



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

**CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA DE
PARTICIPACION DE LAS PEPTIDASAS DIGESTIVAS DEL
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei***

Por:

QBC. Carlos Uriel Estrella Soliz

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Carlos Uriel Estrella Soliz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Adriana Muhlia Almazán
Directora de tesis



Dra. Liliana Carolina Roio Arreola
Co-directora de Tesis



Dr. José Ángel Huerta Ocampo
Integrante del comité de tesis



Dr. Humberto González Ríos
Integrante del comité de tesis

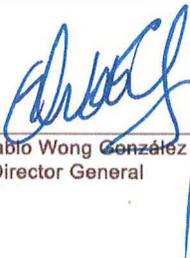
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Caracterización de la Secuencia de Participación de las Peptidasas Digestivas del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Carlos Uriel Estrella Soliz, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para el logro de esta meta.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), en concreto a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA), por las facilidades brindadas para la realización de esta tesis.

Al proyecto A1-S-7729 “Descifrando el sistema digestivo de decápodos” y por la beca para la realización de los estudios de maestría.

A mi familia y amigos por apoyarme siempre.

A la Dra. Muhlia por nunca perder la fe en mí.

A mis compañeros del Lab. de Bioenergética y Genética Molecular, por hacerme compañía.

A los compañeros del CIBNOR de La Paz, en especial a la Dra. Lili y a Ann, no hubiera podido hacer nada sin su consejo.

Y a la gente que me ha estado apoyando a lo largo de mi formación (profesores, compañeros)

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE CUADROS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. El Camarón Blanco como Recurso Natural y su Importancia Económica.....	14
2.2. Aspectos Generales de las Peptidasas Digestivas del Camarón Blanco.....	15
2.3. El Proceso Digestivo del Camarón.....	17
2.4. Herramientas para el Estudio de las Peptidasas Digestivas del Camarón Blanco.....	19
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivos Generales.....	22
4.2. Objetivos Específicos.....	22
5. MATERIALES Y METODOS	23
5.1. Obtención de Muestras.....	23
5.2. Cuantificación de Proteínas Solubles por el Método de Bradford.....	24
5.3. Ensayo de Actividad Proteolítica Total.....	24
5.4. Electroforesis de Proteínas en Gel de Poliacrilamida.....	24
5.5. Zimograma (pH Básico y Ácido).....	25
5.6. Preparación de Muestras para el Análisis Proteómico	26
5.6.1 Extracción, Cuantificación y Gel de Calidad de Proteínas.....	26
5.6.2 Digestión de Proteínas.....	27
5.6.3 Marcaje Isobárico, Fraccionamiento y Desalado de Péptidos.....	27
5.6.4 Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem y Selección de Precursores Sincrónicos (SPS-MS ³).....	27
5.6.5 Identificación de Proteínas con Base en Datos Espectrometría de Masas	28
5.7 Análisis Estadístico.....	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	30
6.1. Cuantificación de Proteínas Solubles y de Actividad Proteolítica Total.....	30
6.2. Análisis de la Actividad Enzimática por Zimogramas.....	31
6.3 Análisis Proteómico.....	36

CONTENIDO (continuación)

6.3.1 Las peptidasas de la Glándula Digestiva de <i>L. vannamei</i>	39
6.3.1.1 Tripsinas y Quimotripsinas.....	39
6.3.1.2 Catepsinas.....	45
6.3.1.3 Metalopeptidasas.....	50
7. CONCLUSIÓN.....	54
8. BIBLIOGRAFÍA.....	55
9. ANEXO.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Sistema Digestivo del Camarón Blanco del Pacífico	17
2 Concentración de Proteína en la Glándula Digestiva del Camarón Blanco por Grupo Experimental	30
3 Actividad Proteolítica Total de la Glándula Digestiva del Camarón Blanco Durante los Tiempos de Ingesta	31
4 Patrón General de Bandas de Peptidasas de la Glándula Digestiva de <i>L. vannamei</i> a pH 6	32
5 Registro de las Bandas con Actividad Peptidasa en la Glándula Digestiva de <i>L. vannamei</i>	33
6 Fenotipos y Genotipos de las Tripsinas Digestivas de <i>L. vannamei</i>	35
7 SDS-PAGE de Proteínas de la Glándula Digestiva de <i>L. vannamei</i> Obtenidas en Diferentes Tiempos de Ingesta: Preprandial, Postprandial 1 h, y Postprandial 3 h	37
8 Abundancia de Proteínas en las Muestras en los Diferentes Tiempos de Toma de Muestra	37
9 Mapa de calor de Abundancia de las Proteínas de la Glándula Digestiva de <i>L. vannamei</i> en Diferentes Tiempos de Ingesta Preprandial, Postprandial 1h y Postprandial 3h.....	38
10 Alineamiento Tipo Clustal de Aminoácidos de las Tripsinas Identificadas	40
11 Gráficas de Abundancia de las Tripsinas Identificadas en el Análisis Proteómico.....	43
12 Alineamiento Secuencias de Quimotripsinas Identificadas en el Análisis Proteómico.....	44
13 Gráficas de Abundancia de las Dos Quimotripsinas Identificadas en el Análisis Proteómico en los Diferentes Tiempos de Ingesta	45
14 Gráficas de Abundancia de las Catepsinas Identificadas en Análisis Proteómico en los Diferentes Tiempos de Ingesta	48
15 Alineamiento de las Secuencias de Aminoácidos de las Catepsinas D	49
16 Alineamiento de las Secuencias de Aminoácidos de las Metalopeptidasas del Camarón Blanco	50
17 Gráficas de Abundancia de las Metalopeptidasas Identificadas en el Análisis Proteómico	52

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Cuadro de Actividad de las Peptidasas Digestivas de <i>L. vannamei</i> en la Glándula Digestiva a pH 6 y 8.....	34
2 Características de las Diferentes Isoformas de las Tripsinas de la Glándula Digestiva del Camarón Blanco.....	41
3 Características de las Diferentes Isoformas de las Quimotripsinas de la Glándula Digestiva del Camarón Blanco.....	44
4 Características de las Diferentes Isoformas de las Catepsinas de la Glándula Digestiva del Camarón Blanco.....	46
5 Características de las diferentes isoformas de las Metalopeptidasas de la Glándula Digestiva del Camarón Blanco.....	51

RESUMEN

A pesar de que el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* es la especie de camarón peneido de mayor importancia comercial en el mundo, aún se desconoce a detalle cómo lleva a cabo el proceso digestivo de la proteína del alimento. En trabajos anteriores se han caracterizado las diferentes peptidasas encargadas de hidrolizar las proteínas del alimento; entre ellas, las tripsinas y quimotripsinas son descritas como las más importantes, aunque existen otras, como las catepsinas y las metalopeptidasas que también realizan funciones digestivas.

En este estudio se estudió la secuencia de activación de las peptidasas digestivas del camarón de acuerdo a su abundancia en diferentes tiempos de ingesta (preprandia, 1 hora postprandia y 3 horas postprandia). Se determinó la concentración de proteína y la actividad proteolítica total de las peptidasas de la glándula digestiva en los diferentes tiempos; también se realizaron análisis proteómicos y zimogramas para analizar los cambios en la actividad proteolítica de peptidasas específicas.

Al comparar la actividad proteolítica total y la concentración de proteína soluble, no se encontraron diferencias significativas en los diferentes tiempos, pero por zimografía se observó que la actividad de las quimotripsinas y tripsinas prevaleció durante los 3 tiempos estudiados, mientras que una aspártico peptidasa (catepsina D) presentó actividad solamente el tiempo preprandial y postprandial 3 h, por otro lado una metalopeptidasa presentó actividad principalmente en el tiempo postprandial 1 h.

En el análisis proteómico no se detectó un cambio significativo en la abundancia de las tripsinas, en general, se mantuvieron estables durante el proceso digestivo. Respecto a las quimotripsinas, se observó un aumento en su abundancia con el paso del tiempo, alcanzando un máximo en el tiempo postprandial 3 h, este perfil fue también observado en las catepsinas L; mientras que la catepsina D1 (digestiva) tuvo un máximo de abundancia en el tiempo preprandial y sufrió una disminución en los tiempos postprandial 1 h y 3 h. Finalmente, la abundancia de la Mpc1 (metalopeptidasa digestiva) se mantuvo estable con un ligero aumento en el tiempo postprandial 1 h. De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede sugerir que existe una secuencia de activación y participación en la digestión del alimento en el camarón blanco, quedando de la siguiente manera: las tripsinas y catepsina D1 están activas en preprandia, con la presencia del alimento las tripsinas y la Mpc1 se

activan, y la digestión del alimento finaliza con la actividad de tripsinas, quimotripsinas y catepsinas L.

Palabras clave: Digestión, Proteómica, *L. vannamei*.

ABSTRACT

Although the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* is the most economically valuable penaeid in the world, the food protein digestion process is still unknown in detail. The different peptidases responsible for hydrolyzing food proteins have been characterized; among them trypsin and chymotrypsin are described as the most important, although others, such as cathepsins and metallopeptidases, also perform digestive functions.

In this study, the activation sequence of shrimp digestive peptidases was studied according to their abundance at different feeding times (pre-prandial, 1 hour post-prandial and 3 hours post-prandial). Protein concentration and total proteolytic activity of the digestive gland peptidases were determined at the different times; proteomic analyzes and zymograms were also performed to determine the changes in the proteolytic activity of specific peptidases.

When comparing the total proteolytic activity and the concentration of soluble protein at the different assayed times, no significant differences were found. But using zymography it was observed that the activity of chymotrypsins and trypsins prevailed during the 3 feeding times studied, while an aspartic peptidase (cathepsin D) showed activity only in the preprandial and at 3 h postprandial time, on the other hand a metallopeptidase showed activity mainly at 1 h postprandial time.

According to the proteomic analysis, trypsin abundance remained stable during the digestive process. Regarding chymotrypsins, an increase in their abundance was observed over time, reaching a maximum at 3 h postprandial time, this profile was also observed for cathepsins L; while cathepsin D1 (digestive) showed a maximum abundance in the preprandial time and a decrease in the postprandial times 1 h and 3 h. Finally, the abundance of Mpc1 (digestive metallopeptidase) remained stable with a slight increase at 1 h postprandial time. According to the results obtained, it can be suggested that there is a sequence of activation and participation in the digestion of food in the white shrimp, as follows: trypsin and cathepsin D1 are active in preprandial, with the presence of food trypsin and Mpc1 are activated, and, in the final stage of food digestion trypsin, chymotrypsin, and cathepsin L are the main partakers.

Keywords: Digestion, Proteomics, *L. vannamei*.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura y la pesca son actividades económicas importantes que se han desarrollado en México desde hace varias décadas, esto debido al potencial de ambas prácticas en el país y al aprovechamiento de la amplia diversidad de climas, pues México cuenta con el 12 % de la biodiversidad mundial (CIDECO, 2019).

Entre los diferentes productos de la acuicultura, el camarón es uno de los organismos de mayor producción acuícola, desarrollada ante la amenaza del agotamiento por sobreexplotación del recurso y para satisfacer la gran demanda de este producto (Rodríguez-Valencia et al., 2010). El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (*syn: Penaeus vannamei*) tiene características biológicas que lo colocan como la especie más cultivada alrededor del mundo; entre estas destacan su tolerancia a la salinidad, su velocidad de crecimiento en condiciones de cultivo, su resistencia al cambio de temperatura y a la presencia de patógenos (Briggs, 2005).

La digestión es un proceso fisiológico que juega un papel central en la asimilación de la energía que proviene del alimento y por lo tanto, del crecimiento. Uno de los procesos biológicos más importantes para el crecimiento de las especies en cultivo es el aprovechamiento eficiente del alimento. En el camarón blanco *L. vannamei* el sistema digestivo se localiza en el cefalotórax (Cárcamo-Aréchiga, 2015).

La glándula digestiva es el órgano con el papel más importante debido a que realiza una gran cantidad de funciones no sólo en el proceso de digestivo, sino también en el metabolismo del organismo como con la distribución de las reservas almacenadas, la absorción de nutrientes y la síntesis de peptidasas digestivas en forma inactiva (zimógenos) (García-Morales, 2007).

Estudios previos sobre las peptidasas digestivas de *L. vannamei* han reportado la existencia de una batería de enzimas proteolíticas de varias clases, tales como: Las serino peptidasas (tripsinas y quimotripsinas), las cisteíno peptidasas (catepsinas B y L), aspártico peptidasas (catepsina D), así como metalopeptidasas. Todas estas enzimas se encargan de hidrolizar las proteínas que se consumen en la dieta para obtener aminoácidos que son indispensables para la síntesis de proteínas, puesto que *L. vannamei* no puede sintetizar algunos aminoácidos esenciales (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2018).

Aún se desconocen varios aspectos del proceso digestivo del camarón blanco, entre ellos la

secuencia de participación de las enzimas digestivas en el proceso de hidrólisis del alimento. En otras especies de decápodos se han realizado estudios acerca de cómo ocurre el proceso digestivo, tal es el caso de la langosta americana *Homarus americanus* en la cual se ha reportado que existe una sinergia entre sus diferentes enzimas digestivas lo que les permite hidrolizar de manera óptima las proteínas ingeridas en la dieta. Esta sinergia ocurre gracias a que existe un orden de activación e intervención de las diferentes peptidasas digestivas al hidrolizar la proteína (Rodríguez-Siordia et al., 2016); por lo que, en la presente tesis se aborda la siguiente pregunta científica: “¿Hay un orden de intervención de las peptidasas de la glándula digestiva del camarón blanco durante el proceso digestivo?”

Para responder la pregunta, en la presente investigación se realizó un análisis proteómico de cuantificación relativa empleando un marcaje con etiquetas isobáricas para identificar y cuantificar las proteínas presentes en la glándula digestiva del camarón en diferentes tiempos de la ingesta, en condiciones de ayuno (pre-prandia), durante la digestión (post-prandia 1 h) y después de comer (post-prandia 3 h). A su vez, se evaluó la actividad de las peptidasas en los diferentes tiempos de ingesta en geles de acrilamida (zimogramas). Todo lo anterior con la finalidad de comprender mejor el proceso digestivo del camarón blanco.

2. ANTECEDENTES

2.1. El Camarón Blanco Como Recurso Natural y su Importancia Económica

Litopenaeus vannamei también conocido como camarón blanco del Pacífico, es un crustáceo que naturalmente se distribuye desde la Costa Oriental desde Sonora, México en el norte, pasando por América Central y del Sur hasta Tumbes en Perú, en áreas donde la temperatura del agua es >20 °C durante la mayor parte del año (FAO, 2016). Actualmente el camarón blanco es una de las tres principales especies de camarones peneidos más cultivadas en el mundo junto con *Penaeus chinensis* y *Penaeus monodon*, en total las tres especies suman aproximadamente el 71 % de la producción camaronera (FAO, 2016). De la misma manera en México, *L. vannamei* es la principal especie de cultivo, en casi todos los estados de la República con acceso al mar, siendo los principales productores los estados de Sonora y Sinaloa (SAGARPA, 2018). En el caso específico de Sonora aproximadamente el 78 % de los sistemas de producción acuícola cultivan camarón (IAES, 2016), sólo en el 2018 se produjeron 230,381 toneladas de peso vivo en el país de las cuales 71,146 toneladas son atribuidas al estado de Sonora, convirtiéndolo en el segundo estado con mayor producción de camarón en el país, sólo detrás de Sinaloa (SAGARPA, 2018).

Existen diferentes características por las cuales el cultivo de *L. vannamei* es rentable, una de ellas es que presenta una tasa de crecimiento muy rápida aumentando hasta 3 g por semana hasta llegar a los 20 g bajo condiciones de cultivo intensivo o de alta densidad. Algunas granjas llegan a cultivar camarones a una densidad de 400 animales/ m² (siendo 150 animales/ m² el estándar). Además *L. vannamei* presenta una alta tolerancia a cambios en la salinidad (pudiendo sobrevivir desde 0.5 hasta 45 ppm), y requiere un alimento con bajo contenido de proteína (20-35 % mientras que *Penaeus monodon* requiere más del 36 %) (FAO, 2016). De manera adicional, el camarón blanco presenta buena tolerancia a los cambios de temperatura (23-30° C), y es resistente a agentes patógenos, lo cual en conjunto le confiere el éxito de cultivo y popularidad a la especie (Briggs, 2005).

2.2 Aspectos Generales de las Peptidasas Digestivas del Camarón Blanco

Para el camarón, como para la mayoría de los organismos vivos, es indispensable disponer de la maquinaria molecular para digerir las proteínas provenientes del alimento. Se ha reportado, que *L. vannamei* tiene un requerimiento de entre 20 y 35 % de proteína en la dieta para alcanzar un crecimiento óptimo. Una de las principales razones de esta necesidad alimentaria, reside en la incapacidad de *L. vannamei* para sintetizar aminoácidos esenciales (Lee y Lee, 2018).

Debido a lo anterior, estudios previos han reportado que *L. vannamei* cuenta con varias enzimas proteolíticas ó peptidasas que le permiten hidrolizar las proteínas que consume en su dieta diaria y cuyos productos son los aminoácidos que requiere para sintetizar proteínas. (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2018). La clasificación de las peptidasas está basada en el tipo de aminoácido esencial y específico requerido para la catálisis enzimática en el centro activo de la enzima, así se pueden clasificar en las siguientes clases: serino, cisteíno, treonino, aspártico, metalo ó glutamil-peptidasas, dependiendo de los aminoácidos que conforman el sitio activo (Rawlings et al., 2006). Entre las peptidasas del sistema digestivo reportadas en el camarón blanco están las tripsinas y las quimotripsinas; ambas en conjunto realizan hasta el 60 % de la actividad proteolítica del hepatopancreas en *L. vannamei*, teniendo en común que pertenecen a la clase de las serino peptidasas (García-Morales, 2007). De acuerdo con Sainz y colaboradores (2004) en la glándula digestiva del camarón blanco se expresan tres isoformas de tripsinas (denominadas A, B y C); estas enzimas hidrolizan el extremo carboxilo de residuos básicos como arginina y lisina (característica en común con otras tripsinas), y cuentan con pesos moleculares de 19.9 (C), 18.4 (B) y 17.2 kDa (A) (Navarrete del Toro et al., 2011). Cabe destacar que estas tres isotripsinas de *L. vannamei* están reguladas como las de un organismo consumidor frecuente, siendo sintetizadas y almacenadas como pro-isotripsinas (zimógenos) para ser activadas y secretadas continuamente (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2018). Reportes recientes han sugerido la existencia de un mayor número de tripsinas en la glándula digestiva de *L. vannamei*, a las previamente reportadas por Klein y colaboradores (1996) y Sainz et al. (2004), cuyas características bioquímicas no se han confirmado a la fecha (Wei et al., 2014).

Por otro lado, dos isoformas de quimotripsina han sido reportadas en la glándula digestiva del camarón blanco, con un peso molecular aproximado de 35.6 kDa y 24.1 kDa (Navarrete del Toro

et al., 2011). Las quimotripsinas son el segundo tipo de peptidasa digestiva con más actividad en la glándula digestiva del camarón y se encargan de hidrolizar proteínas en los residuos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano. Tienen la particularidad de no ser inhibidas por TPCK, (tosil-fenilalanil-clorometilcetona), un inhibidor común en el estudio de las serino peptidasas e hidrolizar muy poco a BTEE (N-benzoil-L-tirosinato de etilo), que es un sustrato común en el estudio de quimotripsinas (Bibo-Verdugo et al., 2015).

Otras clases de peptidasas reportadas en la glándula digestiva de *L. vannamei* son las cisteíno peptidasas y las metalopeptidasas. Siendo la catepsina B estudiada más a detalle, se sabe que en el camarón blanco presenta un peso molecular de aproximadamente 26.9 kDa (Stephens et al., 2012). Las catepsinas son un grupo de peptidasas que suelen ser activas en condiciones ácidas (pH 4), tienen un peso molecular entre los 14 y 65 kDa (Valverde, 2001) y actúan de manera tanto intracelular (en el lisosoma como la catepsina B) como extracelular (como la catepsina L) pudiendo hidrolizar no sólo proteínas, sino también péptidos pequeños. Además de las catepsinas de la clase cisteíno como las catepsinas L, B, C, S, y H; también se han reportado catepsinas en el camarón pertenecientes a la clase de las aspártico peptidasas como la catepsina D (González-Meza, 2014; Martínez-Alarcón, 2018).

La catepsina D es una de las aspártico peptidasas más estudiadas, hidroliza en el extremo amino de los aminoácidos aromáticos y otros aminoácidos con cadenas laterales voluminosas. Estudios previos han descrito que la catepsina D tiene funciones tanto extracelulares como intracelulares en los invertebrados (Rojo, 2010). Dentro de sus funciones, se puede apreciar su participación en la regulación de la muerte celular programada (Gui et al., 2006), en la activación de precursores enzimáticos (Khan et al., 1999), en la degradación proteica intracelular (Metcalf y Fusek, 1993) y en la hidrólisis de proteínas obtenidas del alimento (Williamson et al., 2002).

2.3. El Proceso Digestivo del Camarón

Existe en la literatura vasta información que señala la importancia de un adecuado alimento en los sistemas de cultivo para lograr una producción rentable. Por lo anterior, el sistema digestivo de las especies de peneidos ha sido estudiado durante más de 15 años (Hernández-Cortés, 1999; Sainz et al., 2004; García-Morales, 2007; González-Meza, 2014; Lee y Lee, 2018); sin embargo, aún queda mucho por estudiar en cuanto a el proceso detallado de la digestión en el camarón blanco.

La mayor parte del sistema digestivo de *Litopenaeus vannamei* se localiza en la región anterior del cuerpo también llamada cefalotórax en donde se encuentran el esófago, el estómago y la glándula digestiva, un intestino en la región del abdominal y el ano situado en el telson (Cabrera et al., 1991). Dentro del sistema digestivo del camarón, se considera que el hepatopáncreas, también conocido como glándula digestiva, es el principal órgano durante el proceso de digestión, debido a que este se encarga de secretar una gran variedad de peptidasas digestivas (en forma de zimógenos inactivos) que ayudan a digerir los alimentos consumidos cuando son activados. Otras funciones del hepatopáncreas son la distribución de las reservas almacenadas y la absorción de nutrientes (García-Morales, 2007).

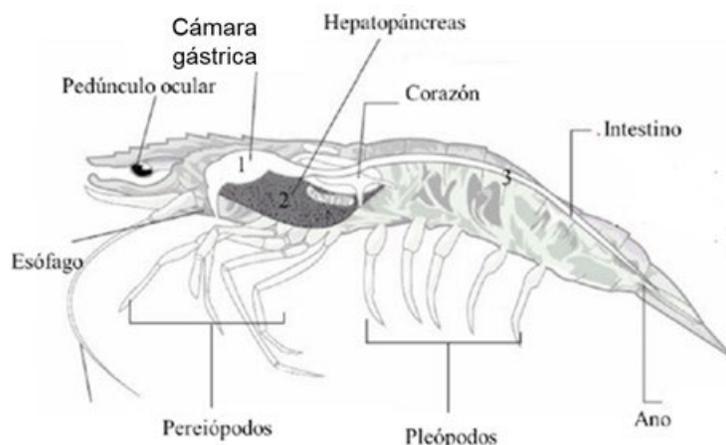


Figura 1. Sistema digestivo del camarón blanco del Pacífico (Modificado de Garibay-Valdez et al., 2020)

El proceso digestivo en los animales es un fenómeno fisiológico altamente regulado con características específicas que permiten el control estricto en la activación de las enzimas digestivas

que hidrolizan las proteínas llamadas peptidasas; este control que permite que las enzimas sean almacenadas después de su síntesis en forma de zimógenos (forma inactiva de la enzima), así evitando la autohidrólisis y el daño tisular que esta pueda causar. De esta forma, las peptidasas pueden ser activadas en cualquier momento que se requiera, sin dañar a los tejidos del camarón (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2018).

A la fecha se han realizado investigaciones en diferentes organismos con el propósito de entender la secuencia de activación de las peptidasas durante la digestión. Uno de los primeros estudios en donde se empezó a describir este tipo de relaciones fue el de Brunelle y colaboradores (1999), quienes estudiaron las proteasas digestivas del escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata*. Los autores reportaron la existencia de un orden en la participación de las peptidasas digestivas atribuyendo a la cathepsina D un papel central sin explorar a fondo las posibles relaciones entre esta enzima y las demás peptidasas digestivas. Otro estudio previo fue presentado por Williamson y colaboradores (2004) en el nemátodo parásito *Ancylostoma caninum* quienes describieron la existencia de una sinergia entre una aspártico peptidasa (APR-1) y una cisteíno peptidasa (CP-2) en la hidrólisis de hemoglobina, sin llegar a describir las relaciones sinérgicas entre las demás peptidasas digestivas del anquilostoma.

En los decápodos como la langosta americana (*Homarus americanus*), se ha descrito una red sinérgica de peptidasas que participan en conjunto para hidrolizar a las proteínas del alimento. En dicha red se ha reportado la participación primordial de las cisteíno peptidasas que actúan en conjunto con las aspártico peptidasas, sin participación alguna de serino peptidasas (Rodríguez-Siordia et al., 2016). Sin embargo, en el camarón blanco este proceso no se ha esclarecido en su totalidad, pues se han realizado estudios enfocados a evaluar cambios en la actividad proteolítica en diferentes etapas del ciclo de vida del camarón y en condiciones de alimentación constante o de ayuno (Sainz et al., 2009). En 1999, Hernández-Cortés y colaboradores, reportaron un cambio en la actividad de las peptidasas digestivas previo a la hora de la alimentación (preprandia) para posteriormente confirmar un incremento en la actividad enzimática durante y posterior a la ingesta (post-prandia), lo que sugiere la presencia de mecanismos de regulación en el camarón blanco según sus hábitos alimenticios.

Aún existe mucho por descubrir del desarrollo del proceso digestivo de *L. vannamei*, dada la importancia económica de la especie en México, la generación del conocimiento detallado respecto al mecanismo de intervención de las enzimas peptidasas será una aportación de peso al acervo científico y desarrollo de los sistemas de cultivos.

2.4 Herramientas para el Estudio de las Peptidasas Digestivas del Camarón Blanco

Entre las herramientas para la detección de actividad enzimática está la electroforesis en geles de poliacrilamida revelados en presencia de sustratos, esta modalidad llamada zimograma, permite caracterizar la presencia de peptidasas activas en un extracto determinado. Esta herramienta, descrita por Laemmli (1970) fue exitosamente adaptada para el estudio de las peptidasas alcalinas de crustáceos por García-Carreño y colaboradores (1993). Esta metodología es de gran validez pues permite inmobilizar y conocer el peso molecular aproximado de las diferentes proteínas en una muestra y algunas de las condiciones para mantener la actividad enzimática.

Un ejemplo claro del uso de esta técnica es el estudio del proceso digestivo de los decápodos, como el reporte que se presenta en el trabajo de Rodríguez-Siordia y colaboradores en 2016, quienes analizaron la sinergia de las peptidasas en la digestión proteica de la langosta americana *Homarus americanus* encontrando, que las peptidasas necesitan de otras peptidasas para cumplir su trabajo de manera óptima, en este artículo, se utilizó el zimograma como herramienta de identificación de las peptidasas digestivas en el jugo gástrico de la langosta americana

Por otro lado, los análisis proteómicos por son valiosas herramientas que ayudan a determinar, no sólo el tipo de proteínas que están presentes en el organismo en un momento determinado, puede ser órgano-específico y/o bajo diferentes condiciones ambientales. La proteómica también permite determinar la abundancia de las proteínas a través de un análisis cuantitativo (Torreblanca y López, 2005). Dichos estudios se han aplicado en el camarón para analizar la respuesta ante diversas condiciones. En 2016, Fan y colaboradores, realizaron un estudio para observar el efecto del estrés generado por las bajas temperaturas en la expresión de las proteínas digestivas de *L. vannamei*. Los autores reportaron una disminución en la síntesis de enzimas digestivas al encontrarse bajo estrés de temperaturas debajo de los cero grados centígrados.

Otro estudio de interés que muestra el aporte de los estudios proteómicos para ayudar a entender el proceso de la digestión es el realizado por Bibo-Verdugo y colaboradores (2015) en el cual se reporta el primer análisis proteómico del jugo gástrico de la langosta americana, el cual fue parte importante en la identificación de las glicosidasas y las peptidasas como las enzimas hidrolíticas más abundantes del jugo gástrico.

Con base en todo lo anterior, es importante conocer cómo funciona el sistema digestivo de *L.*

vannamei y la secuencia de intervención de las peptidasas durante el proceso de hidrólisis de la proteína del alimento. Esta información permitirá generar conocimiento detallado sobre la fisiología de la digestión proteica y proponer un mecanismo que la describa. Dicho conocimiento tiene un potencial impacto en el mejoramiento de los sistemas de cultivo logrando mayores tasas de crecimiento y mejorando la calidad del producto que se consume y en la economía de quien lo cultiva. Los resultados serán integrados al acopio de conocimiento con la que cuenta el grupo de trabajo para plantear un posible mecanismo de digestión proteica del camarón blanco.

3. HIPOTESIS

Si las peptidasas digestivas de *L. vannamei* interactúan sinérgicamente, entonces algunas se activan antes de la ingesta y siguen un orden específico de intervención al hidrolizar la proteína del alimento durante la post-prandia.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar la secuencia de intervención de las peptidasas de la glándula digestiva del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* antes y después de la ingesta.

4.2. Objetivos Particulares

1. Evaluar la actividad proteolítica total de las peptidasas digestivas de la glándula digestiva de *Litopenaeus vannamei* antes y después de la ingesta.
2. Detectar mediante zimografía, la presencia de la forma activa de los principales tipos de peptidasas (tripsinas, quimotripsinas, catepsinas y metalopeptidasas) en la glándula digestiva de *Litopenaeus vannamei* antes y después de la ingesta.
3. Revelar mediante un análisis proteómico los cambios en la abundancia de las peptidasas presentes en la glándula digestiva de *Litopenaeus vannamei* antes y después de la ingesta.
4. Integrar y analizar la información para determinar el orden de intervención de las peptidasas durante el proceso digestivo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de Muestras

Se obtuvieron 90 camarones adultos de la especie *L. vannamei* con un peso promedio de 12.45 ± 2.6 g de una granja local de la costa de Hermosillo, Sonora, los cuales fueron trasladados al Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular del CIAD, en donde se escogieron y distribuyeron 21 camarones en 3 tinas plásticas (N=63) de 100 L repartidos al azar. Los organismos experimentales se mantuvieron en las siguientes condiciones: temperatura 26 °C, salinidad 28 ppm y oxígeno disuelto promedio de 3.5 mg/L. Se realizaron recambios diarios del 50 % de agua de mar en las tinas y se sifonearon las heces diariamente por un periodo de aclimatación de 7 días. Los organismos fueron alimentados hasta saciedad con Camaronina® una vez al día a las 7 am durante el periodo de aclimatación.

Se establecieron 3 tiempos diferentes para la toma de muestras: 30 min antes de la ingesta (preprandia), 1 h después de la ingesta (postprandia 1h) y 3 h después de la ingesta (postprandia 3h) en los que se muestrearon 7 camarones por tina. De los 7 camarones muestreados en cada tiempo y de cada tina: 5 organismos (réplicas biológicas) fueron utilizados para cuantificar la proteína soluble y la actividad enzimática total de la glándula digestiva de cada camarón. Las glándulas digestivas de los 2 camarones restantes se destinaron para el análisis proteómico. El peso de cada espécimen fue registrado antes de disectar la glándula digestiva que fue congelada a -80 °C hasta su análisis.

Se obtuvo un extracto enzimático de cada glandula digestiva, para ello, se registró el peso del tejido y se le agregaron 3 volúmenes de agua destilada (1:3 w/v). Cada muestra se homogenizó con un homogeneizador mecánico y se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min a 4 °C, se separó el sobrenadante con las peptidasas y fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

5.2. Cuantificación de Proteínas Solubles por el Método de Bradford

Para determinar la concentración de proteína soluble en cada uno de los extractos enzimáticos se utilizó el método de Bradford (1976). Se realizó una curva de calibración a partir de una solución estándar de albúmina de suero bovino con una concentración inicial de 2 mg/mL y con diluciones seriadas 1:2 (v/v) con agua bidestilada. En cada reacción se mezclaron 5 μ L de solución de albúmina ó extracto enzimático, 45 μ L de agua mili-Q y 250 μ L de reactivo de Bradford (Bio-Rad, USA) en cada pozo de una microplaca de 96 pozos. Se incubó la mezcla por 5 min a temperatura ambiente en agitación y se leyó a 595 nm en un lector de microplaca iMark (Bio-Rad, USA). Cada determinación se realizó por triplicado.

5.3. Ensayo de Actividad Proteolítica Total

Para determinar la actividad proteolítica total de cada una de las muestras experimentales, se utilizó la metodología propuesta por Yasuda y colaboradores (1999). Se prepararon reacciones para cada uno de los extractos enzimáticos con 150 μ L de buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8) con caseína 1 % como sustrato y 5 μ L de extracto de glándula digestiva, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con ácido tricloroacético al 20 %. Posteriormente la reacción se incubó por 10 min a 4 °C y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, se separó la fracción soluble y se leyó en un espectrofotómetro UV-6300PC (VWR, USA) a 280 nm. Todas las muestras se evaluaron por triplicado.

5.4 Electroforesis de Proteínas en Gel de Poliacrilamida

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones nativas para determinar el patrón proteico de las muestras siguiendo el método de Laemmli (1970). Se separaron las proteínas de cada uno de los extractos enzimáticos obtenidos de los organismos experimentales

en los diferentes tiempos de ingesta en una cámara mini-PROTEAN® tetra cell (BioRad, USA). Se cargaron 20 µg de proteína de cada extracto enzimático y buffer de carga 2X (Tris-HCl 0.125 M, SDS 4 %, glicerol 20 % v/v y azul de bromofenol 0.02 % pH 6.8). Cada uno de los geles se corrió en buffer de corrida (Tris-HCl 250 mM, glicina 1.92 M y SDS 1 %) por 10 min a 100 V, luego se subió el voltaje a 150 V por 110 min a 4 °C. Una vez concluida la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie R-250 0.05 %, metanol 40 %, ácido acético 7 % y agua destilada 53 %) por 1 h y posteriormente se desteñó con solución de desteñido (metanol 40 % de, ácido acético 7 % de y agua destilada 53 %). Una vez desteñido, el gel fue documentado en un equipo Gel Doc EZ imager (BioRad, USA).

5.5. Zimogramas (pH Básico y Ácido)

Para la detección de las bandas con actividad de peptidasas en la glándula digestivas del camarón, se realizaron 18 zimogramas (9 a pH ácido y 9 a pH básico) con una modificación al método descrito por García-Carreño y colaboradores (1993). Se prepararon geles de acrilamida al 12 %, se cargó el extracto de glándula digestiva en un equivalente a 10 mUA (unidades de actividad proteolítica total) diluido con buffer de carga 2X (1:2 v/v), y se utilizaron las mismas condiciones de corrida a 4 °C. Para revelar las bandas de actividad peptidasa a pH básico, se lavaron los geles con agua destilada 2 veces por 5 min en agitación y se estabilizó el pH del gel con buffer Tris 50 mM (pH 8) en agitación, con 3 recambios de buffer por 5 min; posteriormente el gel se incubó a 4 °C por 30 min en el sustrato caseína al 3 % en buffer Tris 50 mM (pH 8), seguido de una incubación de 90 min a temperatura ambiente. El gel fue teñido siguiendo el protocolo de la sección 5.4.

Para revelar las bandas con actividad peptidasa a pH 6 se utilizó el sustrato hemoglobina al 0.25 % en buffer de acetato de sodio 100 mM (pH 6). El proceso de teñido y desteñido es idéntico al descrito en el párrafo anterior. Las proteínas que tienen actividad peptidasa se observan como bandas blancas en un fondo azul.

En cada zimograma se corrieron cinco réplicas de cada uno de los triplicados de cada grupo experimental. La imagen de cada uno de los geles fue ampliada y analizada cuidadosamente y las bandas con actividad fueron registradas tanto a pH 8, como a pH 6 (condición en la que se confirmó

la actividad de la catepsina D).

5.6. Análisis Proteómico Cuantitativo Empleando Marcaje con Etiquetas Químicas Isobáricas

5.6.1 Extracción, Cuantificación e Integridad de Proteínas

Se prepararon nueve extractos proteicos, tres de cada tiempo de muestreo evaluado en el bioensayo (3 tiempos con 3 réplicas cada uno), pasando por 2 pasos: extracción y precipitación. Para la extracción se mezclaron 200-250 mg de glándula digestiva de camarón con 400 μ L de buffer RH (urea 8 M y CHAPS 2 %), 10 μ L de EDTA 0.5 M pH 8 y 10 μ L de PMSF 50 mM. Posteriormente, se homogenizó mecánicamente el tejido con la ayuda de un pistilo durante 60 seg, manteniéndose en un baño de hielo. Se realizó una segunda homogenización por sonicación en 3 ciclos de 20 seg cada uno, con una amplitud del 25 %. El extracto se centrifugó por 15 min a 13,000 rpm a 4 °C y finalmente se recuperó el sobrenadante que fue transferido a un microtubo nuevo.

Para la precipitación, se mezclaron 200 μ L de cada extracto proteico con 1800 μ L de etanol absoluto, la mezcla se agitó usando un vortex y se almacenó a -20 °C toda la noche. Se realizaron 3 lavados con etanol al 90 %, centrifugando la muestra a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y se centrifugo al vacío para secar el precipitado de proteínas. Las proteínas precipitadas se enviaron al laboratorio de Proteómica del Instituto de Ecología A.C. en Xalapa, Veracruz, donde se resuspendieron en PBS con 1% de SDS y se determinó la cantidad de proteínas empleando el método del ácido bicinonínico. Se resolvieron 8 μ g de proteína de cada condición experimental y réplica biológica mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y se tiñeron con el colorante fluorescente Sypro Ruby (Bio-Rad, USA).

5.6.2 Digestión de Proteínas

Cien microgramos de cada muestra (3 condiciones x 3 réplicas biológicas) se redujeron con Tris

(2-carboxietil) fosfina 10 mM durante 45 min a 60 °C, y luego se añadieron grupos alquilo con iodoacetamida 30 mM durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se inactivó con ditioneitol 30 mM durante 10 min. Las proteínas se precipitaron usando cinco volúmenes de acetona fría seguidos de una incubación durante la noche. Se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 min a 4 °C, los pellets de proteína se secaron al vacío y se resuspendieron en 100 µL de bicarbonato de trietilamonio 50 mM y SDS al 0.1 %. Las proteínas se digirieron con tripsina grado espectrometría de masas (Promega) a una relación 1:30 tripsina: proteína, se incubaron durante la noche a 37 °C. Finalmente, se añadió tripsina recién preparada en una proporción de 1:60 de tripsina: proteína y se incubaron 4 h a 37 °C.

5.6.3 Marcaje Isobárico, Fraccionamiento y Desalado de Péptidos

Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina, se marcaron empleando etiquetas químicas isobáricas TMT (Tandem Mass Tags, Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en el siguiente orden: 126, 127 N y 127 C para muestras preprandiales; 128 N, 129 N y 129 C para muestras posprandiales 1 h; 130 N, 130 C y 131 para muestras posprandiales 3 h. Una vez marcados, los péptidos provenientes de las 9 muestras se mezclaron en un mismo tubo y se fraccionaron mediante fase reversa a pH alcalino empleado un kit comercial (Pierce). A continuación, las fracciones se desalaron con cartuchos C18 (Thermo Scientific) y se secaron en un CentriVap (Labconco).

5.6.4 Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem y Selección de Precursores Sincrónicos (SPS-MS³)

Las fracciones desaladas se suspendieron en ácido fórmico al 0.1 % y se inyectaron 20 µL de la solución en una pre-columna nanoviper C18 (3 µm, 75 µm × 2 cm, Dionex) a un flujo de 3 µL/min empleando un sistema RSLC UltiMate 3000 (Dionex) y luego se separaron en una columna EASY spray C18 RSLC (2 µm, 75 µm × 25 cm), usando un gradiente de 100 min con una velocidad de

flujo de 300 nL/ min usando ácido fórmico al 0.1 % como solvente A, y 0.1 % de ácido fórmico en 90 % de acetonitrilo como solvente B. Se estableció un gradiente de la siguiente manera: 10 min de solvente A, 7-20 % de solvente B en 25 min, 20 % de solvente B durante 15 min, 20-25 % de solvente B durante 15 min, 25–95 % de solvente B durante 20 min y 8 min de solvente A. El nano cromatógrafo de líquidos se acopló a un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion Tribrid (ThermoFisher Scientific®) equipado con una fuente de ionización nano “EASY Spray” (ThermoFisher Scientific) y operado en modo de iones positivos. El voltaje del nanospray se fijó en 3.5 kV y la temperatura de la fuente en 280 °C. Como calibradores externos incluyeron cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621 (Thermo Fisher Scientific).

Se realizaron escaneos completos en el modo MS en el analizador Orbitrap a una resolución de 120 000 FWHM, con un rango de escaneo de 350 a 1500 m/z, y un control de ganancia automático (AGC) de 2.0×10^5 , tiempo máximo de inyección de 50 ms, umbral de intensidad de 5.0×10^3 , exclusión dinámica de 1 a 70 s, y tolerancia de masa de 10 ppm. Los parámetros de fragmentación incluyeron: disociación inducida por colisión con 35 % de energía de colisión y Q de activación de 0.25, AGC de 1.0×10^4 en un tiempo de inyección máximo de 50 ms, el rango de masas de selección de precursores fue de 400–1200 m/z, un ancho de exclusión de iones precursores menor a 18 m/z. La detección de los 5 espectros MS² más abundantes y la pérdida de las etiquetas TMT se llevó a cabo en la trampa de iones. Los espectros de MS³ se adquirieron como se describió anteriormente utilizando la selección de precursores sincrónicos (SPS) (McAlister et al., 2014). Los precursores de MS³ se fragmentaron mediante disociación de colisión de mayor energía (HCD por sus siglas en inglés) con un 65 % de energía de colisión y se analizaron en el Orbitrap a una resolución de 60 000 FWHM con un rango de exploración de 120 a 500 m/z, una ventana de aislamiento de 2 m/z, un AGC de 1.0×10^5 , y un tiempo de inyección máximo de 120 ms con un microescaneo.

5.6.5 Identificación de Proteínas con Base en Datos de Espectrometría de Masas

Los espectros generados con SPS-MS³ se procesaron con el software Proteome Discoverer 2.4 (PD, Thermo Fisher Scientific) utilizando los motores de búsqueda Mascot (versión 2.4.1, Matrix Science), Sequest HT y Amanda. Las búsquedas se dirigieron contra el proteoma de *L. vannamei*

(UniProt: UP000283509 que contiene 25,399 secuencias). Los parámetros de búsqueda incluyeron: especificidad de proteasa triptica completa, se permitió la pérdida de dos sitios de corte de la proteasa, como modificaciones fijas se incluyeron la carbamidometilación de las cisteínas (+57.021 Da) y el marcaje químico de los residuos de lisina/N-terminal con las etiquetas TMT 9-plex (+229.163 Da). Las modificaciones variables incluyeron oxidación de metionina (+15,995 Da) y desaminación de asparagina/glutamina (+0,984 Da). Para el método SPS-MS³ (en el que la identificación se realizó a menor resolución en la trampa lineal de iones), se aplicaron tolerancias de ± 10 ppm y ± 0.6 Da para iones precursores y iones fragmento, respectivamente. Los hits de péptidos resultantes se filtraron para una tasa máxima de falsos positivos de 1 % utilizando el algoritmo Percolator (Käll et al., 2007). La cuantificación del ion reportero para las etiquetas TMT se obtuvo con una plantilla de software de PD a nivel de MS³ aplicando tolerancias de masa de ± 10 ppm en el caso del centroide más seguro y un filtro de coaislamiento de precursor del 75 %. Los datos crudos estarán disponibles para libre acceso a través de la plataforma ProteomeXchange (<http://www.proteomexchange.org/>) una vez que se publiquen formalmente.

5.7. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos numéricos obtenidos en el estudio se realizó por medio del Software NCCS. Se hicieron pruebas de distribución normal y homogeneidad de varianza. Las diferencias entre grupos experimentales fueron analizadas por medio de un ANOVA de una sola vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey para los datos de concentración de proteína soluble. Por su parte, para los datos de actividad proteolítica total se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba de Dunn. Todas las pruebas considerando $P < 0.05$ como una diferencia estadísticamente significativa. En el caso de los valores de abundancia de las proteínas de interés resultantes del análisis proteómico se calcularon las abundancias normalizadas de las proteínas y se realizó un ANOVA de una vía y una prueba de comparación de Tukey para cada una de las peptidasas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos enzimáticos de los tres tiempos de muestreo se analizaron de forma individual, tanto en la evaluación de la actividad enzimática, como en el análisis proteómico.

6.1. Cuantificación de Proteínas Solubles y Actividad Proteolítica Total

La figura 2 muestra los resultados de la concentración promedio de proteína soluble en la glándula digestiva de cada uno de los organismos en los diferentes los tiempos de ingesta. No se encontraron diferencias entre los 3 grupos experimentales ($P > 0.05$).

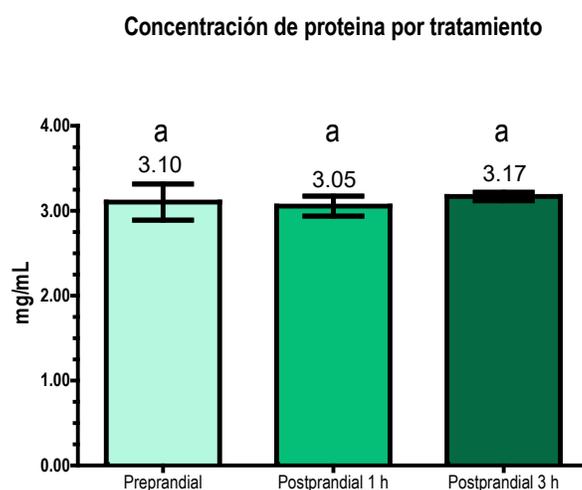


Figura 2. Concentración de proteína soluble en la glándula digestiva del camarón blanco durante los diferentes tiempos de ingesta. (n=15; $P > 0.05$)

Estos resultados reflejan de manera general que el promedio de las proteínas sintetizadas en la glándula digestiva en cada uno de los tiempos se mantiene estable, sin embargo no se sabe específicamente cuanta de esta proteína representa a las enzimas peptidasas. Estos datos van de acuerdo con lo descrito previamente por Sainz y colaboradores (2004), quienes sugirieron que en

la glándula digestiva de *L. vannamei* hay una constante producción y almacenamiento de enzimas en forma de zimógenos (formas inactivas), lo que permite una tasa de recambio constante entre la síntesis e hidrólisis de las proteínas manteniendo un nivel estable de proteínas, lo cual podría explicar este resultado.

Por otro lado, aunque los resultados de la actividad proteolítica total en la glándula digestiva mostraron una ligera tendencia hacia el aumento de la actividad enzimática a los tiempos 1 y 3 h después de la ingesta, estos cambios no fueron significativos como se representa en la figura 3 ($P > 0.05$). Lo anterior sugiere que, al no haber un cambio en la concentración de proteína soluble total en la glándula digestiva, el porcentaje de la proteína que representan las peptidasas es bajo en el órgano; sin embargo, los pequeños cambios detectados en la actividad de las peptidasas digestivas después de la ingesta sugieren que se podrían estar activando las peptidasas almacenadas en forma de zimógenos.

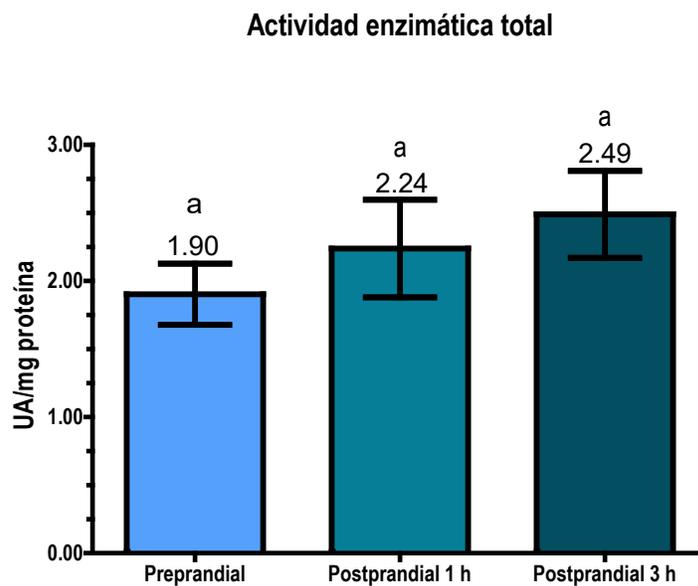


Figura 3. Actividad proteolítica total de la glándula digestiva del camarón blanco durante los diferentes tiempos de ingesta. Los valores representan las medias \pm la desviación estándar ($n=15$; $P \geq 0.05$).

6.2. Análisis de la Actividad Enzimática por Zimogramas

Se realizaron zimogramas para analizar las peptidasas activas en la glándula digestiva en dos

condiciones de pH diferente (6 y 8). La figura 4 muestra el patrón de bandeo general de un zimograma en el que se señalan las masas moleculares relativas de cada una de las peptidasas que a la fecha se tienen detectadas como activas en la glándula digestiva del camarón blanco.

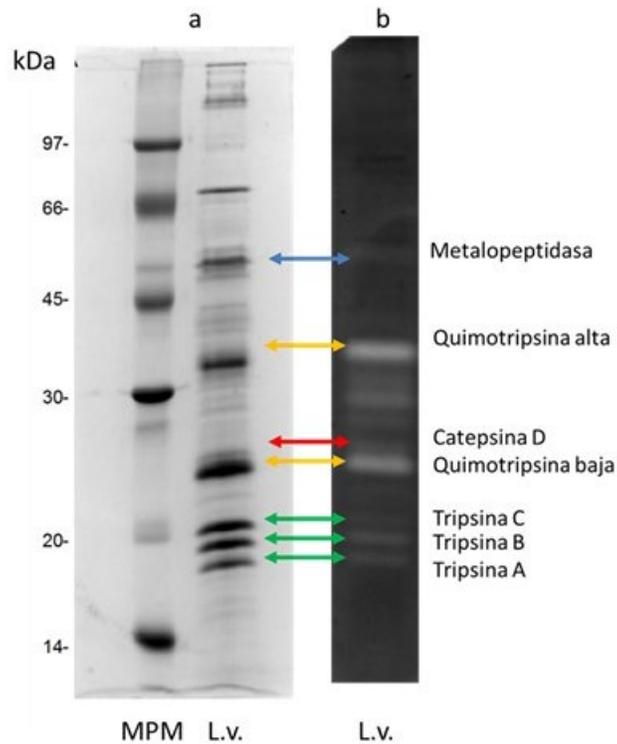


Figura 4. Patrón general de bandas de proteínas y peptidasas de la glándula digestiva de *L. vannamei*. A) Perfil proteico de la glándula digestiva, gel SDS-PAGE 12 %. MPM: Marcador de peso molecular; L.v.: extracto enzimático de la glándula digestiva. B) Zimograma, bandas blancas con actividad a pH 8.

Mientras que la figura 5 representa el cuadro de registro que indica la presencia ó ausencia de cada una de las bandas activas de las peptidasas detectadas en el zimograma. Con los resultados de los zimogramas se registraron las bandas de actividad de cada grupo experimental, mismas que quedaron registradas en el cuadro 1.

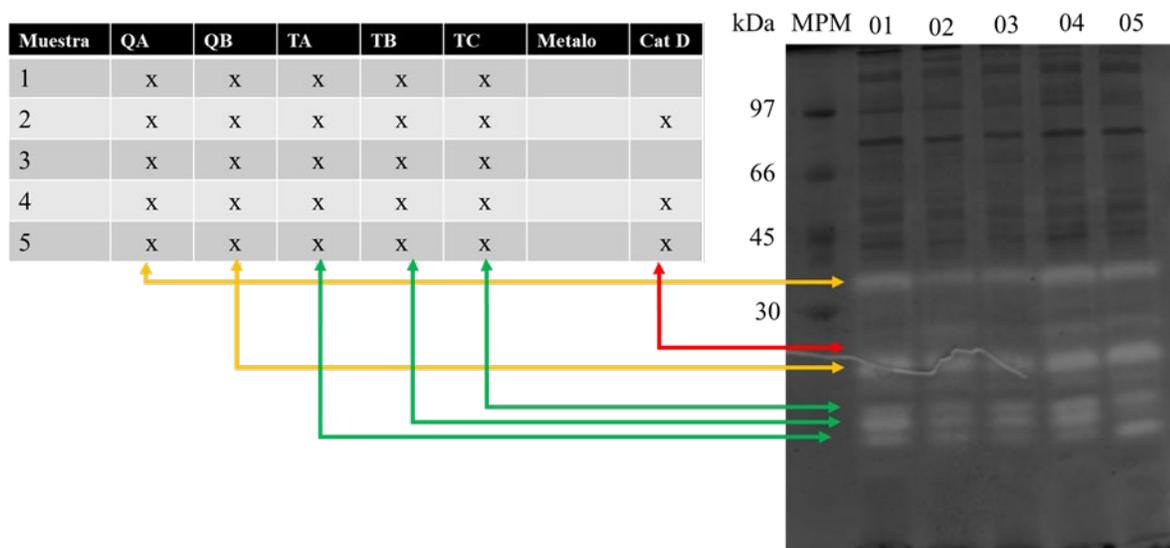


Figura 5. Registro de las bandas con actividad peptidasa en la glándula digestiva de *L. vannamei* a pH 6. Izquierda: Cada una de las columnas del cuadro representa una enzima peptidasa. QA: quimotripsina alta; QB: quimotripsina baja; TA: isotripsina A; TB: isotripsina B; TC: isotripsina C; Metalo: metalopeptidasa y Cat D: catepsina D. Derecha: zimograma en gel SDS-PAGE al 12 % a pH 6. Las bandas blancas muestran a las enzimas activas que hidrolizaron el sustrato.

Los resultados mostraron que en la glándula digestiva del camarón, las serino peptidasas como la tripsina y quimotripsina están representadas por varias isoformas. La tripsina, previamente reportada como un efector importante en la cascada enzimática de la digestión de proteínas, es una peptidasa cuya auto-activación se considera como el primer paso de una serie de reacciones consecutivas en los vertebrados (Navarrete del Toro y García-Carreño., 2018). La existencia de una secuencia de activación de diversas peptidasas de diferentes clases en un organismo, tiene como objetivo final la hidrólisis de la proteína del alimento hasta obtener los monómeros (aminoácidos libres) que serán utilizados por la célula en el proceso de biosíntesis (Muhlia-Almazán et al., 2003; Delcroix et al., 2006).

Hasta la fecha se han reportado tres isoformas de tripsina en la glándula digestiva del camarón blanco denominadas isotripsinas A, B y C, con masas moleculares de 17.2, 18.4 y 19.9 kDa, respectivamente en su forma activa (Navarrete del Toro et al., 2011).

Por otra parte, la quimotripsina es la otra serino peptidasa activa en la glándula digestiva del camarón, de la cual se han reportado dos isoformas con masas moleculares de 24.1 y 35.6 kDa, respectivamente (Navarrete del Toro et al., 2011).

Cuadro 1. Registro de actividad de las peptidasas de *L. vannamei* en la glándula digestiva en diferentes tiempos de ingesta a pH 6 y 8.

Grupo Experimental	Réplica	QA	QB	Metalo	TA	TB	TC	Cat D
Preprandial	R1	X	X	X	X	X	X	X
	R2	X	X		X		X	X
	R3	X	X	X	X	X	X	X
Postprandial 1 h	R1	X	X	X	X	X	X	
	R2	X	X	X	X	X	X	
	R3	X	X	X	X	X	X	
Postprandial 3 h	R1	X	X	X	X	X	X	X
	R2	X	X		X	X	X	X
	R3	X	X		X	X	X	X

Cada una de las columnas del cuadro representa una enzima peptidasa. QA: quimotripsina alta; QB: quimotripsina baja; TA: isotripsina A; TB: isotripsina B; TC: isotripsina C; Metalo: metalopeptidasa y Cat D: catepsina D.

Estudios previos sugieren que en la especie de estudio, las serino peptidasas son las que hidrolizan el mayor porcentaje de la proteína del alimento (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2018). En este estudio no se encontró organismo ó condición en la que no hubiera tripsinas y quimotripsinas activas, pues éstas enzimas tienen la particularidad de estar presentes y activas en los tres tiempos (preprandial, 1 y 3 h postprandial) evaluados. Lo anterior confirma que su expresión no es inducida por la prandia, pues ya se encuentran activas antes de que el organismo ingiera el alimento, durante y después de 3 h de ingesta. Estos resultados confirman los reportados por Hernández-Cortés et al. (1999), quienes por primera vez sugirieron que los camarones cuentan con peptidasas activas incluso antes de la prandia. Lo anterior contradice la idea de que la actividad enzimática se activa por la presencia del alimento como se ha reportado en otras especies de invertebrados (Sainz et al., 2008).

En el caso de las tripsinas, estudios previos han confirmado que su actividad está regulada tanto a nivel transcripcional (Muhlia-Almazán et al., 2003), como a nivel traduccional (Sainz et al., 2004). De acuerdo con el reporte de Sainz y colaboradores (2005), el camarón blanco puede presentar las isotripsinas en tres fenotipos diferentes (figura 6). Estos fenotipos no se inducen por factores como la temperatura del agua, el estado de muda, la edad ó la condición de alimentación, sino son heredados de los progenitores a sus descendientes.

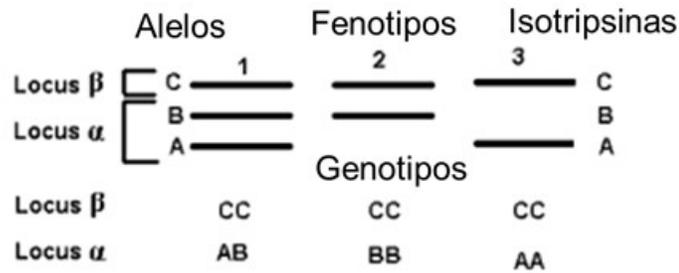


Figura 6. Fenotipos y genotipos de las tripsinas digestivas de *L. vannamei* (Modificado de Sainz et al., 2005)

Lo anterior explica porque, de acuerdo con lo observado durante la preprandia, cada una de las réplicas puede presentar un fenotipo diferente. En este estudio, no se tuvo registro de la isotripsina B expresada en los organismos de la réplica 2 como se observa en el cuadro 1, por lo tanto la mayoría de las muestras de la réplica 2 pertenecían al fenotipo 3 con sólo dos isotripsinas.

En cuanto a las quimotripsinas, ambas se encontraron activas al igual que las tripsinas en los 3 tiempos de ingesta, destacando así, su papel importante en la digestión peptídica en el camarón tal y como se ha reportado en los últimos años (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2018; Navarrete del Toro et al., 2011; Castellanos-Ochoa et al., 2022), pues las quimotripsinas en conjunto con las tripsinas se encargan de aproximadamente el 60 % de la hidrólisis peptídica del camarón (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2018).

Debido a la actividad constante de las quimotripsinas y su función de hidrolizar las cadenas peptídicas en sitios específicos (el extremo carboxilo de aminoácidos aromáticos) diferentes a los de las tripsinas, se liberan polipéptidos más pequeños, exponiendo extremos diferentes y dando cabida a que otras enzimas actúen sobre ellos. Todo lo anterior, confirma la necesidad del camarón de sintetizar de forma constante a las quimotripsinas (Rider y Taylor, 1980; Castellanos-Ochoa et al., 2022).

Por su parte, las peptidasas en las que sí se detectaron diferencias en la expresión entre los diferentes tiempos de la ingesta fueron la metalopeptidasa y la catepsina D. Los resultados sugieren que la metalopeptidasa, que es una enzima que requiere la presencia de iones zinc en su sitio activo (Semenova y Rudenskaya, 2009), se encuentra activa con mayor frecuencia durante la preprandia y después de 1 h postprandia, mientras que después de 3 h postprandia existen pocos organismos con la enzima activa. Previamente, Rojo-Arreola y colaboradores (2019) y Maytorena-Verdugo y colaboradores (2017) describieron la activación de esta metalopeptidasa como una respuesta

compensatoria durante la hidrólisis de proteínas del alimento en *L. vannamei*, aumentando su actividad cuando el alimento presenta inhibidores de serino peptidasas.

Los resultados de este estudio muestran a la catepsina D como una enzima activa en el tiempo preprandial y después de 3 h después postprandial; sin embargo, no se obtuvo registro de su actividad en el tiempo postprandial 1 h (cuadro 1). Se sabe que la catepsina D tiene funciones diversas, incluso teniendo participación en el sistema de respuesta inmune del camarón (Colbert et al., 2009). Respecto al proceso digestivo se ha reportado en la langosta americana *H. americanus*, que la catepsina D juega un papel importante en la hidrólisis proteica trabajando en conjunto con las cisteino peptidasas encargándose de la mayor parte de la hidrolisis a diferencia de como ocurre con *L. vannamei*.(Rodríguez-Siordia et al., 2016).

De acuerdo con los antecedentes y los patrones de actividad peptidasa registrados en los zimogramas en este estudio, podemos suponer que tanto la metalopeptidasa como la catepsina D, son enzimas cuya expresión y actividad se ven modificadas a lo largo del proceso de la ingesta. Estos primeros resultados fueron comparados con los resultados del análisis proteómico, como se describe en el apartado siguiente.

6.3 Análisis Proteómico

En la figura 7 se observa el gel de calidad (SDS-PAGE) de las muestras utilizadas para el análisis proteómico, las bandas representan las proteínas de la glándula digestiva de tres camarones de cada tiempo de ingesta seleccionados como réplicas. Después de determinar la concentración de proteína por el método del ácido bicinconínico se cargaron 8 µg de proteína observándose patrones electroforéticos similares en calidad y cantidad para cada una de las réplicas biológicas analizadas. En la figura 8 se puede observar la mediana del log₁₀ de la abundancia de las proteínas en cada una de las réplicas de los tres grupos experimentales previamente mostrados en la figura 7. Para esta estimación se emplearon los datos de espectrometría de masas, con lo que se comprobó que las muestras en los diferentes tiempos tienen abundancias globales muy similares, por lo que los cambios en la abundancia de proteínas individuales entre las diferentes réplicas y grupos experimentales pueden ser interpretados desde un origen biológico.

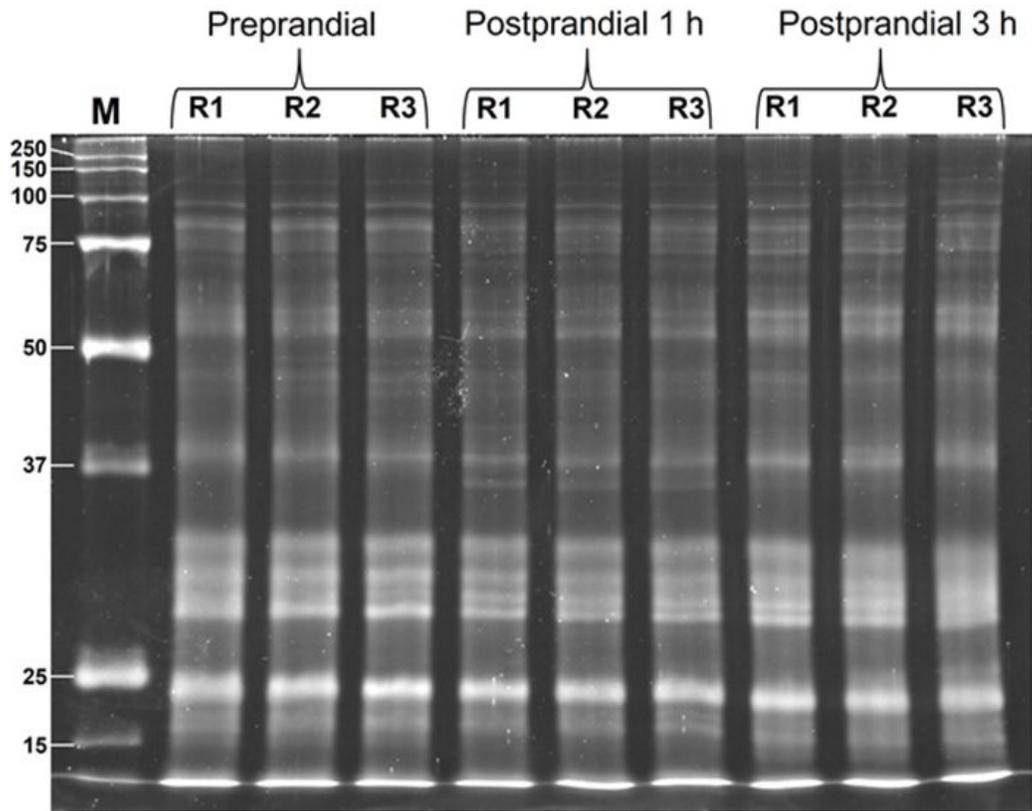


Figura 7. SDS-PAGE de proteínas de las glándula digestiva de *L. vannamei* (8 µg) obtenidas en diferentes tiempos de ingesta: preprandial, postprandial 1 h, y postprandial 3 h. Los geles se tiñeron con Sypro-Ruby.

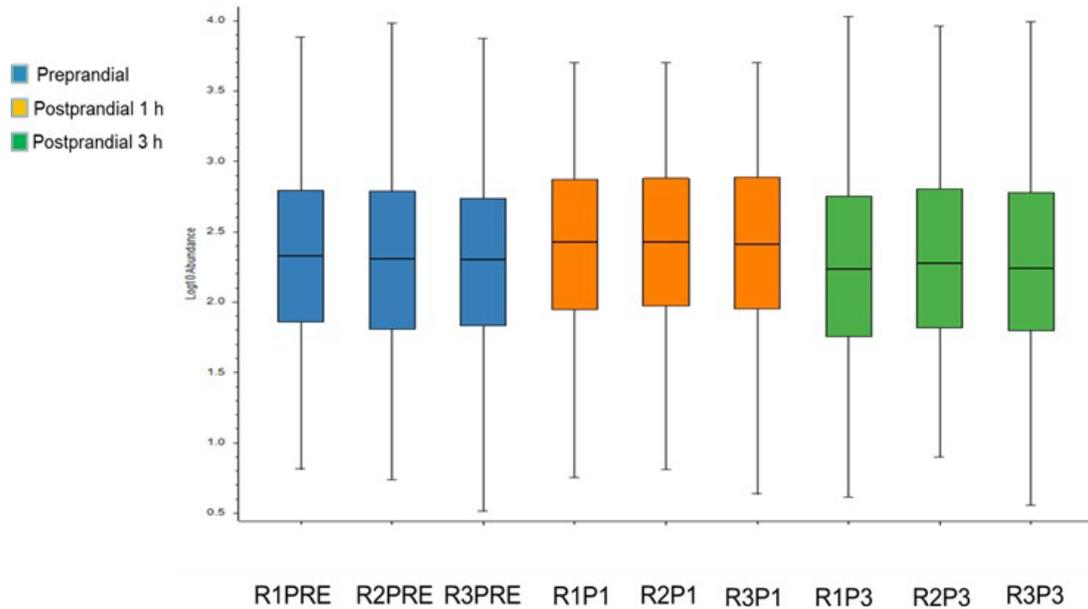


Figura 8. Abundancia de proteínas en las muestras en los diferentes tiempos de toma de muestra. La abundancia está representada por el Log10 de la abundancia y cada color representa las 3 muestras réplica analizadas en cada tiempo de ingesta: azul (preprandial), naranja (postprandial 1 h) y verde (postprandial 3 h).

Con los valores de la abundancia de todas las proteínas identificadas en el análisis proteómico, se realizó un agrupamiento de estructura jerárquica y su correspondiente mapa de calor “Heat map” en donde cada proteína se representa según su abundancia normalizada (figura 9). En este mapa las muestras están distribuidas en columnas y representadas con un color según el tiempo de ingesta. Los resultados muestran que hay consistencia entre las tres réplicas de cada grupo experimental, pues los grupos de proteínas representados en los colores de la escala de abundancia muestran patrones similares entre réplicas y grupos de proteínas diferentes según el tiempo de ingesta.

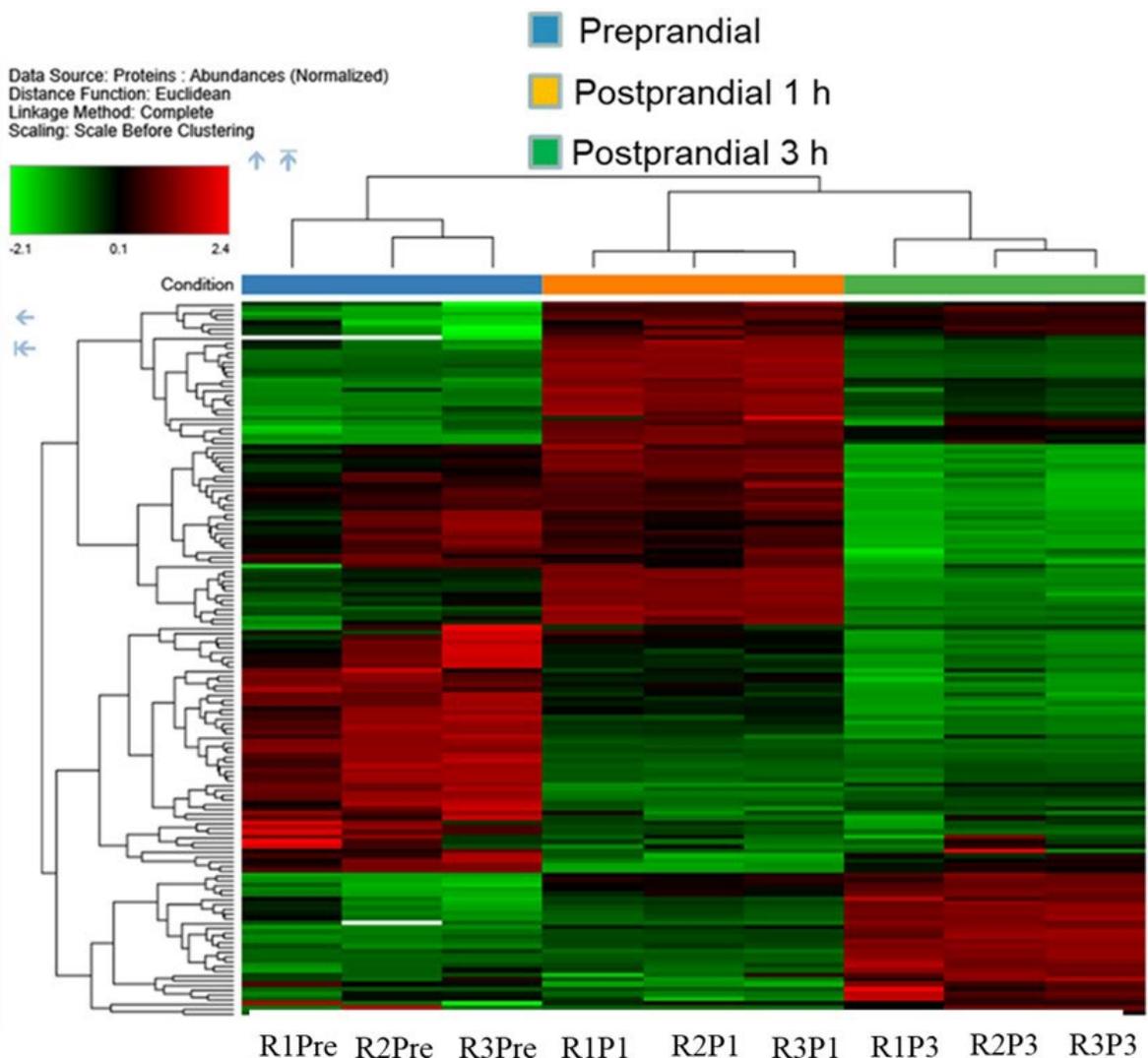


Figura 9. Mapa de calor de abundancia de todas las proteínas de la glándula digestiva de *L. vannamei* en diferentes tiempos de ingesta: preprandial, postprandial 1 h y postprandial 3 h.

6.3.1 Las Peptidasas de la Glándula Digestiva de *L. vannamei*

De un total de 379 proteínas identificadas en el análisis proteómico de la glándula digestiva del camarón, se realizó una selección de aquellas identificadas como las peptidasas que participan en el proceso digestivo de *L. vannamei* y sus posibles formas inactivas (zimógenos). Se identificaron dos quimotripsinas (UniProt Q00871 y P36178), dos catepsinas D (UniProt A0A3R7SR07 y A0A423SAG91), dos catepsinas L (UniProt A0A423TC40 y A0A423TC26), tres metalopeptidasas (UniProt A0A423TAW0, A0A3R7P5D9 y A0A423S926) y cuatro tripsinas (UniProt A0A3R7ME08, A0A423SXG7, A0A3R7M136 y A0A3R7NWS2). Así, de acuerdo con los resultados previamente obtenidos a partir de los zimogramas de actividad, y los resultados del proteoma de la glándula digestiva del camarón en los diferentes tiempos de la ingesta se integró la información que se describe a continuación.

6.3.1.1 Tripsinas y Quimotripsinas. De acuerdo con los resultados del análisis proteómico, se detectaron en la glándula digestiva de *L. vannamei* varias isoformas de tripsina cuyas secuencias fueron comparadas con las tres isoformas previamente identificadas por Sainz et al. (2005). La figura 10 muestra el alineamiento múltiple de todas las secuencias de aminoácidos de las tripsinas, a través del cual se encontró que la secuencia etiquetada como tripsina 4 en este estudio coincide con la isoforma C de las tripsinas previamente reportadas (Klein et al., 1996; Sainz et al., 2005). Sin embargo, las tripsinas identificadas en el análisis proteómico de este estudio, en lo sucesivo denominadas isoformas 1, 2 y 3 no son idénticas a las isoformas ya reportadas A y B (Anexo 1a). Debido a lo anterior, se realizaron análisis de bioinformática para confirmar la identidad de las isoformas 1, 2, y 3.

```

Tripsina 3      MKSLVLCLLL LAGAF AAPS RKPT FRRGLNKIVGGSEVTPGELPYQLSFQDNSWGEAWHYCG 60
Tripsina 4      MKSLVLCLLL LAGAF AAPS RKPT FRRGLNKIVGGSEVTPGELPYQLSFQDNSWGTAWHFCG 60
Tripsina C      MKSLVLCLLL LAGAF AAPS RKPT FRRGLNKIVGGSEVTPGELPYQLSFQDNSWGTAWHFCG 60
Tripsina 1      MKSLVLCLLL LAGAF AAPS RKPT FRRGLNKIVGGSDVTPGELPYQLSFQDISFGFAFHFCG 60
Tripsina 2      -----MADNHYVWHLKLPGISFGFAWHFCG 25
Tripsina A      MKTLILCVLL LAGAF AAPS RKPT FRRGLNKIVGGTDAPGELPYQLSFQDISFGFAWHFCG 60
Tripsina B      MKTLILCVLL LAGAF AAPS RKPT FRRGLNKIVGGTDATPGELPYQLSFQDISFGFAWHFCG 60
                ..  :*: .  ** *:*:**

Tripsina 3      ASIYNEQWAICAGHCVQGEDFDNPSNLQ----VVAGEHNFDVIEGNEQTVVLSKIIQHED 116
Tripsina 4      ASIYENENWAICAGHCVQGGDFDNPSYLAQASSMVVAGEHNFDVNEGNEQTVVLSKIIQHED 120
Tripsina C      ASIYENENWAICAGHCVQGGDFDNPNYLQ----VVAGEHNFDVNEGNEQTVVLSKIIQHED 116
Tripsina 1      ASIYENENWAICAGHCVQGEDMNNPDYLQ----VVAGEHNFDVDEGNEQTVVLSKIIQHED 116
Tripsina 2      ASIYENENWAICAGHCVQGEDMNNPDYLQ----A---KLNQDVDEGTEQTVILSKIIQHED 78
Tripsina A      ASIYENENWAICAGHCVQGEDMNNPDYLQ----VVAGELNQDVDEGTEQTVILSKIIQHED 116
Tripsina B      ASIYENENWAICAGHCVQGEDMNNPDYLQ----VVAGELNQDVDEGTEQTVILSKIIQHED 116
                *****:*****:*.**: ** . : * ** *.*****:*****

Tripsina 3      YNGFTLSNDISLLKLSKPLSFNDNVRAIDIPVQGHAAAGDCIVSGWGALKEEGDSSPSVLQ 176
Tripsina 4      YNGFTISNDISLLKFSQPLSFNDYVRAIDI PAQGHAAAGDCIVSGWGALTEGGSSPSALQ 180
Tripsina C      YNGFTISNDISLLKFSQPLSFNDYVRAIDI PAQGHAAAGDCIVSGWGALTEGGSSPSALQ 176
Tripsina 1      YNGFTISNDISLLQLSQPLSFNEFVAPIALPEAGHAAAGDCIVSGWGTTSEGGSTPSVLQ 176
Tripsina 2      YNGFTISNDISLLKLSQPLSFNDNVRAIDI PAQGHAAAGDCIVSGWGTTSEGGSTPSVLQ 138
Tripsina A      YNGFTISNDISLLKLSQPLSFNDNVRAIDI PAQGHAAAGDCIVSGWGTTSEGGSTPSVLQ 176
Tripsina B      YNGFTISNDISLLKLSQPLSFNDNVRAIDI PAQGHAAAGDCIVSGWGTTSEGGSTPSVLQ 176
                *****:*****:*.**: * * : * *****: . * *.:**

Tripsina 3      KVTVPDIVSDDECRDAYGQNDIEDSMICAGVPEGGKDCSCQGDSSGGPLACSDTGSTYLAGIV 236
Tripsina 4      KVSVPDIVSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGVPEGGKDCSCQGDSSGGPLACSDTGSTYLAGIV 240
Tripsina C      KVSVPDIVSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGVPEGGKDCSCQGDSSGGPLACSDTGSTYLAGIV 236
Tripsina 1      KVSVPDIVSDDECRDAYGQNDIDDSMICAGVPEGGKDCSCQGDSSGGPLACSDTGSAYLAGIV 236
Tripsina 2      KVTVPDIVSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGVPEGGKDCSCQGDSSGGPLACSDTGSTYLAGIV 198
Tripsina A      KVTVPDIVSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGVPEGGKDCSCQGDSSGGPLACSDTGSTYLAGIV 236
Tripsina B      KVTVPDIVSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGVPEGGKDCSCQGDSSGGPLACSDTASTYLAGIV 236
                **:*****:*****:*.**:*****:*****:*****:*.**:*****

Tripsina 3      SWGYGCARPGYPGVYAEVSYHVDWIKANAV 266
Tripsina 4      SWGYGCARPNYPGVYAEVSYHVDWIKANAV 270
Tripsina C      SWGYGCARPNYPGVYAEVSYHVDWIKANAV 266
Tripsina 1      SWGYGCARPNYPGVYTEVAYFVDVLANAV 266
Tripsina 2      SWGYGCARPGYPGVYAEVSYHVDWIKANAV 228
Tripsina A      SWGYGCARPGYPGVYAEVSYHVDWIKANAV 266
Tripsina B      SWGYGCARPGYPGVYAEVSYHVDWIKANAV 266
                |*****:*****:*.**:*.**: *

```

Figura 10. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de las tripsinas identificadas en el análisis proteómico (tripsinas 1-4) y las previamente reportadas por Klein y colaboradores (1996) y Sainz et al. (2005) (tripsinas A, B y C). Los aminoácidos marcados en gris muestran los aminoácidos que conforman el sitio catalítico conservado de las tripsinas.

Para el análisis comparativo de las diversas isotripsinas se calcularon tanto el peso molecular como el punto isoeléctrico teóricos y se confirmó que no coinciden con las ya reportadas (cuadro 2), un punto importante a considerar al momento de analizar las secuencias, es la gran similitud entre ellas, esto ocurre no solo en las secuencias encontradas en este estudio, sino también en las

reportadas por Sainz y colaboradores (2004) que a su vez derivan de los cDNAs reportados por Klein y colaboradores 1996. Entonces, al encontrar estas mismas similitudes en las secuencias encontradas en este estudio se tomó en cuenta al momento de decidir sobre la identidad de una isoforma, ya sea que fuera analizada desde su tripsinógeno reportado o la secuencia sin el péptido señal como se hizo en la cuadro 2.

Los resultados integrados sugieren que en la glándula digestiva del camarón blanco existen más isoformas de tripsina de las reportadas hasta la fecha, mismas que por el porcentaje de identidad de las secuencias y por sus masas moleculares similares podrían no ser detectadas en los zimogramas. La existencia de varias isotripsinas digestivas en el camarón coincide con los resultados reportados por Wei y colaboradores (2014) quienes encontraron hasta 29 transcritos codificantes de tripsinas.

Cuadro 2. Características de las diferentes isoformas de las tripsinas de la glándula digestiva del camarón blanco.

Isoformas	Peso Mol. Calculado kDa	pI Calculado	Número Aminoácidos	ID UniProt	Referencias
Tripsinógeno A	32.90	4.37	266	A0A423SXX9	Klein et al. 1996; Sainz et al. 2005
Tripsinógeno B	32.90	4.37	266	A0A423TSA5	Klein et al. 1996; Sainz et al. 2005
Tripsinógeno C	30.20	4.47	266	A0A3R7M136	Klein et al. 1996; Sainz et al. 2005
Tripsina 1	28.20	4.27	266	A0A3R7ME08	Este estudio
Tripsina 2	28.11	4.31	266	A0A423SXG7	Este estudio
Tripsina 3	28.15	4.32	266	A0A3R7NWS2	Este estudio

La figura 11 muestra los resultados de la abundancia de las cuatro tripsinas detectadas en el estudio. Cada una de las isoformas mostró un comportamiento distinto. Como se puede identificar en la figura 11, la tripsina 1 es entre 6 y 31 veces más abundante que las isoformas 2, 3 y C, sugiriendo que a lo largo de la ingesta, esta isoforma hidroliza un mayor porcentaje de proteína del alimento, que el resto de las isoformas encontradas en este estudio.

A su vez, se encontró al sumar las abundancias de todas las tripsinas en los diferentes tiempos que durante la preprandia ya existe una cantidad abundante de tripsinas en la glándula digestiva, misma

que decreta 1 h después de la ingesta, e incrementa de forma importante 3 h después de la ingesta, que es el tiempo en el que mayor abundancia de tripsinas se registró.

A pesar de que los valores de abundancia no mostraron diferencias significativas en los diferentes tiempos de las tripsinas 1 y 2 ($P > 0.05$); si se detectaron diferencias significativas en las tripsinas 3 y C, mismas que mostraron un comportamiento opuesto a lo largo de la ingesta. Mientras que la tripsina 3 es más abundante antes e inmediatamente después de la ingesta, la tripsina C tiende a aumentar significativamente 3 h después ($P < 0.05$).

Los resultados anteriores confirman a la tripsina como una de las peptidasas más abundantes en la digestión de la proteína del alimento, de acuerdo con lo sugerido previamente por Navarrete del Toro y García-Carreño (2018). Se sugiere también que existen al menos seis isoformas de tripsina en la glándula digestiva del camarón blanco, mismas que modifican su abundancia en los diferentes tiempos de la ingesta, esto con el objetivo de mantener los niveles de actividad tripsina en un estado estable y constante que incrementa y se mantiene hasta 3 h después de la ingesta. Estos resultados sugieren también la existencia de mecanismos de compensación en la abundancia de las peptidasas digestivas, no sólo entre diferentes clases de peptidasas como lo sugirieron Maytorena-Verdugo et al. (2017), sino también entre las diferentes isoformas de una misma enzima como la tripsina.

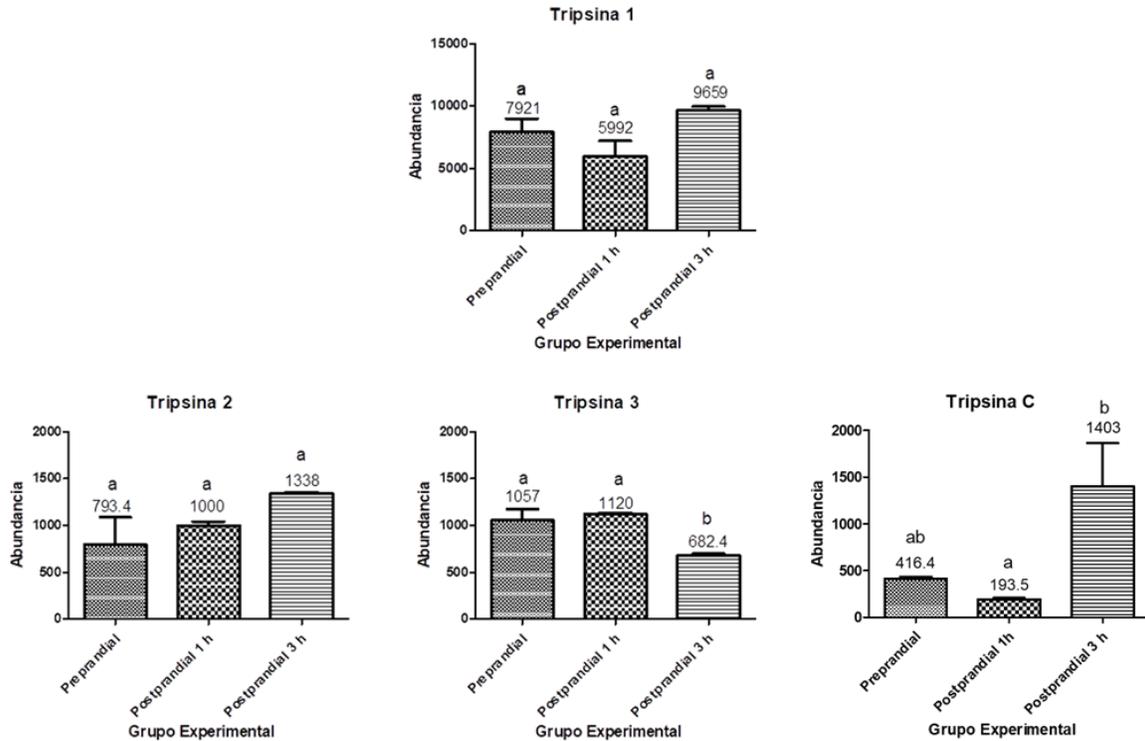


Figura 11. Gráficas de abundancia de las cuatro isotripsinas identificadas en el análisis proteómico en los diferentes tiempos de ingesta. Los valores representan las medias \pm la desviación estándar ($n=3$). Diferentes letras indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Respecto a las quimotripsinas se identificaron dos secuencias (UniProt Q00871 y P36178), las cuales se muestran en el alineamiento de la figura 12 (Anexo 1b). Ambas secuencias cuentan con las características conservadas de las quimotripsinas digestivas y una similitud del 94.46 % entre ellas.

```

Quimotripsina BI      MIGKLSLLLVCVAVASGNPAAGKPWHWKS PKPLVDPRIHVNATPRIVGGVEATPHSWPHQ 60
Quimotripsina BII    MIGKLSLLLVCVAVASGNPAAGKPWHWKS PKPLVDPRIHVNATPRIVGGVEATPHSWPHQ 60
*****

Quimotripsina BI      AALFIDDMYFCGGSLISSEWVLTAAHCMDGAGFVEVVLGAHNIRQNEASQVSITSTDFFT 120
Quimotripsina BII    AALFIDDMYFCGGSLISSEWVLTAAHCMDGAGFVEVVLGAHNIRQNEASQVSITSTDFFT 120
*****

Quimotripsina BI      HENWNSWLLTNDIALIRLPSFVSLNSNIKTVKLPSSDVSVGTITVPTGWGRPSDSASGIS 180
Quimotripsina BII    HENWNSWLLTNDIALIKLPSFVSLNSNIKTVKLPSSDVAVGITVPTGWGRPLDSAGGIS 180
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

Quimotripsina BI      DVLQRQVNVPMNADDCDSVYIVGVDGVVICIDGTGGKSTCNGDSGGPLNLNGMTYGITSTFG 240
Quimotripsina BII    DVLQRQVNVPMNADDCDAVYIVGNGVVICIDSEGGKSTCNGDSGGPLNLNGMTYGITSTFG 240
*****;*:*** ***:*****;*****; ***,*****

Quimotripsina BI      SSAGCEKGYPAAFTRVYYYYLDWIIQKIGVTP 271
Quimotripsina BII    SSAGCEVGYPDFAFTRVYYYYLDWIEQKIGVTP 271
***** ** * *****;*****

```

Figura 12. Alineamiento secuencias de Quimotripsinas identificadas en el análisis proteómico

Se detectó que los pesos moleculares calculados de ambas coinciden con los reportados en la base de datos UniProt, pero no en su punto isoeléctrico calculado (Cuadro 3). Estos datos a su vez coinciden con los reportados por Hernández-Cortés y colaboradores (2017) quienes encontraron una quimotripsina BI (Q00871) y una quimotripsina BII (P36178); sin embargo los pesos moleculares de ambas peptidasas no coinciden ni con los observados en los zimogramas realizados en este estudio ni con los reportados por Hernández-Cortés y colaboradores (2017).

Cuadro 3. Características de las diferentes isoformas de las quimotripsinas de la glándula digestiva del camarón blanco.

Isoforma	Peso Mol. calculado	pI Calculado	Número Aminoácidos	ID UniProt	Referencias
Quimotripsina BI	28.685	5.74	271	Q00871	Este estudio; Hernández-Cortés et al. 2017
Quimotripsina BII	28.723	4.98	271	P36178	Este estudio; Hernández-Cortés et al. 2017

Los resultados de la abundancia relativa de las quimotripsinas sugieren que ambas isoformas

presentan un comportamiento similar a lo largo del proceso digestivo (Figura 13). Se observa que en ambos casos hay un incremento en la abundancia relativa de BI y BII conforme pasa la ingesta, llegando a su punto más abundante al final de la digestión ($P < 0.05$). La quimotripsina de mayor peso molecular en los zimogramas (BI) fue más abundante que la quimotripsina de menor peso molecular (BII), siendo BI 10.2, 7.2 y 7.6 veces más abundante en los grupos experimentales (preprandia, postprandial 1 h y postprandial 3 h), respectivamente.

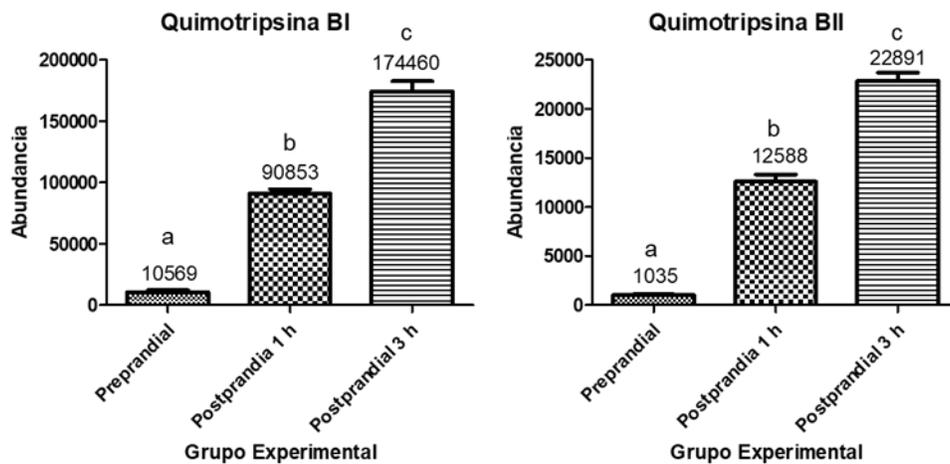


Figura 13. Gráficas de abundancia de las dos quimotripsinas identificadas en el análisis proteómico en los diferentes tiempos de ingesta. Los valores representan las medias \pm la desviación estándar ($n=3$). Diferentes letras indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Los resultados de este estudio confirman que ambas quimotripsinas están activas desde la preprandia hasta el final del proceso digestivo; sin embargo, sus abundancias varían significativamente, siendo su participación más importante durante la postprandia 3 h, a diferencia de las tripsinas que en su mayoría no mostraron cambios significativos.

6.3.1.2 Catepsinas. De las catepsinas identificadas en este estudio, tanto la catepsina D (aspártico peptidasa), como la catepsina L (cisteíno peptidasa), cuentan con una doble función, interviniendo tanto en el sistema inmune como en el sistema digestivo, actuando tanto en los lisosomas como fuera de ellos (Colbert et al., 2009). Dentro de las funciones inmunes reportadas de la catepsina D, está su participación en la apoptosis mediada por los lisosomas y la vía del MHC de clase II,

mientras que la catepsina L es vital en el desarrollo de los linfocitos CD4+ y células NK fuera de su actividad en la digestión de proteínas (Fonteneu et al., 2003).

Como se puede observar en la Cuadro 4, los pesos moleculares calculados entre las catepsinas L y D son bastante similares, esta parece ser una de las principales razones por las que no es posible diferenciarlas en un gel de acrilamida ó en un zimograma. Por su parte, el peso molecular de la catepsina D de *L. vannamei* es parecido a la de otros invertebrados como *H. americanus* y fueron los reportes de Rojo-Arreola y colaboradores (2010), en donde se caracterizó esta proteína en la langosta confirmando que existen catepsinas D con funciones digestivas. Por su parte, Hu y Leung (2006) estudiaron la digestión de proteínas por la catepsina L y descubrieron que tiene actividad peptidasa tanto intracelular como extracelular.

Cuadro 4. Características de las diferentes isoformas de las catepsinas de la glándula digestiva del camarón blanco.

Isoformas	Peso Mol. Calculado kDa	pI Calculado	Número Aminoácidos	ID UniProt	Referencias
Catepsina D1	44.41	4.6	386	A0A423SAG9	Este estudio
Catepsina D2	42	6	386	A0A3R7SR07	Este estudio
Catepsina L1	47.46	7.07	428	A0A423TC40	Este estudio
Catepsina L2	39.3	8.31	357	A0A423TC26	Este estudio

En la Figura 14 se muestran las abundancias observadas en cada grupo experimental de las catepsinas identificadas. La catepsina D1 muestra su mayor abundancia durante la preprandia, disminuyendo significativamente ($P < 0.05$) durante la postprandia 1 h y se mantiene estable después de 3 h. Por su parte, la catepsina D2 no mostró diferencias en su abundancia ($P > 0.05$). Sin embargo, se puede observar un comportamiento que muestra un pico de abundancia después de 1 h postprandial. Los resultados también muestran que la catepsina D2 es considerablemente más abundante que la catepsina D1 (2, 5.7 y 4.5 veces en los tiempos preprandial, postprandial 1 h y postprandial 3 h, respectivamente). Como se aprecia en la Figura 14, también se encontraron dos peptidasas identificadas como catepsinas L, y se observó que ambas mostraron un incremento de su abundancia hacia el final de la ingesta, en la postprandia 3 h ($P < 0.05$). Así mismo, se detectó una diferencia importante en las abundancias de ambas enzimas. La catepsina L1 fue hasta 3 órdenes de magnitud más abundante que la catepsina L2. A su vez, la catepsina L1 fue más

abundante que la catepsina D1 que es la enzima digestiva, en todos los tiempos evaluados.

A pesar de que en el camarón blanco se le ha otorgado a las serino peptidasas el papel más importante en la digestión de la proteína del alimento, la abundancia de las catepsinas D también sugiere un rol importante con niveles altos desde la preprandia. Es importante mencionar que de las dos catepsinas identificadas en este estudio, sólo la catepsina D1 ha sido comprobada con funciones digestivas, esto debido a la falta de un loop de poliprolinas presente en la catepsina D2, que es una característica específica de las catepsinas D digestivas tal y como se puede observar en la figura 15 (Anexo 1d; Rojo et al., 2010).

De acuerdo con los resultados de este estudio, la catepsina D2 mostró la mayor abundancia durante la postprandia 1 h, lo cual se puede explicar debido a que esta enzima cumple otras funciones a parte de la hidrólisis de los péptidos ingeridos en el alimento (Colbert et al., 2009). Si bien, no se ha confirmado que la catepsina D2 tiene un rol digestivo, se hacen necesarios más estudios sobre el papel específico de cada una de las dos isoformas, cuyas abundancias cambian en los diferentes tiempos de ingesta.

Por su parte, la catepsina D1 que es la isoforma cuyo rol digestivo se ha confirmado en el camarón, fue más abundante durante la preprandia. Este resultado coincide con lo observado en los geles de actividad o zimogramas (ver Cuadro 1), en donde la banda de catepsina D muestra actividad desde la preprandia, sugiriendo que esta peptidasa es la que se detecta en las bandas activas del zimograma.

Respecto al papel de la catepsina D en el proceso digestivo, Laurent-Matha y colaboradores (2006) propusieron un posible mecanismo por el cual la catepsina D es activada, este mecanismo consiste en una auto-activación parcial, seguida de una maduración asistida en los lisosomas. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en los dos análisis realizados en este estudio, en los que se muestra tanto la presencia de actividad, como la de una abundancia al menos 2 veces mayor en el tiempo preprandial a los demás tiempos. Esta característica de auto-activación es compartida por las tripsinas, según lo reportado por Goettig y colaboradores (2019), lo cual nos permite sugerir que ambas enzimas podrían ser las que inician la digestión de proteínas en *L. vannamei*, al ser las primeras en estar activas, incluso antes de que el organismo consuma alimento.

Un punto importante a considerar al momento de analizar los zimogramas es el hecho de que ambas catepsinas, D1 y D2, tienen un peso molecular similar, lo que no permitió diferenciar ambas proteínas en los geles de acrilamida con la concentración experimental. Esto resalta la ventaja que

ofrece la complementariedad entre las herramientas convencionales utilizadas en el estudio de las proteínas, como lo son los zimogramas, y las herramientas que ofrecen nuevas estrategias (como lo son los análisis proteómicos) para obtener información sobre las mismas moléculas.

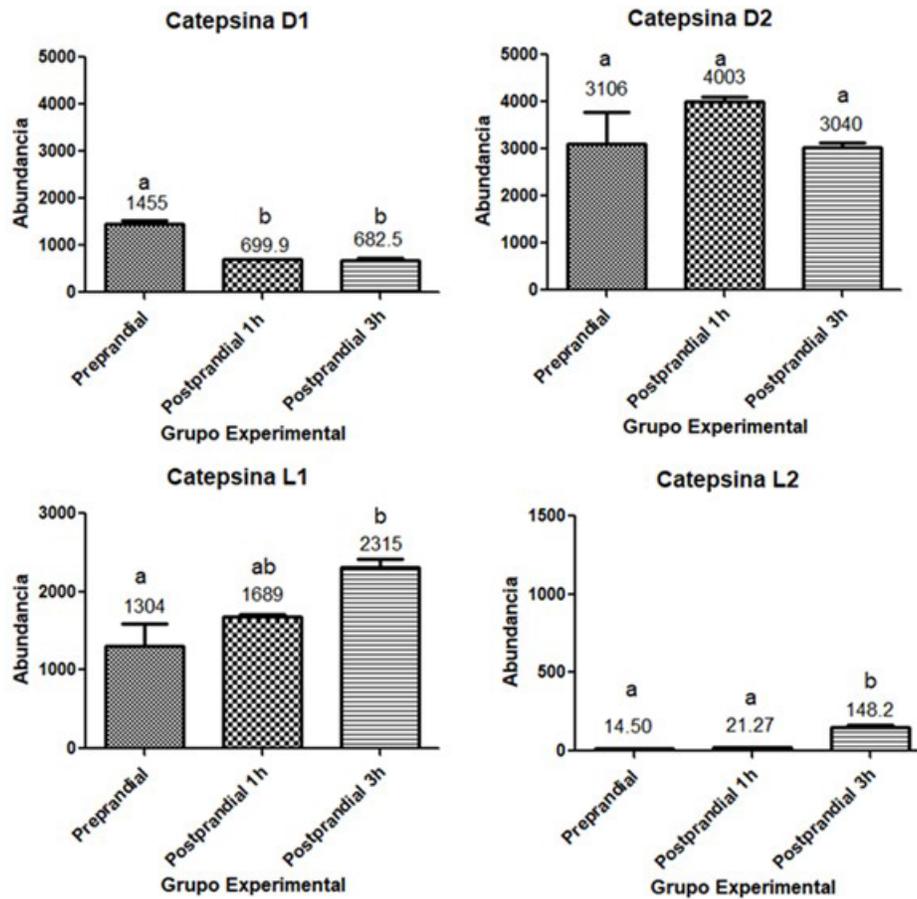


Figura 14. Gráficas de abundancia de las catepsinas identificadas en análisis proteómico en los diferentes tiempos de ingesta. Los valores representan las medias \pm la desviación estándar (n=3). Diferentes letras indican diferencias estadísticas (P < 0.05)

Hasta la fecha se han publicado varios estudios que sugieren la participación compensatoria de esta enzima en la hidrólisis proteica, en condiciones en donde alguna enzima digestiva como la tripsina se encuentre inhibida (Rojo-Arreola et al., 2019; Rodríguez-Siordia, 2017; Schwarzenberger et al., 2010).

Cuadro 5. Características de las diferentes isoformas de las metalopeptidasas de la glándula digestiva del camarón blanco.

	Peso Mol. Calculado kDa	pI Calculado	Número Aminoácidos	ID UniProt	Referencias
MPC1	42.5	5.42	256	A0A3R7P5D9	Rojo et al., 2019 Este estudio
Metalopeptidasa 1	23.81	4.93	210	A0A423TAW0	Este estudio
Metalopeptidasa 2	28.86	5.25	254	A0A423S926	Este estudio

La Figura 17 muestra las abundancias observadas para las metalopeptidasas detectadas. Se observó que la abundancia promedio de las tres metalopeptidasas fue muy diferente. La abundancia de la metalopeptidasa 1 se incrementó a la 1 h postprandia, respecto a la preprandia ($P < 0.05$). Sin embargo, a las 3 h postprandia se redujo a valores menores a los observados en la preprandia ($P < 0.05$). Con respecto a la metalopeptidasa 2, se observó una menor abundancia a las 3 h postprandia respecto a previo a la ingesta de alimento y a la 1 h postprandia ($P < 0.05$). Por último, la MPC1 no tubo cambios en su abundancia durante el proceso digestivo ($P > 0.05$).

A pesar de que MPC1 es la única metalopeptidasa dependiente Zinc reportada con funciones digestivas (Rojo-Arreola et al., 2019), también fue la que tuvo menor abundancia de las tres metalopeptidasas siendo 56, 5.87 y 3.5 veces menos abundante que la metalopeptidasa 1 en los tiempos de preprandial, postprandial 1 h y postprandial 3 h, respectivamente y 10.6, 10.72 y 3.5 veces menos abundante comparada con la metalopeptidasa 2. Sin embargo, los cambios observados durante la ingesta en las tres metalopeptidasas son consistentes, pues los niveles de abundancia incrementan después de 1 h de la ingesta alcanzando su nivel mas alto y después de 3h de la ingesta disminuyen como se muestra en la figura 17. Lo anterior se relaciona con lo observado en los zimogramas, pues se observó que la metalopeptidasa estuvo activa en todos los camarones analizados en el tiempo postprandial 1 h. Si bien, MPC1 no mostró diferencias significativas en su abundancia, se puede observar un punto máximo en el tiempo postprandial 1 h para

posteriormente disminuir a las 3 h después de la prandia.

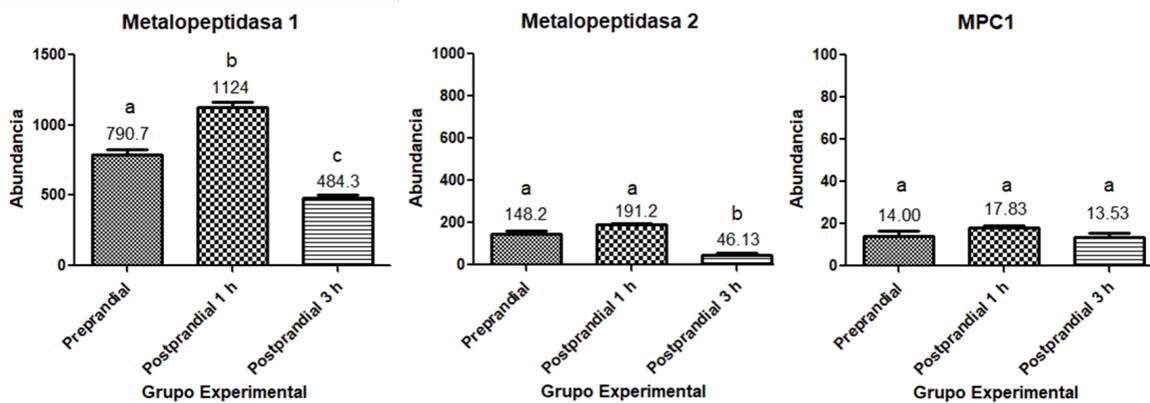


Figura 17. Gráficas de abundancia de las metalopeptidasas identificadas en el análisis proteómico en los diferentes tiempos de ingesta. Los valores representan las medias \pm la desviación estándar ($n=3$). Diferentes letras indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

En relación a la existencia de una sinergia planteada en la hipótesis de este trabajo, se encontró que antes de la ingesta ya existen enzimas activas de todas las clases de peptidasas; lo anterior confirma que en el camarón la ingesta no es el estímulo que dispara la síntesis ó activación de estas enzimas. Sin embargo, existen cambios importantes en el tipo de peptidasas que participan en los diferentes tiempos de la ingesta, los cuales incluyen no sólo peptidasas de diferentes clases, sino también isoformas de peptidasas de la misma clase, como en el caso de las isotripsinas, las catepsinas y las metalopeptidasas. Así, tomando la sinergia como la interacción de dos o más enzimas que ejerciendo sus efectos combinados sobre un mismo sustrato producen una suma de efectos que genera un mejor resultado que su participación de forma individual, en este caso, un mayor grado de hidrólisis de la proteína del alimento, se confirma la existencia de mecanismos sinérgicos en el camarón.

Los resultados de este estudio sugieren que las diferentes activaciones inician con las catepsinas D, cuyos niveles de abundancia y actividad se elevan durante la preprandia, principalmente la catepsina D1 y se encuentra activa en conjunto con las tripsinas para posteriormente disminuir su abundancia y actividad. Por su parte, las metalopeptidasas se mantienen estables en abundancia en los tres tiempos, pero muestran un pequeño aumento en el tiempo postprandial 1 h que coincide con su mayor periodo de actividad disminuyendo hacia el final de la ingesta. Por su parte, al final del proceso digestivo, después de 3 h se mantienen activas tanto las tripsinas, como las quimotripsinas y se observó un incremento en la abundancia de la catepsina L y las quimotripsinas.

Este estudio demostró que existe un mayor número de isoformas de tripsina que las ya reportadas previamente por varios autores (Klein et al., 1996; Sainz et al., 2004; Maytorena-Verdugo et al. 2017); dichas isotripsinas están activas en los tres tiempos analizados en este estudio, aunque como mostraron los resultados, no necesariamente todas están en su mayor nivel de abundancia al mismo tiempo, sino que se compensan incrementando y disminuyendo la expresión de las diferentes isoformas para mantener la actividad constante a lo largo del proceso digestivo. Este fenómeno se ha observado en otras especies como en el mosquito *Aedes aegypti* en donde existen dos tripsinas, una expresada al inicio de la digestión y otra tripsina tardía cuyo pico de expresión y actividad se dan al final de la digestión (Lu et al., 2006). El hecho de que *L. vannamei* exprese varias isoformas de tripsinas se justifica debido a que es la peptidasa de mayor importancia en la digestión proteica, encargándose de alrededor del 60 % de la hidrólisis peptídica (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2018). Futuros estudios permitirán estudiar más a fondo las interacciones entre estas proteínas para poder esclarecer las relaciones entre peptidasas al momento de hidrolizar una proteína a lo largo del proceso digestivo. Asimismo, se requieren más estudios que permitan esclarecer la participación de cada una de las isoformas detectadas en este estudio, tanto de las catepsinas, como de las metalopeptidasas en el proceso digestivo del camarón.

7. CONCLUSIONES

En conclusión, se comprobó la hipótesis de que existe sinergia entre las enzimas digestivas de *L. vannamei* y que siguiendo esa sinergia algunas de las enzimas se activan desde antes de la ingesta y siguen un orden de intervención al hidrolizar la proteína del alimento.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede sugerir que existe una secuencia de activación y participación en la digestión del alimentos en el camarón blanco de la siguiente manera, se inicia la digestión con la activación de las serino peptidasas y la catepsina D, continuando con la activación de las metalopeptidasas en el tiempo postprandial 1 h y culminando con la actividad de las catepsinas L en el tiempo postprandial 3 h y un aumento significativo en la abundancia de las quimotripsinas, cabe destacar que las serino peptidasas se encuentran activas durante este proceso.

8. REFERENCIAS

- Barbé, F., Le Feunteun, S., Rémond, D., Ménard, O., Jardin, J., & Henry, G. (2014). Tracking the in vivo release of bioactive peptides in the gut during digestion: Mass spectrometry peptidomic characterization of effluents collected in the gut of dairy matrix fed mini-pigs. *Food Research International*, 63, 147-156. doi: 10.1016/j.foodres.2014.02.015
- Bibo-Verdugo, B., Rojo-Arreola, L., Navarrete-del-Toro, M., y García-Carreño, F. (2015). A chymotrypsin from the digestive tract of California spiny lobster, *Panulirus interruptus*: Purification and biochemical characterization. *Marine Biotechnology*, 17(4), 416-427. doi: 10.1007/s10126-015-9626-z
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Briggs, M. (2005). Introducciones y movimiento de dos especies de camarones peneidos en Asia y el Pacífico. Consultado el 8 de enero del 2021, de <http://www.fao.org/3/a0086s/A0086S00.htm#TOC>
- Brunelle F., Nguyen-Quoc B., Michaud D., (1999), Protein hydrolysis by Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, digestive proteases: The catalytic role of cathepsin D, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 42(1) 88-89.
- Cabrera J., Jorge Alberto, y Gómez Gil R.-S., Bruno (1991). Morfología del camarón postlarval *Litopenaeus vannamei* con fórmula rostral 3/0; organización y quetotaxia de la anténula. *Anales del Instituto de Biología. Serie Zoología*, 62(1),41-55. Consultado el 30 de enero de 2021. ISSN: 0368-8720. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=458/45862106>
- Cárcamo Aréchiga, N. (2015). Efecto de la temperatura sobre la expresión de proteínas de defensa en *Litopenaeus vannamei* infectado con el virus de la mancha blanca (WSSV) (Doctor en Biociencias). Universidad de Sonora. (Pp.5-8)
- Castellanos-Ochoa C., Torres-Ochoa E., Pacheco-Vega J., Cortés-Sánchez A. y Espinosa-Chaurand D. (2022), Quimotripsina en crustáceos: estado del arte, *Abanico Veterinario* (12), 1-18.
- Centro de Investigación y Desarrollo Costero (CIDECO). (2019). Propuestas de políticas públicas para el desarrollo rural sustentable 2019-2024. Ciudad de México, México: Consejo mexicano para el desarrollo rural sustentable. (pp. 2-3)
- Colbert, J. D., Matthews, S. P., Miller, G., & Watts, C. (2009). Diverse regulatory roles for lysosomal proteases in the immune response. *European Journal of Immunology*, 39(11), 2955-2965. <https://doi.org/10.1002/eji.200939650>
- Delcroix M., Sajid M., Caffrey C., Lim K., Dvorak J., Hsieh I., Bahgat M., Dissous C. y McKerrow J. 2006. A Multienzyme Network Functions in Intestinal Protein Digestion by a Platyhelminth Parasite. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 281, NO. 51: 39316 -39329.

- Fan, L., Wang, A., Miao, Y., Liao, S., Ye, C., y Lin, Q. (2016). Comparative proteomic identification of the hepatopancreas response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 454, 27-34. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.10.016
- FAO Fisheries y Acuicultura *Penaeus vannamei*. (2016). Consultado el 29 diciembre del 2020, de http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en
- Fonteneau, J. F., Kavanagh, D. G., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T. L., (2003)
- Bhardwaj, N. and Larsson, M., Characterization of the MHC class I crosspresentation pathway for cell associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 2003. 102: 4448–4455.
- García-Carreño F., Dimes L. y Haard N., (1993), Substrate-Gel Electroforesis for Composition and Molecular Weight of Proteinases or Proteinaceous Proteinase Inhibidor, *Analytical Biochemistry* 214, 65-69
- García Morales, M., 2007. Crecimiento, supervivencia y vida de anaquel en hielo del Camarón Blanco (*Litopenaeus Vannamei*) alimentado con dietas contaminadas con fumonisina B1. Maestro en Ciencias. Universidad de Sonora. (Pp.10-12) Goettig P., Brandstetter H., Magdolen V., (2019) Surface loops of trypsin-like serine proteases as determinants of function, *Biochimie* 166, 52-76
- Garibay-Valdez E., Martínez-Porchas M., Calderón K., Gollas-Gálvan T., Martínez-Córdova L., Vargas-Albores F. y Arvayo M. 2020. La microbiota del tracto digestivo de camarones peneidos: una perspectiva histórica y estado del arte. *Biotecnica*. 22 (1): 5-16
- González Meza, G. (2014). “Las catepsinas lisosomales como parte del sistema de defensa del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.” (Maestría en ciencias). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (Pp. 8-10)
- Gui, Z., Lee, K., Kim, B., Choi, Y., Wei, Y., & Choo, Y. et al. (2006). Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect metamorphosis. *BMC Developmental Biology*, 6(1), 49. doi: 10.1186/1471-213x-6-49
- Hernández-Cortés, P., Quadros-Seiffert, W., del Toro, M., Portillo, G., Colado, G., & García-Carreño, F. (1999). Rate of ingestion and proteolytic activity in digestive system of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, during continual feeding. *Journal of Applied Aquaculture*, 9(1), 35-45. doi: 10.1300/j028v09n01_03
- Hernández-Cortés, P., Rivera-Pérez C., Garcia-Carreño F., Martínez-Alarcón D. (2017). Proteinases during Early Development of the Pacific Whiteleg Shrimp *Penaeus vannamei*. *Biol. Bull.* 232. (pp 2-11)
- Hu K y Leung P.C. (2006), Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopáncreas, *Comparative Biochemistry and Physiology* 146, 69-80
- Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora (IAES). (2016). Programa Institucional 2016-2021. (Pp. 16)
- Käll, L., Canterbury, J., Weston, J. et al. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods* 4, 923–925 (2007). doi:10.1038/nmeth1113
- Khan, A., Khazanovich-Bernstein, N., Bergmann, E., y James, M. (1999). Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors.

Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 96(20), 10968-10975. doi: 10.1073/pnas.96.20.10968

Klein B., Le Moullac G., Sellos D. y Van Wormhoudt A. (1996), Molecular Cloning and Sequencing of Trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in Assesing Gene Expression during the Moults Cycle. *Biochem. Cell Biol* 28(5), 551-563.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Laurent-Matha V., Derocq D., Prébois C., Katunuma N y Liaudet-Coopman E. (2006), Processing of Human Cathepsin D Is Independent of Its Catalytic Function and Auto-Activation: Involvement

of Cathepsins L and B, *Biochem* 139,363-371

Le Boulay C. y Van Wormhoudt A. (1996), Cloning and expression of cathepsin L-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle, *Comp Physiol* 166, 310-318

Le Boulay C. y Van Wormhoudt A. (1998) Cathepsin L gene organization in crustaceans, *Gene* 128, 77-84

Lee, C., y Lee, K. (2018). Dietary protein requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in three different growth stages. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 21(1). doi: 10.1186/s41240-018-0105-0

Lu S.J., Pennington J.E., Stonehouse A.R., Mobula M.M y Wells M.A. (2006), Reevaluation of the role of early trypsin activity in the transcriptional activation of the late trypsin gene in the mosquito *Aedes aegypti*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 336-343

Martinez-Alarcon D., Saborowski R., Rojo-Arreola L. y García-Carreño F. Is digestive cathepsin D the rule in decapod crustaceans?. 2018. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 215:31-38.

Maytorena-Verdugo C., Córdova-Murrueta J. y García-Carreño F. 2017. *Litopenaeus vannamei* digestive metallo peptidases compensate for anti-nutritional SBTI in feed. *Aquaculture*. 473:508-512

McAlister, G. C., Nusinow, D. P., Jedrychowski, M. P., Wühr, M., Huttlin, E. L., Erickson, B. K., ... & Gygi, S. P. (2014). MultiNotch MS3 enables accurate, sensitive, and multiplexed detection of differential expression across cancer cell line proteomes. *Analytical chemistry*, 86(14), 7150-7158. doi:10.1021/ac502040v

Metcalf P., Fusek M., Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site, *The EMBO journal* 12(4), 1293-1302.

Muhlia-Almazán A., García-Carreño F., Sánchez-Paz J., Yepiz-Plascencia G. y Peregrino-Ugarte A. (2003), Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*, *Comparative Biochemistry and Physiology* 135 (B), 373-383

Navarrete del Toro, M., García-Carreño F. y Córdova-Murieta J. (2011). Comparison of digestive proteinases in three penaeids. *Aquaculture* 317, 99-106

- Navarrete del Toro, M., y García-Carreño, F. (2018). The toolbox for protein digestion in decapod crustaceans: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1005-1021. doi: 10.1111/raq.12276
- Rawlings, N.D., Morton, F.R. y Barrett, A.J. (2006) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34, D270-D272
- Rodríguez-Siordia, I., Bibo-Verdugo, B., Toro, M., Rojo-Arreola, L., y García-Carreño, F. (2016). A synergistic peptidase network mediates food protein digestion in the american lobster *Homarus americanus* (Edwards, 1837). *Journal Of Shellfish Research*, 35(4), 1067-1074. doi: 10.2983/035.035.0429 Rodríguez-Valencia, J.A.; D. Crespo y M. López-Camacho. 2010. La camaronicultura y la sustentabilidad del Golfo de California. Disponible en http://awsassets.panda.org/downloads/rep_camaronicultura_golfo_california_1030.pdf (p. 13)
- Rojo Arreola, L. (2010). *Proteinasas aspárticas digestivas de las langostas queladas Homarus gammarus y Homarus americanus: caracterización y bioquímica molecular* (Doctor en Ciencias). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (p. 9-15). Rojo-Arreola, L., Choquet, C., Cordova-Murueta, J., & García-Carreño, F. (2019). The protease-based compensatory mechanism to minimize the effect of dietary Soybean Trypsin Inhibitor in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands), 500, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.002>
- Rojo-Arreola L., García-Carreño F., Romero R. y Díaz L. (2020), Proteolytic profile of larval developmental stages of *Penaeus vannamei*: An activity and mRNA expression approach, *PLOS ONE*, 1-16 Rider, C.C., Taylor, C.B. (1980). Isoenzymes in metabolic regulation. In: *Isoenzymes. Outline Studies in Biology*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-010-9447-4_5
- SAGAHSPA. (2015). PRINCIPALES ESPECIES DE CAMARON CAPTURADAS EN SONORA (p. 3). Hermosillo: Gobierno del Estado de Sonora.
- SAGARPA. (2018). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Mazatlán, Sinaloa: Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. (pp. 27,84 y 108)
- Sainz, J., Sierra-Beltrán, A., García-Carreño, F., y Hernández-Cortés, P. (2004). Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus Vannamei*. *Journal of Crustean Biology*. 24 (2):266-273.
- Sainz, J. C., García-Carreño, F. L., Córdoba-Murueta, J. H., & Cruz-Hernández, P. (2005). Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) isotrypsins: Their genotype and modulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 326(1), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.05.021>
- Sainz J. y Cordova H., (2009) Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture* 290 (3-4), 190-195.
- Semenova S.A. y Rudenskaya G.N. (2009).The Astacin Family of Metalloproteinases. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 3(1):17-32)
- Stephens A., Rojo L., Araujo-Bernal S., Garcia-Carreño F., Muhlia-Almazán A. (2012), Cathepsin B from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence analysis tissues-specific expression and biological activity, *Comparative Biochemistry and Physiology* 161 B, 32-40.

- Schwarzenberger A., Zitt A., Mueller S. y Von Elert E. (2010) Research article Gene expression and activity of digestive proteases in *Daphnia*: effects of cyanobacterial protease inhibitors, BMC Physiology 10 , 10-6
- Torreblanca, A., & López - Barea, J. (2005). Proteómica: conceptos, desarrollo actual y aplicación en monitorización ambiental. Revista de Toxicología, 22(2),72-73. Consultado el 30 de enero de 2021. ISSN: 0212-7113. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=919/91922207>
- Valverde, D. (2001). Valor plasmático e histológico de catepsina B en cáncer colorrectal y patología abdominal inflamatoria. Sensibilidad y especificidad de la catepsina B, CEA y CA 19.9. (Maestría en Ciencias). Universidad de Córdoba. (Pp. 15-16)
- Wei J., Zhang X., Yua Y., Li F., Xiang J..2014. RNA-Seq reveals the dynamic and diverse features of digestive enzymes during early development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part D (pp. 37-44)
- Williamson, A., Lecchi, P., Turk, B., Choe, Y., Hotez, P., & McKerrow, J. et al. (2004). A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. Journal Of Biological Chemistry, 279(34), 35950-35957. doi: 10.1074/jbc.m405842200
- Yan W. y Chen S. (2004), Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling, Briefings in functional genomics and proteomics 4(1), 27-38
- Yasuda Y., Kageyama T., Akamine A., Shibata M., Kominami E., Uchiyama Y., y Yamamoto K., Characterization of New Fluorogenic Substrates for the Rapid and Sensitive Assay of Cathepsin E and Cathepsin D., Biochem 125, 1137-1143

9. ANEXO 1

a) Matriz del porcentaje de identidad de las tripsinas (Figura 11)

1: TripsinogenoA0A3R7NWS2	100.00	92.86	93.23	85.34	82.89	88.35	88.35	88.35
2: Tripsinógeno C	92.86	100.00	99.62	87.22	84.21	89.47	89.47	89.47
3: TripsinogenoA0A3R7M136	93.23	99.62	100.00	87.22	84.21	89.47	89.47	89.47
4: TripsinaA0A3R7ME08	85.34	87.22	87.22	100.00	82.89	88.72	88.72	88.72
5: TripsinogenoA0A423SXG7	82.89	84.21	84.21	82.89	100.00	93.42	92.98	92.98
6: Tripsinógeno A	88.35	89.47	89.47	88.72	93.42	100.00	99.25	99.25
7: Tripsinógeno B	88.35	89.47	89.47	88.72	92.98	99.25	100.00	100.00

b) Matriz del porcentaje de identidad de las quimotripsinas (Figura 12)

1: Quimotripsina BI	100.00	94.46
2: Quimotripsina BII	94.46	100.00

c) Matriz del porcentaje de identidad de las catepsinas D

1: CatDA0A3R7SR07	100.00	52.79
2: CatDA0A423SAG9	52.79	100.00

d) Matriz del porcentaje de identidad de las catpsinas L

1: CatLA0A423TC40	100.00	80.43
2: CatLA0A423TC26	80.43	100.00

e) Matriz del porcentaje de identidad de las metalopeptidasas

1: MetaloA0A3R7P5D9	100.00	37.56	40.68
2: MetaloA0A423TAW0	37.56	100.00	56.10
3: MetaloA0A423S926	40.68	56.10	100