



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**PROTEINASAS DIGESTIVAS PRESENTES
EN BRAQUIUROS**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

P r e s e n t a

Lourdes Mariana Díaz Tenorio

La Paz, B.C.S., México, Agosto del 2002

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 15 del Mes de Agosto del 2002, 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:

" PROTEINASAS DIGESTIVAS PRESENTES EN BRAQUIUROS "


Presentada por el alumno:

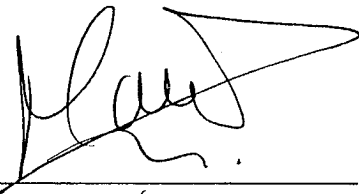
Lourdes Mariana Díaz Tenorio

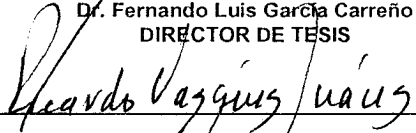
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

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

LA COMISION REVISORA


Dr. Fernando Luis García Carreño
DIRECTOR DE TESIS


Dr. Manuel Díaz López
CO-TUTOR


Dr. Ricardo Vázquez Juárez
CO-TUTOR


Dr. Julio Humberto Córdova Murueta
CO-TUTOR


DRA. THELMA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

El entorno marino posee una gran diversidad de especies animales, en este entorno se presentan diferentes hábitats, como resultado tenemos una gran variedad de proteasas adaptadas a las condiciones de diferentes ambiente. Estas proteasas presentan características especiales, las cuales pueden ser aprovechadas en un sinfín de procesos industriales que involucren alguna transformación proteolítica, incluso, éstas pueden servirnos para estudios de adaptación, digestibilidad, taxonomía, entre otros. El presente trabajo tiene por objetivo el de caracterizar y comparar las proteinasas presentes en el jugo gástrico de los braquiuros *Callinectes bellicosus* y *C. arcuatus*. Dicho conjunto de proteinasas son biosintetizadas por la glándula digestiva y vaciadas en la cámara digestiva; éstas enzimas mostraron una actividad proteolítica máxima en un rango de pH de 6.0-8.0 a 55 °C, dentro de estas proteinasas encontramos algunas con actividad tríptica y quimotríptica. Se encontraron diferencias cualitativas y cuantitativas entre las proteinasas de cada especie. La viabilidad de la extracción del jugo gástrico, nos permite seguir en un sólo organismo los resultados experimentales; el hecho de que en algún momento de su vida el ciclo de muda se interrumpe, hace de estos organismos un posible modelo para describir el fenómeno de la digestión en decápodos.

Palabras clave: serin proteinasas, *Callinectes*, jugo gástrico.



Vo. Bo.

Dr. Fernando Luis García Carreño

ABSTRACT

Greatly diverse animals occupy marine habitats, and each has proteinases adapted to the environments. These proteinases could be used for proteolytic modification in industrial processes or in research on adaptation, digestibility, or taxonomy. We characterized and compared gastric juice proteinases from the crabs *Callinectes bellicosus* and *C. arcuatus* in this work. The enzymes showed maximum proteolytic activity around 55°C, with pH in the range 6.0-8.0. Fifty percent of the proteinases had serin proteinase activity, mainly due to trypsin and chymotrypsin. Proteinase patterns varied depending on species, but not on gender. In contrast, we found differences in protein and proteinase concentrations for each species.

Key words: serin proteinases, *Callinectes*, gastric juice.

DEDICATORIA

A mis padres: Ana Laura, Isaías

A mi hermana: Ana Celia

A mis abuelos: Cruz y Jorge

A mi pareja: Luis Alonso

A mis padres en ciencia: Fernando y Ann

Subimos un escalón más... ¡y los que faltan!

AGRADECIMIENTOS

Esto no hubiera sido posible sin la participación de las siguientes personas e instituciones:

- Mis padres por la confianza depositada en mí para lograr este proyecto, pero sobretodo por siempre estar ahí cuando los necesito.
- Luis Alonso Leyva Soto por tu apoyo incondicional a lo largo de estos dos años, sin tí esto hubiera sido más complicado.
- Fernando García Carreño porque creíste en mí, y por tu ayuda para que llegue a ser una investigadora de éxito.
- Ann porque supiste guiarme con paciencia, amor y comprensión. En serio que me ayudaste a sobrevivir en el laboratorio 😊.
- Patricia Hernández Cortés por la guía al principio de los estudios de Maestría, pero sobretodo por tu gran ayuda y amistad a lo largo de estos años.
- Dres. Manuel Díaz, Ricardo Vázquez y Julio Córdova por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo de investigación.
- CIBNOR por darme las facilidades para estudiar la Maestría.
- CONACyT por su valioso apoyo económico de dos años con la beca-crédito 158425 y además por el financiamiento de los proyectos J33750-N y 28257 otorgados a Dra. Patricia Hernández y Dr. Fernando García.
- Mis amigos del Laboratorio de Bioquímica:, Adriana, Arturo, Julio Humberto, Julio Antonio, por sus enseñanzas, amistad y paciencia.

- Cristiane de Albuquerque por darme un rayo de esperanza en este trabajo.
- B. Cynthia Aldana por el cuidado que le dio a los organismos.
- Kitty Arredondo por todo lo que me ayudaste durante esta aventura.
- Chicos ITSON: Hugo Palafox y Arturo Monterrosa (ST) que me auxiliaron en esta misión casi imposible.

¡ MUCHAS GRACIAS A TODOS!

MARIANA

CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
CONTENIDO.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
Biología y ecología de los braquiuros.....	1
Proceso digestivo.....	3
Proteasas.....	5
Proteasas en la industria.....	7
ANTECEDENTES.....	10
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Organismos.....	14
Toma y manejo de muestra.....	14
Selección de los organismos a estudiar.....	15
Cuantificación de proteína soluble.....	15
Cuantificación de la actividad de proteinasas totales.....	16
Obtención de valores óptimos de pH y temperatura.....	16
Caracterización de las proteinasas.....	16
Estadística.....	18
RESULTADOS.....	19
Sobrevivencia y comportamiento de los organismos en el laboratorio.....	19
Proteínas y proteinasas presentes en el contenido de la cámara cardiaca, tejido del hepatopáncreas y del estómago.....	19
Diferencias entre género y especie en la concentración de proteína, actividad enzimática de proteinasas digestivas del jugo gástrico.....	20
pH óptimo de las proteinasas presentes en el jugo gástrico de cangrejos del género <i>Callinectes</i> sp.....	23
pH óptimo de las proteinasas presentes en el jugo gástrico de cangrejos del género <i>Callinectes</i> sp.....	24

Temperatura óptima de las proteinasas presentes en el jugo gástrico de cangrejos del género <i>Callinectes</i> sp.	24
Caracterización de proteinasas presentes en el jugo gástrico de <i>C. bellicosus</i> y <i>C. arcuatus</i> .	25
DISCUSIÓN	29
Sobrevivencia y comportamiento de los organismos en el laboratorio.	29
Proteínas y proteinasas presentes en jugo gástrico, hepatopáncreas y estómago	30
Diferencias entre género y especie en la concentración de proteína, actividad enzimática de proteinasas digestivas del jugo gástrico.	31
pH óptimo de las proteinasas presentes en el jugo gástrico de cangrejos del género <i>Callinectes</i> sp.	31
Temperatura óptima de las proteinasas presentes en el jugo gástrico de cangrejos del género <i>Callinectes</i> sp.	33
Caracterización de proteinasas presentes en el jugo gástrico de <i>C. bellicosus</i> y <i>C. arcuatus</i>	33
CONCLUSIONES	35
REFERENCIAS	36
ANEXO 1	44
Gráficos resultantes del ANDEVA anidado para la proteína soluble y actividad total del jugo gástrico de <i>C. arcuatus</i> y <i>C. bellicosus</i> .	44
ANEXO 2	46
Gráficos resultantes de la actividad total del jugo gástrico de <i>C. arcuatus</i> y <i>C. bellicosus</i> en ambos géneros, a diferentes valores de pH y temperaturas.	46
ANEXO 3	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
BAPNA	Benzoil-Arg- <i>p</i> -nitroanilida
DMSO	Dimetil Sulfóxido
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos
<i>G</i>	Unidades de fuerza centrífuga relativa
Gly	Glicina
GRAS	Generalmente aceptado como seguro
Lys	Lisina
PAGE	Electroforesis en gel de poloacrilamida
Phe	Fenilalanina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Pro	Prolina
SAPNA	Succinil-(Ala) ₂ -Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilida
SBTI	Inhibidor de tripsina de soya
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Ser	Serina
Thr	Treonina
TLCK	Cetona de tosil-Lys-clorometilo
TPCK	Cetona de tosil-Phe-clorometilo
Tris	Tri-(hidroximetil)-aminometano
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía clásica de un cangrejo de la especie <i>Callinectes</i>	1
Figura 2. Espinas frontales en cangrejos del género <i>Callinectes</i> . a. <i>C. arcuatus</i> . b. <i>C. bellicosus</i>	2
Figura 3. Ciclo biológico del cangrejo (<i>Callinectes</i>)	2
Figura 4. Anatomía del aparato digestivo de un braquiuro	4
Figura 5. Modelo de los sitios de reconocimiento de tripsina, quimotripsina y elastasas	5
Figura 6. Proteínas en <i>C. bellicosus</i>	20
Figura 7. Proteínas en <i>C. arcuatus</i>	20
Figura 8. Proteinasas en <i>C. bellicosus</i>	21
Figura 9. Proteinasas en <i>C. arcuatus</i>	21
Figura 10. Cambio en el perfil de proteínas y proteinasas, del organismo 8 de <i>C.</i> <i>bellicosus</i> en postmuda.	22
Figura 11. Conservación en el tiempo del perfil de proteínas y proteasas en jugo gástrico de la especie <i>C. bellicosus</i>	23
Figura 12. Conservación en el tiempo del perfil de proteínas y proteasas en jugo gástrico de la especie <i>C. arcuatus</i>	23
Figura 13 Variación de la actividad total a diferentes valores de pH, usando azocaseína como sustrato. Proteasas presentes en el jugo gástrico de <i>Callinectes</i> sp.	24
Figura 14. Variación de la actividad proteolítica de las enzimas gástricas de <i>Callinectes</i> sp.	25
Figura 15. Inhibición de proteinasas presentes en el jugo gástrico de hembras de la especie <i>C. bellicosus</i>	27
Figura 16. Inhibición de proteinasas presentes en el jugo gástrico de machos de la especie <i>C. bellicosus</i>	27
Figura 17. Inhibición de proteinasas presentes en el jugo gástrico de hembras de la especie <i>C. arcuatus</i>	28

Figura 18. Inhibición de proteinasas presentes en el jugo gástrico de machos de la especie <i>C. arcuatus</i>	28
---	----

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Especificidad de algunas proteinasas	6
Tabla II. Características deseables en alimentos por la acción de las proteasas.....	8
Tabla III. Relación de proteasas con sus sustratos e inhibidores específicos.....	17
Tabla IV. Supervivencia de los organismos capturados	19
Tabla V. Concentración de proteína soluble y actividad proteolítica total en jugo gástrico	21
Tabla VI. Actividad total y específica en jugo gástrico de cangrejos <i>Callinectes</i> sp.	26
Tabla VII. Disminución de la actividad proteolítica por la presencia de inhibidores (% de inhibición)	26

INTRODUCCIÓN

Biología y ecología de los braquiuros

Los cangrejos verdaderos o braquiuros son un grupo de organismos que pertenecen a la clase Malacostraca, los rasgos principales de esta clase son: a) ojos compuestos sobre un tallo, b) 19 segmentos en el cuerpo (5 en la cabeza, 8 en el tórax y 6 en el abdomen, c) un par de anténulas, d) dos bránqueas, e) en hembras, los órganos reproductores están en el sexto segmento torácico y en machos en el octavo. La orden de los braquiuros es la Decapoda, palabra griega que significa 10 patas, en cangrejos verdaderos, estas estructuras se han modificado: el primer par de patas es un par de pinzas grandes, las cuales usa para cortar, o desgarrar su alimento o como defensa; además en algunos casos como en especies del género *Callinectes* sp., el último par de patas es

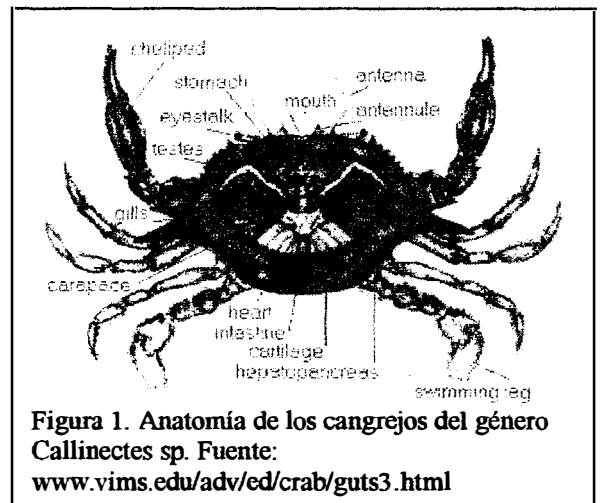


Figura 1. Anatomía de los cangrejos del género *Callinectes* sp. Fuente: www.vims.edu/adv/ed/crab/guts3.html

aplanado y ancho, esta modificación le permite al organismo nadar (figura 1) (Bliss, 1982). Los organismos de la Infraorden Braquiura se caracterizan por tener un abdomen reducido, aplanado y arqueado hacia la superficie ventral del cefalotórax (Haefner, 1985). La especie *Callinectes arcuatus* tiene espinas laterales muy largas y puntiagudas, el caparazón es muy convexo y ligeramente granuloso (especialmente en la región media), el tamaño en adultos va desde 100 a 170 mm, aunque es común encontrar individuos juveniles de 40 a 80 mm. *C. bellicosus* presenta una espina lateral más pequeña que *C. arcuatus*, (con relación al cuerpo), su caparazón es también convexo. Es frecuente confundir a estas dos especies, una manera de diferenciarlas es observando el par de espinas frontales, en *C. arcuatus* están marcadas y puntiagudas, en el caso de *C. bellicosus*, éstas son obsoletas y redondeadas (figura 2); otra característica para diferenciarlas son las patas (para caminar), en *C. arcuatus* son notablemente más largas y de un azul más intenso que en *C. bellicosus*.

Los hábitos no son exclusivamente nocturnos, por lo que se les puede encontrar en el día entre las macroalgas o inactivas en el fondo; en el Golfo de California se tiene una dominancia de la especie *C. bellicosus* sobre *C. arcuatus*. Respecto a la abundancia estacional, tenemos que su máximo valor se presenta en el verano.

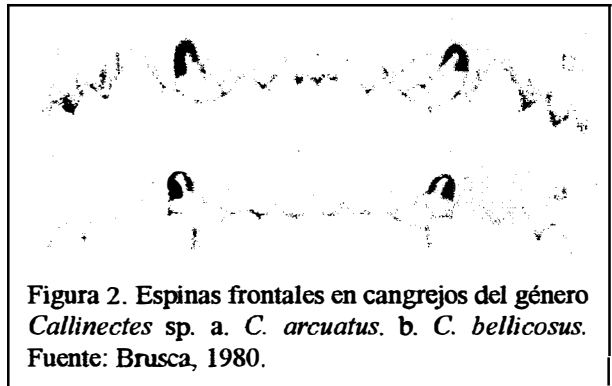


Figura 2. Espinas frontales en cangrejos del género *Callinectes* sp. a. *C. arcuatus*. b. *C. bellicosus*. Fuente: Brusca, 1980.

Los cangrejos del género *Callinectes* sp. se distribuyen en costas de climas templados tropicales, el suelo de estos ambientes es lodoso y arenoso, por ello es muy común localizarlos enterrados. Habitan en zonas de manglar, desembocaduras de ríos, estuarios y lagunas costeras, así como en la plataforma continental hasta los 40 m de profundidad. Se alimentan de moluscos, cangrejos y peces pequeños, por ello son considerados depredadores bentónicos e influyen en la estructura de la comunidad. En el Pacífico podemos encontrar tres especies de este género: *Callinectes arcuatus*, *C. bellicosus* y *C. toxotes*, la primera está distribuida desde el sur de California hasta el Golfo de Perú. La distribución de *C. bellicosus* va desde San Diego, California hasta Mazatlán, Sinaloa, ambas especies se localizan a lo largo del Golfo de California. *C. toxotes* se encuentra distribuida desde el sur del Golfo de California hasta Colombia (Brusca, 1980; Hernández-Moreno, 2000).

En cuanto al ciclo biológico de los braquiuros, tenemos que presentan 5 estadios: huevo, zoea, megalopa, juvenil y adulto (figura 3) Durante los

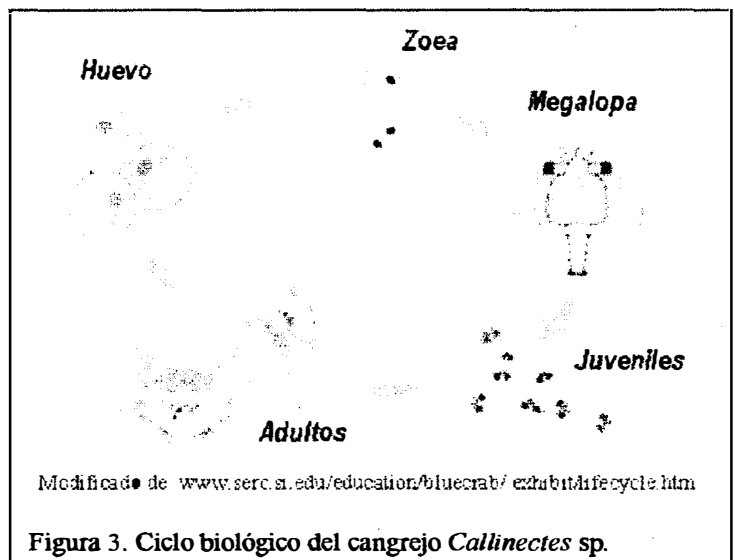


Figura 3. Ciclo biológico del cangrejo *Callinectes* sp.

tres primeros estadios, el organismo se encuentra en el océano y los dos últimos regularmente se localizan en lagunas costeras. Una vez que alcanza el estadio de adulto, el individuo está listo para aparearse, este se realiza entre machos y hembras maduras. Ya que la hembra está en el estadio de muda tardía, los machos se acercan a ellas en espera de la muda, durante la ecdisis los machos les ayudan a deshacerse del caparazón e inmediatamente juntan ambos abdómenes con el fin de aparearse, así permanecen durante tres días hasta que el caparazón de la hembra endurezca. Esta, además de ser una estrategia reproductiva es de protección ya que poco después de la muda, el organismo es vulnerable a cualquier ataque (Jivoff y Hines, 1998).

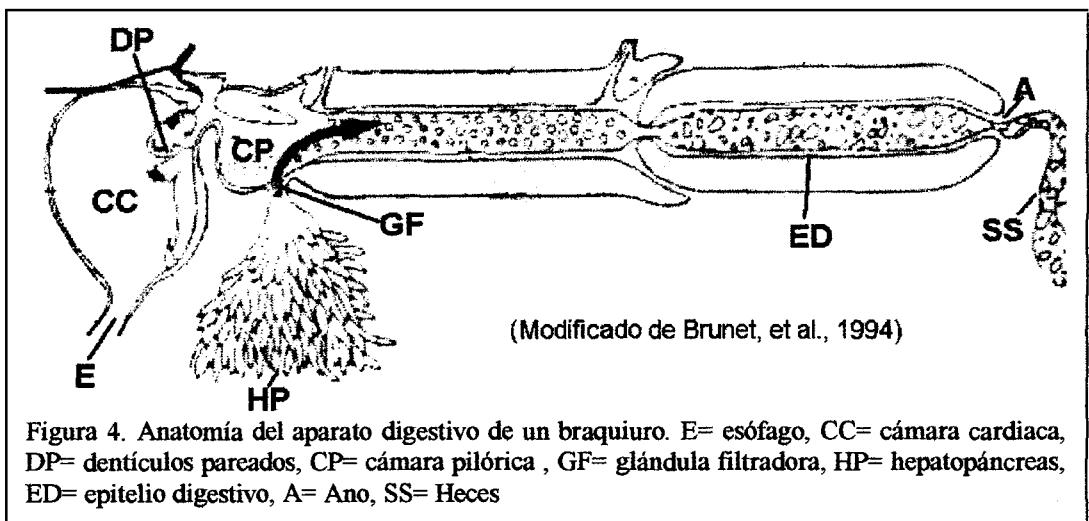
Proceso digestivo

Todos los seres vivos tienen un ciclo de vida determinado, durante este se efectúan procesos fisiológicos tales como el movimiento, desarrollo, mantenimiento, reproducción, entre otras (Schmidt-Nielsen, 1981). Para realizar estos procesos, el organismo necesita energía, la cual se obtiene de una fuente externa; para el caso de los heterótrofos es el sustrato o alimento, compuesto de materia orgánica: carbohidratos, proteínas y lípidos. (Svendensen, 1976).

Las biomoléculas del alimento forman complejos de gran tamaño, cada organismo debe fraccionarlos para obtener energía, por ello realiza un proceso de digestión. Cada organismo posee estructuras especializadas para realizar esta función; en el caso de los braquiuros se tiene que el sistema digestivo está formado por la boca, esófago, cámara cardiaca, cámara pilórica, glándula digestiva, intestino y ano, en la figura 4 podemos observar dichas estructuras (Bliss, 1982, Brunet, et al, 1994).

A continuación se describe el paso del alimento a lo largo de estas estructuras: el alimento sujetado por los quelípedos (pinzas), pasa a través de los terceros maxilípedos y estos a su vez lo empujan hacia la boca, pasa por el esófago y llega al estómago o cámara cardiaca (figura 4), aquí se encuentra con las enzimas digestivas de los jugos gástricos (secretadas

por la glándula digestiva); dentro de la cámara se tienen una serie de denticulos pareados que sirven para moler el alimento. La cámara pilórica conduce el alimento molido y parcialmente degradado, directamente al intestino a una glándula filtradora bilobulada, esta conduce a la glándula digestiva o hepatopáncreas. El hepatopáncreas es un órgano grande bilobulado, compuesto por un gran número de túbulos, que están formados de células secretoras y endocíticas; las funciones de esta estructura son la de digerir intracelularmente las partículas de alimento, absorberlas y almacenarlas, además de empaquetar en vesículas los desechos no digeribles. El material de mayor tamaño que no puede pasar por la glándula filtradora se desvía hacia la cámara pilórica hasta el intestino, donde el epitelio digestivo secreta una membrana peritrófica, la cual envuelve el material a ser expulsado por el ano (Bliss, 1982, Dall y Moriarty, 1983; Icely y Nott, 1992; McGaw y Reiber, 2000; Ruppert y Barnes, 1996).



La digestión enzimática en estómago y hepatopáncreas se efectúa principalmente por acción de enzimas hidrolíticas (EC 3.x.x.x). El conjunto de enzimas presentes en estos órganos está formado por proteasas (proteinasas y peptidasas), lipasas y carbohidrasas principalmente.

Proteasas

Las enzimas son biomoléculas con capacidad catalítica y generalmente son de naturaleza proteica (aunque también existen otras moléculas con capacidad catalítica, como cierto tRNA). La actividad catalítica de las enzimas depende de la integridad de la estructura nativa, por lo que todos los niveles de organización proteica son importantes para su desempeño. Por ello cuando variamos los parámetros operacionales como la temperatura, pH, y fuerza iónica, la actividad de la enzima se ve modificada.

La Unión Internacional de Bioquímica a través de la Comisión de Enzimas, diseñó un sistema de nomenclatura para las enzimas. Este se basa en la reacción que catalizan estas moléculas (Nelson y Cox, 2000). Las proteasas (EC 3.4.x.x) son enzimas responsables de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas. Estas enzimas están involucradas en procesos bioquímicos y fisiológicos donde sea necesaria la modificación posttraduccional de proteínas; ejemplos de estos procesos son: la digestión de las proteínas de los alimentos, la activación de proenzimas, prohormonas y neuropéptidos y la regulación intracelular por proteosomas (García-Carreño, 1992a). Las proteasas se dividen en dos grandes grupos: las peptidasas o exopeptidasas (3.4.11-19.x) y las proteinasas o endopeptidasas (3.4.21-24.x); las primeras hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos que se encuentran en los extremos de la molécula, ya sea en su parte amino o carboxiloterminales, las últimas llevan a cabo la hidrólisis en los enlaces peptídicos de los aminoácidos internos.

Las endopeptidasas pueden pertenecer a uno de los cuatro grupos: serin (EC 3.4.21.X), cisteín

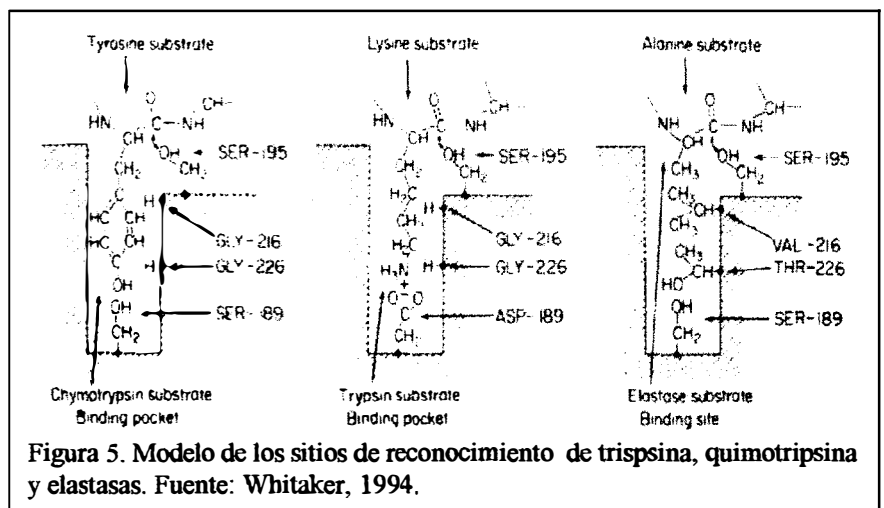


Figura 5. Modelo de los sitios de reconocimiento de tripsina, quimotripsina y elastasas. Fuente: Whitaker, 1994.

(EC 3.4.22.X), asparto (EC 3.4.23.X) o metaloproteinasas (EC 3.4.24.X), el grupo está determinado por el aminoácido del sitio catalítico, que participa en la catálisis; para el caso de las metaloproteinasas, es necesaria la presencia de un catión divalente (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997).

Las serin proteinasas, estas presentan residuos de serina, histidina (grupo imidazol) y ácido aspártico en el sitio activo. Las características generales de catálisis de este grupo de proteinasas son idénticas, sólo los aminoácidos que dan la especificidad son diferentes. La α -quimotripsina y la tripsina, sitio de unión para el sustrato está muy abierto por el residuo de glicina (figura 5), de tal manera que un grupo lateral de cadena larga puede penetrar al sitio. La diferencia entre estas dos proteinasas radica en el fondo de este hueco, mientras que quimotripsina presenta un residuo de serina, la tripsina tiene uno de aspartato; la carga negativa de este grupo forma un puente electrostático con la carga positiva del grupo amino de la lisina o con el grupo guanidinio de la arginina, estos últimos aminoácidos presentes en el sustrato. De lo anterior podemos deducir que las proteinasas presentan cierta especificidad, no sólo por el enlace peptídico, sino por los residuos de aminoácidos que los conforman (Whitaker, 1994). En la tabla I se enlista las especificidades de algunas serin proteinasas.

Tabla I. Especificidad de algunas proteinasas

Enzima	Especificidad
α -quimotripsina bovina	Tyr, Phe, Trp
Quimotripsina B bovina	Tyr, Phe, Trp
Tripsina bovina	Lys y Arg
Trombina bovina	Lys y Arg
Elastasa bovina	Ala
Subtilisina de <i>Bacillus subtilis</i>	Tyr, Phe, Trp

Fuente: Whitaker, 1994

Proteasas en la industria

Desde épocas muy remotas el hombre ha usado a las enzimas en técnicas para modificar las biomoléculas de los alimentos, de tal manera que el producto final adquiere características sensoriales agradables para el consumidor. El 50% de las enzimas utilizadas por la industria tiene actividad proteolítica (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997), la variedad de estas enzimas es amplia, ya que al presentarse en todos los organismos podemos encontrar proteasas que catalizan reacciones a muy diversas condiciones ambientales.

El uso de enzimas en la industria es amplio debido a:

- actúan específicamente,
- la velocidad de reacción se puede controlar,
- la mayoría se pueden inactivar fácilmente,
- incrementa el rendimiento de los procesos.

Las enzimas pueden participar en procesos donde se necesite reducir viscosidad, mejorar extracciones, realizar bioconversiones, cambiar propiedades funcionales, incluso son utilizadas para limpiar tuberías (Boyce, 1986).

El origen de las proteasas empleadas en la industria es animal, vegetal, y microbiano. Las más importantes de origen animal son pepsina, tripsina y quimotripsina, en cuanto a las de origen vegetal tenemos a papaína, ficina, bromelina. Las proteasas de origen microbiano; pueden obtenerse por fermentación; para su uso en alimentos estas enzimas deben ser de organismos GRAS y cumplir con las recomendaciones emitidas por la FAO y la FDA, esto para disminuir los riesgos de salud de los posibles organismos consumidores. En la tabla II se pueden observar algunas aplicaciones de enzimas proteolíticas en esta industria (García-Carreño, 1991; Shamsuzzaman y Haard, 1985; Simpson y Haard, 1987).

Tabla II. Características deseables en alimentos por la acción de las proteasas

Alimento	Acción
Pan	<ul style="list-style-type: none"> ○ Reduce el tiempo de amasado, mejora textura. ○ Da cuerpo, sabor.
Cerveza	<ul style="list-style-type: none"> ○ Formación de nutrientes al fermentar. ○ Ayuda a la filtración y clarificación.
Queso	<ul style="list-style-type: none"> ○ Coagulación de la caseína. ○ Desarrolla sabores durante la maduración.
Carnes	<ul style="list-style-type: none"> ○ Recuperación de proteínas de huesos. ○ Mejora textura (ablanda)
Hidrolizados proteicos	<ul style="list-style-type: none"> ○ Producción de salsa de soya y de pescado.
Pescado	<ul style="list-style-type: none"> ○ Solubilización de proteína para concentrados. ○ Recuperación de aceite o trozos de músculo en partes inaccesibles.

Fuente: Boyce, 1986

El entorno marino posee una gran diversidad de especies animales, dentro de ellas se encuentran los invertebrados, este grupo posee una gran variedad de estrategias alimenticias, dentro de las cuales las proteasas juegan un rol muy importante. En la industria alimentaria el uso de las proteasas de crustáceos se ha extendido considerablemente; dichas biomoléculas pueden ser usadas en procesos de eliminación de piel, escamas o membranas, incluso son empleadas para elaborar productos alimenticios donde se requiera de la hidrólisis de proteínas, para impartirle propiedades organolépticas deseables (Díaz-López y García-Carreño, 2000).

La mayoría de los organismos mencionados son especies de importancia comercial, incluso algunos son especies cultivables. Algunos objetivos de la acuicultura de crustáceos son producir: a) alimento para humanos u otros animales, b) carnada para pesca, c) organismos para reconstituir hábitats naturales, d) organismos ornamentales (Provenzano, 1985). Dentro de esta actividad, la falta de conocimiento sobre la biología de los organismos ha ocasionado el fracaso de proyectos o un alto costo de producción. La alimentación de estos

organismos representa un costo importante, de tal manera que es necesario optimizar este rubro. Una manera de hacerlo es conociendo como se lleva a cabo el proceso digestivo de estos organismos. Para lograrlo, es importante saber cuales son las enzimas partícipes de este fenómeno, cómo se modula o se regula su actividad biológica en respuesta a estímulos internos o externos.

ANTECEDENTES

En peces se han caracterizado enzimas de ciego pilórico y estómago de *Colossoma macropomum*, *Dentex dentex*, *Sparus aurata*, *Gadus morhua*, *Brycon orbignyanus*. En estos organismos se ha encontrado tanto actividad proteolítica de proteinasas ácidas (pepsina), como de alcalinas (tripsina, quimotripsina). (De Souza Bezerra et al., 2000; Alarcón et al., 1998; Bjarnason et al., 1990; García-Carreño et al., 2002, Moyano et al., 1998).

En insectos, se tienen reportes sobre las características de las enzimas digestivas presentes en algunos coleópteros y lepidópteros (región digestiva media). Se ha encontrado principalmente enzimas con actividad de serin proteinasas y cisteín proteinasas (Noriega y Wells, 1999; Ortego et al., 1996; Purcell et al., 1992; Zhu y Baker, 1999).

Los organismos de la orden Decapoda presentan proteasas digestivas, trabajos anteriores a este, han analizado hepatopáncreas o extractos de organismos completos. Ejemplos de estos trabajos tenemos los realizados en *Pleuroncondes planipes*, *Pacifistacus astacus*, *Penaeus paulensis*, *P. schmittii*, *P. vannamei*, *Panulirus japonicus*, *Pleoticus muelleri* y *Artemesia longinaris*. En ellos se han encontrado actividad tanto de proteinasas como de peptidasas. (Galgani y Nagayama, 1987; García-Carreño, 1992b; García-Carreño y Haard, 1993; García-Carreño y Hernández-Cortés, 1995; Lemos, et al., 1999; Lemos, et al., en prensa; Fernández Gimenez, et al. 2001; Fernández Gimenez, et al., en prensa). Sobre la presencia de enzimas digestivas en jugo gástrico, se tiene el reporte de Brockerhoff et al. (1970) quienes encontraron que la langosta *Homarus americanus* presenta actividad de proteasas, lipasas, nucleasas y carbohidrasas.

En hepatopáncreas de los cangrejos *Parathodes camtschatica*, *Portunus pelagicus*, *Geryon affinis* y *Chionoecetes japonicus* se ha encontrado actividad de tripsina, carboxipeptidasa A y colagenasa, resaltando principalmente la actividad de esta última (Galgani, y Nagayama, 1988; Klimova et al., 1990; Dionysius, et al., 1993).

Dendinger en 1987, caracterizó las proteasas digestivas de la glándula digestiva del cangrejo *Callinectes sapidus*, encontró que el pH óptimo del conjunto de proteinasas es de 6.2, aunque hasta 7.5 aún se conserva alrededor del 90% de la actividad. Dentro de las proteinasas encontradas se tiene que tripsina presenta una mayor actividad que de quimotripsina.

En organismos juveniles de *Callinectes arcuatus*, se tienen reportes sobre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas, se encontró actividad de amilasas, proteasas y lipasas en general, los resultados se relacionaron con el estadio de muda (Vega-Villasante, et al., 1999).

El objetivo de este trabajo, además de caracterizar las proteinasas presentes en el aparato digestivo del género *Callinectes* sp., es demostrar que estos organismos pueden ser un modelo útil para el estudio del fenómeno digestivo en decápodos.

HIPÓTESIS

En el jugo gástrico de los braquiuros se encuentra un conjunto de proteasas cuya composición es igual a la que se encuentra en la glándula digestiva.

La concentración de proteína soluble y la actividad proteolítica varía entre especies y género (macho y hembra).

Dentro del conjunto de proteinasas digestivas podemos encontrar que las enzimas con actividad de tipo tripsina y quimotripsina, éstas son las principales responsables de la actividad proteolítica.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y comparar las proteinasas presentes en el jugo gástrico de los braquiuros *Callinectes bellicosus* y *C. arcuatus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar el patrón de proteinasas presentes tanto en glándula digestiva como en jugo gástrico de cada especie.

Comparar la concentración de proteína, actividad enzimática de proteinasas digestivas del jugo gástrico entre especie y entre género.

Caracterizar las proteinasas presentes en el jugo gástrico mediante el uso de sustratos e inhibidores específicos.

Establecer los valores óptimos de pH y temperatura de la actividad proteolítica total.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos

Los organismos se colectaron en los esteros de la Ensenada de La Paz con redes parabólicas y de cuchara. De los organismos recolectados, se seleccionaron 20 de cada especie de cangrejo: *Callinectes arcuatus* (14 machos y 6 hembras), *C. bellicosus* (13 machos y 7 hembras). Se mantuvieron 15 días en el laboratorio húmedo para aclimatarlos (la salinidad del agua a 35 ppm y la temperatura entre 27-28 °C). Se colocaron dos organismos en tanques rectangulares de plástico de 70 L de capacidad, separados por una malla metálica con recubrimiento plástico de 1.27 cm de luz de malla. Diariamente se les cambió el 80% de agua y se les alimentó con calamar fresco, el día de muestreo los organismos fueron alimentados después de la toma de muestra.

Toma y manejo de muestra

Para cada especie se realizaron 6 tomas de muestra de jugo gástrico (semanales), en la primera se registraron datos morfométricos: peso, talla (largo de espina a espina) y ancho del caparazón y se registró el número de quelípedos (pinzas) de cada organismo, así como el género; esta información se tomó después de la muda. Los organismos se muestrearon semanalmente a la misma hora, extrayéndoles el contenido de la cámara cardiaca (jugo gástrico), lo cual se realizó mediante la inserción, por la boca hacia la cámara, de una sonda de 16 mm de diámetro, la succión se hizo con la ayuda de una jeringa; el volumen de jugo gástrico obtenido fue variable (desde 100-1200 μ L). El líquido se depositó en un microtubo y se mantuvo en hielo hasta su centrifugación (10,000 g, 4 °C, 30 min), el sobrenadante se trasvasó a otro tubo y se congeló a -20 °C para su posterior liofilización. Al finalizar el periodo de muestreo a los organismos sobrevivientes se les extrajo la glándula digestiva y estómago (ambas cámaras), éste último se lavó con agua destilada, con el fin de eliminar al máximo las proteínas del jugo gástrico; se registró el peso de los órganos y se almacenaron individualmente a -20 °C para su posterior análisis.

Se prepararon extractos enzimáticos del tejido de hepatopáncreas y estómago según lo descrito en Garcia-Carreno y Haard, 1994. Las enzimas del hepatopáncreas se extrajeron empleando un homogenizador de tejidos, para las presentes en el estómago se empleó un potter. En ambas situaciones se usó agua destilada en una relación 1:2 (p/v), con el fin de separar la parte insoluble, se centrifugó siguiendo las condiciones anteriores, se eliminó la fase lipídica y la fase acuosa, se almacenó a 4 °C para su posterior análisis.

Selección de los organismos a estudiar

Se seleccionaron diferentes organismos para cada una de las tres partes en que se divide este trabajo. Primera parte: comparación de las proteínas y proteinasas presentes en jugo gástrico y glándula digestiva. Segunda: comparación de las proteínas y proteinasas (concentración de proteína y actividad enzimática) entre especies y géneros. Por último, la caracterización de las proteinasas.

Para la primera se seleccionaron 12 organismos (6 de cada especie y de estos 3 de cada género); éstos reunieron las siguientes características: a) sobreviviente a los 6 muestreos, b) contar con muestra de hepatopáncreas, estómago y jugo gástrico al momento de selección.

Para la segunda (n=20), se eligieron 10 organismos de cada especie, 5 de cada género. Se seleccionaron los organismos de mayor tamaño (11.15 ± 0.98 cm en *C. arcuatus* y 13.21 ± 1.89 cm para *C. bellicosus*).

Para la tercera combinando las características especie-género, se hicieron 4 mezclas del jugo gástrico del mismo día de muestreo (tercero para *C. bellicosus* y primero para *C. arcuatus*), los organismos se eligieron al azar.

Cuantificación de proteína soluble

Se cuantificó la concentración de proteína empleando el método de Bradford (1976), se elaboró una curva patrón usando como proteína estándar albúmina sérica bovina (fracción V). El volumen final de la mezcla que contenía la proteína fue de 100 μ L, a los cuales se le

adicionó 1 mL del reactivo de Bradford, después de 5 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm, para obtener el valor de concentración en mg/mL, dicho valor se sustituyó en la ecuación lineal de la curva patrón.

Cuantificación de la actividad de proteinasas totales

La actividad en tubo se midió siguiendo la metodología de García-Carreño (1992b), se empleó azocaseína como sustrato. A 5-10 μ L de muestra se adicionaron 500 μ L de buffer Tris-HCl 20mM, pH 8.0. Para iniciar la reacción de hidrólisis se agregó 500 μ L de azocaseína al 1%, se usó ácido tricloroacético al 20% para detener la reacción. Después de centrifugar (10,000 g, 5 min, 25 °C), la absorbancia del sobrenadante se registro a 366 nm, haciendo blanco con el buffer. Para calcular la actividad específica se dividió el cambio de absorbancia por minuto entre la cantidad de proteína presente en la muestra.

Obtención de valores óptimos de pH y temperatura

Para estos ensayos se siguió la misma metodología para evaluar la actividad total de proteasas, usando azocaseína como sustrato.


Para obtener el pH óptimo, se usó buffer universal (Stauffer, 1989) ajustado a valores de pH de 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 9.0

Los ensayos de temperatura óptima se hicieron a 10 y 20 minutos a las siguientes temperaturas: 5, 25, 35, 50 y 75 °C. El buffer usado en este ensayo fue Tris-HCl 50mM, pH 7.0.

Caracterización de las proteinasas

Para caracterizar a las proteinasas presentes en el jugo gástrico se emplearon sustratos e inhibidores específicos de acuerdo a García-Carreño et al. (1994). En la tabla III se detalla esta información para cada proteinasa.

Tabla III. Relación de proteasas con sus sustratos e inhibidores específicos

Proteinasa	Sustrato	Inhibidor (Soluciones Stock)
Tripsina	BAPNA 1 mM en buffer Tris-HCl 50mM (pH 8.0), 20mM CaCl ₂	<ul style="list-style-type: none"> • TLCK 10 mM en HCl 1 mM • SBTI 250 μM
Quimotripsina	SAPNA 0.1 mM en buffer Tris-HCl 50mM (pH 8.0), 20mM CaCl ₂	<ul style="list-style-type: none"> • TPCK 5 mM en metanol • Quimostatina 10mM en DMSO
Serin-proteinasas		<ul style="list-style-type: none"> • PMSF 100 mM en metanol

Como ayuda en la caracterización, se evaluó el efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica total con azocaseína como sustrato; previo al ensayo de actividad, la mezcla enzima:inhibidor se incubó durante 60 minutos.

Para corroborar los resultados de los ensayos en tubo, se empleó SDS-PAGE al 10% (Laemmli, 1970). Para visualizar la composición de proteínas, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie-ácido acético-metanol (0.05:40:7), posteriormente se destiñó con una la misma solución sin el colorante. Se hicieron zimogramas para revelar actividad proteolítica en los extractos, de acuerdo a García-Carreño, et al. (1993): al terminar el corrimiento electroforético, el gel se sumergió en una solución de caseína al 3% durante 30 min a 4 °C, esto con el fin de que la caseína se difundiera al gel; posteriormente se incubó a 25 °C por 90 minutos, durante este tiempo, las proteinasas hidrolizaron a la caseína. Se tiñó el gel con azul de Coomassie, las bandas blancas sobre el fondo azul nos indicaron la presencia de proteinasas. Con el fin de conocer de que tipo son estas proteasas, este ensayo se repitió corriendo las muestras previamente incubadas en 20% (v/v) de los inhibidores mencionados anteriormente. De cada análisis de proteína se aplicó 20 μg y 7 mU para los zimogramas.

Se evaluó la actividad de cada enzima usando sustratos sintéticos e inhibidores específicos, usando el paquete computacional UV KinLab (Perkin Elmer) se registró el cambio de la absorbancia en el tiempo. La actividad de la enzima se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = \frac{(\text{Abs}_{410\text{nm}}/\text{min}) * (1000) * (Vt)}{(8800) * (\text{Prot})}$$

Donde: **Vt** es el volumen final de la reacción en mL y **Prot** son los mg proteína añadida a la reacción. 8800 es el coeficiente de extinción de la *p*-nitroanilina liberada por la hidrólisis de los sustratos sintéticos.

Para evidenciar la actividad enzimática de enzimas de tipo tripsina se usó BAPNA y TLCK, para actividad quimotriptica se empleó SAPNA y quimostatina. Como controles se utilizaron tripsina porcina tipo IX comercial y quimotripsina tipo II bovina.

Estadística

La evaluación estadística de los resultados se realizaron con un análisis de varianza (ANDEVA) de una sola vía y anidado, las pruebas de rango múltiple se analizaron con la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD). El programa computacional usado fue STATISTICA V.5 (StatSoft, Inc.).

RESULTADOS

Sobrevivencia y comportamiento de los organismos en el laboratorio

Ya que no se tenía antecedentes acerca de la sobrevivencia y comportamiento de estos cangrejos en el laboratorio húmedo, este punto fue evaluado. Los organismos se mantuvieron alrededor de 10 semanas en el laboratorio húmedo, la sobrevivencia se califica como aceptable, en la tabla IV se muestran los resultados. Los fallecimientos generalmente se produjeron por fuga del organismo.

Se observó que la especie *C. bellicosus* se manipulaba con más facilidad que la *C. arcuatus*, ya que una vez sujeta, ésta se mantenía tranquila hasta su regreso al agua, no así la otra especie que debía ser manipulada con mayor cuidado pues algunos organismos llegaron a presentar desprendimiento espontáneo de quelípedos.

La longitud promedio del caparazón fue de 12.90 ± 1.46 cm para la especie *C. bellicosus* y de 10.97 ± 1.02 cm para *C. arcuatus*. No se consideró importante el peso del organismo, ya que algunos fueron capturados sin quelípedos o durante el muestreo los perdieron.

Tabla IV. Sobrevivencia de los organismos capturados

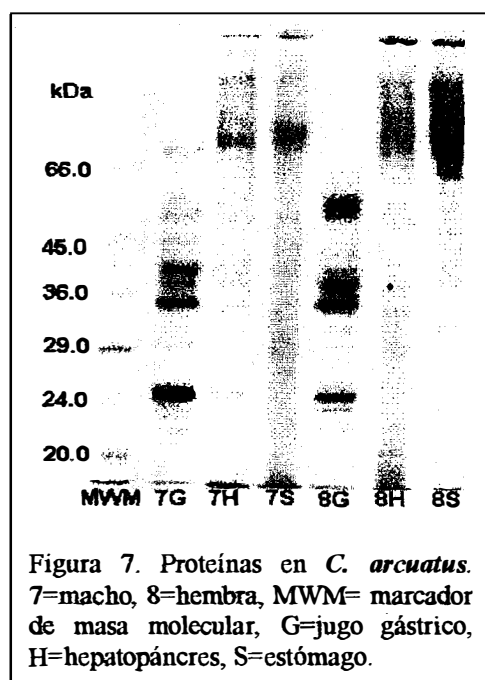
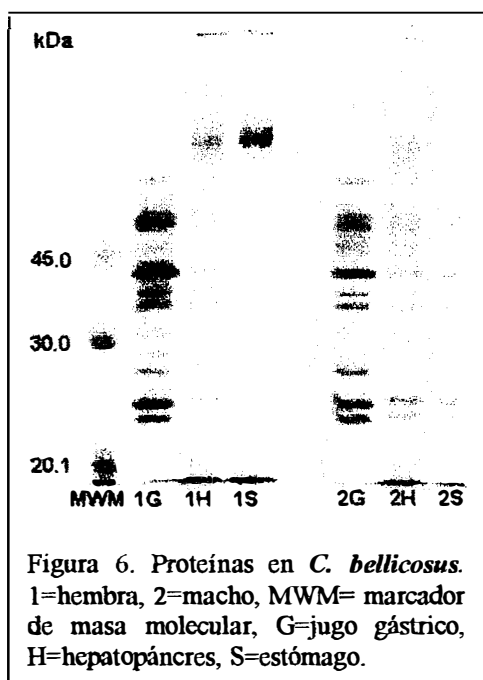
Especie	Hembras			Machos			Total		
	NI	NF	% SV	NI	NF	% SV	NI	NF	% SV
<i>C. arcuatus</i>	6	5	83.33	14	12	85.71	20	17	85.00
<i>C. bellicosus</i>	7	5	71.43	13	11	84.62	20	16	82.00

NI= Número inicial, NF= Número final, % SV= Porcentaje de sobrevivencia

Proteínas y proteinasas presentes en el contenido de la cámara cardiaca, tejido del hepatopáncreas y del estómago

Las proteínas y proteinasas localizadas en los órganos disectados y jugo gástrico se visualizaron en geles de poliacrilamida al 10%. En las figuras 6 y 7 podemos observar, un perfil de proteínas similar, independientemente de los géneros (macho y hembra). La única

diferencia cualitativa es una banda de alta masa molecular (>66 kDa), tanto en hepatopáncreas como en estómago. La composición de proteína es diferente entre especies. En relación a la actividad de las proteinasas presentes en las muestras, se encontró que hay diferencias cuantitativas entre muestras y entre géneros, mientras que entre especies se presentan diferencias tanto cuantitativas como cualitativas (ver figuras 8 y 9). En la última parte de resultados se detalla más acerca de este punto.



Diferencias entre género y especie en la concentración de proteína, actividad enzimática de proteinasas digestivas del jugo gástrico

De cada uno de los 20 organismos, se analizaron 6 muestras de jugo gástrico, obteniéndose los valores de concentración de proteína y de actividad proteolítica total, el promedio y desviación estándar de estos valores se presentan en la tabla V. Los datos de los organismos 7 y 8 no se tomaron en cuenta para el ANDEVA anidado, ya que el primero dejó de comer durante un periodo prolongado y el segundo mudó un día anterior al muestreo; esto afectó a la actividad proteolítica total, además de un cambio en el tipo y concentración de proteasas (figura 10).

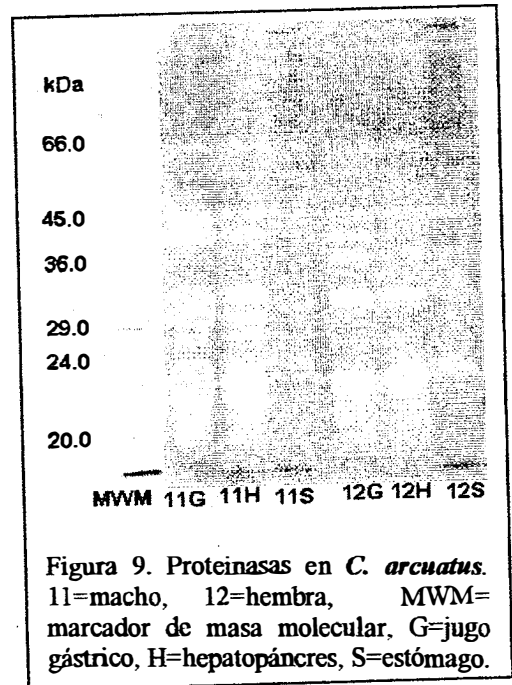
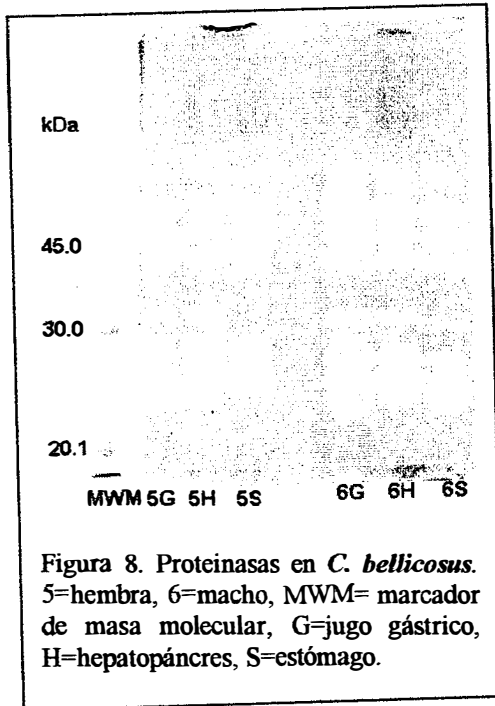
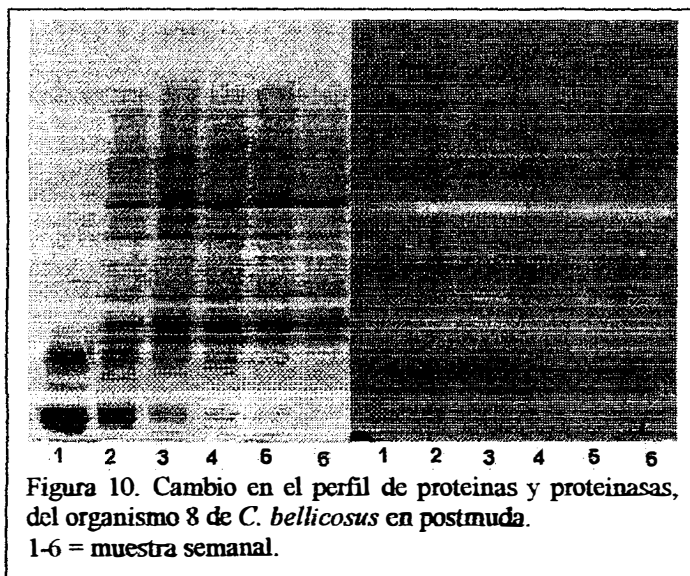


Tabla V. Concentración de proteína soluble y actividad proteolítica total en jugo gástrico

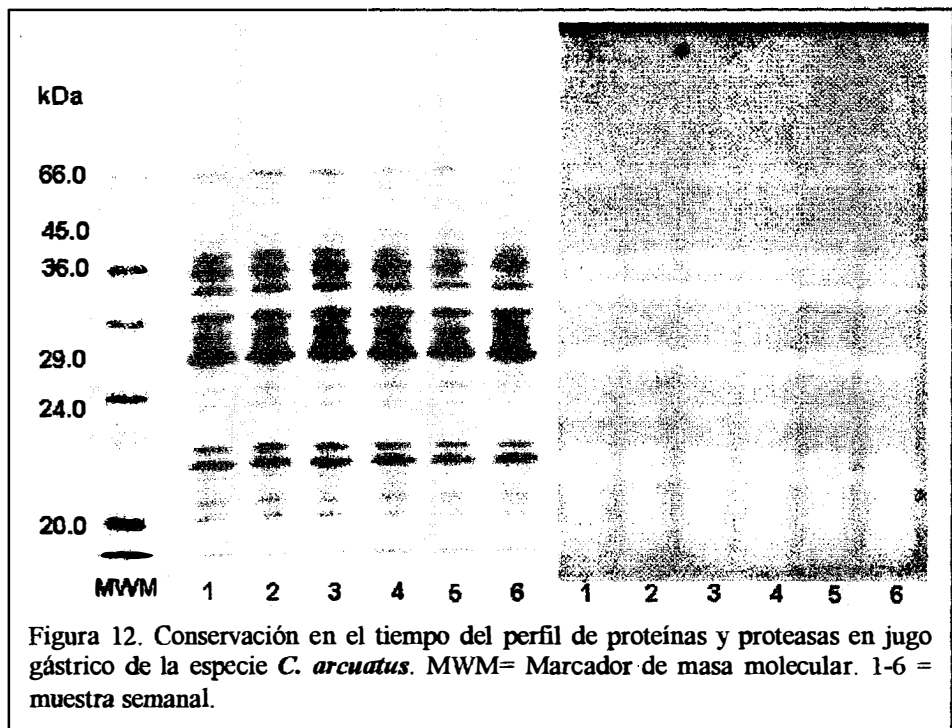
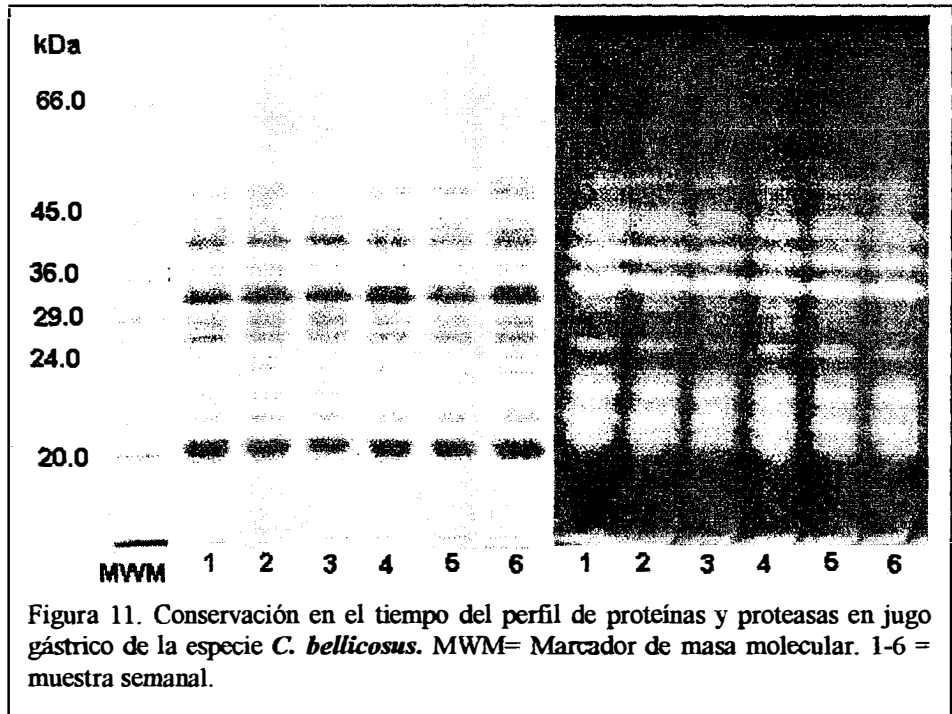
<i>Callinectes bellicosus</i>				<i>Callinectes arcuatus</i>			
O	G	Proteína (mg/mL GJ)	Actividad total (U/mL GJ)	O	G	Proteína (mg/mL GJ)	Actividad total (U/mL GJ)
1	H	23.83 ± 6.49	90.66 ± 34.25	11	M	24.61 ± 2.56	105.48 ± 15.13
2	M	21.70 ± 4.78	96.70 ± 20.55	12	M	21.08 ± 4.99	82.34 ± 14.06
3	M	23.96 ± 4.64	74.20 ± 27.20	13	M	20.19 ± 5.68	91.05 ± 23.82
4	H	34.72 ± 5.45	110.47 ± 24.58	14	H	15.65 ± 2.73	63.67 ± 15.11
5	H	32.95 ± 6.79	116.51 ± 21.79	15	M	17.24 ± 3.31	76.52 ± 9.31
6	H	29.52 ± 4.71	95.08 ± 17.63	16	M	17.63 ± 1.45	58.86 ± 14.43
7	H	36.02 ± 8.73	85.24 ± 42.53	17	H	15.72 ± 1.18	50.93 ± 10.84
8	M	29.91 ± 10.71	98.18 ± 41.98	18	H	18.26 ± 8.78	64.44 ± 17.04
9	M	29.42 ± 5.28	108.51 ± 23.68	19	H	13.35 ± 6.24	69.15 ± 29.36
10	M	29.54 ± 2.34	96.43 ± 25.26	20	H	17.27 ± 4.38	65.37 ± 12.65

O = organismo, G = género, H = hembra, M = macho, GJ = jugo gástrico

Al examinar los resultados del ANDEVA anidado se encontró que la concentración de proteína soluble varía entre las especies analizadas ($P<0.01$) y entre los géneros de éstas ($P<0.01$). La actividad proteolítica total también varía en función de la especie ($P<0.01$) y del género ($P<0.05$). Los gráficos resultantes se pueden observar en el anexo 1.

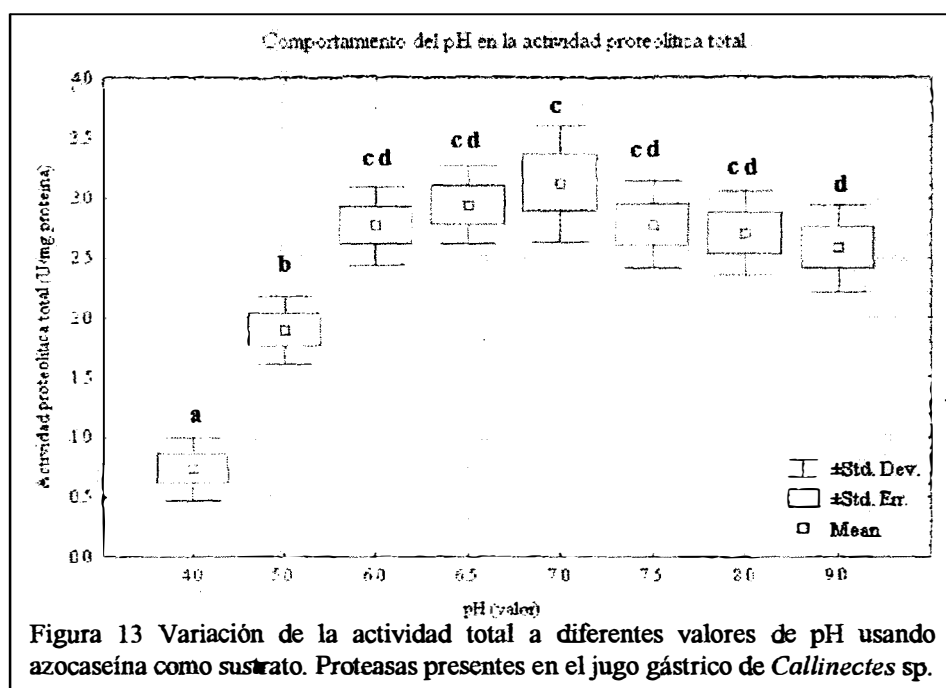


Las proteínas y proteinasas de cada organismo analizado se separaron en SDS-PAGE al 10%, se observó que se presentan diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre especies (ver figuras 11 y 12), no así entre género (macho y hembra) donde sólo se presentaron diferencias cualitativas. Además, el perfil de estas moléculas no cambia a través del tiempo. En la siguiente sección de resultados se detallan las diferencias.



pH óptimo de las proteinasas presentes en el jugo gástrico de cangrejos del género *Callinectes* sp.

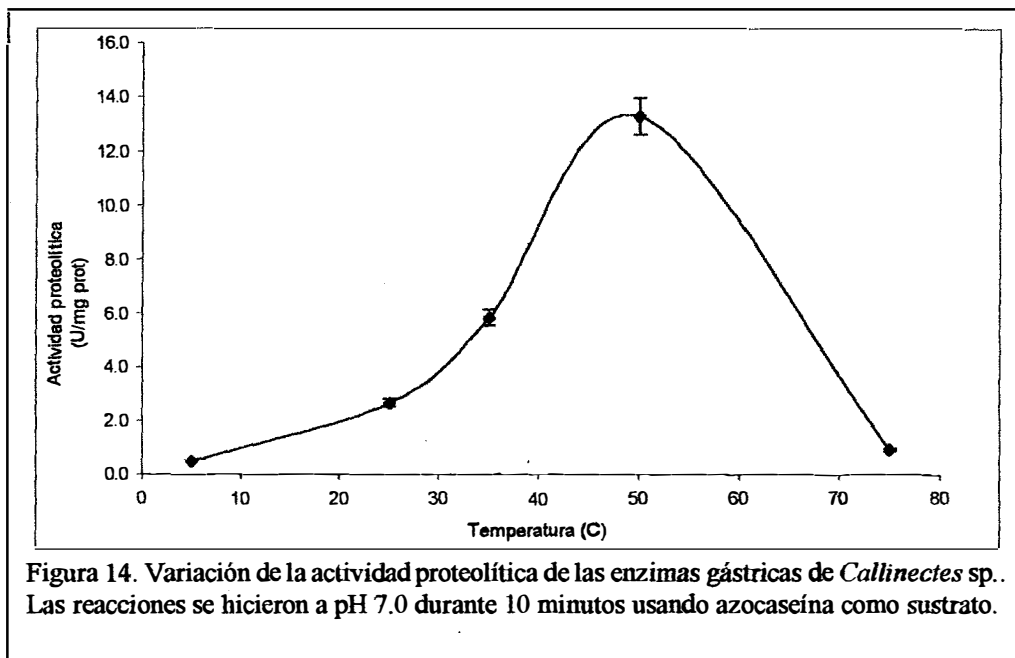
Se analizó la actividad de proteasas de las 4 mezclas de cada combinación especie:género. Se observó que los perfiles de pH óptimo obtenidos, eran similares (ver anexo 2), por ello, se decidió analizar los datos por medio de un ANDEVA de una sola vía, tomado el valor de cada combinación como una réplica. Se encontró que existía diferencia significativa entre los valores de pH ($P < 0.01$); analizando con una prueba de rango múltiple, se encontró que el valor óptimo de pH para la actividad proteolítica, en el género *Callinectes* sp. es de 7.0, aunque en el rango de 6.0 a 8.0 no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), por lo que podemos afirmar que el rango óptimo de ambas especies es de 6.0 a 8.0.



Temperatura óptima de las proteinasas presentes en el jugo gástrico de cangrejos del género *Callinectes* sp.

Una vez que se estableció el valor óptimo de pH, se realizaron ensayos para determinar la temperatura óptima (a 10 min) para la actividad de proteasas. Al igual que con el pH, este factor presentó un perfil similar en los cuatro grupos (anexo 2). La temperatura a la que se

registró mayor actividad a 10 minutos de reacción, fue de 50 °C (figura 12). Los resultados obtenidos a 20 minutos no se tomaron en cuenta, ya que las absorbancias obtenidas sugerían que el sustrato se agotó antes de finalizar el tiempo de reacción (35 y 50 °C).



Caracterización de proteinasas presentes en el jugo gástrico de *C. bellicosus* y *C. arcuatus*.

Con cada combinación especie:género se realizaron ensayos de actividad total y específica. Los valores del promedio y desviación estándar se muestran en la tabla 6; analizando los datos, se encontró que entre las combinaciones existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), excepto en la actividad total entre los géneros (macho y hembra) de *C. bellicosus*. Además se observó que las hembras de cada especie poseen mayor actividad que los machos, en cuanto al análisis por especie, *C. bellicosus* presenta mayor actividad que *C. arcuatus*. En relación a la actividad específica, podemos observar que el conjunto de proteinasas del jugo gástrico hidrolizaron tanto BAPNA como SAPNA, esta hidrólisis disminuyó en 100 % cuando las enzimas se incubaron con inhibidores específicos (TLCK y quimostatina).

Tabla VI. Actividad total y específica en jugo gástrico de cangrejos *Callinectes* sp.

	Control ^{&}	Cb/H [#]	Cb/M [#]	Ca/H [#]	Ca/M [#]
Actividad Total	NA	45.59 ± 3.53 ^a	44.60 ± 3.13 ^a	38.82 ± 0.39 ^b	37.80 ± 0.31 ^c
Actividad quimo-tríptica*	27.70 ± 1.10	52.44 ± 1.43 ^d	45.59 ± 3.47 ^e	38.15 ± 3.22 ^f	28.95 ± 3.06 ^g
Actividad tríptica*	3.27 ± 0.32	12.44 ± 0.33 ^h	9.61 ± 1.43 ⁱ	7.37 ± 0.50 ^j	6.37 ± 0.55 ^k

* Como controles se utilizaron tripsina porcina tipo IX y quimotripsina tipo II bovina.

[&] Actividad específica expresada en U/mg de proteína NA= No analizado

[#] Actividad específica expresada en U/mL de jugo gástrico a-k = grupos estadísticamente diferentes

Cb= *C. bellicosus*, Ca= *C. arcuatus*, H= hembra, M= macho

Con el objetivo de conocer el tipo de proteasas y su proporción, se realizaron ensayos de reducción de la actividad proteolítica total por acción de inhibidores específicos. En la tabla 7 se presentan los resultados, en negritas se muestran los valores que no son significativos, ya que pueden considerarse como el error de la técnica.

En el jugo gástrico las proteinasas de tipo serina contribuyen con alrededor del 48.03 ± 5.92% de la actividad total de proteinasas (SBTI), entre ellas tenemos que tripsina contribuye con un 22.89 ± 5.37%. El porcentaje de actividad de quimotripsina no es claro pues sólo en hembras de ambas especies se encontró alrededor de un 15.53 ± 1.24% de inhibición total (quimostatina).

Tabla VII. Disminución de la actividad proteolítica por la presencia de inhibidores (% de inhibición)

	Cb/H	Cb/M	Ca/H	Cb/M	Try	Chy
Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TLCK	20.26	17.37	29.78	24.13	88.69	0.00
TPCK	7.04	6.03	7.12	2.73	9.96	92.91
PMSF	24.20	33.24	41.40	36.94	93.59	93.65
SBTI	44.98	43.60	56.68	46.84	97.33	43.46
Quimostatina	14.65	4.52	16.41	4.89	0.00	93.91

Cb= *C. bellicosus*, Ca= *C. arcuatus*, H= hembra, M= macho, Try= tripsina, Chy= quimotripsina

Con el fin de saber el tipo de las proteinasas se realizaron ensayos de inhibición y evaluación de la actividad en gel, por cada combinación especie:género. Los resultados se observan en las figuras 15-18; dentro de los rectángulos se pueden distinguir las bandas de las proteasas inhibidas por acción de TLCK, TPCK, PMSF, quimostatina y SBTI.

Para la especie *C. bellicosus* (figuras 15 y 16) se confirma que no existen diferencias cualitativas en el perfil de proteína y proteinasas entre géneros (macho y hembra). Dentro de las proteinasas de esta especie podemos encontrar proteinasas con actividad de tripsina, ya que en el carril con muestra incubada con TLCK, SBTI y PMSF se observa la falta de bandas de proteinasas en el rango de 22-25 kDa. Respecto a moléculas con actividad de tipo quimotripsina se tienen dos bandas inhibidas con quimostatina y PMSF (33 y 37 kDa). Se encontró la presencia de cinco proteínas no identificadas, dos proteasas de tipo serin proteinasas (39-44 kDa) y otras tres de 47, 49 y 57 kDa.

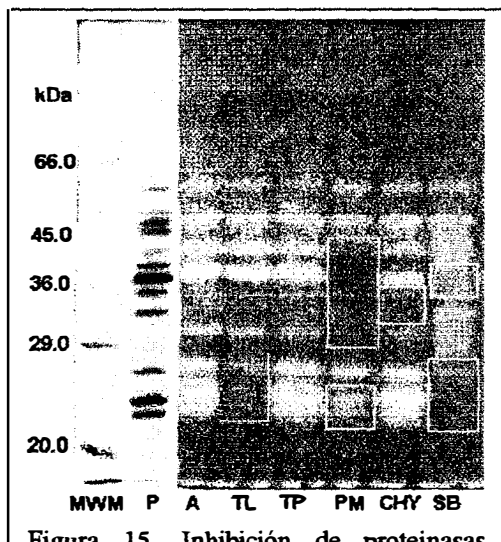


Figura 15. Inhibición de proteinasas presentes en el jugo gástrico de hembras de la especie *C. bellicosus*. MWM= Marcador de masa molecular, P= Proteína, A=actividad de proteasas (control), TL= TLCK, TP= TPCK, PM= PMSF, CHY= quimostatina, SB= SBTI.

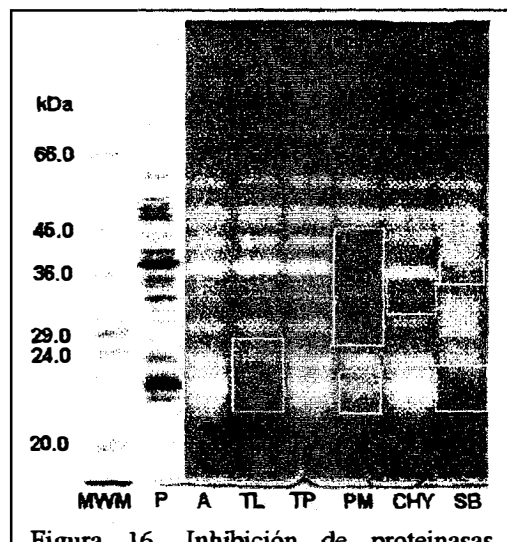


Figura 16. Inhibición de proteinasas presentes en el jugo gástrico de machos de la especie *C. bellicosus*. MWM= Marcador de masa molecular, P= Proteína, A=actividad de proteasas (control), TL= TLCK, TP= TPCK, PM= PMSF, CHY= quimostatina, SB= SBTI.

Analizando el perfil de proteinasas de los géneros (hembra y macho) de la especie *C. arcuatus* en el carril de quimostatina, se observa una diferencia en la inhibición de bandas de tipo quimotripsina, ya que en hembras inhibición es evidente, mientras que en machos no; dichas bandas inhibidas se presentan a 28 y 31 kDa (figuras 17 y 18).

Esta especie también tiene la presencia de proteinasas de tipo tripsina en un rango de 20-25 kDa, sólo se observan tres bandas bien definidas en este rango (20, 23 y 25 kDa), esto puede visualizarse en el carril de muestras incubadas con TLCK, PMSF y SBTI.

Las bandas parcialmente identificadas como serin proteinasas se encuentran a 41 y 43 kDa. Y dos más no identificadas en la región de 54 y 63 kDa.

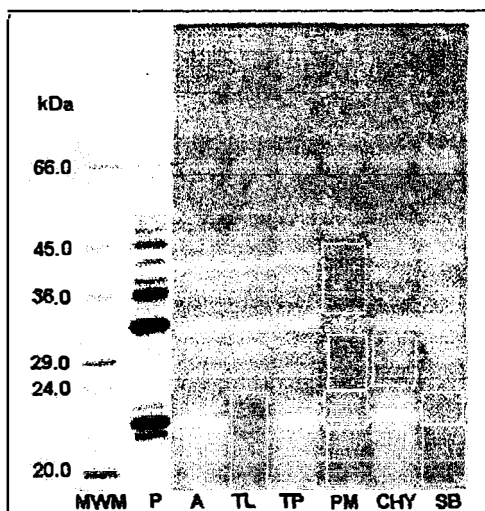


Figura 17. Inhibición de proteinasas presentes en el jugo gástrico de hembras de la especie *C. arcuatus*. MWM= Marcador de masa molecular, P= Proteína, A=actividad de proteasas (control), TL= TLCK, TP= TPCK, PM= PMSF, CHY= quimostatina, SB= SBTI.

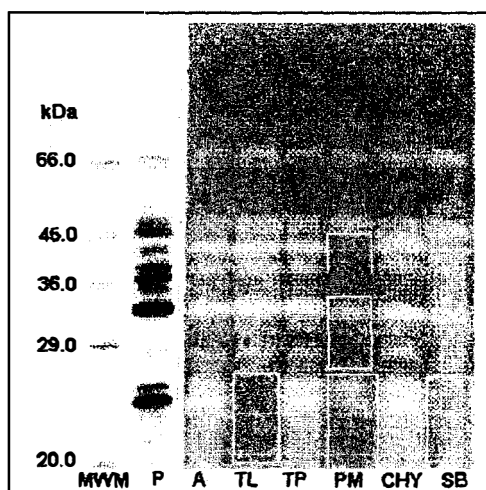


Figura 18. Inhibición de proteinasas presentes en el jugo gástrico de machos de la especie *C. arcuatus*.

MWM= Marcador de masa molecular, P= Proteína, A=actividad de proteasas (control), TL= TLCK, TP= TPCK, PM= PMSF, CHY= quimostatina, SB= SBTI

DISCUSIÓN

La Biotecnología moderna es una actividad multidisciplinaria, que permite el estudio integral y la manipulación de los sistemas biológicos. A partir de esto, se busca el uso inteligente y respetuoso de la biodiversidad, mediante el desarrollo de tecnología eficaz, limpia y competitiva para facilitar la solución de problemas importantes de los sectores productivos de un país (Bolívar-Zapata, 2001).

Es importante tener en cuenta que los organismos están sujetos a factores anatómicos, fisiológicos y ecológicos; la combinación de estos determina el comportamiento del organismo. Por ello con la comprensión de cada uno de los fenómenos que rigen a un organismo nos será posible aprovechar al máximo este recurso.

Este trabajo contribuye al conocimiento de la fisiología de un grupo importante de los invertebrados: los braquiuros, estos cangrejos se encuentran en diferentes hábitats, dando como resultado una gran variedad de proteasas adaptadas a diferentes entornos. Estas proteasas presentan características especiales, las cuales pueden ser aprovechadas en un sin fin de procesos industriales que involucren alguna transformación proteolítica, incluso, éstas pueden servirnos para estudios de adaptación, digestibilidad, taxonomía, entre otros.

Sobrevivencia y comportamiento de los organismos en el laboratorio

Los cangrejos del género *Callinectes* sp. son organismos que pueden ser fácilmente obtenidos en la región ya que son abundantes. Se considera que son resistentes al manejo en la recolección, transporte y adaptación al laboratorio húmedo. El mantenimiento no es costoso, ya que no requieren de alimentación especial o condiciones especiales a las predominantes en el laboratorio.

En cuanto al comportamiento la especie *C. arcuatus* podemos decir que ésta es más agresiva que *C. bellicosus*, por tanto el manejo de esta última es menos complicado. Por especie, detectamos que el género femenino era más agresivo y esto coincide con lo

descrito por Jivoff y Hines (1998) quien indica que la diferencia de comportamiento radica en las variaciones de los niveles hormonales de estas.

En trabajos futuros se recomienda utilizar organismos que hayan completado todo el ciclo de muda, del género masculino. Esto es porque durante el ciclo de muda, el organismo experimenta cambios fisiológicos y bioquímicos significativos (Chang, 1995). La preferencia del género masculino radica en que estos organismos son menos agresivos que las hembras, son de mayor tamaño, facilitando así la extracción de jugo gástrico.

Estos organismos nos ofrecen la viabilidad de obtener el jugo gástrico, ya que éste contiene las proteinasas responsables de la digestión de proteína, es posible realizar ensayos de digestibilidad en un mismo organismo, así no habría necesidad de sacrificarlo para la obtención del hepatopáncreas. Con ello los resultados de los experimentos serían más certeros ya que se eliminaría la variación entre organismos, además de que se ahorraría en el costo y espacio de los experimentos.

Proteínas y proteinasas presentes en jugo gástrico, hepatopáncreas y estómago

Según lo descrito por Bliss, 1982, Dall y Moriarty, 1983; Icely y Nott, 1992; McGaw y Reiber, 2000; Ruppert y Barnes, 1996, las enzimas presentes en el estómago de los braquiuros provienen del hepatopáncreas. Por ello, no se esperaba encontrar proteinasas en el tejido del estómago, a pesar de esto, por lo que la actividad registrada puede atribuirse a contaminación, ya que el lavado que se hizo no fue suficiente, permaneciendo así, una pequeña cantidad de jugo gástrico, dentro de la cámara membranosa. Comparando el perfil de proteinasas en el hepatopáncreas y jugo gástrico observamos que, en términos cualitativos, es igual, lo cuál indica que las enzimas son vaciadas al estómago y no producidas por éste. Así que la digestión de proteína se da por proteinasas del hepatopáncreas.

En cuanto al perfil de proteínas podemos decir que las proteínas de alta masa molecular (>66 kDa) presentes en los extractos de estómago y hepatopáncreas, pueden ser proteínas de la membrana celular, ya que estas muestras provienen de tejidos homogenizados.

Diferencias entre género y especie en la concentración de proteína, actividad enzimática de proteinasas digestivas del jugo gástrico

Probablemente las variaciones en el perfil de proteína de los organismos se deben a la presencia de proteína del alimento. A pesar de que los organismos no habían ingerido alimento el día del muestreo, algunos aún tenían restos de calamar sin ingerir; según McGaw y Reiber (2000) la cámara se vacía después de 8 a 10 h después de la ingesta del alimento.

Si bien sólo se encontraron diferencias cuantitativas entre el perfil de proteínas y proteinasas entre machos y hembras de la misma especie, la concentración de estas varía según el organismo. Dichas variaciones pueden deberse a condiciones externas como el ayuno (Mulhia-Almazán y García-Carreño, en revisión), calidad y cantidad de proteína en el alimento (Córdova-Murueta, 2002) e internas del organismo como etapa ontogénica del organismo, (Gawlicka, et al., 2000; Fang y Lee, 1992, Lovett y Felder, 1990, Lemos, et al., 1999), estadio de muda (Chang, 1995, Vega-Villasante, et al., 1999), género (Noriega y Wells, 1999), ciclo circadiano (Hernandez-Cortes, 1999).

La variabilidad encontrada entre los organismos ya sea, de la misma especie y género (macho y hembra), nos refuerza más la ventaja que nos ofrece estos organismos de dar el seguimiento de un sólo cangrejo en los experimentos.

pH óptimo de las proteinasas presentes en el jugo gástrico de cangrejos del género *Callinectes* sp.

El valor de pH óptimo es considerado un parámetro operacional ya que se obtiene bajo ciertas condiciones, incluso estas, pueden no ser las predominantes en el sitio de donde se aisló. Generalmente bajo ésta condición se presenta una mayor actividad enzimática, esto

puede atribuirse a dos razones: que la enzima es más estable en esta condición o tiene influencia en la unión y catálisis (Whitaker, 1994).

Estudios anteriores en insectos nos indican que las enzimas digestivas de coleópteros y lepidópteros presentan una mayor actividad a valores de pH 10-11 y algunos organismos de 6-7 (Purcell, et al., 1992; Ortego, et al., 1996).

En decápodos, se sabe que el pH óptimo es de 7-8 para *Homarus americanus* y *Panulirus japonicus* (Brockhoff, 1970; Galgani, y Nagayama, 1987). Las proteasas digestivas en hepatopáncreas de los braquiuros *Geryon affinis* y *Chionoectes japonicus*, presentan un pH óptimo de 6-7 (Galgani, y Nagayama, 1988). Dendinger (1987), encontró que las proteasas del hepatopáncreas de *C. sapidus* presentaban una mayor actividad a pH 6.2, aún a pH 7.5 conservaba el 90% de la actividad total.

McGaw y Reiber (2000) describieron que el tiempo de residencia del alimento en el estómago es de 8-10 h, y el de digestión total (vaciado total del aparato digestivo) es de 18-24. Con lo anterior y sabiendo que el pH del jugo gástrico varía entre 5.8 y 6.2, podemos decir que el organismo digiere el alimento eficientemente, lo cual facilita el paso de moléculas más pequeñas al hepatopáncreas, las cuales serán digeridas y absorbidas por células especializadas. Con el fin de confirmar esto, es necesario realizar un experimento donde se haga un balance de materia y energía en el organismo.

Podemos decir que el rango de pH óptimo encontrado en este trabajo para ambas especies (6.0 a 8.0), es el que predomina entre las proteínas digestivas de los decápodos. Esta información nos es de mucha utilidad para la evaluación de digestibilidad in vitro, ya que el pH al que se realizan las evaluaciones es de 8.0 (Tonglet, et al., 2001), así que éste es estadísticamente igual al pH óptimo (7.0) y al predominante en el estómago del género *Callinectes* sp.

Temperatura óptima de las proteinasas presentes en el jugo gástrico de cangrejos del género *Callinectes* sp.

Este valor es también un parámetro operacional ya que es un dato obtenido bajo condiciones especiales. Este factor afecta a la reacción enzimática, pues influye en la estabilidad de la molécula, pH del medio, afinidad de las enzimas a inhibidores o activadores. Dicho valor debe ir acompañado del tiempo de reacción ya que entre mayor sea la temperatura, la velocidad de reacción incrementa dentro de un pequeño intervalo de tiempo, para después decrecer, la causa de ello es que la tasa de desnaturalización de la enzima se incrementa.

Si comparamos el resultado obtenido en este trabajo (55 °C) con lo reportado en los braquiuros *Geryon affinis* y *Chionoectes japonicus* (45-55 °C), en la langosta *Panulirus japonicus* (60 °C); podemos decir que la temperatura óptima promedio para decápodos está alrededor de 53 °C. Dicho valor será útil para su posible uso, en la industria alimentaria ya que existen procesos que requieren de una proteólisis a altas temperaturas.

Caracterización de proteinasas presentes en el jugo gástrico de *C. bellicosus* y *C. arcuatus*

Al igual que en otro decápodos, las proteinasas de los organismos del género *Callinectes*, presentan un gran porcentaje de actividad serin-proteolítica, y gran parte de esta actividad puede ser atribuida a enzimas con actividad de tripsina y quimotripsina. (Galgani y Nagayama, 1987; García-Carreño, 1992b; García-Carreño y Haard, 1993; García-Carreño y Hernández-Cortés, 1995; Lemos, et al.,1999; Lemos, et al., en prensa; Fernández Gimenez, et al. 2001; Fernández Gimenez, et al., en prensa)

Las tripsinas del género *Callinectes* sp. se presentan alrededor de 20.0-25.0 kDa, y las quimotripsinas de 28.0 y 31 kDa para el caso de *C. arcuatus* y de 33.0 y 37.0 kDa *C. bellicosus*. En ambas especies se encuentran otras serin proteinasas, posiblemente alguna de ellas tenga actividad colagenolítica, ya que los braquiuros al ser carroñeros presentan proteinasas con esta actividad (Klimova, et al., 1990; Galgani y Nagayama, 1988).

Al igual que en el presente trabajo, Fernández Gimenez (2001) también encontró proteínas con actividad proteolítica (masa molecular > 66kDa), se requerirá del uso de inhibidores de otro tipo de proteinasas para identificar la actividad específica de estas.

CONCLUSIONES

Los cangrejos del género *Callinectes* sp. pueden considerarse buenos modelos para describir el fenómeno de la digestión en decápodos, ya que son organismos relativamente fáciles de capturar, no requiere de condiciones especiales de mantenimiento, durante su ciclo biológico presenta menos estadios ontogénicos y durante el estadio adulto, se interrumpe el ciclo de muda.

Al llegar a una talla mayor a 9 cm, es posible la extracción de jugo gástrico, ya que las proteinasas presentes en él son las mismas a las del hepatopáncreas, es posible realizar estudios, en el mismo organismo, sobre el efecto de diversos factores sobre la regulación de la actividad proteolítica; además de estudio de digestibilidad in vitro.

En el género *Callinectes* sp., la cantidad de proteína y la actividad proteolítica son factores que varían según la especie y el género (macho y hembra).

Las proteasas presentes en el jugo gástrico de *Callinectes* sp. presentan actividad máxima en un rango de pH de 6.0 a 8.0 a una temperatura de 55 ° durante 10 minutos.

En el jugo gástrico del género *Callinectes* sp. se encuentran proteinasas de tipo serina, las cuales en su mayoría son de tipo tripsina y quimotripsina.

REFERENCIAS

- Alarcón, F.J., Díaz, M, Moyano, F.J. y Abellán, E. 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiol. Biochem.* 19:257-267.
- Beynon, R. y Bond, J.S. 2001. Proteolytic enzymes. Oxford University Press. 2da. edición. Reino Unido. 340 pp.
- Bjarnason, J.B., Mantyla, E.O. y Ásgeirsson, B. 1990. Purification and characterization of proteolytic digestive enzymes from the pyloric caeca of Atlantic cod. En: Walther, B.T. y Fyhn, H.J. (ed.). Physiological and biochemical aspects of fish development. Grafisk Hus. Bergen, Noruega. 240-246.
- Bliss, D.E. 1982. Shrimps, lobsters and crabs. Their fascinating life history. Columbia University Press. Nueva York, EUA. 242 pp.
- Bolivar-Zapata, F. 2001. Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: Retos y oportunidades. CONACyT. México
- Boyce, C.O.L. 1986. Novo's handbook of practical biotechnology. Novo Industry A/S. 2da. edición. Bagsvaerd, Dinamarca. 125 pp.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brockerhoff, H., Hoyle, R.J. y Hwang, P.C. 1970. Digestive enzymes of the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board Can.* 27(8):1357-1370.

- Brusca, R.C. 1980. Common Intertidal Invertebrates of the Gulf of California. The University of Arizona Press. 2da. edición. Tucson, USA
- Brunet, M., Arnaud, J. Mazza, J. 1994. Gut structure and digestive cellular processes in marine crustacea. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 32:335-367.
- Chang, E.S. 1995. Physiological and biochemical changes during molt cycle in decapod crustaceans: an overview. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 193:1-14.
- Córdova-Murueta, J.H. 2002. Digestión de proteína en camarones peneidos. Tesis Doctorado en uso, manejo y preservación de los recursos naturales. CIBNOR. La Paz, BCS. México. 34 pp.
- Dall, W. y Moriarty, D.J.W. 1983. Functional aspects of nutrition and digestion. En Mantel, L.H. (ed.). *The biology of Crustacea. Vol. 5. Internal Anatomy and physiological regulation.* Academic Press Inc. Nueva York, EUA. pp. 215-261.
- Dendinger, J.E. 1987. Digestive proteases in the midgut gland of the atlantic blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B(2):503-506.
- De Souza Bezerra, R., Ferreira Dos Santos, J., Da Silva Lino, M.A., Almeida Vieira, V.L. y Becerra Carvalho, L. 2000. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *J. Food Biochem.* 24:189-199.
- Díaz-Lopez, M. y García-Carreño, F.L. 2000. Applications of fish and shellfish enzymes in food and feed products. En: Haard, N.F. y Simpson, B.K.(ed.). *Seafood enzymes. Utilization and influences on postharvest seafood quality.* Marcel Dekker, Inc. Nueva York, EUA. 571-618.

- Dionysius, D.A., Hoek, K.S., Milne, J.M. y Slattery, S.L. 1993. Trypsin-like enzyme from sand crab (*Portunus pelagicus*): Purification and characterization. *J. Food Sci.* 58(4):780-792.
- Eckert, R., Randall, D., Augustine, G. 1992. Fisiología animal. Mecanismos y adaptaciones. 3ª edición. Interamericana-Mc Graw Hill. Madrid, España. 683 pp.
- Fang, L.-H. y Lee, B.-N. 1992. Ontogenic change of digestive enzymes in *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. and Physiol.* 103B(4):1033-1037.
- Fernández Gimenez, A.V., García-Carreño, F.L., Navarrete del Toro, M.A, Fenucci, J.L. 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. *Comp. Biochem. and Physiol.* 130B, 331-338.
- Fernández Gimenez A.V., García-Carreño F.L., Navarrete del Toro M.A., Fenucci J.L. 2002. Digestive proteinases of *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae) and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology*. En prensa.
- Galgani, F. y Nagayama, F. 1987. Digestive proteinases in the japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 87(4):889-893.
- Galgani, F. y Nagayama, F. 1988. Digestive proteolysis and digestive proteinases in deep sea crabs *Geryom affinis* and *Chionocetes japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 54(6):983-987.
- García-Carreño, F.L. 1991. Proteases in food technology. *Biotech. Educ.* 2(4):150-153.
- García-Carreño, F. 1992a. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnol. Educ.* 4(3), 145-150.

- García-Carreño, F. 1992b. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, decapoda): their partial characterization and effect of feed on their composition. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 103:575-578.
- García-Carreño, F.L., y Haard, N.F. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncondes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17:97-113.
- García-Carreño, F.L., Dimes, L.E. y Haard, N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* (214): 65-69.
- García-Carreño, F. L. and N. F. Haard. 1994. Preparation of an exopeptidase-enriched fraction from the hepatopancreas of decapods. *Proc. Biochem.* 29: 663-670.
- García-Carreño, F.L., Hernández-Cortés, M.P. y Haard, N.F. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from digestive systems of a freshwater and marine decapod. *J. Agric. Food. Chem.* 42:1456-1461.
- García-Carreño, F.L. y Hernández-Cortés, M.P. 1995. Proteasas digestivas de la langostilla. En: Aurióles-Gamboa, D. y Balart, E.F. (ed.). La langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento. CIBNOR, S.C. 207-219.
- García-Carreño, F. y Navarrete del Toro, M. 1997. Classification of proteases without tears. *Biochem. Educ.* 25(3), 161-167.
- García-Carreño, F.L., Albuquerque-Cavalcanti, C. Navarrete del Toro, M.A. y Zaniboni-Filho, E. 2002. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 132:343-352.

Gawlicka, A., Parent, B., Horn, M.H., Ross, N., Opstad, I. y Torrissen, O.J. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*. 184:303-314.

Haefner, P.A.Jr. 1985. The biology and exploitation of crabs. En: Bliss, D.E. (ed.). The biology of Crustacea. Vol. 10. Provenzano, A.J. Jr.. Economic aspects: Fisheries and culture. Academic Press Inc. Florida, EUA. 330 pp.

Hernandez-Cortes, P., Quadros-Seittfer, W., Navarrete del Toro, A., Portillo, G., Colado, G. y García-Carreño, F. Rate of ingestion and proteolytic activity in digestive system during continous feeding of juveniles shrimps. *Journal of Applied Aquaculture*. 9, 35 - 45,. 1999.

Hernández-Moreno, L.G. 2000. Aspectos sobre la ecología y biología de las jaibas *Callinectes arcuatus* y *C. bellicosus* (Crustacea:Portunidae) en la laguna costera Las Guásimas, Sonora, México. Tesis de maestría. CIBNOR. La Paz, México. 56 pp.

Icely, J.D. y Nott, J.A. 1992. Digestion and absorption: Digestive system and associated organs. En: Harrison, F.W. y Hummes, A.G. (ed.) Microscopic anatomy of invertebrates. Vol. 10. Decapod Crustacea. Wiley-Liss, Inc. Nueva York, EUA. pp. 147-201

Jivoff, P., Hines, A.H. 1998. Female behaviour, sexual competition and mate guarding in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Anim. Behav.* 55:589-603

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

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

Lemos, D., Hernandez-Cortes, M.P., Navarrete, A., Garcia-Carreño, F.L. y Phan, V.N. 1999. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larval and postlarval pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Mar.Biol.* 135: 653-662.

Lemos, D.; Hernández, P.; Sánchez, A.; Navarrete, A.; Garcia-Carreño, F.L. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA contents in the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*. En impresión.

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

McGaw, I.J. y Reiber, L. 2000. Integrated physiological responses to feeding in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Biol.* 203:359-368.

Moyano, F.J., Alarcón, F.J. y Díaz, M. 1998. Comparative biochemistry of fish digestive proteases applied to the development of in vitro digestibility assays. *Trends Comp. Biochem, Physiol.* 5:135-142.

Mulhia-Almazán, A. y García-Carreño, 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. (En revisión).

Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2000. Lehninger. Principles of Biochemistry. Worth Publishers. 3ra. edición. Nueva York, EUA. 1152 pp.

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

Ortego, F., Novillo, C. y Castañera, P. 1996. Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32:163-180.

Provenzano, A.J.Jr. 1985. Culture of crustaceans: General principles. En: Provenzano, A.J.Jr. (ed.). *The Biology of Crustacea*. Vol. 10. Economic aspects: Fisheries and culture. Nueva York, EUA. pp 249-268.

Purcell, J.P., Greenplate, J.T. y Sammons, R.D. 1992. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22(1):41-47.

Ruppert, E.E. y Barnes, R.D. 1996. *Zoología de los invertebrados*. McGraw Hill-Interamericana. 6ta. Edición. 1114pp.

Schmidt-Nielsen, K. 1981. *Fisiología Animal*. UTEHA. 1era. Edición. México, DF. 220 pp.

Shamsuzzaman, K., Haard, N.F. 1985. Milk clotting and cheese making properties of a chymosin-like enzyme from harp seal mucosa. *J. Food Biochem.* 9:173-192.

Simpson, B.K. y Haard, N.F. 1987. Cold-adapted enzymes from fish. En: Knorr, D. (ed.). *Food Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, EUA. 495-527.

StatSoft, Inc. 1995. *STATISTICA for Windows*. Computer program manual. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, EUA.

Stauffer, C. 1989. Effect of pH on activity. En: Enzymes assay for food scientist. Avi press. Nueva York.

Svendensen, P. 1976. Introducción a la Fisiología Animal. ACRIBIA. Zaragoza, España. 216 pp.

Tonglet, C., Jeusette, I., Istasse, L. y Diez, M. 2001. Prediction of protein digestibility in dog food by a multi-enzymatic method: a useful technique to develop. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 85:189-194.

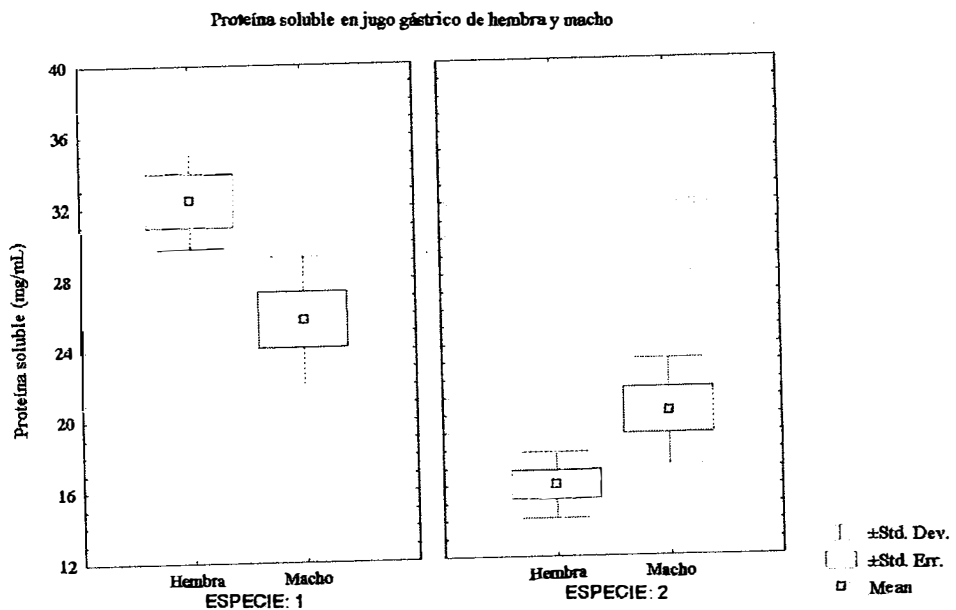
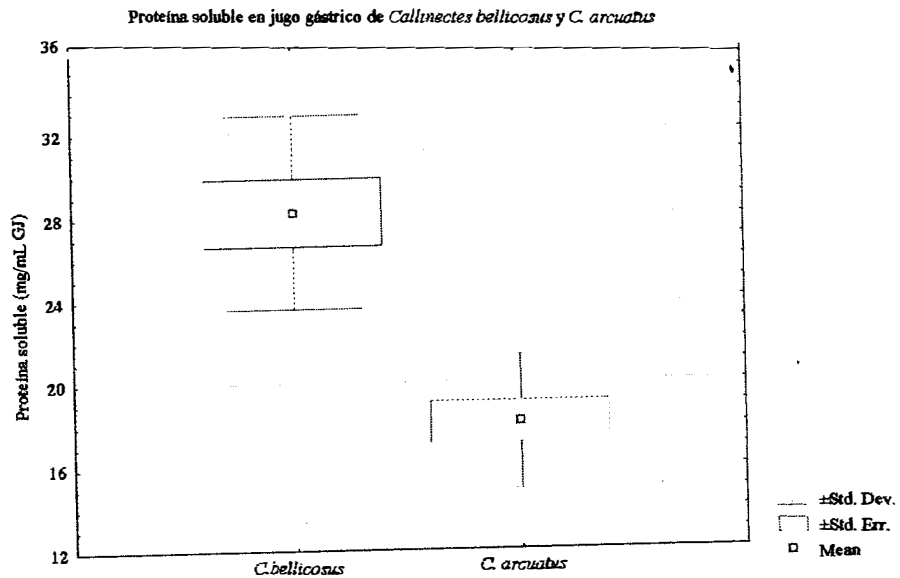
Vega-Villasante, F., Fernández, I., Preciado, R.M., Oliva, M., y Nolasco, H. 1999. The activity of digestive enzymes during the moulting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Orway, 1983 (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Bull. Mar. Sci.* 65(1):1-9.

Whitaker, J.R. 1994. Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker, Inc. 2da. edición. Nueva York, EUA. 625 pp.

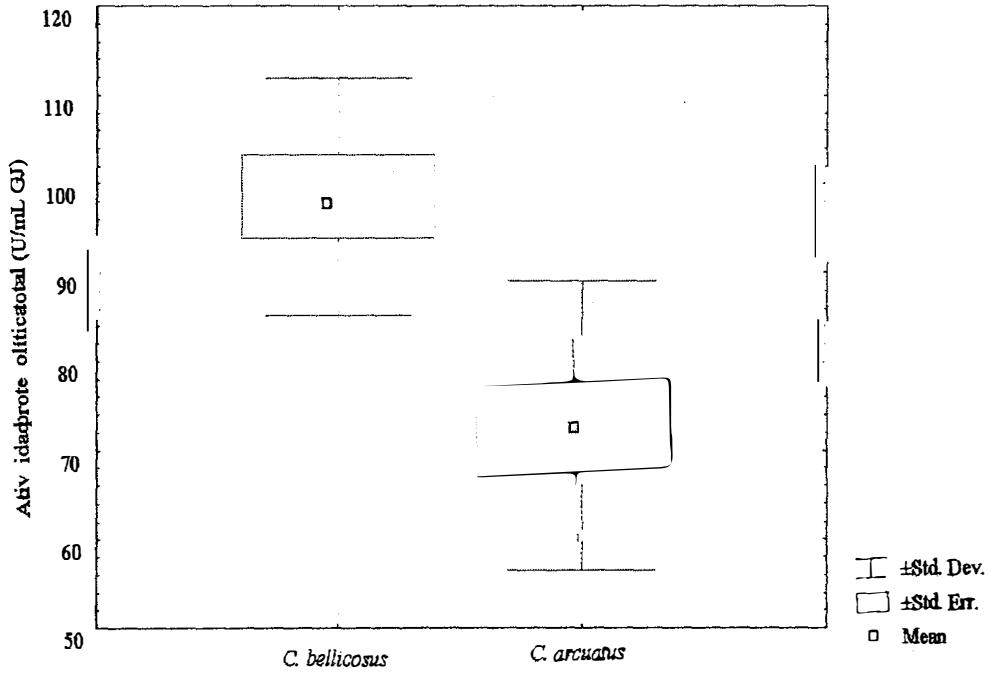
Zhu, Y.-H. Baker, J.E. 1999. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNA from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29:1053-1063.

ANEXO 1

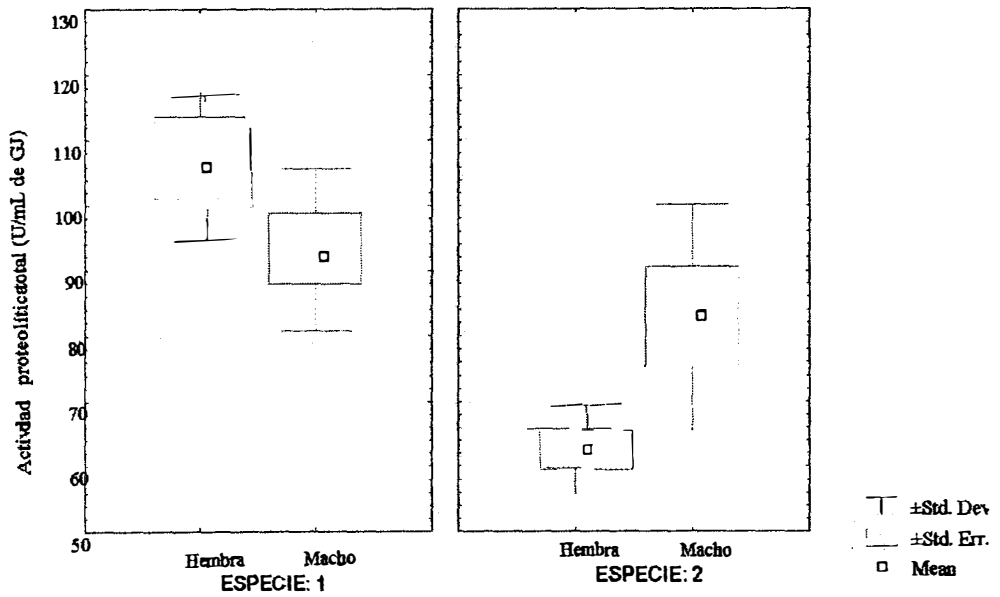
Gráficos resultantes del ANDEVA anidado para la proteína soluble y actividad total del jugo gástrico de *C. arcuatus* y *C. bellicosus*.



Actividad proteolítica total en jugo gástrico
de *Callinectes bellicosus* y *C. arcuatus*

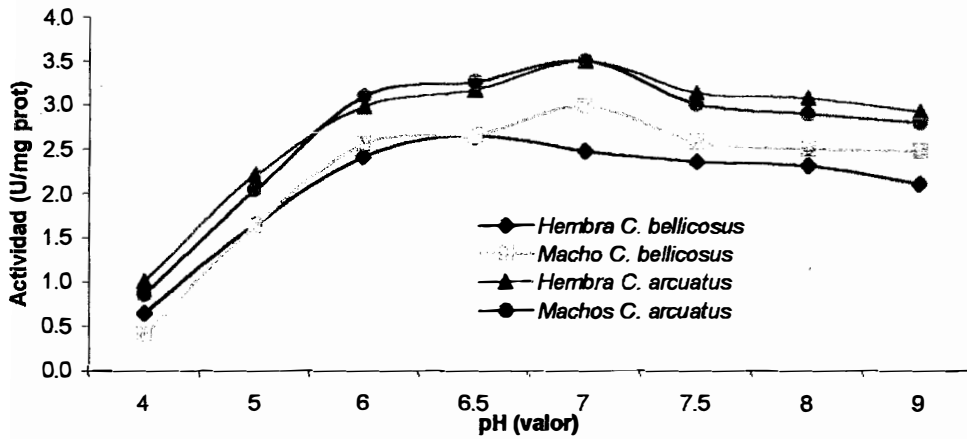


Actividad proteolítica total en jugo gástrico de hembras y machos
1: *C. bellicosus*, 2: *C. arcuatus*



ANEXO 2

Gráficos resultantes de la actividad total del jugo gástrico de *C. arcuatus* y *C. bellicosus* en ambos géneros, a diferentes valores de pH y temperaturas.



ANEXO 3

Características de los inhibidores utilizados en este trabajo (Beynon y Bond, 2001).

PMSF: Es una molécula que inhibe a todas las serin proteinasas mediante una reacción irreversible. Presenta una masa molecular de 174.2. La concentración efectiva es de 0.1 a 1 mM, presenta una vida media de 1h a pH 7.0.

Quimostatina: Inhibidor reversible que actúa sobre proteinasas con actividad de quimotripsina y de algunas cisteín proteinasas. Su masa molecular es de 604.7. Es estable por varias horas, principalmente se usa en concentraciones de 10-100 μ M.

SBTI: Inhibidor protéico de alta masa molecular (20 100), que actúa sobre serin proteinasas en una concentración equimolar. Presenta una inhibición reversible y se disocia a valores bajos de pH.

TLCK: Inhibidor sintético que afecta la actividad proteolítica de enzimas de tipo tripsina. Es útil a bajas concentraciones (10-100 μ M), su acción es irreversible. Esta molécula cuenta con una masa de 332.5.

TPCK: Tiene una masa molecular de 351.5, inhibe enzimas con actividad quimotriptica en concentraciones de 10-100 μ M, es estable por varias horas.