



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS EN EL  
SISTEMA DIGESTIVO DE LA LANGOSTA ROJA  
(*Panulirus interruptus*)**

**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)

presenta

**Laura Evelia Celis Guerrero**

La Paz, B.C.S. Julio del 2003

## **COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR DE TESIS**

Dr. Fernando Luis García Carreño  
Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Mar Bermejo No. 195  
Col. Playa Palo de Santa Rita, Apdo. Postal 128. La Paz, Baja California Sur  
23090. México.

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta  
Asesor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Mar Bermejo No. 195  
Col. Playa Palo de Santa Rita, Apdo. Postal 128. La Paz, Baja California Sur  
23090. México.

Dr. Manuel Díaz López  
Asesor

Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. 04120. Almería, España.

## **MIEMBROS DEL JURADO DE LA DEFENSA DE TESIS**

Dr. Fernando Luis García Carreño

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Dr. Manuel Díaz López

M.C. José Arturo Sánchez Paz

## DEDICATORIA

Durante mi estancia de posgrado y en la realización de la tesis, se conjugaron una serie de situaciones y ejercicios que reflejan lo que plasmo a continuación. Así, este trabajo está dedicado a:

**Todas aquellas personas que al pasar de los años mantienen el espíritu de lucha,**

**aquellas que están convencidas que bajo cualquier circunstancia no hay cosa más patética que la indiferencia,**

**aquellas personas que en el hacer por los demás, no va implícito un sentimiento de sacrificio de sí mismo.**

Hay hombres que luchan un día  
y son buenos.

*Hay otros que luchan un año  
y son mejores.*

*Hay quienes luchan muchos años  
y son muy buenos.*

*Pero hay los que luchan toda la vida:  
esos son los imprescindibles.*

**Bertol Brecht**

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis agradecimientos a quienes de alguna manera contribuyeron en mi formación en esta etapa, no sólo en el aspecto académico, también en el aspecto humano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico ya que la realización de este posgrado hubiese sido compleja sin la beca que ofrece esta instancia de gobierno.

A todos aquellos que conforman la Dirección de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), por sus eficientes servicios y gestiones.

Al personal del Centro de Información y Biblioteca del CIBNOR, a Esther Ojeda, Susana Luna, Ana María Talamante y Antonio Díaz.

Al personal técnico del laboratorio de reproducción de especies marinas y al laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR. A la Biol. Cinthya Aldana y a la Biol. Carmen Rodríguez.

Al grupo de Bioquímica del CIBNOR. Al Dr. Fernando García por la dirección y por darme la oportunidad de participar en el proyecto RP10, por enseñarme a ver las cosas desde una perspectiva distinta y por que mantenemos una relación honesta y productiva a pesar de las diferencias. A la Tec. Angeles Navarrete mi agradecimiento por la asesoría no sólo en la parte técnica, por la paciencia y entrega hacia su trabajo. ¡Gracias por disfrutarlo!. A la Dra. Patricia Hernández por ayudarme a ampliar el horizonte de mis preguntas existenciales. Al Dr. Julio Córdova por las sugerencias en momentos claves del desarrollo de mi tesis y por la divertida compañía. Mi estancia de maestría no tendría el mismo sabor sin personajes como “el chamaco” (Julio Antonio Hernández) y “juanca’ón” (Juan Carlos Sainz), gracias por los momentos tan divertidos, por el cariño y sobretodo por la complicidad. En alguna etapa de la estancia disfruté de la compañía y sugerencias de compañeros y amigos como Cristiane Alburquerque, Mariana Díaz, Joaquín, Adriana Muhlia y Arturo Sánchez.

Al grupo de Nutrición Animal de la Universidad de Almería, España. Al Dr. Manuel Díaz por la apreciada asesoría y por el gusto de conocerle y conocer a su familia. A los Dres. Francisco Moyano, Javier Alarcón y Tomás Martínez, por las críticas y acertadas sugerencias de mi trabajo. La estancia en este grupo tuvo un lado muy emotivo gracias a la compañía y amistad de Lola, Bea Carmen, Jaime y Toñi. Cada uno me enseñó una faceta distinta del sureste de España.

A mis compañeros de maestría por la unidad que siempre han mostrado. Mi cariño para Azucena, Scarry, Arturo y Miguel Angel.

A Minerva Maldonado por mostrarme ese gran ser humano que es y que pocos tienen la oportunidad de conocer.

A Paola Magallón por la bonita amistad y por permitirme conocer esa hermosa familia que tiene. A ellos gracias por enseñarme a conocer más acerca de mí.

En general doy gracias a la vida por darme todas estas satisfacciones, pero creo que no hay más satisfacción por agradecerle que el tener la familia que tengo. Soy un ser humano pleno y feliz. Esta felicidad se magnifica por la forma en que se concluyó esta etapa de formación y todo esto, principalmente, es producto de como mi familia me enseñó a ver la vida: la vida es muy sencilla, nosotros la complicamos.

Esta etapa de formación no podía concluir mejor que con la llegada de skyolness, otro hermoso regalo que la vida me ofrece. Aprecio mucho tu individualidad y el compromiso que te caracteriza.

## RESÚMEN

Con la caracterización de proteasas digestivas se conocen algunos aspectos bioquímicos de la digestión de proteína. La eficiencia con que los organismos digieren y utilizan los componentes nutritivos depende de la presencia de ciertas enzimas proteolíticas. Conociendo qué clases y tipos se sintetizan, y cómo actúan, se podría diseñar un alimento digerible basado en el conocimiento de la capacidad fisiológica que tienen los organismos.

El objetivo de este trabajo fue describir y clasificar las principales proteasas que se encuentran en el sistema digestivo de la langosta roja *Panulirus interruptus*, así como observar su respuesta a variables físico-químicas. Esto se consiguió utilizando una serie de ensayos enzimáticos en tubo y SDS-PAGE, con sustratos específicos para proteasas de la clase serino e inhibidores específicos para clasificar la acción de proteasas del tipo serino y metalo. Se manejaron variables de pH y temperatura. De acuerdo a los resultados arrojados y a los estudios previos del tema, esta especie de crustáceo cuenta con proteasas digestivas compuestas en su mayoría por la familia serino, con masas moleculares de alrededor de 50 y 20 kDa y una de baja masa molecular (10 kDa). De este grupo de proteasas, la mayoría son del tipo tripsina, encontrando además, actividad del tipo quimotripsina. El rango de estabilidad de estas proteasas a variables físico-químicas fue amplio, siendo en pH, de 5 a 11 y en temperatura, de 10 a 50 °C con una hora de incubación. Los óptimos de actividad fueron pH 8-9 (en la región alcalina), pH 3 (en la región ácida) y temperatura de 50 °C, estando estos valores muy por encima de los que se presentan in vivo. Diferencias en la actividad específica por región de la glándula digestiva, así como diferencias intraespecíficas en el patrón enzimático, fueron algunos de los resultados encontrados. La utilización de jugo gástrico para futuros ensayos es una opción, ya que este extracto presentó una mayor actividad por mg de proteína y su obtención no requiere la disección de los organismos que son objeto de estudio.

Palabras clave: caracterización, proteasas, crustáceos.

## SUMMARY

By characterizing digestive proteases, it is possible to learn some biochemical aspects of protein digestion. The efficiency of organisms to digest and use nutritive components depends on the presence of proteolytic enzymes. Knowing what classes and types of proteases are synthesized and how they work could enable researchers to design feeds based on the physiological capacity of the organism.

The purpose of this work was to describe and classify the principal proteases located in the digestive system of the red lobster *Palinurus interruptus* and to observe their response to physico-chemical variables. To reach this objective, several enzymatic assays in test tubes and SDS-PAGE were performed. To classify the action of metallic and serine proteases, specific substrates and inhibitors were used. In all cases, pH and temperature were measured. According to previous studies, this species mostly uses digestive proteases from the serine family. Most molecular weights were around 20 and 50 kDa, and one with a weight of 10 kDa. Of these proteases, the majority was trypsin-like, but some were chymotrypsin-like. Stability was highest at one hour of incubation at 5 to 11 pH and 10 to 50°C. Enzymatic activity was optimal at 50°C and pH 8 to 9 in the alkaline region and pH 3 in the acid region. These values were obtained in vivo. Based on results for enzymatic activity in the digestive gland, there were significant differences. Finally, interspecific differences of the enzymatic pattern were also found. The use of gastric juice in one attractive option for future assays because of the high level of activity per mg protein, as well as its avoiding sacrifice of the animal.

Key words: characterization, proteases, crustaceans.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	0
1.1. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA ESPECIE .....	0
1.1.1. La muda .....	1
1.1.2. Hábitos alimentarios .....	1
1.2. LA DIGESTIÓN EN CRUSTÁCEOS .....	2
1.2.1. Sistema digestivo en crustáceos .....	2
1.2.1.1. Intestino Proximal .....	3
1.2.1.2. Intestino Medio .....	4
1.2.1.3. Intestino Distal .....	8
1.2.2. Diferenciación celular en túbulos de la glándula digestiva .....	8
1.2.2.1. Células Embrionarias (E) .....	8
1.2.2.2. Células Fibrillenzellen (F) .....	8
1.2.2.3. Células Blasenzellen (B) .....	9
1.2.2.4. Células Restzellen (R) .....	9
1.2.2.5. Células basales (M) .....	10
1.2.3. Aspectos relacionados con la digestión .....	10
1.2.3.1. Ontogenia y Alimentación .....	11
1.2.3.2. Muda y ayuno .....	12
1.2.3.3. Ciclo Circadiano .....	13
1.2.3.4. Estrés Ambiental .....	13
1.3. LAS PROTEASAS .....	14
1.3.1. Clasificación .....	14
1.3.2. Propiedades de las proteasas y parámetros operacionales .....	16
1.3.3. Principios teóricos en el estudio de proteasas digestivas .....	16
1.3.4. Las proteasas de origen marino y su importancia en los procesos biotecnológicos .....	20
1.4. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO DE LAS PROTEASAS DIGESTIVAS EN CRUSTÁCEOS .....	21
1.4.1. Características generales .....	21
1.4.2. Tripsinas .....	22
1.4.3. Quimotripsinas y colagenasas .....	24
1.4.4. Peptidasas y metalo proteasas .....	25
1.4.5. Proteasas de bajo peso molecular .....	26
2. HIPÓTESIS .....	27
3. JUSTIFICACIÓN .....	28
4. OBJETIVOS .....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
5.1. Organismos y extracción del sistema digestivo .....	30
5.2. Extracción enzimática de tejidos y fluidos gástricos .....	31
5.3. Cuantificación de proteína .....	31
5.4. Actividad de proteinasas alcalinas .....	32
5.5. Actividad de proteinasas ácidas .....	32
5.6. Cinética .....	33



5.7.	pH y temperatura óptima .....	33
5.8.	Estabilidad de las enzimas .....	33
5.9.	Actividad específica de proteinasas.....	33
5.10.	Ensayos de inhibición para evaluar los tipos de proteinasas.....	34
5.11.	Análisis electroforéticos para identificar patrones proteicos, actividad proteolítica e inhibición por inhibidores específicos. ....	35
5.12.	Técnicas Histológicas .....	36
6.	RESULTADOS.....	38
6.1.	Proteasas en el sistema digestivo .....	38
6.2.	Parámetros físico-químicos de las proteinasas encontradas.....	43
6.3.	Análisis histológico .....	46
7.	DISCUSIÓN .....	48
7.1.	Actividad en los extractos enzimáticos .....	48
7.2.	Diferencias intraespecíficas en la actividad y patrón proteolítico.....	50
7.3.	Diferencias entre lóbulos de la glándula digestiva .....	51
7.4.	Respuesta a inhibidores específicos .....	52
7.5.	Características de las proteinasas encontradas .....	53
7.6.	Parámetros físico-químicos de las proteinasas encontradas.....	54
8.	CONCLUSIONES .....	57
9.	LITERATURA CITADA.....	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema del tracto digestivo de especies de langosta y algunos decápodos, indicando las regiones que lo componen.....	2
<b>Figura 2.</b> Túbulo y diferenciación celular de la glándula digestiva en decápodos .....	7
<b>Figura 3.</b> Clasificación de las proteasas según la EC.....	14
<b>Figura 4.</b> Algunos sustratos sintéticos utilizados para la cuantificación de proteasas digestivas tanto de proteinasas ( <b>a</b> -BAPNA para tripsina, <b>b</b> -SAPNA para quimotripsina) como de peptidasas ( <b>c</b> -LPNA para leucinaminopeptidasa, <b>d</b> -HPA para carboxipeptidasa).....	18
<b>Figura 5.</b> Inhibidores sintéticos más utilizados en la detección de tipos enzimáticos. <b>a</b> ) TLCK, <b>b</b> ) PMSF <b>c</b> ) TPCK <b>d</b> ) EDTA y <b>e</b> ) EGTA. ....	20
<b>Figura 6.</b> Esquema que muestra como se disectó el sistema digestivo.....	30
<b>Figura 7.</b> Actividad enzimática en tejidos y fluidos de cuatro organismos, evaluada a pH 8 con azocaseína como sustrato. ....	38
<b>Figura 8.</b> Concentración de proteína en tejidos y fluidos en cuatro organismos.....	38
<b>Figura 9.</b> Concentración de proteína en cada sección de la glándula digestiva (a,b,c,d), en cuatro organismos.....	39
<b>Figura 10.</b> Actividad específica con sustratos sintéticos para tripsina (BAPNA) y quimotripsina (SAPNA), por sección de la GD en cuatro organismos. Las diferencias son comparadas por sección de la glándula en un organismo y para cada enzima..	39
<b>Figura 11.</b> Patrón proteolítico en 14 organismos mantenidos durante tres meses bajo las mismas condiciones de alimentación y ambientales. Al momento de tomar la muestra, la L9 presentaba un estadio D2; L13-16, 24 y 25 en estadio C; L17-23 en estadio D0. ....	40
<b>Figura 12.</b> SDS-PAGE para proteína y actividad proteolítica en los tres extractos enzimáticos: jugo gástrico (JG), glándula digestiva (GD) y contenido intestinal (CI). Actividad alcalina fue evaluada a pH 8.0 y la ácida a pH 2.0 y sólo en JG.....	41
<b>Figura 13.</b> Actividad proteolítica en gel mostrando las secciones de la glándula digestiva (GD) de dos organismos. Para todas las secciones se cargaron 10 mU de actividad. ....	41
<b>Figura 14.</b> Inhibición en gel de actividad proteolítica alcalina pH 8.0. Los inhibidores utilizados fueron PMSF (para serino proteasas), TLCK (tripsina), SBTI (tripsina y quimotripsina) y TPCK (quimotripsina). Ver discusiones para explicación de cómo se comportan los inhibidores (página 51). ....	42
<b>Figura 15.</b> Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica alcalina en extracto del jugo gástrico (JG) y de la glándula digestiva (GD). Actividad evaluada con azocaseína a pH 8.0 .....	43
<b>Figura 16.</b> Efecto del pH en la actividad proteolítica alcalina en extracto del JG y de la GD. Actividad alcalina evaluada con azocaseína a y la ácida con hemoglobina.....	44
<b>Figura 17.</b> Efecto del pH en la estabilidad de las proteasas alcalinas del extracto de la glándula digestiva (GD).....	45
<b>Figura 18.</b> Efecto del pH en la estabilidad de las proteasas alcalinas del jugo gástrico (JG). ....	45
<b>Figura 19.</b> Efecto de la temperatura en la estabilidad de las proteasas alcalinas del extracto de la glándula digestiva (GD). ....	45
<b>Figura 20.</b> Efecto de la temperatura en la estabilidad de las proteasas alcalinas del jugo gástrico (JG).....	45

- Figura 21.** Índice relativo del área del lumen de los túbulos a lo largo del par derecho de la glándula digestiva, desde la parte anterior hasta la posterior. Cada valor indica el tamaño del lumen (b) con respecto al tamaño del túbulo (a). ..... 46
- Figura 22.** Foto del par derecho de la glándula digestiva, indicando las áreas con los mayores índices de área del lumen. La parte que señala la flecha es la región que conecta la glándula digestiva a las cámaras gástricas. .... 46
- Figura 23.** Cortes transversales de los túbulos de la glándula digestiva (par derecho), en donde se muestran las diferencias en el tamaño del área del lumen del túbulo en diferentes regiones de la glándula. De las 99 laminillas que se obtuvieron y que correspondieron a todo el par derecho, la **a)** muestra la lámina número 13; **b)** lámina 49, región dorsal; **c)** lámina 49, región ventral; **d)** lámina 57, región ventral. .... 47

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Clasificación de las proteasas de acuerdo al mecanismo de catálisis, según la EC. ....	15
<b>Tabla II.</b> Clasificación de las proteasas desde un punto de vista evolutivo.....	15
<b>Tabla III.</b> El efecto de inhibidores sobre la hidrólisis de azocaseína .....	40
<b>Tabla IV.</b> Actividad amidasa en jugo gástrico (JG), glándula digestiva (GD) y contenido intestinal (CI), utilizando sustratos sintéticos específicos para tripsina (BAPNA) y quimotripsina (SAPNA). ....	43
<b>Tabla V.</b> Características de proteasas digestivas en algunas especies de crustáceos. ...	48

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA ESPECIE

La langosta es un recurso pesquero de importancia económica en México y entre los crustáceos uno de los más utilizados comercialmente. La producción Mexicana de este crustáceo depende de cinco especies situadas en aguas tropicales y subtropicales. Cuatro de estas especies se localizan a lo largo de la costa del Pacífico (*Panulirus interruptus*, *P. gracilis*, *P. inflatus* y *P. penicillatus*). La langosta roja espinosa *Panulirus interruptus* constituye la mayor producción de langosta en el Pacífico Mexicano que se refleja en la economía de la Península de la Baja California (Gracia y Kensler, 1980; Vega-Velázquez *et al.*, 1996). La distribución de la langosta roja comprende desde San Luis Obispo, California, U.S.A. hasta Bahía Magdalena Baja California Sur, localizándose la región de mayor abundancia en la parte central de la Península de Baja California, de Punta Abreojos a Isla de Cedros (26-28 °N y 114-116 °O). Sin embargo hay reportes en donde se han encontrado escasos ejemplares mas al sur entre Arroyo el Conejo y Todos Santos, así como en el Golfo de California (Gracia y Kensler, 1980; Vega-Velázquez *et al.*, 1996).

La langosta roja *P. interruptus* habita en fondos rocosos y rocoso arenosos, desde aguas someras hasta los 150 m de profundidad, en aguas frías subtropicales de la Corriente de California (Vega-Velázquez *et al.*, 1996). En las áreas donde se ha encontrado a este crustáceo, abunda un tipo de vegetación dominante compuesto de algas gigantes (*Macrocystis pirifera*) y algas coralinas. Los Palinúridos tienen hábitos nocturnos, permaneciendo ocultas durante el día en oquedades que les brindan protección de sus enemigos naturales (Gracia y Kensler, 1980). Entre los depredadores de la langosta roja se encuentran el pulpo *Octopus bimaculatus*, el pez *Pimelometopon pulchra* y diversas especies de los géneros *Paralabrax*, *Scorpaena*, *Sebastes* (Briones-Fourzan, 1992).

### 1.1.1. La muda

Los Palinúridos son especies longevas que viven más de 20 años y llegan a alcanzar alrededor de 200 mm de longitud cefalotorácica (LC). El crecimiento, como en todos los crustáceos, se lleva a cabo a través del proceso de muda. Se ha descrito que *Panulirus interruptus* muda una o más de una vez por año y en el trabajo realizado por Bodkin y Browne (1992), mencionan que esta especie muda una vez por año en el periodo de agosto-octubre. Según Vega-Velázquez *et al.* (1996), los machos llevan a cabo la muda antes del periodo de reproducción (marzo), mientras que las hembras lo hacen al terminar el ciclo reproductivo (octubre). Cabe resaltar que los tiempos señalados varían de acuerdo a los gradientes térmicos.

### 1.1.2. Hábitos alimentarios

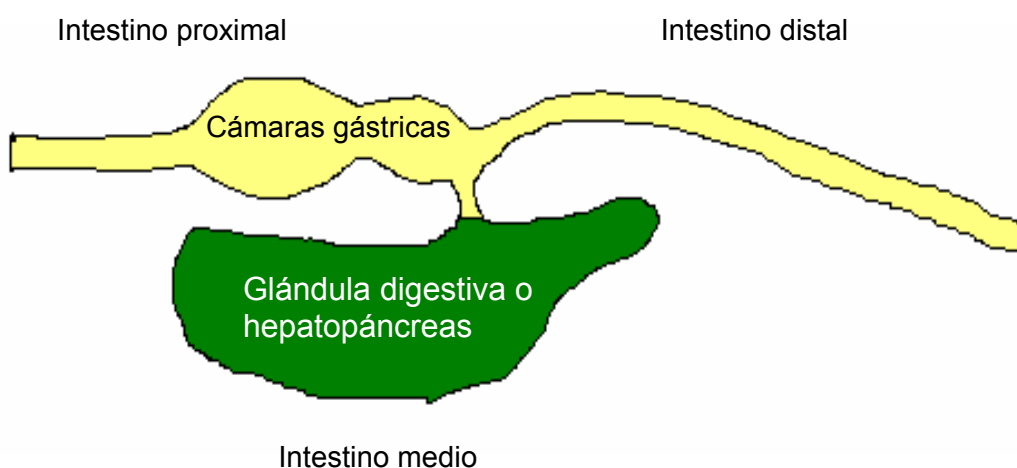
Las langostas espinosas son omnívoras, cambiando el hábito carnívoro a herbívoro dependiendo de las condiciones ambientales. La alimentación de las langostas se efectúa durante la noche principalmente, y en el día sólo en áreas muy protegidas. A menudo estos organismos adoptan hábitos carroñeros, aunque generalmente prefieren el alimento fresco al que se encuentra en estado de putrefacción. La dieta de *P. interruptus* consiste principalmente de gasterópodos, restos de peces, decápodos y algas rojas y cafés. Esta especie de langosta tiene preferencia por el pasto *Phyllospadix torrellyii* o sus epibiontes (Gracia y Kensler, 1980). Díaz-Arredondo y Guzmán del Prío (1995) describieron variaciones estacionales y diferencias en los patrones alimenticios entre machos y hembras de esta especie de langosta. Las diferencias observadas son relacionadas al estadio reproductivo de cada uno y a los movimientos cíclicos a lo largo del año.

## 1.2. LA DIGESTIÓN EN CRUSTÁCEOS

### 1.2.1. Sistema digestivo en crustáceos

Varios trabajos han descrito el tracto digestivo de algunos decápodos (Dall, 1967; Barker y Gibson, 1977; Gibson y Barker, 1979; Bell y Lightner, 1988; Dall, 1992; Icely y Nott, 1992; Brunet *et al*, 1994; Ceccaldi, 1998) realizando importantes contribuciones desde los primeros estudios en donde eran de tipo descriptivo, hasta los más recientes en donde se incluye la fisiología, bioquímica y biología molecular.

El tracto digestivo de decápodos es dividido en tres regiones (**Figura 1**)



**Figura 1.** Esquema del tracto digestivo de especies de langosta y algunos decápodos, indicando las regiones que lo componen.

- 1) Intestino proximal (“foregut”).- conformado por una cavidad bucal, un esófago corto y dos cámaras gástricas. Las paredes internas están constituidas por complejos de quitina y proteína, capa que es remplazada como parte del exoesqueleto en el momento de la ecdisis, así como las setas demolidoras localizadas en la parte posterior de la cámara cardiaca en decápodos mayores (Ceccaldi, 1998). En esta región se lleva a cabo el

proceso de digestión mecánica y química, a través de extracto enzimático proveniente de la glándula digestiva (Icely y Nott, 1992; Brunet *et al.*, 1994).

- 2) Intestino medio (“midgut”).- Región conformada por una glándula digestiva compuesta por cientos de túbulos que están formados por células diferenciadas (**Figura 2**). La glándula digestiva es un órgano fundamental en diversos procesos metabólicos. En el proceso digestivo tiene la función de sintetizar, excretar y almacenar biomoléculas que participan en este proceso. En algunos crustáceos se asocian dos divertículos a esta región (Barker y Gibson, 1977; Dall, 1992).
- 3) Intestino distal (“hindgut”).- sección situada entre el intestino medio y la región anal. En esta sección se lleva a cabo el transporte iónico y absorción de agua, además de compactar y transferir las excretas. Al igual que el intestino proximal, el intestino distal presenta una capa quitinosa. En algunos decapados, la síntesis de la membrana peritrófica se lleva a cabo en el intestino distal (Dall, 1967; Icely y Nott, 1992; Brunet *et al.*, 1994; Ceccaldi, 1998).

#### 1.2.1.1. Intestino Proximal

**Cavidad bucal.** Está asociada a apéndices especializados: maxíbula, maxila, mandíbula y maxilípedos. La parte anterior de la cavidad esta reforzada por una estructura, *hard labrum*, que previene el reflujo del alimento ingerido (Ceccaldi, 1998). Los crustáceos en estadio adulto seleccionan partículas a través de los órganos quimiorreceptores, anténulas, situados cerca de la cavidad bucal, mientras que en estadio larvario utilizan filtros y sistemas de desecho en los apéndices anteriores. Barker y Gibson (1977) mostraron que en especies de *Homarus* las mandíbulas no cumplen la función de masticar, sólo ayudan a sujetar



el alimento capturado por los pereiópodos y lo llevan hacia la cavidad bucal por los maxilípedos.

**Esófago.** Por lo general es corto y cilíndrico. Debajo del epitelio, en el tejido conectivo, están incluidas glándulas tegumentarias que cumplen la función de deposición y mantenimiento de la epicutícula, síntesis y secreción de mucopolisacáridos y amilasas. La densidad de las glándulas tegumentarias decrece conforme se llega hacia la cámara cardíaca (Barker y Gibson, 1977).

**Cámaras gástricas.** La mucosa es similar a la del esófago y carece de glándulas tegumentarias. Las paredes de las cámaras forman lamelas de varios tamaños, cepillos y agujas. Los depredadores y carroñeros tienen estructuras calcáreas en estas cámaras para triturar y separar partículas del alimento ingerido además de la selección de partículas con filtros localizados en la cámara posterior o pilórica (Ceccaldi, 1998). En la cámara cardíaca el alimento es mezclado con mucosidad proveniente de las glándulas tegumentarias del esófago, después el alimento es triturado por las estructuras calcáreas. En la cámara pilórica se localiza un filtro que permite el paso de pequeñas partículas de alimento hacia la glándula digestiva, pasando nuevamente las partículas muy grandes a través de válvulas cardio-pilóricas hacia la cámara cardíaca para ser reprocesadas y mezcladas con jugo enzimático proveniente de la glándula digestiva (Barker y Gibson, 1977).

#### 1.2.1.2. Intestino Medio

**Glándula digestiva.** La glándula digestiva o hepatopáncreas es el principal órgano digestivo en los crustáceos. Está involucrado en diferentes actividades metabólicas, incluyendo la digestiva, control neuroendócrino, maduración gonádica y ciclo de muda, por citar algunas (Harrison, 1990; Ceccaldi, 1998). Esta glándula es un órgano par con múltiples túbulos, situada entre las cámaras gástricas y el intestino. Cada par de este órgano es lobulado, variando el número

de lóbulos entre especies. Los pares, de forma independiente, se conectan por un conducto con la región posterior de la cámara pilórica. Cada par del órgano presenta un conducto primario que se divide en conductos secundarios, insertándose en cada lóbulo. Estos conductos secundarios se ramifican en pequeños conductos terciarios, que se conectan con los túbulos (unidad de la glándula digestiva donde se lleva a cabo la digestión final, **Figura 2**). Este sistema de conductos trae el alimento predigerido de las cámaras gástricas para su digestión extra e intracelular, y transporta enzimas digestivas, productos de desecho de la absorción y células degeneradas a las cámaras gástricas e intestino. La región intertubular está formada por tejido conectivo basofílico, senos hemolinfáticos, depósitos de polisacáridos y una variedad de desechos celulares. La capa celular simple formada en este órgano está en contacto directo con la hemolinfa, permitiendo una mejor absorción de nutrientes (Barker y Gibson, 1977; Ceccaldi, 1998).

La glándula digestiva está compuesta de cinco tipos celulares denominados: embrionarias (E), "fibrillenzellen" (F), "blasenzellen" (B), "restzellen" (R) y basales (M) dependiendo de estas células la función de la glándula (**Figura 2**). Por ejemplo, la presencia de células con micro vellosidades (R y F) muestra la función de absorción pero no está claro si ambas presentan la misma capacidad de absorción (Ceccaldi, 1998). El origen de cada tipo celular aún no está claro. Hay hipótesis que plantean que cada célula se origina de una separada línea, y que todas derivan de células E (Voght *et al.*, 1989). Otra hipótesis plantea que la diferenciación celular se da en una misma línea y se originan de la misma célula E (Gibson y Barker, 1979; Dall, 1992). Lo que sí se sabe es que hay una relación entre el estado nutricional y la estructura celular de la glándula digestiva (Chen, 1993).

El ciclo digestivo en la glándula digestiva toma alrededor de 24 horas. En *Penaeus semisulcatus*, las primeras heces son producidas 6 horas después de la ingestión

del alimento y contienen pocas células B (del ciclo previo) y poco material indigerido proveniente de las cámaras gástricas. La segunda columna de heces se produce entre las 10-12 horas y contiene mayor material indigerido. Entre 24-30 horas hay heces con mayor cantidad de células B y membranas provenientes de la glándula digestiva (Al Mohana y Nott, 1986).

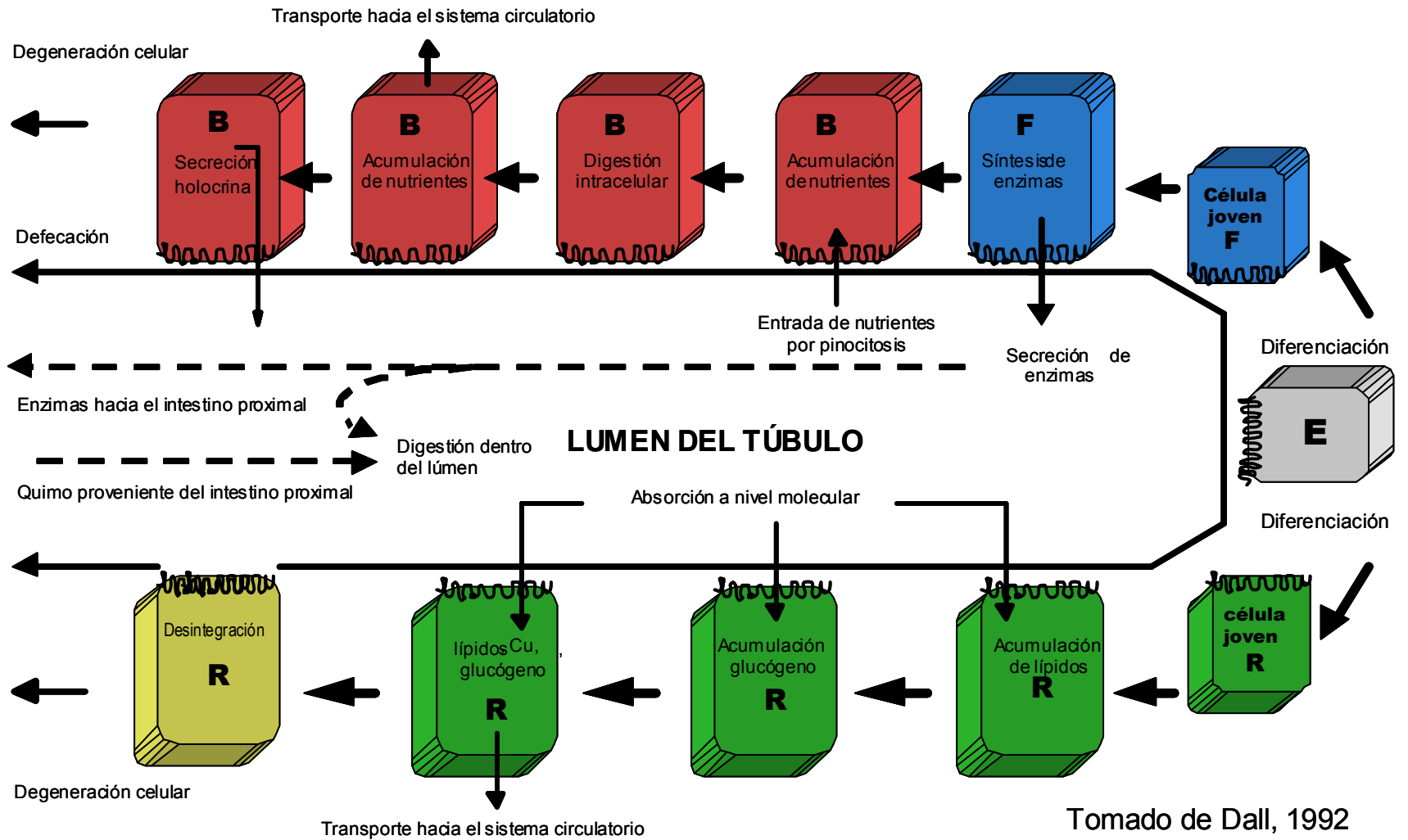


Figura 2. Túbulo y diferenciación celular de la glándula digestiva en decápodos

### 1.2.1.3. Intestino Distal

El intestino distal participa en el transporte iónico y absorción de agua, además de compactar y transferir las excretas. Esta región no muestra conductos sobre la epicutícula o atravesando la capa quitinosa. Se encuentran glándulas tegumentales con mayor abundancia en el segmento anterior del intestino distal. En condiciones de ayuno, se observa en el lumen del intestino células secretorias del hepatopáncreas, mientras que en alimentados se aprecia material fecal. El contenido intestinal siempre presenta mucopolisacáridos ácidos (Barker y Gibson, 1977; Dall 1967).

## 1.2.2. Diferenciación celular en túbulos de la glándula digestiva

### 1.2.2.1. Células Embrionarias (E)

De las células E se derivan todos los tipos celulares, no están especializadas y poseen un gran núcleo respecto al tamaño celular. La región apical no posee borde de cepillo y por lo general están en proceso de mitosis. Este tipo celular tiene comportamientos distintos a lo largo del ciclo de la muda (Al Mohanna *et al.*, 1985a; Al Mohanna y Nott , 1989).

### 1.2.2.2. Células Fibrillenzellen (F)

Son basófilas y más largas que las R, tienen borde de cepillo y se localizan en la región central del túbulo. Sintetizan y exocitan zimógenos hacia el lumen tubular y una vez que los zimógenos son activados son transportados hacia las cámaras gástricas para la digestión extracelular dos horas después de alimentarse. Después de ese tiempo, las células F toman el material para la digestión intracelular y se diferencian en células B. La máxima frecuencia de las células F se presenta en el estadio de posmuda (AB) y junto con células R, dominan el epitelio

(Al Mohanna *et al.*, 1985a; Al Mohanna y Nott , 1989). Recientemente Lehnert y Johnson (2002) encontraron la expresión de los genes de enzimas digestivas y de la hemocianina en las células F de *Penaeus monodon*.

#### 1.2.2.3. Células Blasenzellen (B)

La principal función de absorción y digestión se lleva a cabo por células B. Sin embargo, en el citoplasma de estas células, no se ha encontrado la expresión de los genes de enzimas digestivas (Lehnert y Johnson, 2002) pero si la presencia de enzimas digestivas en sus vacuolas (Icely y Nott, 1992). Al Mohanna y Nott (1986 y 1989) proponen que las células B participan en la digestión ingiriendo los nutrientes por endocitosis, suscitándose una digestión intracelular en vacuolas. Los productos de desecho son liberados por secreción apócrina o por desintegración completa de la célula que es liberada en el lumen y empaquetada en forma de heces para ser transportada hacia el intestino.

El material a digerir es pinocitado entre 1 y 2 horas después de la ingestión y en 24 horas hay pérdida de células B, que coincide con la fase de actividad mitótica en las células E. La acumulación de material en células B, podría tomarse como un indicio del alimento indigerible, y así, saber que alimento se utiliza con mayor eficiencia (Al Mohanna y Nott, 1986 y 1989).

#### 1.2.2.4. Células Restzellen (R)

Las células R son las más abundantes, absorben material soluble, metabolitos del lumen y hemolinfa. Es almacén de lípidos y glucógeno en vacuolas, además de tener la función de detoxificación. Las vacuolas celulares se caracterizan por formar inclusiones supranucleares conteniendo iones metálicos y no metálicos como cobre, zinc, sulfuro y en menor proporción calcio, fósforo y potasio. El material soluble se toma del lumen por difusión, no desarrolla canales dentro de la

célula y no hay producción de zimógenos. Los cambios asociados en la acumulación, utilización y excreción de estos materiales están relacionados más con el ciclo de muda que con el alimenticio. La tasa de acumulación de reserva energética en las células R puede utilizarse para monitorear requerimientos de la dieta (Al Mohanna y Nott, 1987 y 1989).

#### 1.2.2.5. Células basales (M)

Célula basal pequeña y menos numerosa, tiene forma redonda con  $6\mu\text{m}$  de diámetro y tiene extensiones citoplasmáticas que se ramifican entre células vecinas. No hay una asociación directa con el lumen, posiblemente almacena reservas orgánicas. El material en este tipo celular es denso y homogéneo, no cambia a lo largo del ciclo de la muda ni del alimenticio, pero si se han visto variaciones en el ciclo circadiano. Las células M tienen la función de almacén en vacuolas y son ricas en proteína (Al Mohanna *et al.*, 1985b).

### 1.2.3. Aspectos relacionados con la digestión

El estudio del proceso digestivo, considerando variaciones de factores ambientales y las características biológicas del organismo, se ha documentado en trabajos como el de Lee *et al.*, 1984; Dall, 1990; Juinio *et al.*, 1992; Chen, 1993; Rodríguez *et al.*, 1994; Stuck *et al.*, 1996; Shiau, 1998; entre otros. Una serie de condiciones tales como el ayuno, fuente de alimento, ciclo circadiano, estadio de muda y ontogenia se relacionan con la síntesis y excreción enzimática, que va desde la concentración hasta la síntesis de tipos enzimáticos. Galgani y Nagayama (1987b) mencionan que la producción de enzimas digestivas es afectada por condiciones fisiológicas las cuales cambian con el estado nutricional, estación del año y edad, incluso Lee *et al* (1984) consideran el tamaño del organismo. Un estudio menor se ha realizado en el efecto de la actividad bacteriana con la actividad proteolítica digestiva (Donachie *et al.*, 1995).

### 1.2.3.1. Ontogenia y Alimentación

Biesot y Capuzzo, 1990; Chen, 1993; Rodríguez *et al.*, 1994, han encontrado que los tipos enzimáticos expresados en la digestión tienen correlación con la naturaleza alimenticia durante la ontogenia. Empero, Jones *et al.* (1997) mencionan que existe una estimulación de la síntesis de tripsina en larvas de *P. monodon* por el consumo de microalgas, la cual no está relacionada con la concentración de proteína en el alimento. La alta concentración de tripsina en larvas alimentadas con microalgas puede deberse a la combinación de respuestas por la baja concentración de proteína en el alimento y una estimulación directa para la secreción enzimática por componentes activos de la microalga (Jones *et al.*, 1997). Por ejemplo, los herbívoros tienen altas tasas de ingestión y tiempos cortos de retención en el intestino, resultando en altas tasas de conversión del sustrato en productos digeridos. Esta es una estrategia en la que una alta actividad enzimática digiere suficiente proteína para mantener una adecuada proporción de C:N para el desarrollo metabólico. Se ha visto baja actividad enzimática en tiempos largos de retención del alimento (Jones *et al.*, 1997).

Jones *et al.* (1997) y Lemos *et al.* (1999) encontraron que las larvas de crustáceos adaptan su fisiología digestiva a diferentes estrategias alimenticias durante el desarrollo larval, dominando la actividad de tripsina en todos los estadios larvales. Por otra parte, se ha encontrado que una modificación en la actividad enzimática en diferentes larvas de especies de peneidos está relacionada con la calidad y cantidad de los componentes en el alimento (Lemos y Rodríguez, 1998; Ceccaldi, 1998). En diferentes especies de crustáceos se ha encontrado que las actividades tanto de proteasas como amilasas son moduladas por la composición de la dieta, incrementándose al aumentar el contenido de carbohidratos o proteína. En el caso de digestión de proteína, arriba del porcentaje óptimo de 40-50% de contenido proteico en el alimento, la actividad de proteasas decrece. Estas variaciones nos



dan un indicio del valor trófico del alimento ingerido por los crustáceos (Brethes *et al.*, 1994). Si diferentes tipos proteicos se ingieren, los crustáceos tienen la capacidad de ajustar las capacidades enzimáticas (Ceccaldi, 1998).

Lee *et al.* (1984) encontraron que el origen de la proteína en el alimento tiene efectos sobre las enzimas y está relacionado a la talla de peneidos pequeños (9-11 g). En adultos, el origen de la proteína es menos importante. También estos autores encuentran que el cambio en actividad enzimática no es directamente relacionada a la tasa de crecimiento. Así, la falta de correlación entre crecimiento y actividad proteolítica sugiere que la actividad es afectada por otras variables en el alimento, más que por la cantidad de proteína. Un ejemplo lo menciona Ceccaldi (1998) en una revisión, indicando que en organismos alimentados con calamar, se estimula la actividad de quimotripsina, mientras que la actividad de tripsina decrece cuando la proteína de pescado concentrada es utilizada como fuente de alimento en organismos marinos cultivados. Rodríguez *et al.* (1994) mencionan que el efecto de diferentes alimentos en la actividad catalítica es ocasionado por el proceso de compensación que tienen los organismos a las diferentes fuentes de proteína.

#### 1.2.3.2. Muda y ayuno

En varios estudios sobre crustáceos se ha observado el efecto que tiene la muda en la actividad digestiva (Barcklay *et al.*, 1983; Al-Mohanna y Nott, 1989; Fernández-Giménez *et al.*, 2001; 2002). Este efecto es provocado por los periodos de ayuno que mantiene el organismo entorpecido debido al proceso de ecdisis. La relación muda-ayuno se muestra claramente en el trabajo de Muhlia-Almazán y García-Carreño (2002), en donde concluyen que el efecto de la muda tanto en la concentración de proteína, como en la actividad enzimática digestiva, es principalmente causada por el efecto del ayuno. En este estudio, el contenido de proteína en la glándula digestiva disminuyó conforme el tiempo de ayuno,

coincidiendo con los trabajos de Cuzon *et al.* (1980) y Lee *et al.* (1984). Este último autor afirma que al disminuir la concentración de proteína, la actividad enzimática específica (actividad enzimática total/mg de proteína) se afecta en un menor grado durante el ayuno, si se compara con la actividad total.

#### 1.2.3.3. Ciclo Circadiano

En crustáceos se ha encontrado que ciertos fenómenos biológicos ocurren rítmicamente alrededor de la misma hora. Estos fenómenos se observaron a niveles bioquímicos reflejándose en la concentración de proteína y ácidos grasos (Moureau *et al.*, 1984), así como en la secreción de enzimas digestivas y actividad alimentaria (van Wormhoudt, 1977; Hernández-Cortés *et al.*, 1999b). Un trabajo de Cuzon *et al.* (1982), muestra una correlación entre comportamiento y metabolismo, así como la relación entre actividad del organismo y secreción enzimática. Hernández-Cortés *et al.* (1999b) observó en peneidos que las tasas de ingestión del alimento (gramos de alimento ingerido por hora) ocurrió en tres periodos, coincidiendo la máxima ingesta con la mayor actividad enzimática y el comportamiento nocturno de la especie.

#### 1.2.3.4. Estrés Ambiental

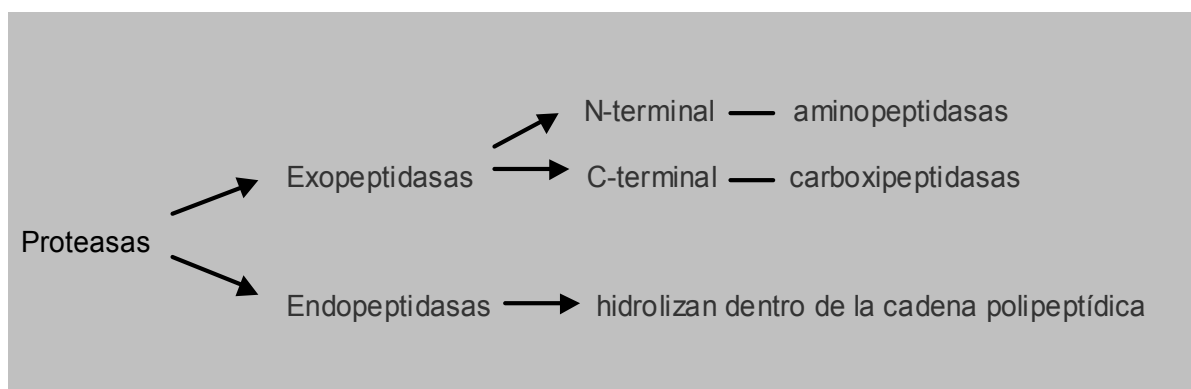
El efecto que tiene el estrés ambiental sobre la actividad enzimática digestiva, puede documentarse en trabajos como el de Shiau *et al.* (1991). Estos autores evaluaron la digestibilidad de *P. monodon* en condiciones de estrés osmótico y menciona que la digestibilidad es afectada cuando la salinidad aumenta de 16 a 35 ppm en el camarón. Rodríguez *et al.* (1994) encontraron una disminución en la concentración de proteína (en la glándula digestiva de peneidos) al incrementarse la concentración de NaCl en el medio. Esta disminución de proteína posiblemente es causada por una tendencia en utilizar proteína y no lípidos como fuente energética en condiciones donde hay una elevada salinidad.

### 1.3. LAS PROTEASAS

La digestión de proteína es llevada a cabo por las Proteasas (EC 3.4.x.x.) y su importancia no se limita en al la participación en la fisiología digestiva sino que además, tienen un papel muy importante en determinados procesos de control fisiológico. Además, esta subclase de enzimas vienen siendo utilizada por el hombre, de forma directa o indirecta, desde antaño en procesos de transformación. Recientemente, estas enzimas está siendo utilizadas por la industria en importantes procesos biotecnológicos (Haard y Simpson, 2000).

#### 1.3.1. Clasificación

Las enzimas son clasificadas en función de la región catalizada, usando un sistema de códigos, asignado por la Comisión de Enzimas (EC). Sin embargo, frecuentemente son denominadas por términos no sistemáticos. El término “proteasas” incluye a las *proteinasas* y *peptidasas*. La EC recomienda el término de “peptidasas” para todas las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos. Las proteasas se subdividen según el siguiente esquema (**Figura 3**).



**Figura 3.** Clasificación de las proteasas según la EC.

García-Carreño (1991) y García-Carreño y Navarrete del Toro (1997) muestran la denominación de las proteasas de acuerdo al lugar de hidrólisis en la cadena polipeptídica. Las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos entre un aminoácido y el extremo C- o N-terminal (exopeptidasas) las denominan por acuerdo “*peptidasas*”. Las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos dentro de la cadena polipeptídica (endopeptidasa) las denominan “*proteinasas*”.

Las proteasas son clasificadas por la EC en cuatro subsubclases de acuerdo a la naturaleza química de la triada catalítica, que es responsable de la actividad catalítica de la enzima (**Tabla I**). Desde un punto de vista evolutivo, que la clasificación original de la EC

**Tabla I.** Clasificación de las proteasas de acuerdo al mecanismo de catálisis, según la EC.

Subsubclase*	Asignación EC
Serino	EC 3.4.21.x
Cisteino (tiol)	EC 3.4.22.x
Ácido aspártico	EC 3.4.23.x
Metalo	EC 3.4.24.x

\* Clasificadas de acuerdo al grupo químico del aminoácido que es responsable de la actividad

no considera, las proteasas son agrupadas en seis *familias* en la que se considera la homología de secuencia de los residuos de amino ácidos (**Tabla II**). Por último Barret *et al.* (1998) agrupa a las familias que tengan un ancestro común en *clanes*.

**Tabla II.** Clasificación de las proteasas desde un punto de vista evolutivo

Familia	Proteasa representativa	Características del sitio activo
Serino I	<b>Quimotripsina</b> , Tripsina, Elastasa	Asp <sup>102</sup> , Ser <sup>195</sup> , His <sup>57</sup>
Serino II	<b>Subtilisina</b>	Asp <sup>32</sup> , Ser <sup>221</sup> , His <sup>64</sup>
Cisteino	<b>Papaína</b> , Actinidina, Catepsina B y H	Cys <sup>25</sup> , His <sup>159</sup> , Asp <sup>158</sup>
Ácido Aspártico	<b>Penicilopepsina</b> , Renina	Asp <sup>33</sup> , Asp <sup>213</sup>
Metalo I	<b>Carboxipeptidasa A</b>	Zn, Glu <sup>270</sup> , Try <sup>248</sup>
Metalo II	<b>Termolisina</b>	Zn, Glu <sup>143</sup> , His <sup>231</sup>

\* Se considera la homología de la mitad de la secuencia de los residuos de amino ácidos

### **1.3.2. Propiedades de las proteasas y parámetros operacionales**

Las proteasas tienen propiedades que varían conforme a su naturaleza proteica, propiedades que cambiarán dependiendo del medio en que se encuentre la proteasa a estudiar. Por ejemplo, en cierto pH, temperatura o fuerza iónica, las proteínas difieren en solubilidad, densidad y distribución de carga, pI, forma, hidrofobicidad, estabilidad y reactividad. Así, las propiedades de las proteasas están sujetas a una serie de condiciones específicas del medio en que se encuentran, y si alguna de estas condiciones cambia, lo mismo sucederá con la propiedad de la proteasa.

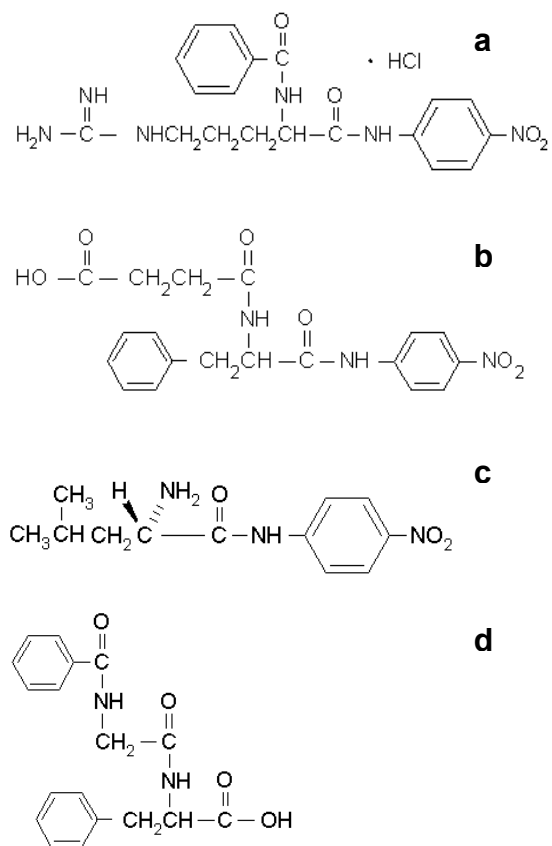
Hay que diferenciar claramente entre propiedad y parámetro operacional en el estudio de las proteasas. El óptimo de una variable, como pH y temperatura, es considerado como un parámetro operacional y no como una propiedad enzimática, al menos que condiciones estrictas sean utilizadas en los ensayos. Esto es debido a que el óptimo de una enzima es dependiente de una serie de condiciones experimentales que incluyen el tiempo de reacción, temperatura, naturaleza y concentración del sustrato, solución amortiguadora, fuerza iónica del medio y pureza de la preparación enzimática. Así, los factores responsables por el efecto de una variable sobre la reacción pueden ser divididos en dos categorías: las que afectan a la estabilidad de la enzima y las que influyen en el enlace y catálisis (Whitaker, 1994).

### **1.3.3. Principios teóricos en el estudio de proteasas digestivas**

Cuando se quieren conocer los tipos de enzimas presentes en un extracto, las propiedades y formas de acción, es necesario realizar una serie de metodologías en forma secuencial, considerando cada uno de los resultados arrojados y así, diseñar el siguiente paso a seguir. Los principios generales en el estudio enzimático lo muestran claramente García-Carreño y Navarrete del Toro (1999).

Hasta ahora, las caracterizaciones de enzimas en invertebrados están basadas en la especificidad con sustratos e inhibidores diseñados para vertebrados, de ahí que las enzimas encontradas en invertebrados sean denominadas “tipo de” o “like”. Una vez que se tenga identificado el tipo enzimático con sustratos o inhibidores, el siguiente paso es medir cuanta enzima está presente en una preparación. Los reporteros cromógenos en el sustrato han sido muy utilizados para este propósito, ya que se puede cuantificar la aparición o desaparición de un color, producto de la reacción enzimática, por espectrofotometría. Respecto a la unidad de medida para cuantificar la actividad, se considera el cambio de absorbancia por unidad de tiempo por mg de enzima. Ésta es denominada “unidad” y una unidad de actividad enzimática es aquella que cataliza la conversión de un  $\mu\text{mol}$  de sustrato o la formación de un  $\mu\text{mol}$  de producto en un minuto. La actividad específica de una preparación enzimática es el número de unidades por mg de proteína (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1999).

Los sustratos utilizados en la detección de proteasas pueden ser de origen proteico o sintético. De forma general, los sustratos sintéticos de un grupo reportero cromógeno, unido a una cadena de aminoácidos específica del centro catalítico de la enzima que se pretende evaluar. En los sustratos de origen proteico como la “azocaseína”, la enzima libera péptidos solubles de bajo peso molecular, a lo que se haya ligado un grupo cromógeno, grupo azo para el caso de la azocaseína. Estos azopeptidos tienen una máxima absorbancia en la región visible, lo cual permite medir espectrofotométricamente la actividad enzimática. Para el caso de sustratos de origen proteico y que no contengan un grupo cromógeno, la hidrólisis proteica se cuantifica a través de aminoácidos aromáticos liberados.



**Figura 4.** Algunos sustratos sintéticos utilizados para la cuantificación de proteasas digestivas tanto de proteinasas (**a**-BAPNA para tripsina, **b**-SAPNA para quimotripsina) como de peptidasas (**c**-LPNA para leucinaminopeptidasa, **d**-HPA para carboxipeptidasa).

aminoácido (Beynon y Bond, 2001).

Referente a los sustratos sintéticos (**Figura 4**), éstos están diseñados en torno a la química del amino ácido y péptidos específicos para que la enzima lo reconozca como sustrato. Para el caso de proteinasas, en el aminoácido susceptible a proteolisis se agregan nuevos grupos, tanto en el lado alfa- $\text{NH}_2$ , como en el alfa- $\text{COOH}$ . Así, el sustrato sintético es un amino ácido acoplado a través del alfa- $\text{COOH}$  a una amina cromogénica (4-nitroanilina) y por el lado alfa- $\text{NH}_2$  se acopla a un bloqueador (ej.: un grupo succinil). Respecto a peptidasas, el sustrato consiste en un aminoácido susceptible de proteolisis unido a un grupo cromogénico que se libera en cada hidrólisis. La unión del grupo cromogénico se efectúa bien por el grupo  $\text{NH}_2$  o por el grupo  $\text{COOH}$ , dejando libre uno de los grupos del

Los estudios de inhibición pueden aportar datos sobre la especificidad de las enzimas, así como de su estructura física y química. La inhibición de la actividad enzimática, la cual se define como la reducción de la velocidad de la reacción, es uno de los principales mecanismos reguladores y de protección en los seres vivos. Para los estudios enzimáticos se han diseñado una serie de inhibidores sintéticos (además de los inhibidores naturales que se extraen de los sistemas biológicos),

basándose en la especificidad de los inhibidores por el centro activo de la enzima. Estos inhibidores sintéticos se utilizan para determinar los tipos de proteinasas que hay en un extracto enzimático crudo. La forma de realizar esta determinación se basa en calcular la actividad residual del extracto después de haber sido preincubado con el inhibidor específico. El porcentaje de inhibición será proporcional a la cantidad de proteinasa específica presente en el extracto. Algunos inhibidores que se utilizan en la caracterización de los tipos de enzimas digestivas y la forma en que actúan, se explican a continuación (**Figura 5**):

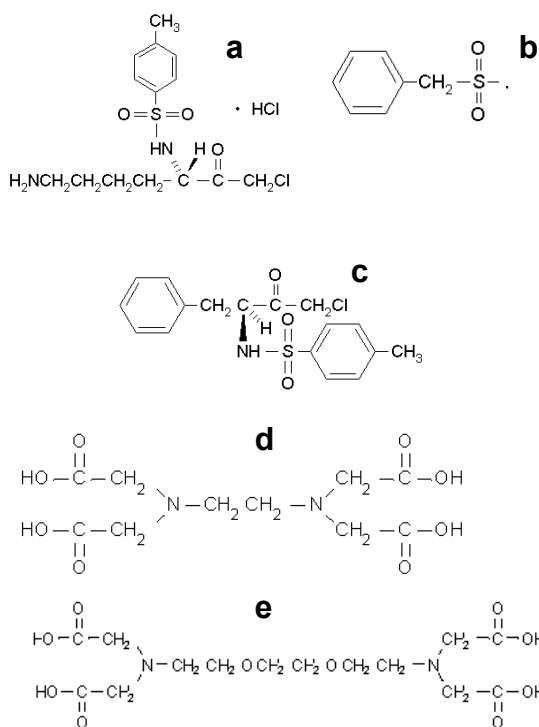
- **TLCK (N $\alpha$ -p-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone)**. Inhibidor clorometil cetona utilizado para enzimas del tipo tripsina, que desactiva la enzima por la alquilación de la His de la triada catalítica. El inhibidor forma un enlace covalente con His en el sitio activo de la enzima y bloquea el enlace con el sustrato. La presencia de la lisina permite que el inhibidor se una específicamente a la tripsina.

- **TPCK (N $\alpha$ -p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone) y ZPCK (Z-L-phenylalanine chloromethyl ketone)**. Inhibidores clorometil cetonas utilizados para tipo quimotripsinas, son irreversibles y muy estables. La inhibición se produce en una forma similar a la del TPCK pero en este caso, la presencia de la fenilalanina es la que hace que estos inhibidores sean específicos de la quimotripsina.

- **PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)**. En un inhibidor no específico para serino proteasas. Actúa sulfonando el grupo hidroxil del residuo de serina de la triada catalítica, causando una inhibición irreversible.

- **EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) y EGTA (ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)**. Las proteasas que no son desactivadas por estos quelantes no requieren iones metálicos como cofactores para la actividad. Estos compuestos forman un fuerte complejo con cationes





**Figura 5.** Inhibidores sintéticos más utilizados en la detección de tipos enzimáticos. **a)** TLCK, **b)** PMSF **c)** TPCK **d)** EDTA y **e)** EGTA.

divalentes:  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ , si bien, en determinadas circunstancias, el pH del medio interfiere negativamente en la formación de estos complejos. Por ejemplo, EDTA no remueve  $\text{Ca}^{++}$  de amilasas en el rango de pH 7-9, pero a pH 4 hay una rápida remoción de  $\text{Ca}^{++}$ . EDTA y EGTA no son considerados inhibidores puesto que no requieren reaccionar con la enzima para hacer su función. Son considerados como

desactivadores y tienen un mecanismo de acción reversible, cuando la capacidad quelante de estos productos se ve limitada por saturación o cambios de fuerza iónica en el medio (Whitaker, 1994; Beynon y Bond, 2001).

#### 1.3.4. Las proteasas de origen marino y su importancia en los procesos biotecnológicos

Debido a la gran diversidad de organismos marinos, las proteasas digestivas son una importante herramienta biotecnológica por la alta y variable capacidad de biotransformación, por lo que los organismos marinos son fuente potencial de estas enzimas. Excepto los mamíferos, los organismos acuáticos son poiquiloterms y tienden a cambiar de ambiente a lo largo del año. Las enzimas de estos organismos están adaptadas a trabajar a las diferentes condiciones ambientales, ya sea aumentando su concentración, cambiando el tipo de enzima o sintetizando alguna isoforma que se adapte a la condición actual. Enzimas de

organismos que habitan zonas subtropicales y templadas poseen propiedades únicas, propiedades que son claves para procesos de la industria alimentaria: alta actividad molecular a baja temperatura de reacción y una rápida desnaturalización a temperatura moderada sin afectar al producto del proceso. Esto es importante en el manejo de alimentos, ya que la baja temperatura minimiza la actividad bacteriana y otras reacciones que interfieran con el producto (Díaz-López y García-Carreño, 2000).

## 1.4. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO DE LAS PROTEASAS DIGESTIVAS EN CRUSTÁCEOS

### 1.4.1. Características generales

En la actualidad existen numerosos estudios sobre enzimas digestivas en crustáceos (Sakharov y Litvin, 1990; Lu *et al.*, 1990; Tsai *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1991; García-Carreño y Haard 1993; García-Carreño *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 2001). Las enzimas estudiadas son tomadas de extractos de la glándula digestiva y jugo gástrico, encontrando en las especies de langosta enzimas del tipo tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa A y B, leucinaminopeptidasa, elastasa, colagenasa, quitobiosa,  $\alpha$ -amilasa, maltasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa, lipasa, nucleasa y fosfatasa alcalina (Brockhoff *et al.*, 1970; Hoyle 1973; Galgani y Nagayama, 1987a; Biesot y Capuzzo, 1990; Glass y Stark, 1994 y 1995). Las enzimas encontradas en mayor proporción en los crustáceos son proteasas del tipo tripsina, colagenasa, leucin aminopeptidasa, carboxipeptidasa A y B, así como proteasas de bajo peso molecular. Actividad elastasa y quimotripsina se ha encontrado en pocas especies y nunca detectado actividad del tipo pepsina (Galgani y Nagayama, 1988).

En general, las proteasas encontradas en crustáceos tienen una masa molecular desde 10 kDa (Hernández-Cortés *et al.*, 1999a) hasta 81 kDa (García-Carreño y

Haard, 1993). El pH óptimo varía con la especie, teniendo en algunas especies, dos óptimos de actividad: uno por debajo de 4 y otro por encima de 6, utilizando los sustratos caseína, azocoll y hemoglobina (Brockerhoff *et al.*, 1970; Hoyle 1973; Brun y Wojtowicz, 1974; Glass y Stark, 1994; Figueiredo *et al.*, 2001). La temperatura óptima de estas proteasas varía entre 40 °C y 60 °C, incluso llegando a los 65 °C (Jiang *et al.*, 1991).

La clase de proteasas más estudiada en los crustáceos es la serino o serin-proteinasas. Esta clase se caracteriza por que en su mecanismo catalítico participan una triada conformada por residuos de serina, histidina y ácido aspártico. García-Carreño y Haard (1993) encuentran que las serin-proteinasas son responsables de la mayor actividad proteolítica en extractos del langostino *Pacifastacus astacus* y la langostilla *Pleuroncodes planipes*. Se ha observado que las serin-proteinasas de decápodos tienen un punto isoeléctrico (pI) extremadamente aniónico, contrario a mamíferos, siendo más lábiles a condiciones ácidas (García-Carreño *et al.*, 1994) y más específicas para enlaces peptídicos que involucren un residuo leucil (Tsai *et al.*, 1991). Las propiedades de tripsinas aniónicas en una especie de langostino han sido estudiadas por Kim *et al* (1994).

#### **1.4.2. Tripsinas**

Las tripsinas catalizan la hidrólisis de enlaces ester y peptídicos en el lado carboxil de residuos de aminoácidos básicos y en los cuales, un residuo de serina e histidina del sitio activo participan (Simpson y Haard, 1984). La importancia de tripsina radica en su participación en varios procesos biológicos, como el de digestión, adaptación a un recurso alimenticio y evolutivo (Klein *et al.*, 1996), además de contribuir con el 6% de la proteína soluble total en la glándula digestiva de peneidos, considerándose una de las proteasas más importantes en la digestión del alimento (Galgani y Nagayama, 1987a). En algunos estudios

realizados en varias especies de camarón, langostino, langosta, cangrejos y otros decápodos, se describe la actividad de tripsina y sus propiedades (Galgani y Nagayama, 1988; Lu *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1994), mientras que en otros trabajos muestran secuencias de cDNAs de proteinasas tipo tripsina (Klein *et al.*, 1996; 1998).

Las tripsinas estudiadas en especies de crustáceos, presentan de 2 a 4 isoformas, tienen un pH óptimo en la región neutral-alcalina, una temperatura óptima mayor de 40 °C, masas moleculares alrededor de los 25 kDa y muestran un carácter aniónico (Brockerhoff *et al.*, 1970; Hoyle, 1973; Galgani y Nagayama, 1987a y 1988; Glass y Stara, 1994; Kim *et al.*, 1994). Las tripsinas aniónicas no son exclusivas de los crustáceos, ya que se han encontrado estas formas en varias clases de vertebrados (Martínez *et al.*, 1988). Las tripsinas no son estables a pH ácido, son irreversiblemente desnaturalizadas a pH menor de 4.5 y son poco específicas para sustratos con pI básicos, además de presentar un  $K_M$  bajo respecto a las tripsinas de mamíferos, lo que le confiere una mayor reactividad hacia los sustratos en general. El  $K_M$  de tripsinas aniónicas en algunos crustáceos es de dos órdenes de magnitud menor que las tripsinas bovinas, mientras que el  $K_M$  de tripsina aniónica humana es menor que la catiónica humana. Posiblemente la naturaleza ácida de las tripsinas de crustáceos correlacionen con los bajos valores de  $K_M$  (Lu *et al.*, 1990).

La cinética de catálisis de las tripsinas depende de la conformación del sustrato utilizado, de la carga total y de la presencia de ciertos residuos de aminoácidos (Lys y Arg) en la cadena polipeptídica del sustrato. Se ha encontrado que en sustratos con residuos de Arg, la hidrólisis es más rápida que con sustratos con residuos de Lys (Lu *et al.*, 1990). En varios estudios muestran que las tripsinas tienen mayor actividad catalítica hacia sustratos ester (TAME), que amidas (BAPNA). Este caso es reportado en varias especies de teleósteos: Bacalao de Groelandia, *Gadus ogac* (Simpson y Haard, 1984); anchoveta, *Engraulis*

*encrasicholus* (Martínez *et al.*, 1988); Bacalao del Atlántico, *Gadus morhua* (Simpson *et al.*, 1989).

Referente a las isoformas de tripsinas en crustáceos y a la homología que hay con otras especies, se han encontrado cinco cDNAs que codifican cinco isoformas de tripsina en la glándula digestiva de *P. vannamei*. La secuencia del cDNA de la tripsina de mayor tamaño tiene un 74% de identidad con la tripsina de langostinos y secuencias homologas (~40%) con tripsinas de mamíferos e insectos (Klein *et al.*, 1996). La tripsina del langostino *Pacifastacus leniusculus*, muestra características estructurales, como longitud del péptido señal y sitio de enlace del calcio, similares a tripsinas bacterianas (Hernández-Cortes *et al.*, 1999a).

#### **1.4.3. Quimotripsinas y colagenasas**

Quimotripsina es una proteinasa que pertenece, al igual que tripsina, a la clase serino. El estudio de quimotripsina en invertebrados ha provocado discusiones respecto a la ausencia o baja actividad de proteinasas de este tipo, ya que trabajos como el de Brockerhoff *et al.*, 1970; Brun y Wojtowicz, 1974; Galgani y Nagayama, 1987a; Glass *et al.*, 1989; Glass y Stark, 1994; García-Carreño y Haard, 1993; no detectaron actividad quimotripsina en diferentes especies de crustáceos. Sin embargo Tsai *et al.* (1986a) encontraron actividad tipo quimotripsina en el tracto digestivo de diferentes especies de camarón. Lo mismo sucedió con el estudio de Jiang *et al.* (1991) y Hernández-Cortés (1997). Así, las quimotripsinas presentes en decápodos tienen diferencias estructurales que provocan que estas enzimas no reaccionen con un inhibidor diseñado para quimotripsinas de mamíferos como el TPCK (Tsai *et al.*, 1986b).

Algunas características de las quimotripsinas en crustáceos son estudiadas en trabajos como el de Tsai *et al.* (1986b y 1991) y Hernández Cortés *et al.* (1999a). Las quimotripsinas de peneidos tienen un óptimo pH de 7.8 y una masa molecular

en el rango de 26 (van Wormhoudt *et al.*, 1992; Sellos y van Wormhoudt, 1992) y 33.2 kDa (Hernández-Cortés *et al.*, 1997), presentan un pI ácido (3-4), son inestables a temperaturas mayores de 50 °C y a pH fuera del rango 5-9, además de tener un valor de  $K_M$  mayor, con respecto a las quimotripsinas bovinas (Tsai *et al.*, 1986b). Estas enzimas reconocen como sustrato el lado carboxilo de los residuos tirosil, fenilalanil y leucil. En menor grado, a los residuos de lisil, arginil, glutaminil (Tsai *et al.*, 1986b). Hidrolizan mejor grupos ester que sustratos amidas, además de no hidrolizar sustratos para elastasas (Tsai *et al.*, 1991).

La actividad colagenasa se ha encontrado en proteasas de organismos acuáticos y corresponden a la familia serino (Chen, 1993), contrario a las encontradas en vertebrados y bacterias, las cuales son colagenasas de la familia metalo proteinasas. Grant *et al.* (1981) y Chen (1993) muestran que las tripsinas y quimotripsinas en algunos decápodos son responsables de la hidrólisis de colágeno en el extracto de la glándula digestiva. Roy *et al.* (1996) describe una serie de serin-colagenasas en la especie de cangrejo *Carcinus maenas*, con masa molecular de 24 a 36 kDa, un óptimo pH de 8 y una temperatura óptima de 40 °C, mientras que Sakharov y Litvin (1990) encuentran amplio rango de actividad a pH de 6 a 11 y la inactivación de la serino colagenasa a temperaturas mayores de 40 °C, en la especie *Paralithodes camtschatica*.

#### **1.4.4. Peptidasas y metalo proteasas**

De la misma manera que en quimotripsina, la actividad de algunas exopeptidasas se presenta con cierta irregularidad en los crustáceos. En el jugo gástrico de la langosta americana *H. americanus*, los resultados no mostraron la presencia de dipeptidasas y leucinaminopeptidasas (Brockhoff *et al.*, 1970). Sin embargo, en la jaiba azul *Callinectes sapidus* se encontró actividad de carboxipeptidasa A y B, así como aminopeptidasa, mostrando la actividad de carboxipeptidasa B dos veces

mayor que la carboxipeptidasa A. Esta última presentaba un pH óptimo de 7.5 (Dendinger, 1987).

#### **1.4.5. Proteasas de bajo peso molecular**

Las proteasas de bajo peso molecular (LMW) han sido documentadas y estudiadas desde Brockerhoff *et al.* (1970) y Armstrong y De Villez (1978). Estas proteasas aparecen referidas en trabajos más recientes como el de Glass y Stark (1994) y el de Hernández-Cortés *et al.* (1999a) y en trabajos no tan recientes como el de Galgani y Nagayama (1987a y 1987b). Estos últimos autores reportan que las proteasas LMW presentaron la mayor proteólisis proteica en la especie de langosta *Panulirus japonicus*. Glass y Stark (1994) mencionan que proteasas de bajo peso molecular (12 kDa) aparentemente ausentes en vertebrados, compensan la carencia de pepsina en crustáceos.

## 2. HIPÓTESIS

Esta tesis pretende demostrar que el jugo enzimático presente en las cámaras gástricas contiene las proteasas que se sintetizan en la glándula digestiva, no teniendo las cámaras gástricas una participación directa en la síntesis de proteasas alcalinas. Para ello será necesario realizar la caracterización de las proteasas digestivas en esta especie de langosta (*Panulirus interruptus*), en las diferentes cavidades y glándulas que conforman el sistema digestivo.



### 3. JUSTIFICACIÓN

Con la caracterización de proteasas en el sistema digestivo de la langosta roja *Panulirus interruptus*, conocemos los grupos de proteasas y dilucidamos algunos aspectos bioquímicos de la digestión de proteína en esta especie. La eficiencia con que los organismos digieren y utilizan los componentes nutritivos depende de la presencia de ciertas enzimas digestivas. De esta manera, se podría deducir un alimento adecuado basado en el conocimiento de la capacidad fisiológica del organismo. La proteína es el componente más costoso del alimento y su importancia radica en que participa como componente estructural, en la función celular, crecimiento y reparación de tejidos, así como bajo ciertas condiciones, en la reserva energética. Por lo tanto, el estudio de las proteasas digestivas es un pilar para entender la nutrición del organismo a estudiar.

Los aspectos nutricionales se explotan para obtener mayor eficiencia en el crecimiento de los organismos con interés de producción. Aunque la langosta *P. interruptus* es un producto pesquero que se comercializa al momento de la captura y que no es cultivado en la región, esto no significa que se deje fuera el interés por un crecimiento eficiente, ya que en otros países el recurso langostero es mantenido en estanques especiales por varios meses y alimentados durante ese periodo para obtener un mayor crecimiento y recuperación del producto, con la finalidad de comercializarlo vivo y fuera de temporada. También, este estudio puede ser la base para futuros trabajos en donde se aborden cambios *postmortem* en el manejo y empaquetado para comercializar esta especie de langosta como producto fresco. Además, están bien documentados los usos de las proteasas digestivas de origen marino en la industria alimentaria (Haard y Simpson, 2000), por las ventajas que estas tienen respecto a proteasas de otros orígenes.

## 4. OBJETIVOS

### GENERAL

Describir y clasificar las principales proteasas que se localicen en el sistema digestivo de la langosta roja *Panulirus interruptus*.

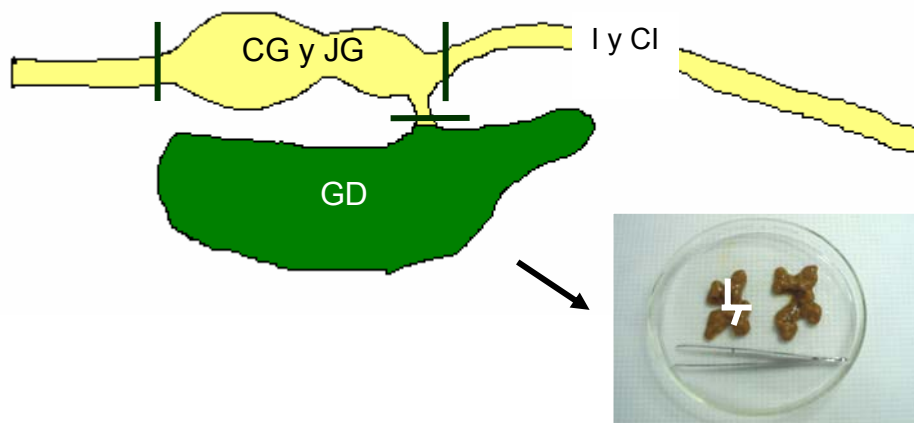
### ESPECÍFICOS

- Reconocer en el sistema digestivo los tejidos y fluidos que contengan proteasas
- Identificar el número de proteasas y sus masas moleculares
- Caracterizar los tipos de proteinasas con inhibidores específicos y sustratos sintéticos
- Describir el tiempo en que se da la tasa máxima de reacción, los óptimos de temperatura, pH y la estabilidad a estos parámetros físico-químicos

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Organismos y extracción del sistema digestivo

Hembras en estadio de intermuda, con un peso de  $650 \pm 100$  g y  $9 \pm 3$  cm longitud del cefalotórax (LC), se obtuvieron a través de una cooperativa que opera en la Bahía de San Carlos, B. C. S. El fluido de las cámaras gástricas (jugo gástrico) se tomó dos días después de haberles proporcionado alimento con ayuda de una sonda de 1.5 mm de diámetro. Esta fue insertada dentro de las cámaras por la cavidad bucal, tomando entre 0.5 y 1.5 ml de JG. Los organismos se mantuvieron tres días en el Laboratorio de Cultivo de Especies Marinas del CIBNOR y fueron disectados para la extracción del sistema digestivo (**Figura 6**). Se obtuvieron muestras de las cámaras gástricas (CG), glándula digestiva (GD), intestino (I) y contenido intestinal (CI). Uno de los pares de la GD fue separado en cuatro secciones de manera aleatoria (a, b, c, d) manejándolos por separado en los ensayos.



**Figura 6.** Esquema que muestra como se disectó el sistema digestivo

Tres meses después se consiguió un lote de veinticinco organismos, once machos y catorce hembras. Estos se mantuvieron durante seis meses en acuarios

individuales. Se alimentaron diariamente con calamar congelado, 2% de alimento respecto a su peso. En este lote sólo se obtuvo JG, tomando muestras en diferentes fechas. La finalidad de este ensayo fue el observar variaciones intraespecíficas en la actividad proteolítica y si esta actividad cambia con el tiempo y durante el proceso digestivo.

## 5.2. Extracción enzimática de tejidos y fluidos gástricos

Los tejidos fueron homogenizados en agua destilada a 4 °C, en las siguientes proporciones: cámaras gástricas 1:2 p/v, glándula digestiva 1:3 p/v, intestino 1:3 p/v. Las muestras se centrifugaron en dos ocasiones a 10 000 g durante 20 min a 4 °C para eliminar lípidos y restos celulares. El extracto enzimático se recuperó en el sobrenadante. El contenido intestinal se homogenizó en agua destilada con una proporción de 1:1 p/v y se centrifugó en las mismas condiciones. Al final de la recuperación del extracto enzimático las muestras se almacenaron a –20 °C hasta su procesamiento (García-Carreño y Haard, 1994).

Se registró el pH de cada uno de los tejidos y fluidos con un potenciómetro Orion modelo 301 y un microelectrodo de contacto. También el peso y color de la glándula digestiva de cada organismo fueron registrados. Los ensayos se hicieron por individuo para ver variaciones intraespecíficas en la actividad proteolítica.

## 5.3. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se evaluó por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina bovina como proteína estándar. Este método se basa en medir los cambios de coloración, ya que el reactivo Azul de Coomassie G-250 pasa de un estado protonado (tono rojo) a un estado no protonado (tono azul) al formarse el complejo colorante-proteína en un medio ácido. La evaluación se realizó en un espectrofotómetro de UV/VIS Perkin Elmer Lambda Bio 20 a 595 nm.

#### 5.4. Actividad de proteinasas alcalinas

Se utilizó el sustrato azocaseína (García-Carreño, 1992). La técnica consistió en utilizar 0.5 ml de la solución Tris-HCl 50mM pH 8.0, 0.5 ml de azocaseína al 1% y una alícuota de 5-20  $\mu$ l de extracto enzimático. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 25 °C. Después del tiempo de incubación la reacción fue detenida con 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. En las muestras control se utilizó la misma mezcla de reacción, anteponiendo el TCA sobre el sustrato. La mezcla de reacción se incubó durante 10 min a -20 °C para acelerar la precipitación de solutos y obtener el sobrenadante a través de la centrifugación de las muestras. La centrifugación fue de 5 min a 10000 *g*. La absorbancia del sobrenadante fue registrada a 366 nm, utilizando agua destilada como blanco. La actividad enzimática específica fue calculada con la ecuación 1 y 2.

$$\text{Unidades de Absorbancia}_{366nm} = \text{Abs muestra} - \text{Abs control} \quad (1)$$

$$\text{Unidades de Actividad Específica} = \frac{\text{Unidades de Abs}}{\text{min de incubación a } 25\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{mg proteína en la mezcla de reacción}} \quad (2)$$

#### 5.5. Actividad de proteinasas ácidas

De acuerdo con la técnica de Anson (1938), utilizando hemoglobina al 0.5% en solución de Glicina-HCl 100 mM pH 3.0. Alícuotas de extracto (5-20 $\mu$ l) se les añadió 1 ml de sustrato disuelto, se incubó durante 10 min y la reacción se detuvo con 0.5 ml de ácido acético al 20%. La absorbancia fue medida a 280 nm. Una unidad de actividad enzimática fue definida como 1  $\mu$ g de tirosina liberada/min utilizando 0.005 ml/ $\mu$ g/cm como coeficiente de extinción de tirosina. La actividad específica fue calculada con la ecuación 1 y 3.

$$\text{Unidades de Actividad} = (\text{Unidades de Abs} * \text{vol final mezcla de reacción}) / (0.051 * \text{tiempo de incubación a } 25^{\circ}\text{C} * \text{mg proteína en la mezcla de reacción})$$

(3)

## 5.6. Cinética

La misma técnica utilizada para actividad de proteinasas alcalinas (García-Carreño, 1992), pero evaluando a diferentes tiempos de incubación de la reacción: 5, 10, 15, 20, 40 y 60 min.

## 5.7. pH y temperatura óptima

La actividad proteínasa fue evaluada a diferentes pHs. Se utilizó un amortiguador universal, el cual se compone de sales de fosfato, ácido bórico y ácido cítrico. La finalidad es de encontrar el óptimo pH de las proteasas (Stauffer, 1989).

La actividad proteolítica fue evaluada a diferentes temperaturas de incubación.

## 5.8. Estabilidad de las enzimas

En este ensayo se utilizaron los mismos rangos de pH y temperatura que en el ensayo anterior. Los extractos enzimáticos de la GD y el JG se preincubaron durante 60 min en cada una de las variables de pH y temperatura. En el transcurso de ese tiempo se tomó, cada 15 min, alícuotas de los extractos incubados. La actividad se evaluó usando azocaseína al 1% como sustrato usando la técnica anteriormente detallada y en las condiciones óptimas para la enzima.

## 5.9. Actividad específica de proteinasas

Las actividades se evaluaron por la tasa de hidrólisis con sustratos sintéticos.

- **Tripsina.** La hidrólisis de benzoyl-Arg-p-nitroanilide (BAPNA) 1mM disuelto en dimethylsulfoxido (DMSO) y diluido en amortiguador Tris-HCl 50mM y CaCl<sub>2</sub> 20mM. La tasa de reacción se registró a 410 nm (Erlanger *et al.*, 1961). Actividad total de tripsina se expresa como el cambio de absorbancia min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína de la enzima utilizada en el ensayo (ecuación 4).

$$\text{Unidades de Actividad} = \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) (1000) (\text{volumen de la mezcla de reacción})}{(8800) (\text{mg de proteína})} \quad (4)$$

- **Quimotripsina.** La actividad esterasa se evaluó a 410 nm por liberación del grupo nitroanilina del sustrato sintético N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phep nitroanilida (SAPNA), disuelto en dimethylsulfoxido (DMSO) y diluido en el amortiguador Tris-HCl 50mM y CaCl<sub>2</sub> 20mM (del Mar *et al.*, 1979). Actividad total de quimotripsina se expresa como el cambio de absorbancia · min<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup> de proteína de la enzima utilizada en el ensayo (ecuación 4).

## 5.10. Ensayos de inhibición para evaluar los tipos de proteinasas

El ensayo de inhibición se realizó según se describe en García-Carreño (1993), donde el extracto enzimático es incubado con diferentes inhibidores de proteinasas. Las soluciones stock de los inhibidores utilizados fueron PMSF 100mM, disuelto en 2-propanol; TLCK 10mM, en HCl 1mM; SBTI 250μM, en agua destilada; TPCK 5mM, en MeOH; EDTA 20mM y EGTA 20mM, en agua destilada. Por separado, 10μl de inhibidor fue mezclado con los extractos enzimáticos e incubados durante 60 minutos a 25 °C. Después se realizó un ensayo para evaluar la actividad residual de proteinasas utilizando azocaseína al 1% como sustrato. La actividad inhibitoria se reportó en porcentaje, considerando como 0% de actividad

inhibitoria a la muestra incubada en ausencia del inhibidor. Se realizó un control para evaluar la inhibición de los solventes utilizados.

#### 5.11. Análisis electroforéticos para identificar patrones proteicos, actividad proteolítica e inhibición por inhibidores específicos.

Se utilizó la técnica de SDS-PAGE (Laemmli, 1970) con modificaciones hechas por García-Carreño *et al.* (1993), que básicamente son: eliminar el  $\beta$ -mercaptoetanol del tampón de muestra y no hervir éstas una vez preparadas. Esta técnica modificada permite observar las zonas de actividad proteolítica, ya que las proteasas separadas dentro del gel son inmersas en una solución proteica (caseína 3% p/v) y posteriormente, se revela su actividad en condiciones idóneas para la enzima, no pasando por el proceso de desnaturalización con mercaptoetanol y calor. El método consistió en utilizar geles de poliacrilamida al 12%, con detergente dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La electroforesis fue vertical con placas de 80 x 100 x 1.5 mm. Los extractos enzimáticos se cargaron con sus correspondientes diluciones para aplicar 20  $\mu$ g de proteína y 7 mU de actividad proteolítica. Para observar actividad inhibitoria, cada inhibidor fue incubado durante 60 min con el extracto enzimático antes de cargar el gel con el volumen de extracto correspondiente (1:1). Así, las proteínas con actividad se manifestaron en zonas claras contrastando con el fondo azul oscuro, mientras que las enzimas que fueron inhibidas no se manifestaron.

Una vez cargados los geles, se conectaron a una fuente de poder con 100 Volts, 8 miliAmperes y 4 Watts por cada gel. En general, los extractos utilizados corrían por 3 horas. Los marcadores moleculares utilizados fueron de bajo peso (6.5-66 kDa) de la marca Sigma, los cuales estaban compuestos de Lisozima (14.3 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina bovina (18.4 kDa), tripsinogeno bovino (24 kDa), pepsina porcina (34.7 kDa), albumina (45 kDa) y albumina bovina plasmática (66 kDa). Cuando las



proteínas fueron separadas, el gel fue incubado durante 2 horas en la solución de Azul de Commassie (R-250) al 0.1%, esto para revelar únicamente las bandas de proteína. Para revelar proteínas que presentan actividad proteolítica, previo a la tinción con Azul de Commassie, el gel se sumergió en el sustrato por un periodo de 30 min a 4 °C, para que el sustrato se difundiera dentro del gel a una actividad enzimática reducida. Posteriormente, la temperatura de incubación se incrementó a 25 °C durante 90 min, con la finalidad de que las fracciones activas digieran el sustrato proteico. El sustrato utilizado fue caseína al 3% en amortiguador Tris-HCl 50mM a pH 8. Los geles después de pasar por la tinción con Azul de Commassie (R-250) se decoloraron con una solución compuesta de ácido acético al 7% y metanol al 40%. Posteriormente, los geles se conservaron en otra solución con los mismos componentes que la anterior, pero con metanol al 5%.

## 5.12. Técnicas Histológicas

La técnica utilizada fue la de inclusión en parafina y tinción con Hematoxilina-Eosina. El análisis se llevó a cabo en el laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR. El estudio consistió en explorar la GD por lóbulos en el par izquierdo y sin separar los lóbulos en el par derecho, en un organismo hembra en estadio de intermuda con 48 horas de ayuno.

**Fijación.** A causa de lo frágil que es la GD y que al momento de manejarla se pierde la orientación de este órgano, se procedió a fijar la glándula sin disectar al organismo. Previo a la fijación, la langosta fue aletargada disminuyendo la temperatura del medio donde se encontraba. La solución fijadora utilizada fue la de Davidson's (Humason, 1972), que consiste en una mezcla de alcohol etílico, formaldehído saturado (en solución acuosa), ácido acético y glicerina. Se mantuvo el organismo completo en la solución fijadora durante 48 horas a 4 °C. Después de este tiempo, se extrajo íntegramente la GD del organismo, se tomaron la partes correspondientes sin perder la orientación de cada lóbulo o sección y la muestras

ya identificadas, pasaron a una solución de alcohol etílico para eliminar la solución de Davidson's.

**Deshidratación.** Consistió en someter el tejido a incrementos en concentración de alcohol etílico, por determinado tiempo. La concentración inició en 70°, siguiendo 80°, 90° y 96°. Las incubaciones fueron de una hora en cada uno de los alcoholes hasta llegar a los 100°, con incubación de dos horas. De ahí, las muestras pasaron por una mezcla de alcohol etílico absoluto y xilol (1:1) durante 20 min y finalizando en la solución de xilol absoluto durante 10 min.

**Inclusión en parafina.** Los tejidos deshidratados se incluyeron en Paraplast-xtra de punto de fusión de 54-56 °C. Las mezclas fueron parafina y xilol (1:1) para tres parafinas con diferente grado de pureza. Las inclusiones fueron entre una y dos horas. Finalmente, los tejidos se incluyeron en moldes adecuados al tamaño del tejido y se enfriaron en hielo para obtener la dureza necesaria para el corte.

**Cortes de las muestras y tinción.** Los cortes histológicos fueron en serie con un microtomo de rotación (Leica, modelo 2025), con 4 micras de grosor cada 200 micras, desde la parte anterior (A) hasta la posterior (P) del órgano. En todas las laminillas se utilizó la tinción de Hematoxilina-Eosina, la cual consiste en establecer un contraste entre los colorantes Hematoxilina de Harris y Eosina Azulosa Alcohólica, para poner de manifiesto estructuras de diferente composición química.

Las laminillas teñidas se observaron en un microscopio óptico Olympus BX45 y las imágenes fueron obtenidas con un sistema de análisis de imágenes Image-Pro PLUS versión 4.5.

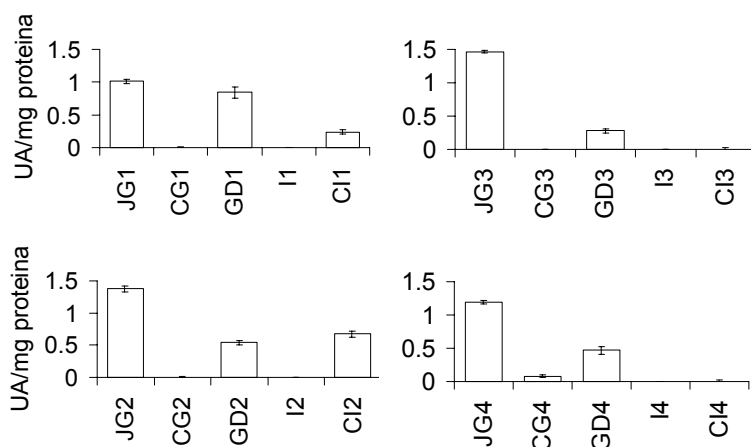
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Proteasas en el sistema digestivo

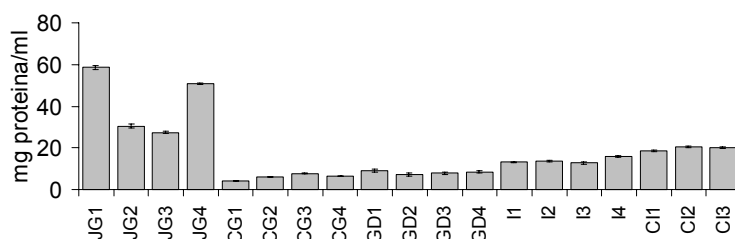
Al explorar en el sistema digestivo la actividad proteolítica en tejidos como el de las cámaras gástricas (CG), glándula digestiva (GD) e intestino (I), así como los fluidos tomados de las cámaras gástricas (jugo gástrico, JG) y del intestino (contenido intestinal, CI), se encontró la presencia de actividad proteinasa alcalina sólo en JG, GD y CI. La mayor actividad por mg de proteína se obtuvo en el JG en todos los organismos (**Figura 7**), teniendo una unidad de actividad específica más que los demás órganos.

En la GD se encontró actividad no mayor de 0.8 unidades por mg de proteína.

La actividad proteolítica entre individuos fue significativamente diferente ( $P < 0.05$ ), tanto en el JG como en la GD, no así la concentración de proteína en la GD. El JG



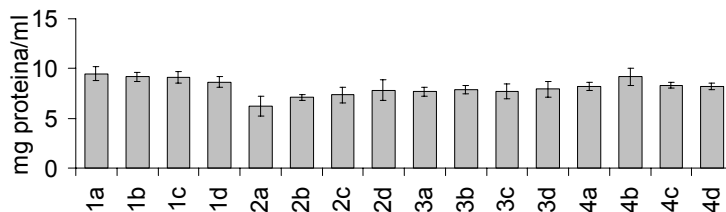
**Figura 7.** Actividad enzimática en tejidos y fluidos de cuatro organismos, evaluada a pH 8 con azocaseína como sustrato.



**Figura 8.** Concentración de proteína en tejidos y fluidos en cuatro organismos.

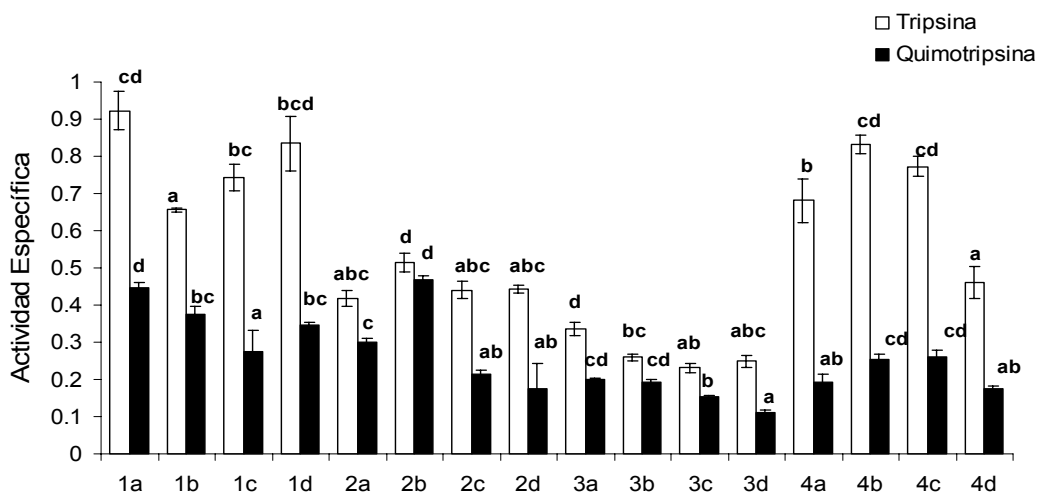
si mostró grandes diferencias en la concentración de proteína entre los individuos (Figura 8).

Respecto a la actividad proteolítica alcalina por lóbulo o sección de la GD, se encontró diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre las mismas, con una marcada tendencia en una sección (no identificada ya que se



**Figura 9.** Concentración de proteína en cada sección de la glándula digestiva (a,b,c,d), en cuatro organismos.

tomaron de manera aleatoria). No hay diferencias en la concentración de proteína entre los lóbulos de la GD (Figura 9). La tendencia en una sección de la GD no es tan evidente con sustratos específicos para actividad de tripsina y quimotripsina, pero si muestra diferencias entre secciones (Figura 10).



**Figura 10.** Actividad específica con sustratos sintéticos para tripsina (BAPNA) y quimotripsina (SAPNA), por sección de la GD en cuatro organismos. Las diferencias son comparadas por sección de la glándula en un organismo y para cada enzima.

En los ensayos de actividad con inhibidores específicos, se encontró un mayor porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica al utilizar SBTI, PMSF y TLCK. Los extractos incubados con EDTA y EGTA presentaron un menor porcentaje de inhibición, mientras que TPCK no tuvo efecto en la actividad proteolítica alcalina (Tabla III).

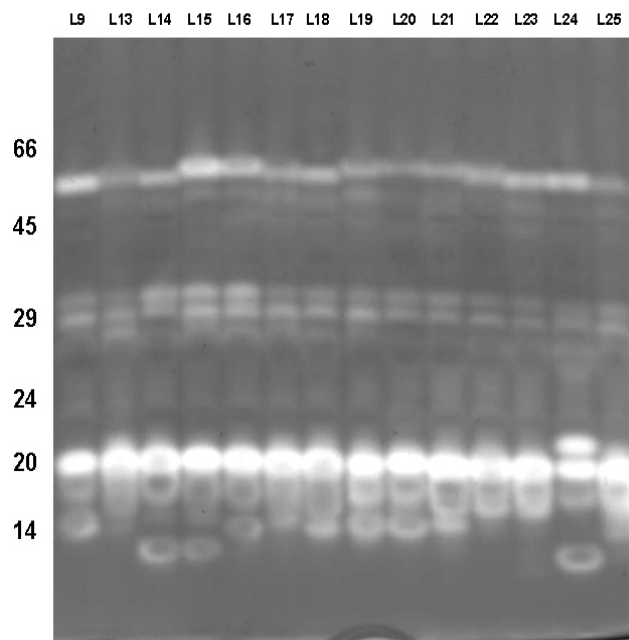
**Tabla III.** El efecto de inhibidores sobre la hidrólisis de azocaseína

% inhibición*			
	JG	GD	CI
<b>Ctrl</b>	0	0	0
<b>PMSF</b>	54±2.5	59±3.5	68±3.8
<b>TLCK</b>	46±0.5	50±1.8	41±7.6
<b>SBTI</b>	74±0.8	76±5.0	73±4.5
<b>TPCK</b>	9±1.6	0±3.6	----
<b>EDTA</b>	5±2.0	4±6.0	----
<b>EGTA</b>	15±1.9	4±3.3	----

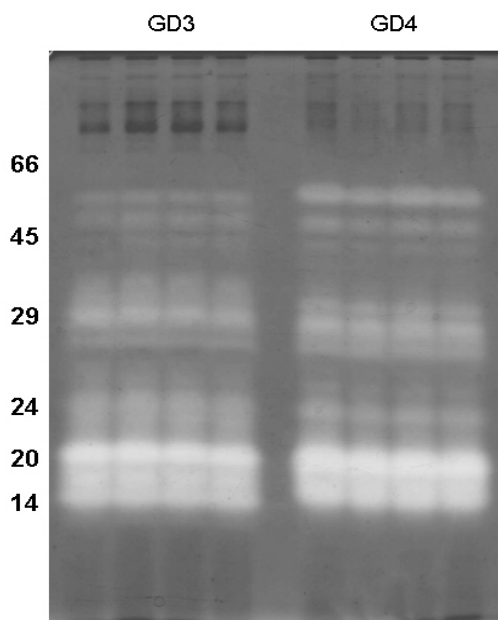
\* El porcentaje de inhibición fue calculado en base a la actividad en muestras sin el inhibidor, las cuales fueron tomadas como 0% de actividad inhibitoria.

A través de las técnicas electroforéticas se pudo observar una diferencia en el patrón proteolítico entre individuos, tanto en extracto de la GD como en el JG (Figura 11).

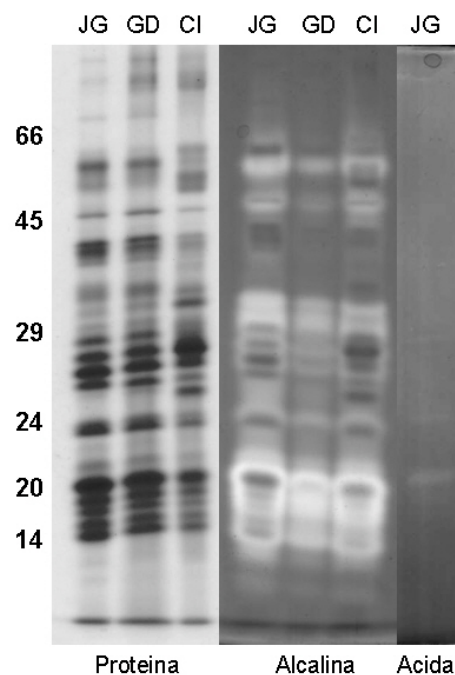
**Figura 11.** Patrón proteolítico en 14 organismos mantenidos durante tres meses bajo las mismas condiciones de alimentación y ambientales. Al momento de tomar la muestra, la L9 presentaba un estadio D2; L13-16, 24 y 25 en estadio C; L17-23 en estadio D0.



Entre secciones de la GD, el patrón de proteasas se conserva (**Figura 13**). Al realizar una comparación de los extractos del JG, GD y CI, se encontró que se conserva el mismo patrón proteolítico, pero con proporciones distintas de las proteasas, es decir, la concentración de una y otra proteasa es diferente en los tres extractos enzimáticos (**Figura 12**).



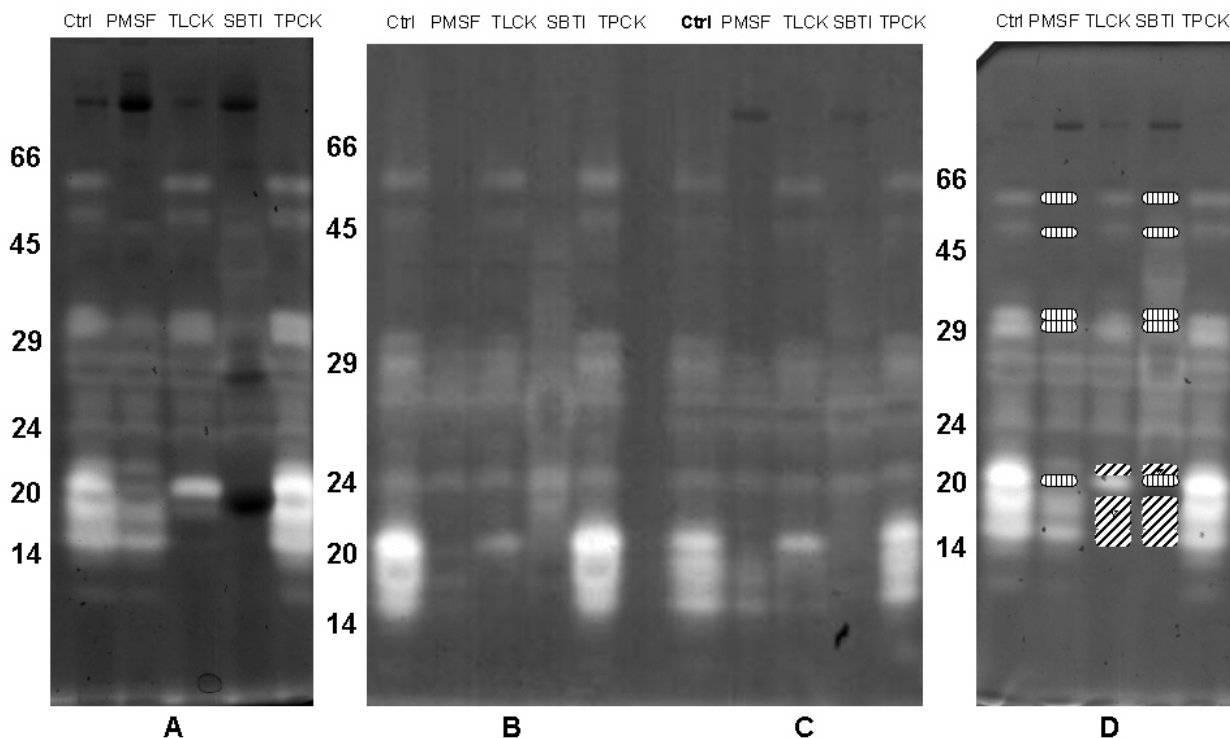
**Figura 13.** Actividad proteolítica en gel mostrando las secciones de la glándula digestiva (GD) de dos organismos. Para todas las secciones se cargaron 10 mU de actividad.



**Figura 12.** SDS-PAGE para proteína y actividad proteolítica en los tres extractos enzimáticos: jugo gástrico (JG), glándula digestiva (GD) y contenido intestinal (CI). Actividad alcalina fue evaluada a pH 8.0 y la ácida a pH 2.0 y sólo en JG.

En el zimograma se identificaron 15 fracciones con actividad proteolítica alcalina en la glándula digestiva. Las bandas de actividad con masas moleculares alrededor de 50 kDa y otras alrededor de 20 kDa fueron afectadas por el inhibidor de serin-proteasas, PMSF; el inhibidor de tripsina, TLCK, actuó sobre proteasas que se encuentran alrededor de 20 kDa; SBTI, inhibió a proteasas de 50 kDa y 20 kDa. Así, tenemos quimotripsinas de 20, 33, 35, 58 y 60 kDa y tripsinas de 16-22

kDa, y posiblemente una de 10 kDa. Este mismo patrón de inhibición se dividió en el JG y el CI (**Figura 14**). Las proteasas encontradas en el rango de 24 y 30 kDa no se identificaron.



**Figura 14.** Inhibición en gel de actividad proteolítica alcalina pH 8.0. Los inhibidores utilizados fueron PMSF (para serino proteasas), TLCK (tripsina), SBTI (tripsina y quimotripsina) y TPCK (quimotripsina). Ver discusiones para explicación de cómo se comportan los inhibidores (página 52).

En el ensayo con sustratos específicos para proteasas con actividad de tripsina y quimotripsina, se encontró una hidrólisis mayor en el sustrato específico para tripsina (BAPNA) comparada con quimotripsina (SAPNA) (**Tabla IV**). De la misma forma, el zimograma muestra bandas con mayor actividad proteolítica en las regiones que afectan los inhibidores específicos para tripsina (TLCK y SBTI).

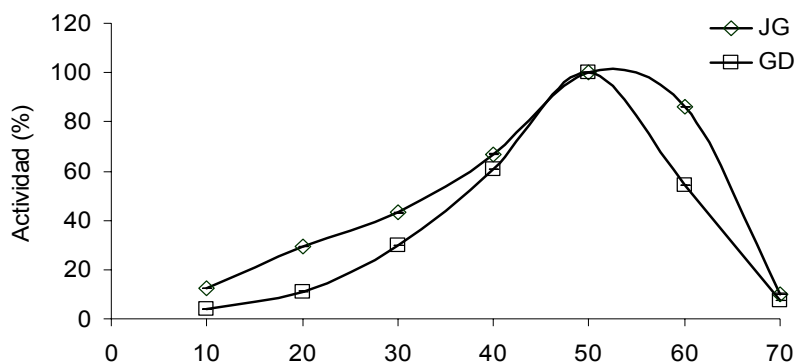
**Tabla IV.** Actividad amidasa en jugo gástrico (JG), glándula digestiva (GD) y contenido intestinal (CI), utilizando sustratos sintéticos específicos para tripsina (BAPNA) y quimotripsina (SAPNA).

Actividad Amidasa*			
	JG	GD	CI
BAPNA	1.54±0.08	0.55±0.02	0.35±0.02
SAPNA	0.52±0.02	0.25±0.02	0.13±0.01

\* La actividad de BAPNA y SAPNA son expresadas como  $\mu\text{mol}$  de nitroanilida liberada /min /mg proteína (actividad específica).

## 6.2. Parámetros físico-químicos de las proteinasas encontradas

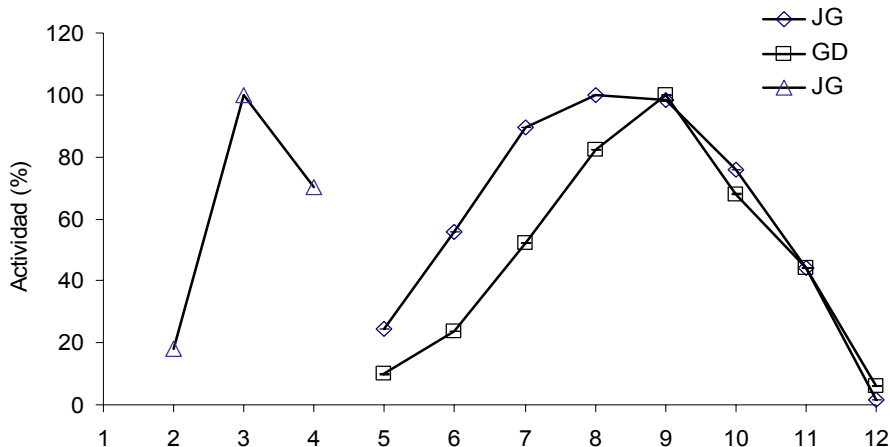
La temperatura óptima de las proteasas alcalinas fue de  $50^{\circ}\text{C}$  (Figura 15) y el pH óptimo en la región alcalina esta entre 8-9, tanto para la GD como para el JG; por otra parte, en la región ácida se encontró un óptimo de actividad de pH 3 (Figura 16). Las



**Figura 15.** Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica alcalina en extracto del jugo gástrico (JG) y de la glándula digestiva (GD). Actividad evaluada con azocaseína a pH 8.0

enzimas del JG se comportaron más estables a variables físico-químicas. Mientras que la actividad de la GD disminuyó 90% a pH 5, durante el tiempo de reacción con el sustrato (10 min), la actividad en JG disminuyó 75%. A pHs más alcalinos al óptimo, la actividad en ambos extractos enzimáticos fue similar.

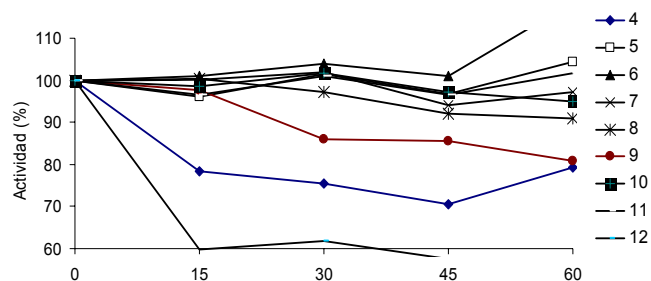




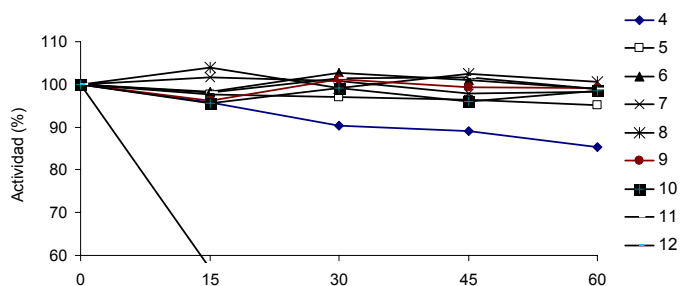
**Figura 16.** Efecto del pH en la actividad proteolítica alcalina en extracto del JG y de la GD. Actividad alcalina evaluada con azocaseína a y la ácida con hemoglobina.

La misma respuesta se observó para temperatura; la actividad de la GD disminuye 96% a 10 °C y la de JG sólo 87%. En este caso, la disminución en la actividad de el JG en ambos extremos del óptimo es menos dramática que en la GD.

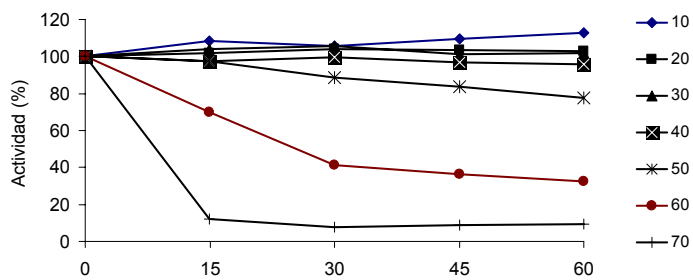
Los ensayos de estabilidad al pH indicaron una pérdida de la actividad proteolítica mayor del 20% en la GD a pH 4 a los 15 min de incubación (**Figura 17**), mientras que en el JG se pierde el 5% de la actividad al mismo pH y tiempo de incubación (**Figura 18**). En general, la GD pierde hasta el 20% de la actividad después de 60 min de incubación, en los valores de pH que están más alejados del óptimo (pH 8-9). En el JG, la actividad a diferente pH decrece hasta un 5% después de 60 min de incubación en los valores más alejados del óptimo. En el caso de la termoestabilidad, los resultados entre los dos extractos enzimáticos son muy similares. Las proteasas tanto de la GD como del JG son estables durante 60 min hasta los 50 °C. A los 30 min de incubación a 60 °C, pierden casi el 60% de la actividad y a los 15 min de incubación a 70 °C, pierden más del 80% de la actividad proteolítica a pH 8 (**Figura 19** y **Figura 20**).



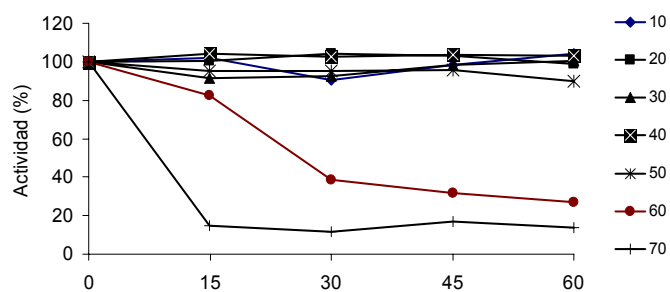
**Figura 17.** Efecto del pH en la estabilidad de las proteasas alcalinas del extracto de la glándula digestiva (GD).



**Figura 18.** Efecto del pH en la estabilidad de las proteasas alcalinas del jugo gástrico (JG).



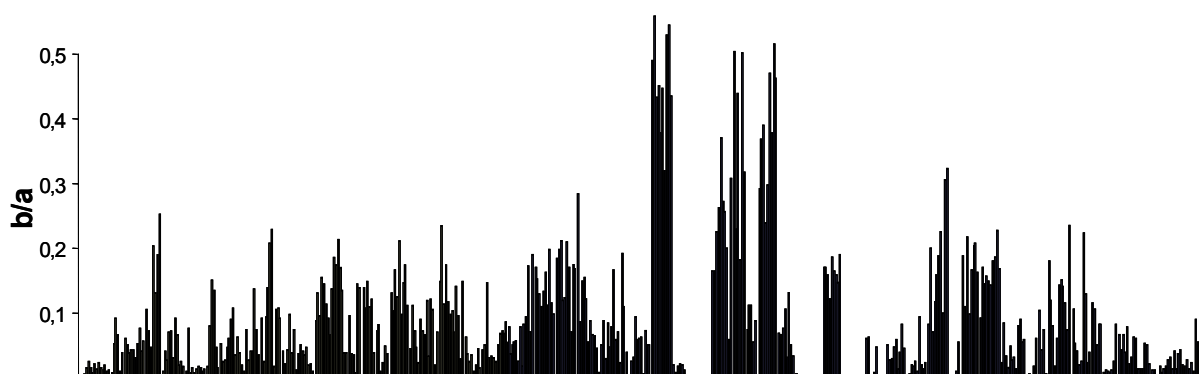
**Figura 19.** Efecto de la temperatura en la estabilidad de las proteasas alcalinas del extracto de la glándula digestiva (GD).



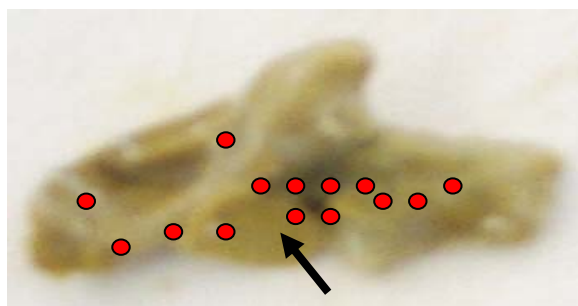
**Figura 20.** Efecto de la temperatura en la estabilidad de las proteasas alcalinas del jugo gástrico (JG).

### 6.3. Análisis histológico

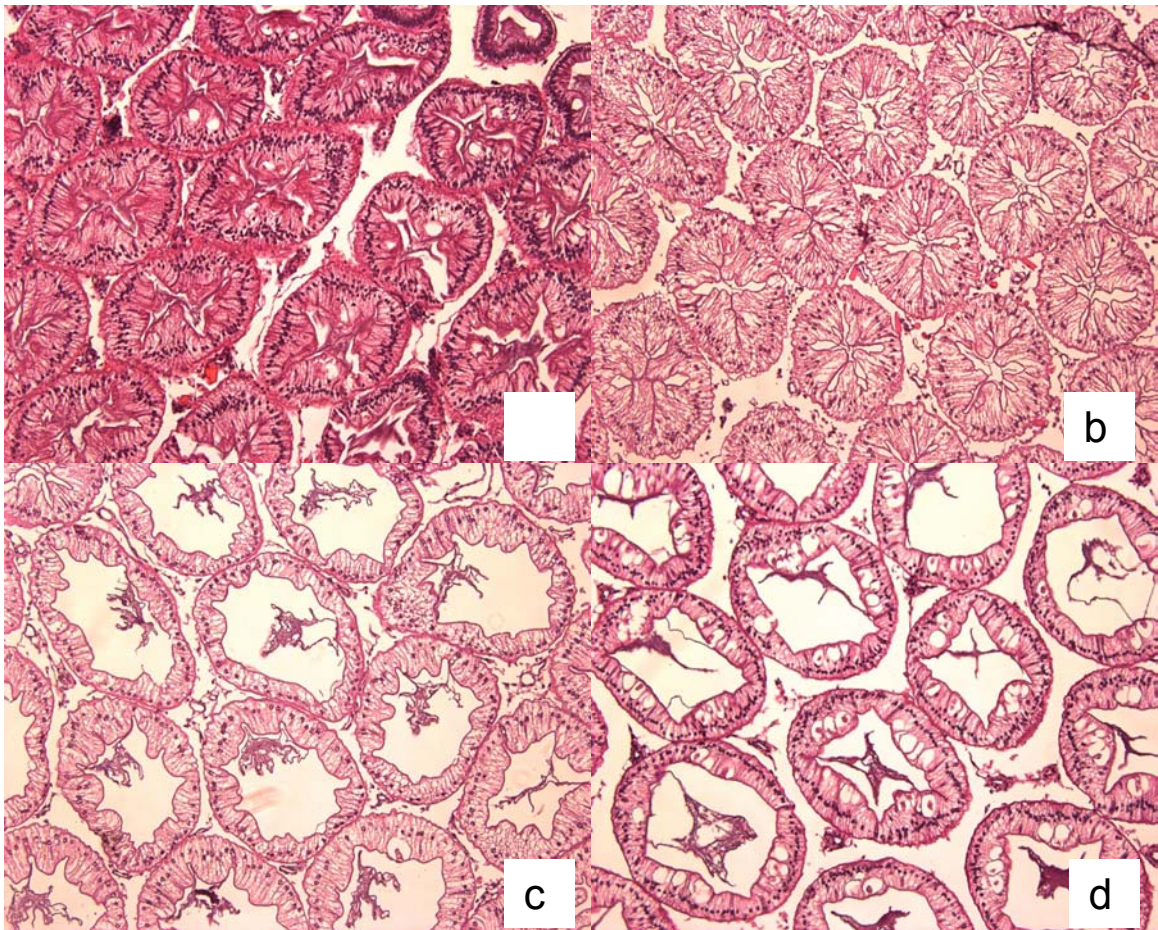
Con la tinción de Hematoxilina-Eosina no se logró observar una tendencia, por lóbulo de la GD, en la frecuencia de los tipos celulares F y B. Sin embargo, se observó que los cortes de los lóbulos que se encontraban más próximos a las cámaras gástricas y que se orientaban hacia la región ventral (**Figura 23**), presentaban regiones con un mayor diámetro del lumen tubular. Para confirmar esta observación, todos los cortes transversales realizados en el par derecho se analizaron midiendo un índice relativo del área del lumen de los túbulos, dividiendo el área del lumen entre el área de cada túbulo. Al graficar los valores de los índices (**Figura 21**), se observó un incremento considerable en la región de la GD adyacente a las cámaras gástricas (**Figura 22**).



**Figura 21.** Índice relativo del área del lumen de los túbulos a lo largo del par derecho de la glándula digestiva, desde la parte anterior hasta la posterior. Cada valor indica el tamaño del lumen (b) con respecto al tamaño del túbulo (a).



**Figura 22.** Foto del par derecho de la glándula digestiva, indicando las áreas con los mayores índices de área del lumen. La parte que señala la flecha es la región que conecta la glándula digestiva a las cámaras gástricas.



**Figura 23.** Cortes transversales de los túbulos de la glándula digestiva (par derecho), en donde se muestran las diferencias en el tamaño del área del lumen del túbulo en diferentes regiones de la glándula. De las 99 laminillas que se obtuvieron y que correspondieron a todo el par derecho, la **a)** muestra la lámina número 13; **b)** lámina 49, región dorsal; **c)** lámina 49, región ventral; **d)** lámina 57, región ventral.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Actividad en los extractos enzimáticos

Las proteinasas digestivas presentes en la especie *Panulirus interruptus* muestran características similares a otras especies de crustáceos. Esta similitud está basada en el óptimo pH en la región alcalina, masa molecular alrededor de los 30 kDa y actividad del tipo tripsina. La actividad del tipo quimotripsina y la actividad en la región ácida coincide sólo en unas pocas especies de crustáceos (Tabla V).

**Tabla V.** Características de proteasas digestivas en algunas especies de crustáceos.

Especie	pH óptimo	PM kDa	Enzima estudiada	Sustrato utilizado	Referencia
<i>Homarus americanus</i>	4• y 8 2.5 y 5.5	12.5•, 25* y 50	Tripsina* quimotripsina	azocoll hemoglobina caseina	Brockerhoff et al. (1970), Hoyle (1973)
<i>Cancer borealis</i> y <i>Cancer irroratus</i>	3.8 y 8	16 y 20	Proteasas en general	caseina y azocoll	Brun y Wojtowicz (1974)
<i>Panulirus japonicus</i>	7.5	11 y 24*	Tripsina*, NO quimotripsina	Caseina	Galgani y Nagayama (1987)
<i>Penaeus sp</i>	7.8	25, 27 y 28	quimotripsinas	SAPNA	Tsai et al. (1991)
<i>Homarus gammarus</i>	2.5, 5.8 y 8.3*	18	Tripsina* NO quimotripsina	caseina Azocaseina Azocoll Congo red	Glass y Stark (1994)

(\*) y (•) Datos que corresponden en filas

De los extractos enzimáticos estudiados (CG, JG, GD, I y CI), sólo se encontró actividad proteinasa alcalina en JG, GD y CI. Estos tres extractos enzimáticos tienen el mismo patrón proteolítico (Figura 13), lo cual se respalda con el trabajo

realizado por Córdova-Murueta (*comunicación personal*) donde se muestran patrones proteolíticos similares entre la glándula digestiva y heces del camarón blanco *Penaeus vannamei*.

Respecto a las diferencias en actividades por mg de proteína entre los tres extractos enzimáticos (JG, GD y CI), el JG fue el extracto que presentó una mayor actividad (**Figura 7**). Posiblemente, esto se deba a que en la GD se encuentran otras proteínas con diferentes funciones para el mantenimiento celular, las cuales se reflejan en el aumento de la concentración de proteína soluble pero no en el de actividad proteolítica. En el JG se secretan las proteasas activas de la GD, y dado que los individuos se encontraban en ayuno, el jugo gástrico presentaba mayor concentración de enzima activa por mg de proteína. Por otra parte, también es posible que esta diferencia entre la actividad específica de JG y GD se vea potenciada por el efecto que ejerce la concentración de sales (como el NaCl) en la actividad, ya que la ingesta del alimento en estos crustáceos viene acompañada de sales entre 0.3-0.5M.

La influencia que tiene la concentración de sales en la actividad se ve apoyado por Tsai *et al.* (1991), quienes estudiaron el efecto del NaCl y KCl en la cinética de quimotripsinas purificadas hacia el sustrato aniónico SAPNA y el neutral APNA en varias especies de peneidos. La tasa hidrolítica hacia los sustratos N-succinil se fue incrementando al adicionar sales al medio de reacción, pero la tasa enzimática por sustratos N-acetil no fue afectada. Se encontró que mientras la quimotripsina incrementa su actividad un 45% a una salinidad de 0.4M, la actividad de tripsina disminuye. Los autores explican que el incremento en la actividad por el efecto del NaCl es causado por un aumento en las interacciones hidrofóbicas, disminuyendo la repulsión electrostática entre la enzima y el sustrato. Por otra parte, Vega-Villasante *et al.* (1995), encuentran una considerable actividad proteolítica a una concentración de 2M de NaCl en *Penaeus californiensis*. Otro ejemplo lo menciona Whitaker (1994), en donde se observa un efecto positivo de los iones

monovalentes (principalmente el cloro) sobre la actividad de alfa amilasa en mamíferos.

El contenido intestinal (CI), presentó la menor actividad proteolítica alcalina. Se cree que esta menor actividad es por una pérdida en la actividad enzimática producto de una autohidrólisis y reabsorción en el sistema. La actividad proteolítica alcalina encontrada en el CI y su ausencia en el tejido del intestino (I), indica que las enzimas son arrastradas a lo largo del tubo digestivo y excretadas junto con el alimento no asimilado.

El ensayo enzimático del tejido de la CG, mostró la ausencia de proteinasas y un contenido muy bajo de proteínas solubles. La ausencia de actividad alcalina en este tejido es debida a que las enzimas son sintetizadas en la glándula digestiva y transportadas hacia las cámaras gástricas en forma de jugo gástrico, funcionando estas cámaras como un reservorio para la mezcla, trituración y digestión del alimento ingerido (Dall, 1967; Barker y Gibson, 1977).

## 7.2. Diferencias intraespecíficas en la actividad y patrón proteolítico

La diferencia entre individuos tanto en la actividad como en el patrón detectado por SDS-PAGE modificado (**Figura 11**) indica que a pesar de estar, aparentemente bajo las mismas condiciones, se presentan marcadas diferencias entre organismos de una misma especie. Este fenómeno de variabilidad intraespecífica se ha venido estudiando por autores como Mitton y Grant (1984) y Koehn y Bayne (1989) y concluyen que la variabilidad intraespecífica viene dada por una dependencia genotípica en el balance entre la síntesis e hidrólisis proteica. También mencionan, que los individuos con una mayor heterocigocidad muestran menores variaciones fenotípicas. El estudio de las ventajas que le confieren a los organismos que tengan una mayor heterocigocidad, se ha venido realizando por McCarthy *et al.* (1994) en la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*. Estudio que

muestra que la mayoría de los individuos que son heterocigotos tienen mayor tasa de crecimiento, esto como resultado de un reducido costo de mantenimiento y un aumento en la eficiencia metabólica.

### 7.3. Diferencias entre lóbulos de la glándula digestiva

La diferencia encontrada en la actividad específica alcalina entre lóbulos de la GD (**Figura 10**) pero no en concentración proteica (**Figura 9**), posiblemente es consecuencia de una síntesis o una activación heterogénea de las proteinasas digestivas. Esta concentración enzimática, no uniforme dentro de un órgano, lo menciona Whitaker (1994). Este autor da el ejemplo del hígado, el cual está compuesto de diferentes tipos celulares con diferentes complementos enzimáticos. Otra hipótesis, referente a la heterogeneidad de la actividad enzimática, es que los túbulos que están más cerca de la cámara cardiaca (o cámara anterior) acumulan mayor jugo gástrico, posiblemente sintetizado de los túbulos posteriores. Cabe mencionar que la GD es un órgano par lobulado el cual se ramifica en múltiples túbulos y estos desembocan en canales que incrementan el diámetro conforme se llega a la cámara cardiaca. Posiblemente, esta acumulación de JG en los túbulos próximos de las cámaras se incrementa al entrar el alimento predigerido, ya sea como respuesta a un estímulo o por acumulación del jugo que regresa de las cámaras hacia la GD. Esta apreciación se confirma en los resultados encontrados con las técnicas histológicas (**Figura 23**).

En el ensayo para medir la actividad proteolítica alcalina, se encontró que en una sección (no identificada) muestra una mayor diferencia en actividad con respecto a las restantes. No así al medir la actividad con sustratos específicos para tripsina y quimotripsina. Esta incongruencia puede ser causada por estrategias metodológicas, ya que la técnica de actividad proteolítica alcalina incluye la acción de todas las proteinasas alcalinas y no sólo de una clase específica. La existencia de actividad leucin aminopeptidasa y carboxipeptidasa A y B ha sido documentada



en trabajos como el de Galgani y Nagayama (1988). Posiblemente la acción de estas enzimas se vea reflejada en el ensayo de actividad proteolítica alcalina.

#### 7.4. Respuesta a inhibidores específicos

El porcentaje de inhibición (que osciló entre 50 y 80%) hacia SBTI, PMSF y TLCK, indica que las proteinasas digestivas de esta especie de langosta están compuestas en su mayoría por serin-proteasas. De éstas, la mayoría son tripsinas, ya que los inhibidores específicos para esta enzima (TLCK y SBTI) presentan el mayor porcentaje de actividad. Esto se corrobora al comparar actividad específica de tripsina y quimotripsina, siendo en tripsina el doble de la actividad mostrada en quimotripsina (**Tabla IV**).

La mínima y nula respuesta hacia los inactivadores EDTA y EGTA indican que las proteinasas de la familia metalo no predominan en estos extractos. Este resultado coincide con los trabajos realizados en la especie de langosta *Homarus americanus* (Brockerhof *et al.*, 1970; Hoyle, 1973), en donde estos autores no encontraron efecto inhibitorio por EDTA ni activación por iones como el Zn. Además, la inacción de EDTA y EGTA indica que las tripsinas de esta especie no requieren calcio para su actividad, contraponiéndose a lo encontrado por Figueiredo *et al.* (2001) y Kim *et al.* (1994). Sin embargo, existen reportes acerca de la presencia de metaloproteinases en especies de langostino y langostilla (García-Carreño y Haard, 1993).

Respecto al TPCK, el cual es específico para quimotripsina de mamíferos, no muestra efecto inhibitorio de consideración en la actividad proteolítica. Esto no indica la ausencia de actividad tipo quimotripsina, ya que en los trabajos de Tsai *et al.* (1986a; 1986b) y Jiang *et al.* (1991) demuestran la actividad de esta serin-proteinasa, además que en este trabajo se encontró actividad con sustrato sintético específico para quimotripsina. Otro dato que indica la presencia de quimotripsinas en esta especie de crustáceo, se encuentra en Hernández-Cortés

(1997). En este trabajo se realizó un ensayo sometiendo a una quimotripsina purificada, de una especie de crustáceo, a varios inhibidores. A pesar de no haber encontrado inhibición con TPCK, se han identificado proteasas del tipo quimotripsina, en base a su inhibición por PMSF y SBTI, además de no tener efecto inhibitorio por TLCK (Hernández-Cortés, 1997). Por otra parte, existen reportes de casos de inhibición con otro inhibidor de quimotripsina, ZPCK, en extractos enzimáticos de crustáceos (García-Carreño *et al.*, 1994). Por lo tanto, las variaciones en la presencia de actividad tipo quimotripsina entre las especies pueden ser consecuencias técnicas, producto de las limitantes de sustratos e inhibidores, los cuales son específicos para proteasas de vertebrados (Tsai *et al.*, 1986b).

Las limitantes metodológicas se pueden apreciar en varios trabajos donde se han comprobado que existen diferencias especie-específicas en cuanto a especificidad por el sustrato y por inhibidores, a pesar de que las enzimas tengan secuencias muy similares (Terra y Ferreira, 1994). En esta misma línea, también se han encontrado diferencias especie-independiente, mostrando que dentro de una misma especie aparecen isoformas de la quimotripsina con distinta especificidad por el sustrato (Hudaky *et al.*, 1999).

## 7.5. Características de las proteinasas encontradas

De acuerdo a la respuesta de los inhibidores específicos, las masas moleculares de las serin-proteasas están alrededor de los 50, 20 y una en 10 kDa (**Figura 14**). Las tripsinas de esta especie de langosta están entre los 16 y 22 kDa, masas moleculares cercanas a las 6 isoenzimas encontradas en *Panulirus japonicus*, las cuales fueron en torno a los 24 kDa. Sin embargo en *P. japonicus* no se presentó un fuerte efecto inhibitorio de TLCK y SBTI sobre las tripsinas, mostrando diferencias funcionales con tripsinas de vertebrados (Galgani y Nagayama, 1987a). Es probable que el resto de las proteinasas son de tipo colagenasas, ya

que estos crustáceos se alimentan de tejido animal que contiene colágeno como componente proteico.

Referente a la proteinasa de 10 kDa, esta bien documentado en crustáceos la existencia de proteasas de bajo peso molecular, las cuales están alrededor de los 11 kDa (Armstrong y De Villez, 1978; Galgani y Nagayama, 1987; Glass y Stark, 1994; Ceccaldi, 1998). Posiblemente las proteasas de bajo peso molecular, las cuales están ausentes en vertebrados, compensan la carencia de pepsina en algunas especies de crustáceos. La misma especie molecular esta asociada a actividades con diferentes pH óptimos, pH 2 y 6 en general (Armstrong y De Villez, 1978; Glass y Stark, 1994).

## 7.6. Parámetros físico-químicos de las proteinasas encontradas

**pH.** En múltiples trabajos se ha encontrado que las proteasas en los sistemas digestivos actúan por debajo de lo óptimo. En esta especie de crustáceo el pH, tanto del jugo gástrico como el de la glándula digestiva, es ligeramente ácido ( $6.3 \pm 0.3$ ) más de dos unidades por debajo del óptimo (**Figura 16**). Valores similares de pH en extractos enzimáticos son reportados en otras especies de crustáceos (Brockhoff, 1970; Hoyle, 1973; Glass y Stark, 1994; Figueiredo *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha visto que el alimento, una vez que se ingiere, llega alcalinizar ligeramente el jugo digestivo (Barker y Gibson, 1977). Por otra parte, se ha observado que el valor óptimo de pH no se comporta similar en todos los estadios de vida, ya que en larvas de crustáceos se ha encontrado un óptimo cercano al pH del JG (Jones *et al.*, 1997).

El efecto que tiene el pH en la actividad y en la estabilidad enzimática es consecuencia de estrategias metodológicas. En las curvas de actividad las enzimas bajan su actividad al alejarse del valor óptimo de pH, esto es debido al efecto que tienen los iones  $H^+$  en los grupos prototrópicos que participan en la

formación del producto (Whitaker, 1994). En las curvas de estabilidad se observa una mayor tolerancia del extracto enzimático a los valores de pH alejados del óptimo, comportamiento influenciado por la restauración de los grupos ionizables al momento del tiempo de reacción, ya que el ensayo de estabilidad se efectuó en condiciones de óptimo pH.

Los extractos analizados de la GD y JG, mostraron poca actividad de las proteasas a valores ácidos de pH, no mostrando el mismo efecto en la estabilidad. En estos extractos se observó una clara estabilidad a valores ácidos de pH, estables a pH 5 incluso hasta pH 4 en JG. Este resultado se ha confirmado en trabajos previos (Galgani y Nagayama, 1987a; Glass y Stark, 1994) y se contraponen con lo encontrado por Martínez *et al* (1988). Este autor muestra que las proteasas, principalmente tripsinas aisladas de organismos marinos (excepto tripsinas de peces pulmonados), son inestables en valores ácidos de pH, contrario a las catiónicas de mamíferos.

En los valores óptimos de pH se presentan dos picos de actividad (**Figura 16**) uno de ellos entorno a pH 3. Esto coincide con la estabilidad de las proteasas a los pHs ácidos. Los valores óptimos en dos regiones de la curva de pH han sido registrados en varios trabajos, tanto en especies de langosta (Brockhoff *et al.*, 1970; Hoyle 1973; Glass y Stark, 1994), como en otras especies de crustáceos (Brun y Wojtowicz, 1974; Figueiredo *et al.*, 2001). Glass y Stark (1994), mencionan que la misma especie molecular es asociada en ambos picos de actividad. No se ha descrito el significado fisiológico de este fenómeno pero consideramos que esto le confiere una mayor amplitud en el grado de hidrólisis, que pudiera estar asociado a las variaciones estacionales en las preferencias alimentarias de esta especie de langosta.

**Temperatura.** Lo mismo que ocurrió con el pH óptimo ocurre con el óptimo de temperatura, en donde las enzimas actúan por debajo del punto óptimo (**Figura**

15). Esta especie de langosta vive en aguas que son hasta 30°C menor (Vega-Velazquez *et al.*, 1996) a la temperatura óptima de las proteasas alcalinas. Este mismo comportamiento se ha observado en otras especies de langosta (Galgani y Nagayama, 1987a) y en otras especies de crustáceos (Galgani y Nagayama, 1988; Jiang *et al.*, 1991). Estos últimos autores encontraron diferentes óptimos de temperatura en varias isoformas de tripsina (Jiang *et al.*, 1991).

Al comparar las curvas de estabilidad y actividad, tanto al pH como a la temperatura, entre el JG y la GD, se observa ligeramente una mayor estabilidad en el JG (**Figura 17** a la **Figura 20**). Esta mayor estabilidad por parte del JG respecto a la GD, posiblemente esta influenciado por las sales que entran en las cámaras gástricas al momento de la ingesta de alimento. En cambio, de acuerdo a lo ya muy mencionado de que la estabilidad enzimática es favorecida en homogenizados de tejidos por la protección que ofrece el material coloidal (como carbohidratos, pectinas y otras proteínas) a la estructura enzimática (Whitaker, 1994), era de esperarse una mayor estabilidad en el extracto de la GD. Sin embargo, en el trabajo de Sakharov y Litvin (1990), se muestra a través de las curvas de termoinactivación con diferentes concentraciones enzimáticas, que la interacción proteína-proteína no influye en la estabilidad enzimática.

En general, se ha encontrado que las enzimas digestivas son más estables a temperaturas bajas y la inactivación a temperaturas elevadas es consecuencia de una parcial desnaturalización de la molécula. Los mecanismos para incrementar la estabilidad térmica de las proteínas son por medio de la fuerza que ejercen interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro, en el interior de la molécula proteica (Heu *et al.*, 1995). También se ha visto, que existe una correlación entre el tamaño y complejidad de la molécula enzimática, hacia la susceptibilidad a parámetros ambientales (Whitaker, 1994).

## 8. CONCLUSIONES

De acuerdo con las técnicas utilizadas, para describir y clasificar las principales proteasas que se localizan en el sistema digestivo de *Panulirus interruptus*, se concluye que la glándula digestiva es el único órgano de síntesis y excreción de proteasas alcalinas en el sistema digestivo. Estas proteasas son vaciadas a las cámaras gástricas y forman parte de la mezcla digestiva del jugo gástrico, además de encontrarlas como parte del contenido intestinal. El jugo gástrico es el mejor candidato para futuros ensayos enzimáticos, ya que presentó una mayor actividad por mg de proteína y ligeramente una mayor estabilidad a parámetros físico-químicos.

La glándula digestiva no es un órgano homogéneo en cuanto a la actividad proteolítica alcalina detectada, ya que una región de la glándula presentó mayor actividad específica con respecto a las tres regiones restantes. Esta región no fue identificada. Sin embargo, con ayuda de las técnicas histológicas, se consiguió observar que los túbulos adyacentes a las cámaras gástricas presentaban un mayor diámetro del lumen. Por consiguiente, es de esperarse que en esta región se concentre la mayor actividad específica. Este dato es importante en cuestiones técnicas para el manejo de la glándula en futuros ensayos.

Las proteasas encontradas en *P. interruptus* actúan en el rango alcalino, siendo su pH óptimo entre 8-9 y mostrando a la vez un óptimo en la región ácida por encima de pH3. Estas proteasas tienen un amplio margen de acción en parámetros de pH y temperatura. Conservan el 40% de su actividad durante una hora en un pH de 6 a 11, estando dentro de este rango el valor encontrado *in vivo* (pH 6). También son capaces de hidrolizar proteína a valores muy ácidos de pH. Tienen estabilidad durante una hora a temperaturas en el rango de 10 a 50 °C, consiguiendo un óptimo a 50 °C.

Las proteasas digestivas en esta especie de crustáceo están compuestas en su mayoría por serín-proteasas, con masas moleculares entre 50 y 20 kDa, principalmente. También se presenta una proteasa de bajo peso molecular o LMW (10 kDa), que al parecer es del tipo tripsina. Proteasas del tipo tripsina se presentan de 5-6 isoformas, entre 16-22 y una en 10 kDa. Estas tripsinas tienen la mayor actividad proteolítica, por lo que muestran un papel importante en la digestión y al parecer no requiere de calcio para su actividad. Proteasas del tipo quimotripsina se encontraron en esta especie de crustáceo, aunque no de forma clara por cuestiones técnicas. Las isoformas de quimotripsina presentaron masas moleculares de alrededor de 20, 33, 35, 58 y 60 kDa.

Por último, se concluye que la expresión de proteasas que participan en el proceso digestivo en esta especie de crustáceo no es similar entre individuos. Hay variaciones intraespecíficas muy marcadas en el patrón proteolítico alcalino. En estas variaciones no se encontró una relación con algún factor externo o funcional, por lo que especulamos que es de origen filogenético. Aún así es necesario realizar un estudio específico para dilucidar la respuesta a las variaciones encontradas y si estas dan alguna ventaja en el proceso digestivo de cada individuo.

## 9. LITERATURA CITADA

- Al Mohanna, S. Y., Nott, J. A., Lane, D. J. W. 1985a. Mitotic E and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 65:901-910.
- Al Mohanna, S. Y., Nott, J. A., Lane, D. J. W. 1985b. M-midget cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* de Haan. *Crustaceana.* 48:260-268.
- Al Mohanna, S. Y., Nott, J. A. 1986. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 66:403-414.
- Al Mohanna, S. Y., Nott, J. A. 1987. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus*. *Mar. Biol.* 95:129-137.
- Al Mohanna, S. Y., Nott, J. A. 1989. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* during the moult cycle. *Mar. Biol.* 101:535-544.
- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22:79-89.
- Armstrong, J. R., De Villez, E. J. 1978. Proteases of low molecular weight in the digestive fluids of decapods. *Can. J. Zool.* 56:2225-2229.
- Barcklay, M. C., Dall, W., Smith, D. M. 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 68:229-244.
- Barker, P. L., Gibson, R. 1977. Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 25:297-324.
- Barret, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F. 1998. Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press. U.S.A. 1665 pp.
- Bell, T. A., Lightner, D. V. 1988. A handbook of normal Penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society. Allen Press. U.S.A.
- Beynon, R., Bond, J. S. 2001. Proteolytic enzymes. 2 ed. Oxford University Press. N. Y. 340 pp.



- Biesot, P. M., Capuzzo, J. M. 1990. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 136:107-122.
- Bodkin, J. L., Browne, L. 1992. Molt frequency and size-class distribution in the California spiny lobster *Panulirus interruptus* as indicated by beach-cast carapaces at San Nicolas Island, California. *Calif. Fish and Game* 78(4):136-144.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.* 72:248-254.
- Brethes, J. C., Parent, B., Pellerin, J. 1994. Enzymatic activity as an index of trophic resource utilization by the snow crab *Chionoecetes opillio* (O. Fabricius). *J. Crust. Biol.* 14(2):220-225.
- Briones-Fourzan, P. 1992. Biología y pesca de las langostas de México. En: Gonzalez-Farias, F., de la Rosa Velez, J. Temas de oceanografía biológica en México. Vol II. Universidad Autonoma de Baja California. Ensenada, B. C., México. 207-236pp.
- Brockerhoff, H., Hoyle, R. J., Hwang, P. C. 1970. Digestive enzymes of the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Bd. of Canada.* 27:1357-1370.
- Brun, G. L., Wojtowicz, M. B. 1974. Comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of Jonah crab (*Cancer borealis*) and Rock crab (*Cancer irroratus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 53B:387-391.
- Brunet, M., Arnaud, J., Mazza, J. 1994. Gut structure and digestive cellular processes in marine crustacea. *Oceanograp. Mar. Biol. and Ann. Rev.* 32:335-367.
- Ceccaldi, H. J. 1998. A synopsis of the morphology and physiology of the digestive system of some crustacean species studied in France. *Reviews in Fisheries Sciences.* 6(182):13-39.
- Chen, H. Y. 1993. Recent advances in nutrition of *Penaeus monodon*. *World Aquaculture Society.* 24(2):231-240.

- Cuzon, G., Cahu, C., Aldrin, J. F., Messenger, J. L., Stephan, G., Mevel, M. 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. *Procc. World Mariculture Soc.* 11:410-423.
- Cuzon, G., Hew, M., Cognie, D., Soletechnik, P. 1982. Time lag effect of feeding on growth of juvenile shrimp *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture.* 29:33-44.
- Dall, W. 1967. The functional anatomy of the digestive tract of a shrimp *Metapenaeus bennettiae* Racek and Dall. *Aust. J. Zool.* 15:699-714.
- Dall, W. 1990. The biology of the Penaideae. En: Blaxter, J., Southward, A. (eds). *Advances in marine biology.* Vol 27. Academic Press, San Diego. 21-29pp
- Dall, W. 1992. Feeding, digestion and assimilation in Penaeidae. *Proceedings of the Aquaculture Nutrition Workshop.* 57-63.
- Del Mar, E. G., Largman, C., Brodrick, J. W., Goekas, M. C. 1979. A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal. Biochem.* 99:316-320.
- Dendinger, J. E. 1987. Digestive proteases in the midgut gland of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B(2):5.03-5.06
- Díaz-Arredondo, M. A., Guzmán del Prío, S. A. 1995. Feeding habits of the spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) in Bahía Tortugas, Baja California Sur. *Ciencias Marinas.* 21(4):439-462.
- Díaz-López, M., García-Carreño, F.L. 2000. Applications of fish and shellfish enzymes in food and feed products. En: Haard, N.F., Simpson, B. K. *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality.* Marcel Dekker, N.Y., 571-618.
- Donachie, S., Saborowski, R., Peters, G., Buchholz, F. 1995. Bacterial digestive enzyme activity in the stomach and hepatopancreas of *Meganyctiphanes norvegica* (M. Sars, 1857). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 188:151-165.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95:271-278.
- Fernández-Gimenez, A. V., García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A., Fenucci, J. L. 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri*:

partial characterization and relationship with molting. *Comp. Biochem. 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. *Comp. Biochem. Physiol.* 132B:593-598.
- Figueiredo, M. S. R. B., Kricker, J. A., Anderson, A. J. 2001. Digestive enzyme activities in the alimentary tract of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda:Parastacidae). *J. Crustacean Biol.* 21(2):334-344.
- Galgani, F., Nagayama, F. 1987a. Digestive proteinase in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B(4):889-893.
- Galgani, F., Nagayama, F. 1987b. Digestive proteinases in five species of Lithodidae. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B(1):103-107.
- Galgani, F., Nagayama, F. 1988. Digestive proteolysis and digestive proteinases in deep sea crabs *Geryon affinis* and *Chionoectes japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 54(6):983-987.
- García-Carreño, F. L. 1991. Student-friendly classification for proteases. *Biotechnology Education.* 3(2):144-149.
- García-Carreño, F. L. 1992. The digestive proteases of langostilla *Pleuroncodes planipes*: their partial characterization, and the effect of feed on their composition. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B(3):575-578.
- García-Carreño, F. L. 1993. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education.* 3(4):145-150.
- García-Carreño, F. L., Haard, N. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17:97-113.
- García-Carreño, F. L., Dimes, L. E., 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., Haard, N. 1994. Preparation of an exopeptidase enriched fraction from the hepatopancreas of decapods. *Process Biochemistry.* 29:663-670.

- García-Carreño, F. L., Hernández-Cortés, M. P., Haard, N. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and marine decapod. *J. Agric. Food Chem.* 42(7):1456-1461
- García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A. 1997. Classification of proteases without tears. *Biochemical Education.* 25(3):161-168.
- García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A. 1999. Métodos generales de manipulación enzimática. En: Prado-Barragán, L. A., Huerta-Ochoa, S., Rodríguez-Serrano, G., Saucedo-Castañeda, G (eds). Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. Univ. Autónoma Metropolitana. México. 67-86.
- Gibson, R., Barker, P. L. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17:285-346.
- Glass, H. J., MacDonald, N. L., Moran, R. M., Stark, J. R. 1989. Digestion of protein in different marine species. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B(3):607-611.
- Glass, H., Stark, J. 1994. Protein digestion in the European lobster *Homarus gammarus* (L). *Comp. Biochem. Physiol.* 108B(2):225-235.
- Glass, H., Stark, J. 1995. Carbohydrate digestion in the European lobster *Homarus gammarus* (L). *J. Crustacean Biol.* 15(3):424-433.
- Gracia, A., Kensler, C. B. 1980. La langosta de México: su biología y pesquería. *An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. UNAM.* 7(2):111-128.
- Grant, G. A., Eisen, A. Z., Bradshaw, R. A. 1981. Collagenolytic protease from fiddler crab *Uca pugilator*. *Methods in Enzymology.* 80. Academic Press.
- Haard, N. F., Simpson, B. K. 2000. Seafood enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality. Marcel Dekker, N.Y. 681p.
- Harrison, K. E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embrionic development of decapod crustaceans: a review. *Journal of Shellfish Research.* 9(1):1-28.
- Hernández-Cortés, M. P. 1997. Crustacean proteases characterization, biochemical and molecular consideration. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur. México.

- Hernández-Cortés, M. P., García-Carreño, F. L., Whitaker, J. R. 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea:Decapoda). *J. Food Biochem.* 21: 497-514.
- Hernández-Cortés, M. P., Cerenius, L., García-Carreño, F. L., Soderhall, K. 1999a. Trypsin from *Pacifastacus leniusculus* hepatopancreas: purification and cDNA cloning of the synthesized zymogen. *Biol. Chem.* 380:499-501.
- Hernández-Cortés, M. P., Quadros-Seiffert, W., Naverrete del Toro, M. A., Portillo, G., Colado, G., García-Carreño, F. L. 1999b. Rate of ingestion and proteolytic activity in digestive system of juvenile white shrimp *Penaeus vannamei*, during continual feeding. *J. Applied Aquaculture.* 9(1):35-45.
- Heu, M. S., Kim, H. R., Pyeun, J. H. 1995. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B(3):557-567.
- Hoyle, R. J. 1973. Digestive enzyme secretion after dietary variation in the American lobster *Homarus americanus*. *J. Fish Res. Board Can.* 30:1647-1653.
- Hudaky, P., Kaslik, G., Venekei, I., Graf, L. 1999. The differential specificity of chymotrypsin A and B is determined by amino acid 226. *Eur. J. Biochem.* 259: 528-533.
- Humason, G. L. 1972. Animal tissue techniques. 3 ed. W. H. Freeman and Company, U.S.A.
- Icely, J. D., Nott, J. A. 1992. Digestion absorption: digestive system and associated organs. En: Harrison, F. W., Humes, A. G. Microscopic anatomy of invertebrates. Wiley-Liss. Vol 10. N.Y. 147-201.
- Jiang, S. T., Moody, M. W., Chen, H. C. 1991. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Food Sci.* 56(2):322-326.
- Johnston, D. J., Hermans, J. M., Yellowlees, D. 1995. Isolation and characterization of a trypsin from the slipper lobster *Thenus orientalis* (Lund). *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 324(1):35-40.
- Jones, D. A., Kumlu, M., Le Vay, L., Fletcher, D. J. 1997. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. *Aquaculture.* 155:285-295.

- Juinio, M. A. R., Cobb, J. S., Bengtson, D., Jonson, M. 1992. Changes in nucleic acids over the molt cycle in relation to food availability and temperature in *Homarus americanus* postlarvae. *Mar. Biol.* 114:1-10.
- Kim, H. R., Meyers, S. P., Pyeun, J. H., Godber, J. S. 1994. Enzymatic properties of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B(2):197-203.
- Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D., van Wormhoudt, A. 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28(5):551- 563.
- Klein, B., Sellos, D., van Wormhoudt, A. 1998. Genomic organization and polymorphism of a crustacean trypsin multigene family. *Gene.* 216:123-129.
- Koehn, R. K., Bayne, B. L. 1989. Towards a physiological and genetic understanding of the energetics of the stress response. *Biological Journal of the Linnean Society* 37, 157–171.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lee, P. G., Smith, L. L., Lawrence, A. L. 1984. digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture.* 42:225-239.
- Lehnert, S. A., Johnson, S. E. 2002. Expression de hemocyanin and digestive enzymes messenger RNAs in the hepatopancreas of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 133B:167-171.
- Lemos, D., 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 del Toro, A., García-Carreño, F. L., Phan, V. N. 1999. Ontogenic variation in the digestive proteinase activity of larvae and postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Mar. Biol.* 135:653-662.
- Lu, P. G., Liu, H. C., Tsai, I. H. 1990. The midgut trypsins of shrimp *Penaeus monodon*: high efficiency toward native protein substrates including collagens. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 371:851-859.

- Martínez, A., Olsen, R. L., Serra, J. L. 1988. Purification and Characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of Anchovy *Engraulis encrasicolus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B(4):677-684.
- McCarthy, I. D., Houlihan, D. F., Carter, C. G. 1994. Individual variation in protein turnover and growth efficiency in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Proceed Royal Soc. London Series.* 257B:141-147.
- Mitton, J. B., Grant, M. C. 1984. Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15:479-499.
- Moureau, C. E., Boucard, C. G., Ceccaldi, H. J. 1984. Variations circadiennes des activités estérases de l'hémolymphe de *Penaeus Japonicus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 12:103-107.
- Muhlia-Almazán, A., García-Carreño, F. L. 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.* 133(3):383-394.
- Rodríguez, A., Le Vay, L., Mourente, G., Jones, D. A. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Mar. Biol.* 118:45-51.
- Roy, P., Colas, B., Durand, P. 1996. Purification, kinetical and molecular characterization of a serine collagenolytic protease from green shore crab *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 115B:87-96.
- Sakharov, I. Y., Litvin, F. E. 1990. Stability of serine collagenolytic protease A from hepatopancreas of crab *Paralithodes camtschatica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 97B(3):407-410.
- Sellos, D., van Wormhoudt, A. 1992. Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine-protease with chymotrypsic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of *Penaeus vannamei*. *FEBS letters.* 309:219-224.
- Shiau, S.Y., Kwok, C.C., Chou, B. S. 1991. Optimal dietary protein level of *Penaeus monodon* reared in seawater and brackishwater. *Journal of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* 57:711-716.
- Shiau, S. Y. 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. *Aquaculture.* 164:77-93.

- Simpson, B. K., Haard, N. F. 1984. Purification and characterization of trypsin from the Greenland cod (*Gadus ogac*): kinetic and thermodynamic characteristics. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 62:894-900.
- Simpson, B. K., Smith, J. P., Yaylayan, V., Haard, N. F. 1989. Kinetic and thermodynamic characteristics of a digestive protease from atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Food Biochemistry.* 13:201-213.
- Stauffer, C. 1989. Effect of pH on activity. En: Van Nostrand Reinhold (eds) Enzyme assay for food scientists. AVI Press. N.Y. 305 pp.
- Stuck, K. C., Watts, S. A., Wang, S. Y. 1996. Biochemical responses during starvation and subsequent recovery in postlarval Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Mar. Biol.*125:33-45.
- Terra, W. R., Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function: Review. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B (1):1-62.
- Tsai, I. H., Chuang, K. L., Chuang, J. L. 1986a. Chymotrypsins in the digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). *Comp. Biochem. Physiol.* 85B (1):235-239.
- Tsai, I. H., Liu, H. C., Chuang, K. L. 1986b. Properties of two chymotrypsins from the digestive gland of prawn *Penaeus monodon*. *FEBS.* 203(2):257-261.
- Tsai, I. H., Lu, P. J., Chuang, J. L. 1991. The midgut chymotrypsins of shrimps *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. penicillatus*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1080:59-67.
- van Wormhoudt, A. 1977. Activités enzymatiques digestives chez *Palaemon serratus*: variations annuelles de l'acrophase des rythmes circadiens. *Biol. Syst. Ecol.* 5:301-307.
- van Wormhoudt, A., Chevalier, P., Sellos, D. 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities of a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 103B:675-680.
- Vega-Velázquez, A., Espionzoza-Castro, G., Gómez-Rojo, C. 1996. Pesquería de la langosta *Panulirus sp.* En: Casas-Valdez, M., Ponce-Díaz, G. Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. 227-259.



- Vega-Villasante, F., Nolasco, H., Civera, R. 1995. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*: properties of the protease activity in the whole digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B(1):123-129.
- Voght, G., Stocker, W., Storch, V., Zwilling, R. 1989. Biosynthesis of *Astacus protease*, a digestive enzyme from crayfish. *Histochemistry.* 91:373-381.
- Whitaker, J. R. 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Marcel Dekker, Inc. N. Y. 625 pp.