <i>winged bean</i> (WBA-1)	Proteína de reserva
BPTI	BPTI y sus fragmentos 1-15, 18-39 y 40-58 poseen actividad bactericida,  Inhibe cisteínproteasa del adenovirus,  Inhibe canales de Ca <sup>++</sup> y K <sup>+</sup>
Inhibidor proteico del precursor amilóide	Funciona como receptor neural
Dentrotóxina	Bloquea algunos canales de K <sup>+</sup> e incrementa la liberación de neurotransmisores
Folistatina	Modulador de la acción de varios miembros del factor de crecimiento del tipo B
PSTI-II	Liberación de CCK
Rondina	El segundo dominio se conecta al sitio de reconocimiento del fibrinógeno en la trombina
Pacifastina	La cadena pesada está relacionada estructural y funcionalmente a las transferrinas

\*Modificado de <http://www.chem.purdue.edu/LASKOWSKI> (2001)

Por los resultados encontrados se sugiere la importancia de los IPs en el mantenimiento de la homeostasis en decápodos. Pero aún quedan muchas preguntas sin contestar: ¿cómo la digestión de proteínas es regulada en crustáceos?, ¿cuáles son los roles de los inhibidores de proteasas? y ¿a qué nivel ocurre su regulación?



## CONCLUSIONES

- En todas las especies de peneidos estudiados fueron encontrados por lo menos dos IPs.
- En *P. californiensis* y *P. vannamei* es sugerido que la presión evolutiva puede haber causado diferentes repertorios de IPs para quimotripsina, ya que las tasas de inhibición contra quimotripsina endógena, fueron estadísticamente diferentes para los otros peneidos estudiados ( $P < 0.05$ ).
- Las moléculas purificadas poseen subunidades ó pueden comportarse linealmente, ya que en condiciones de reducción, fueron encontradas más de una banda en SDS-PAGE y la masa molecular aumentó.
- Entre *P. monodon*, *P. vannamei* y *P. leniusculus* existe un IP, de 20 kDa, lo cual mostró afinidad por la tripsina bovina.
- Así como para otros organismos, IPs desempeñan un rol en la regulación de proteasas digestivas en peneidos y *P. leniusculus*.
- El conocimiento de cómo los IPs interactúan con las proteasas y como las proteasas son reguladas, soportará varias áreas del campo biotecnológico.

## Literatura Citada

- de Albuquerque-Cavalcanti, C. (1998) Proteases digestivas em juvenis de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, PISCES: CHARACIDAE) e aplicação da técnica de digestibilidade in vitro. Tesis de Maestria. UFSC. Florianópolis. Brasil.
- de Albuquerque-Cavalcanti, C., García-Carreño, F.L. y Navarrete del Toro, M.A. (2002). Trypsin and Trypsin Inhibitors from Penacid Shrimp. *Journal of Food Biochemistry*. In press.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G. y Lawrence, A.L. (1992) Penaeid shrimp nutrition. In: *Marine shrimp culture: Principles and practices*. Elsevier. Amsterdam. p. 535-568.
- Bode, W., and Huber, R. (2000) Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 241-252.
- Bohe, H., Bohe, M., Lindström, C. y Ohlsson, K. (1995) Pancreatic secretory trypsin inhibitor in human Brunner's gland. *J. Gastroenterol.* 30:90-95.
- Bozkurt, T. y Haberich, F.J. (1985) Physiological studies of exocrine pancreas secretion in conscious rats. 7th communication: short-term kinetics of adaptation of digestive enzymes to different nutritional stimuli. *Z Gastroenterol* 23: 257-266.
- Bragado, M.G., Tashiro M y Williams JA. (2000) Regulation of the initiation of pancreatic digestive enzyme protein synthesis by cholecystokinin in rat pancreas in vivo. *Gastroenterology*. 2000 Dec;119(6):1731-9.
- Broadway, R.M. (1995) Are insects resistant to plant proteinase inhibition? *Journal of Insect Physiology* 41(2): 107-116.
- Carrera, S., Fueri, C., Chaix, J. y Puigserver, A. (1996) Feedary modulation of mRNA stability of trypsin isozymes and two forms of secretory trypsin inhibitor in the rat pancreas. *European Journal of Biochemistry* 239: 117-123.
- Ceccaldi, H. J. (1989) Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. AQUACOP IFREMER. *Actes de Colloque* 9: 243-259.
- Christie, A.E., Baldwin, D.H., Turrigiano, G., Graubard, K. y Marder, E. (1995) Immunocytochemical localization of multiple cholecystokinin-like peptides in the stomatogastric nervous system of the crab *Cancer borealis*. *J Exp Biol* 198: 263-271.
- Cordova-Murueta, J.H. y García-Carreño, F.L. (2001) Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture*. In Press
- Corring, T., Juste, C. y Lhoste, E.F. (1989) Nutritional regulation of pancreatic and biliary secretion. *Nutri Research Rev* 2: 161-180.
- Craik, C.S., Choo, Q.L., Swift, G.H., Quinto, C., MacDonald, R.J. y Rutter, W.J. (1984) Structure of two related rat pancreatic trypsin genes. *J Biological Chem* 259: 14255-14264.
- Czapinska, H. y Otlewski, J. (1999) Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases. *Eur J Biochem*. 1999 Mar;260(3):571-95.
- Dall, W., Hill, P.C., Rothlisberg, G. y Sharples, D.J. (1990) *Advances in Marine Biology – The Biology of Penaeidae*. v. 27. Academic Press – London.
- Davies, C. A., Riddeil, D.C., Higgins, M.J., Holden, J.J.A. y White, B.N. (1985) A gene family in *Drosophila melanogaster* coding for trypsin like enzymes. *Nucleic Acids Research* 13: 6605-6619.
- Dixon, M. y Webb, E. *Enzymes*. Academic Press. New York. 1979.
- Favrel, P., Van Wormhoudt, A., Studler, J.M. y Bellon, C. (1987) Immunochemical and biochemical characterization of gastrin/cholecystokinin-like peptides in *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda): intermolt variations.
- Fersht, A. (1999) Structure and mechanism in protein science – a guide to enzyme catalysis and protein folding. W. H. Freeman and Company. New York. 105-109.

- Fink, E., Rehm, H., Gippner, C., Bode, W., Eulitz, M., Machleidt, W. y Fritz, H. (1986) The primary structure of BdeLLin B-3 from the Leech *Hirudo medicinalis*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367: 1235-1242.
- Friedrich, T., Kröger, B., Bialojan, S., Lemaire, H.G., Höfken, H.W., Reuschenbach, P., Otte, M. y Dodt, J. (1993) A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* 268: 16216-16222.
- Fukuoka, S., Kawajiri, H., Fushiki, T., Takahashi, K. y Iway, 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.
- Galgani, F. y Nagayama, F. (1988) Digestive proteolysis and digestive proteinases in deep sea crabs *Geryon affinis* and *Chionocetes japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 983-987.
- García-Carreño, F.L. y Haard, N.F. (1993) Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food and Biochemistry* 17: 97-113.
- García-Carreño, F.L., Hernández-Cortés, M.P. y Haard, N.F. (1994) Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and marine decapod. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42: 1456-1461.
- García-Carreño, F.L. y Navarrete del Toro, M. (1997) Classification of proteases without tears. *Biochemistry Education* 25(3): 161-167.
- García-Carreño, F.L., Carrillo, O. y Navarrete, M.A. (1998) Control of digestive functions in shrimp. I. An Inhibitor of trypsin activity in the hepatopancreas In: Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress. Amsterdam. p. 1-8.
- Giorgi, D., Renaud, W., Bernard, P. y Dagorn, J. (1985) Regulation of proteolytic enzyme activities and mRNA concentrations in rat pancreas by food content. *Biochem Biophys Research Commun* 127-3: 937-942.
- Graf, R., Valeri, F., Gassmann, R., Hailemariam, S., Frick, T.W. y Bimmler, D. (2000) Adaptive response of the rat pancreas to dietary substrates: parallel regulation of trypsinogen and pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Pancreas* 21(2):181-190.
- Gross, P.S., Bartlett T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W. y Warr, G.W. (2001) Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev Comp Immunol.* 2001 Sep;25(7):565-77.
- Hernández-Cortés, M.P. (1997) Crustacean proteases characterization, biochemical and molecular considerations. Tesis de doctorado. CIBNOR. La Paz. México.
- Hernández-Cortés, M.P. y Seiffert, W.Q. (1998) Rate of ingestion and proteolytic activity in digestive system of juvenile shrimp, *Penaeus vannamei*, during continual feeding. *Journal of Applied Aquaculture* 1(9) 35-45.
- Herzig, K.H., Louie, D.S. y Owyang, C. (1994) Somatostatin inhibits CCK release by inhibiting secretion and action of CCK-releasing peptide. *Am J Physiol* 266:G1156-G1161.
- Horii, A., Tomita, N., Yokouchi, H., Doi, S., Uda, K., Ogawa, M., Mori, T. y Matsubara, K. (1989) On the cDNA's for two types of rat pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 14;162(1):151-9.
- Häll, L. y Söderhäll, K. (1982) Purification and properties of a protease inhibitor from crayfish hemolymph. *Journal of Invertebrates Pathology* 39: 29-37.
- Iway, K., Fukuoka, S., Fushiki, T., Tsujikawa, M., Hirose, M., Tsunasawa, S. y Sakiyama, F. (1986) Purification and sequencing of a trypsin-sensitive cholecystokinin-releasing peptide from rat pancreatic juice. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 8956-8959
- Johansson, M.W., Keyser, P. y Söderhäll, K. (1994) Purification and cDNA cloning of a four-domain Kazal proteinase inhibitor from crayfish blood cells. *European Journal of Biochemistry* 223: 389-394.

- Kishimura, H., Saeki, H. y Hayashi, K. (2001) Isolation and characteristics of trypsin inhibitor from the hepatopancreas of a squid (*Todarodes pacificus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2001 Aug;130(1):117-23.
- Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D. y Van Wormhoudt, D. (1996) Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 551-563.
- Krowarsch, D., Dadlez, M., Buczec, O., Krokoszynska, I., Smalas, A., O. y Otlewski, J. (1999) Interscaffolding additivity: binding of P<sub>1</sub> variants of bovine pancreatic trypsin inhibitor to four serine proteases. *Journal of Molecular Biology* 289: 175-186.
- Kurokawa, T. y Suzyki, T. (1996) Formation of diffuse pancreas and the development of digestive enzymes synthesis in larvae of japanease flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 141: 267-276.
- Larson, B.A. y Vigna, S.R. (1983) Gastrin/cholecystokinin-like immunoreactive peptides in the Dungeness crab, *Cancer magister* (Dana): immunochemical and biological characterization. *Regul Pept* 7(2):155-70.
- Laskowski, M. y Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review in Biochemistry* 49: 593-626.
- Laskowski, M. J. y Qasim, M.A. (2000) What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 324-337.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. (1993). *Principles of biochemistry*. 2<sup>nd</sup> edition. Worth Publishers – New York.
- Leiros, H.K.S., Willassen, N.P. y Smalås, A.O. (2000) Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. Elucidating the molecular basis of cold-adaptation. *Eur. J. Biochemistry* 267: 1039-1049.
- Lemos, D. y Rodríguez, A. (1998) Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development. *Aquaculture* 160: 103-116.
- Lemos, D., Hernández-Cortés, M.P., Navarrete, M.A., García-Carreño, F.L. y Phan, V.N. (1999) Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larval and postlarval pink shrimp *Penaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Marine Biology* 135:653-662.
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D. y Van Wormhoudt A. (1996). Adaptation of trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amylase to casein level of protein source in *Penmaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *J Exp Mar Biol Ecol* 208: 107-125.
- Le Vay, L., Jones, D. A., Pucllo-Cruz, A.C., Sangha, R. S. y Ngamphonsai, C. (2001) Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 128: 623-630.
- Lhoste, E. F., Fiszlewicz, M, Gueugneau-Tranchant, T. y Corring, T. (1994) Early adaptation of pancreas to protein-enriched feed: role of cholecistokinin and gastrin-releasing peptide.
- Liang, Z., Sottrup-Jensen, L., Aspán, A., Hall, M. y Söderhäll, K. (1997) Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing an unique transferrin chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6682-6687.
- Lovett, D. y Felder D. (1990) Ontogenetic change in the digestive enzyme activity of larval and post larval white shrimp *Penaeus setiferus*. *Biol. Bull.*, 178: 144-159.
- Lu, P. J., Liu, H.C. y Tsai, I.H. (1990) The midgut trypsins of shrimp (*Penaeus monodom*). High efficiency toward native protein substrates including collagens. *Biol Chem Hoppe Seyler* 371(9): 851-859.
- Lu, S.M., Lu, W., Qasin, M.A., Anderson, S., Apostol, I., Ardelt, W., Bigler, T., Chiang, Y.W., Cook, J., James, M., N., G., Kato, I., Kelly, C., Kohr, W., Komiyama, T., Lin, T., Ogawa, M., Otlewski, J., Park, S., Qasin, S., Ranjbar, M., Tashiro, M., Warne, N., Whatley, H., Wieczorek, A., Wieczorek, M., Wilusz, T., Wynn, R., Zhang, W. y Laskowski Jr., M. (2001) Predicting the



- reactivity of proteins from their sequence alone: Kazal family of protein inhibitors of serine proteases. *PNAS* (98) 4: 1410-1415.
- Matsuda, K., Ogawa, M., Murata, A., Kitahara, T. y Kosaki, G. (1995) Pancreatic secreted inhibitors in rat. *American Journal of Gastroenterology* 80: 694-698.
- Mc Vey, D.C., Romac, J.M.J., Clay, W.C., Kost, T.A., Liddle, R.A. y Vigna, S.R. (1999) Monitor peptide binding sites are expressed in the rat liver and small intestine. *Peptides* 20(4):457-464.
- Muhlia-Almazan. A.T., García-Carreño. F.L., Navarrete del Toro. M.A. y Hernández-Cortés. M.P. (2000) Is there enzymatic compensation in the digestive system of penaeid shrimp? In: Pacific Fisheries Technologist. 52th Annual Meeting. Ketchikan. Alaska. USA. pp 2.
- Neurath, H. (1989) Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem Sci* 14(7):268-271.
- Owyang, C. (1994) Negative Feedback control of exocrine pancreatic secretion: role of cholecystokinin and cholinergic pathway. *Symposium New Research in the Physiology of Cholecystokinin, Nutritional Issues* 1321-1326.
- Palmer, T. (1995) *Understanding enzymes*. Prentice Hall-Ellis Horwood. London.
- Pérez, A., Zambonino-Infante, J.L. y Cahu, C. (1998) Feedary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 19: 145-152.
- Rogelj, B., Strukelj, B., Bosch, D. y Jongsma, M.A. (2000) Expression, purification, and characterization of equitatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 19(3): 329-34.
- Sarfati, P. y Morisset, J. (1989) Regulation of pancreatic enzyme secretion in conscious rats by intraluminal somatostatin: mechanism of action. *Endocrinology* 124:2406-2414.
- Scheving, L. A. (2000) Biological clocks and the digestive system. *Gastroenterology* 119: 536-549.
- Schick, J., Verspohl, R., Kern, H. y Scheele, G. (1984). Two distinct adaptative responses in the synthesis of exocrine pancreatic enzymes to inverse changes in protein and carbohydrate in the diet. *Am J Physiol* 247: G611-616.
- Scopes, R.K. (1994) *Protein purification*. Springer. New York. 380 pp.
- Sellos, D. and, Van Wormhoudt. A. (1992) Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vanameii* (Crustacea, Decapoda). *FEBS Lett* 11449: 219-224.
- Sudaryono, A., Hoxcy, M.J., Kailis, S.G. y Evans. L.II. (1995) Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenil shrimp. *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 134: 313-323.
- Söderhäll, K., Iwanaga, S. y Vasta, G. (1996) *New directions in invertebrate immunology*. Fair Haven, NJ: SOS Publications. p. 229-53.
- Tsai, I., Chuang, K. y Chuang, J. (1986) Chymotrypsins in digestive tracts of crustaceans decapods (shrimps). *Comparative Biochemistry and Physiology* 85B: 235-239.
- Tschesche, H., Kolkenbrock, H. y Bode. W. (1987) The covalent structure of the elastase inhibitor for *Anemonia sulcata* – a ‘non-classical’ Kazal-type protein. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368. 1297-1304.
- Tsuzuki, S., Iushiki, T., Kondo, A., A., Murayama, A. y Sugimoto, A. (1991). Effect of a high-protein feed on the gene expression of a trypsin-sensitive, cholecistokinin-releasing peptide (monitor peptide) in the pancreas. *Eur J Biochem* 199: 245-252.
- Turrigiano, G.G., Van Wormhoudt, A., Ogden, L. y Selverston, A.I. (1994) Partial purification, tissue distribution and modulatory activity of a crustaccan cholecystokinin-like peptide. *J Exp Biol* 187:181-200.
- Uda. K., Murata. A., Nishijima. J., Doi. S., Tomita. N., Ogawa. M. y Mori. T. (1994) Elevation of circulating monitor peptide/pancreatic secretory trypsin inhibitor-I (PSTI-61) after turpentine-induced inflammation in rats: hepatocytes produce it as an acute phase reactant. *J. Surg. Res.* Nov-57(5): 563-568.

- Valueva, T.A., Matveen, N.L., Mosolov, V.V. y Penin V.A. (1992) Protein proteinase inhibitor in experimental pancreatitis: pharmacological characterization of the inhibitor. *Agents Actions Supplement* 38(2): 203-210.
- Uvnäs-Wallensten, K. (1977). The occurrence of gastrin in gastric juice. Antral secretion and antral perfusates of anesthetized cats. *Gastroenterology* 73: 487-491.
- Wang, K., Gan, L., Lee, I. y Hood, L. (1995) Isolation and characterization of the chicken trypsinogen gene family. *Biochem J* 307: 471-479, 1995.
- Whitaker, J.R. (1994) *Principles of Enzymology for the Food Science*. Marcel Dekker. Inc., New York. p 1-27.
- Ødum, L., Bundgaard, J., R. y Johnsen. A. J. (1999) A Kazal-type trypsin inhibitor from the protochordate *Ciona intestinalis*. *Eur. J. Biochem.* 259: 872-876.