

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Obtención de los Extremos 5' y 3' del ADNc de Quimotripsinógeno
II de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*)**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

Presenta:

Francisco Eliezer Sánchez Galván

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de nombre y apellidos completos del sustentante, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico en Alimentos.

Dr. Francisco Javier Castillo Yáñez
Director de Tesis

Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Secretario

Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo
Vocal

Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera
Suplente

AGRADECIMIENTO

Agradezco especialmente a la Universidad de Sonora, institución que me ha formado y dado conocimientos sobre mi futura profesión, a sus maestros que me han enseñado todos los conocimientos especializados que he requerido y aplicaré en un futuro. Agradezco al Departamento de Ciencias Químico Biológicas que ha hecho posible que continúe cada semestre aprendiendo y adquiriendo conocimientos teóricos y prácticos y me ha dado las bases para poder comprender, realizar y redactar todos los procesos implicados en este trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Francisco Javier Castillo Yáñez por haberme confiado la realización de este proyecto, estar al pendiente de las necesidades que surgieron y de todos los trámites requeridos para mi titulación, al proyecto CONACyT-60477 registrado como: "Expresión, purificación y caracterización de tripsina recombinante de sardina Monterey" por financiar todos los materiales implicados en la realización del proyecto y al Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores por orientarme en los aspectos académicos tanto teóricos como prácticos que surgieron, así como por estar siempre disponible durante toda la parte experimental para evaluar los resultados y orientar sobre que lecturas resultarían provechosas realizar para comprender y discutir los resultados.

Agradezco también particularmente a mis profesores el Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, la Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo, la Dra. Josafat Marina Ezquerro Bauer y el Dr. Eduardo Ruiz Bustos por darme las bases para comprender todos los procesos bioquímicos implicados en la realización de este trabajo, así como por despertar gran interés en mí por estos temas. Agradezco nuevamente al Dr. Francisco Javier Castillo Yáñez, por darme la oportunidad de titularme con un trabajo de investigación en un tema que es de gran interés para mí y al Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores por despertar mi interés en la biotecnología, tema en el que me interesa seguir adquiriendo conocimientos. También a mi profesora de seminario-taller de alimentos, la maestra María Virginia Fernández Ramírez por darme los conocimientos para redactar trabajos profesionales.

DEDICATORIA

Agradezco a mis madres que me han apoyado para continuar adelante en mis estudios universitarios y así poder concluir una carrera, para poder generarle un bien a la sociedad ejerciendo mi profesión de manera ética y de acuerdo a las necesidades que surjan.

Dedico este trabajo a todas las personas que han hecho posible su realización, mis madres que siempre me han apoyado con lo necesario para que no tenga problemas de ningún tipo que me impidan desistir de la universidad de alguna forma y pueda seguir estudiando para ingresar a un posgrado, mi mamá Alicia que siempre desde que nací se ha preocupado por mi salud, por mi alimentación y por mis estudios a pesar de haber tenido que renunciar al estudio de la abogacía para poder cuidarme, a mi mamá Julia porque siempre cuidó que tuviera lo que me hiciera falta trabajando en el IMSS y en el ISSSTE y viendo por mi salud.

A mi padrino y madrina que siempre me aconsejan tanto en aspectos escolares como de mi formación como persona, a los maestros, sobre todos a los de bioquímica que han despertado un gran interés por estos temas en mí y también agradezco a Dalia que se ha preocupado también por mi salud, por que siga adquiriendo conocimientos en la universidad y próximamente con el favor de Dios en el posgrado, así como por tenerme tanta paciencia por que salga adelante en la realización de este trabajo y en todos los aspectos de mi vida.

CONTENIDO

	Página
FORMA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
DEDICATORIA.....	4
CONTENIDO.....	5
LISTA DE TABLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
OBJETIVOS.....	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
Antecedentes.....	15
Pelágicos Menores.....	16
Sardina.....	16
Sardina Monterey.....	17
Pesca de sardina en el Golfo de California.....	18
Contaminación ambiental por la industria sardinera.....	22
Consecuencias de la contaminación ambiental de la industria sardinera.....	22
Composición de las aguas de cola de la industria sardinera.....	23
Vísceras de la sardina como subproducto.....	24
Enzimas.....	24
Enzimas Alimentarias.....	26
Enzimas Gástricas de Origen Marino.....	28
Proteasas de peces.....	31
Serina-Proteasas.....	33
Quimotripsina.....	34
Aplicaciones de la quimotripsina.....	41
Biología Molecular.....	41
Secuenciación de un Gen.....	41
ARN.....	42
PCR de transcripción inversa.....	43

Síntesis de ADNc.....	43
Iniciadores para la síntesis de ADNc.....	44
Rápida Amplificación de Extremos de ADNc (RACE).....	45
5' RACE.....	47
3' RACE.....	48
MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
Reactivos.....	51
Diseño de los Iniciadores Gen Específicos.....	52
Obtención del Extremo 3' del Gen Codificante del Quimotripsinógeno II de Sardina Monterey: 3' RACE.....	53
Obtención del Extremo 5' del Gen Codificante del Quimotripsinógeno II de Sardina Monterey: 5' RACE.....	55
Análisis Electroforético.....	57
Clonación del ADNc Bicatenario.....	57
Transformación Bacteriana.....	58
Extracción de ADN Plasmídico.....	59
Secuenciación y Análisis de los Fragmentos Clonados.....	61
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
Amplificación, Clonación y Transformación del Extremo 3'.....	63
Amplificación, Clonación y Transformación del Extremo 5'.....	64
Traslape del Extremo 3' Obtenido con la Región Central Parcial Conocida.....	65
Traslape del Extremo 5' Obtenido con la Región Central Parcial Conocida.....	67
Ensamblado del Gen Codificante del Quimotripsinógeno II de Sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>).....	69
Comparación del Quimotripsinógeno II de Sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) con Quimotripsinógenos II de Otros Peces.....	71
Comparación del Quimotripsinógeno II de Sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) con Quimotripsinógeno de <i>Gadus morhua</i> Adaptado al Frío y Otros Quimotripsinógenos Mesofílicos.....	74
CONCLUSIONES.....	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Captura (t) de la flota sardinera que desembarca en el estado de Sonora, temporada de pesca 2007-2008.....	20
2. Enzimas gástricas extracelulares recuperadas de peces, invertebrados acuáticos y mamíferos marinos.....	20
3. Aplicaciones de enzimas de peces e invertebrados acuáticos.....	30
4. Algunos usos de enzimas proteolíticas en la industria alimentaria.....	31
5. Estabilidad térmica, estabilidad al pH y propiedades cinéticas de quimotripsina de peces e invertebrados acuáticos.....	37
6. Constantes cinéticas de quimotripsina de la sardina Monterey y otros peces...	40
7. Propiedades de los iniciadores diseñados para 5' y 3' RACE.....	53
8. Composición de la mezcla de reacción de PCR para los protocolos 3' y 5' RACE.....	54
9. Composición de la mezcla de reacción para los PCR de colonias.....	60
10. Porcentaje de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos deducidos del quimotripsinógeno II de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) con quimotripsinógenos II de otros peces.....	71
11. Composición de aminoácidos de la quimotripsina II de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) obtenida y su comparación con quimotripsina de <i>Gadus morhua</i> adaptada al frío y otras quimotripsinas mesofílicas.....	77

LISTA DE FIGURAS

Tabla	Página
1. Morfología de la especie <i>Sardinops sagax caerulea</i>	17
2. Distribución geográfica de la sardina <i>Sardinops sagax caerulea</i> (sombreada en rojo).....	18
3. Comportamiento histórico de los desembarcos comerciales, en sonora, de peces pelágicos menores capturados en el Golfo de California.....	21
4. Destino de la captura total de peces pelágicos menores en sonora, temporadas de pesca 1998/99 a 2002/03.....	22
5. Disminución de la energía libre de activación por el efecto catalítico de las enzimas.....	25
6. Relación velocidad de reacción Vs. concentración de sustrato durante la catálisis enzimática.....	25
7. Acción de las endopeptidasas y exopeptidasas en la estructura proteica....	32
8. Semejanzas estructurales entre tripsina (azul) y quimotripsina (rojo).....	34
9. Semejanzas estructurales y diferencias en los bolsillos S1 de quimotripsina, tripsina y elastasa.....	34
10. Localización del centro activo de la quimotripsina.....	35
11. Estabilidad de quimotripsina I y II de sardina Monterey y quimotripsina bovina al pH.....	39
12. Temperatura óptima de quimotripsina I y II de sardina Monterey y bovina..	40
13. Síntesis de ADNc: representación de la amplificación de los extremos terminales 5' del ARNm	45
14. Esquema de la Rápida Amplificación de Extremos de ADNc (RACE).....	46
15. Esquema de 3' RACE.....	48
16. Esquema de 5' RACE.....	49
17. Secuencia parcial del quimotripsinógeno II establecida por Félix (2006).....	50
18. Diagrama de la metodología utilizada en el experimento.....	51
19. Iniciadores diseñados para la obtención del gen codificante del quimotripsinógeno II de sardina Monterey.....	52
20. Diagrama de la metodología a seguir para la obtención de los extremos 5' y 3' del ADNc.....	56
21. Análisis electroforético del PCR colonial de bacterias transformadas con el producto de clonación del protocolo 3' RACE.....	63

22. Análisis electroforético del PCR colonial de bacterias transformadas con el producto de clonación de los protocolos 5' RACE y amplificadas con los iniciadores M13.....	65
23. Traslape del extremo 3' obtenido con la región central parcial conocida.....	66
24. Traslape del extremo 5' obtenido con la región central parcial conocida.....	68
25. Ensamblado del gen codificante del quimotripsinógeno II de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>).....	70
26. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del quimotripsinógeno II de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) obtenida, con quimotripsinógenos II de otros peces.....	73
27. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del quimotripsinógeno II de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) obtenida, con un quimotripsinógeno de <i>Gadus morhua</i> adaptado al frío y otros quimotripsinógenos mesofílicos.....	75

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener el ADNc de los extremos 3' y 5' del ADNc de quimotripsinógeno II de sardina Monterey mediante la técnica PCR-RACE.

Objetivos Específicos

- Diseñar iniciadores específicos a partir de la secuencia nucleotídica parcial conocida del quimotripsinógeno II de sardina Monterey.
- Obtener el extremo 5' del ADNc usando una técnica PCR-RACE conjunto a una PCR anidada.
- Obtener el extremo 3' del ADNc usando una técnica PCR-RACE conjunto a una PCR anidada.
- Comparar la secuencia deducida de aminoácidos de la quimotripsinógeno II de sardina Monterey con quimotripsinógenos de otros peces y de organismos mesofílicos.

RESUMEN

Al principio de este trabajo se contó con una secuencia parcial de 540 nucleótidos correspondiente a una región central del gen que codifica para el quimotripsinógeno II de sardina Monterey, la cual fue deducida por Félix (2006). Se diseñaron iniciadores a partir de esta región para conocer la secuencia de las regiones desconocidas (inicio y fin de traducción del gen) y se utilizó la técnica rápida amplificación de extremos de ADNc (RACE) para realizar las amplificaciones. La muestra de donde se parte es una mezcla de ADN complementario (ADNc) obtenido por Anaya (2008) a partir de ARN total extraído de ciegos pilóricos de la sardina Monterey. En este trabajo se estudia la estructura primaria, es decir la secuencia deducida de aminoácidos del quimotripsinógeno II de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) y se compara con quimotripsinógenos de otros peces, tales como el quimotripsinógeno adaptado al frío de bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) (UniProtKB/Swiss-Prot: P47796.1); los quimotripsinógenos de *Sardinops melanostictus* (GenBank: BAM62884.1), *Pagrus major*, *Danio rerio*, *Thunnus orientalis*, *Salmo salar* y *Gadus morhua* (GenBank: CAB43766.1); y con quimotripsinógenos de organismos mesófilos, tales como *Sus scrofa*, *Bos taurus* y *Homo sapiens*.

En el presente trabajo se logró avanzar en la secuencia del quimotripsinógeno II de sardina Monterey hasta completar 217 aminoácidos. En base a la comparación de la composición de quimotripsinógenos de otras especies de peces con la secuencia del quimotripsinógeno de sardina Monterey obtenida en este trabajo, se estimó que el quimotripsinógeno II de sardina Monterey consta de 245 aminoácidos y su forma activa la quimotripsina consta de 230 aminoácidos, por lo que faltaron 28 aminoácidos para completar el gen que codifica para el quimotripsinógeno y 13 aminoácidos para completar la quimotripsina. Sin embargo, hasta que se logre completar el extremo 5' se conocerá con exactitud su secuencia.

Quimotripsina II de sardina Monterey presentó una composición de aminoácidos semejante a la de enzimas adaptadas al frío mostrando preferencias por los residuos típicos de estas mismas. Más específicamente presentó una composición y distribución de aminoácidos semejante a la quimotripsina A adaptada al frío de *Gadus morhua*. Quimotripsina adaptada al frío de *Gadus morhua* y quimotripsina II de sardina Monterey mostraron similitudes entre sí en regiones específicas que se encontraban conservadas en los organismos mesófilos mencionados anteriormente.

INTRODUCCIÓN

Las especies que viven en hábitats donde se registran bajas temperaturas o efectúan migraciones estacionales han sufrido variaciones genéticas que han adaptado a su organismo para realizar sus reacciones metabólicas de manera más eficiente. Una de estas adaptaciones se puede observar en el incremento de las eficiencias catalíticas de algunas enzimas o isoformas de éstas, las cuales pueden catalizar reacciones a bajas temperaturas, en donde las velocidades de reacción son menores y para ello han tenido que incrementar su eficiencia desarrollando una mayor flexibilidad y una menor estabilidad térmica. El estudio y comprensión de los factores estructurales responsables de una mayor eficiencia catalítica en las enzimas es de especial interés, ya que enzimas con dichas características se pueden aplicar a procesos biotecnológicos en muy diversos campos. Uno de ellos es la industria alimenticia, tanto dentro del procesamiento de los alimentos, como en el manejo de sus desechos.

México tiene 11,122 kilómetros de litorales (INEGI, 2011), que significan un gran potencial de recursos pesqueros y ocupa el 4º lugar por su volumen de pesca en el continente americano con 1,774,000 toneladas (t.) de volumen de producción pesquera capturadas en el 2009 (INEGI, 2011). El litoral del Pacífico es la zona de mayor producción pesquera en México pues éste aporta un 81.8% del total del país. Los estados del litoral del Pacífico colindantes con el Golfo de California como lo son Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa contribuyen con un 73.4% de la producción pesquera total, convirtiendo al Golfo de California en la zona del litoral del Pacífico de mayor producción pesquera en México. Sonora es el estado de mayor producción pesquera de esta zona con un 34.9% de la producción total del país (INEGI, 2011) y también el principal productor de sardina del país (INEGI, 2011). Sus principales puertos de desembarque son Guaymas y Yávaros. Según el Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA, 2006), del total de pelágicos menores desembarcados en estos puertos, las sardinas son por mucho la especie dominante y dentro de ellas, la sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es la principal especie desembarcada representando más del 50% del volumen total.

Una consecuencia de la captura y procesamiento de la sardina han sido los problemas ambientales generados en ecosistemas marinos, principalmente en los puertos de Guaymas y Yávaros, Son. Estos ecosistemas son afectados por los afluentes de la industria sardinera que incluyen escamas, sanguaza, agua de cola, combustibles y grasas. Para evitar la eliminación y posterior acumulación de estos subproductos se ha buscado desarrollar tecnologías para la recuperación y/o utilización de los mismos en el desarrollo de

nuevos productos o procesos. Debido a la naturaleza mayormente proteica de las aguas de cola (sangre, vísceras, aletas, cabezas de pescado, conchas y pieles), ésta es una fuente rica de enzimas y entre los mismos subproductos, las vísceras de pescado son fuentes potenciales de enzimas con nuevas e interesantes aplicaciones, sobre todo en el procesamiento de alimentos, debido a su tolerancia a altos niveles de sal, su amplia gama de pH al que muestran actividad y su adaptación para catalizar reacciones en ambientes fríos. Además, su recuperación y utilización sería una forma de contribuir a la disminución de los problemas de contaminación presentes en los ecosistemas circundantes a las plantas procesadoras de pescado.

Entre las principales enzimas recuperadas de las vísceras de peces, están las serina-proteasas, las cuales poseen una alta actividad en pH alcalino. Las serina-proteasas que han recibido más atención son la tripsina y quimotripsina por sus características de interés industrial como estabilidad y actividad en condiciones de temperaturas altas (50 a 60°C), pH alto y en presencia de surfactantes o agentes oxidantes (Klomklao, 2008). Particularmente, la quimotripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) presenta una actividad relativamente alta en un rango de pH de 5 a 10 con una actividad óptima a pH 8.0 y 50°C, además de una baja termoestabilidad (Castillo y col., 2006). Debido a que la sardina Monterey es una especie migratoria que se ve sometida a cambios ambientales bruscos, para adaptarse a ellos ha desarrollado enzimas capaces de catalizar sus reacciones metabólicas eficientemente a bajas temperaturas. En la sardina Monterey se han encontrado dos isoformas para la quimotripsina, siendo la isoforma II la que presenta actividad a más bajas temperaturas (intervalo de 10 a 45°C) (Castillo y col., 2009).

Estudios previos de caracterización bioquímica de la quimotripsina II de sardina Monterey realizados por Castillo y col. (2009) posicionaron a la quimotripsina II como un catalizador eficiente ($100 \text{ k}_{\text{cat}} / \text{Km}$) con actividad a bajas temperaturas (intervalo de 10 a 45°C) y con una alta estabilidad al pH (pH 5 a 11). Por lo tanto, esta enzima se vuelve muy interesante desde el punto de vista biotecnológico para el procesamiento de alimentos. Además, esta enzima proveniente de un subproducto industrial junto con otras proteasas de las vísceras de sardina podría ayudar en el tratamiento enzimático de la misma agua de cola de donde es descartada. Debido a que cada isoforma se activa y predomina dependiendo de las condiciones ambientales presentes, se piensa que la principal isoforma activa en la sardina Monterey capturada en el Golfo de California es la isoforma I. Sin embargo cuando la sardina se ve sometida a aguas con temperaturas bajas como las presentes en el norte de Estados Unidos y Canadá, la isoforma II puede ser la principal forma activa, tal como el quimotripsina adaptada al frío de bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) (UniProtKB/Swiss-

Prot: P47796.1) (Guthmundsdóttir y col., 1994) se expresa bajo condiciones ambientales frías.

El presente trabajo busca deducir la secuencia de aminoácidos de la isoforma II. Para poder obtener la secuencia de aminoácidos de la isoforma II de la sardina Monterey a partir de sardinas capturadas en el Golfo de California se tiene que conocer el gen que codifica esta isoforma en particular y dicha información está depositada en sus ARNm maduros, ya que una vez que éstos son traducidos, es posible que en las sardinas de Golfo de California, la isoforma I sea la mayormente expresada. Félix (2006) obtuvo una secuencia parcial del gen que codifica para el quimotripsinógeno II, cuando caracterizó biofísica y molecularmente tripsina de sardina Monterey. Más adelante Anaya (2008) sintetizó ADNc a partir de ARN total extraído de ciegos pilóricos de la sardina Monterey y logró secuenciar en su totalidad el gen que codifica para el tripsinógeno II de Sardina Monterey. La secuencia parcial obtenida por Félix (2006), (una región conocida del centro del gen) puede servir para diseñar iniciadores que revelen las regiones de los extremos del ARNm que se traduce a quimotripsinógeno II. Usando para las amplificaciones el ADNc sintetizado por Anaya (2008) y así detectar el inicio y final de la traducción del gen por medio de técnicas como la PCR de transcripción inversa (RT-PCR) y la rápida amplificación de extremos de ADNc (RACE).

Una vez conocida la secuencia completa del gen, se puede proceder a clonarlo por medio de un vector plasmídico y transformar una bacteria, para que cuando ésta genere descendencia, el plásmido recombinante sea heredado y de esta manera se puedan obtener grandes volúmenes de la enzima. Al obtener cantidades significativas de la isoforma II se pueden realizar, bioensayos que permitan descubrir su potencial biotecnológico, además también se puede estudiar su composición polipeptídica para comprender que cambios estructurales son los responsables de su alta actividad a abajas temperaturas y su gran estabilidad al pH.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antecedentes

Este trabajo parte de estudios previos (Shahidi y Janak, 2001; Castillo y col, 2004, 2005, 2006, 2009; Félix, 2006; Anaya, 2008) de enzimas proteasas tales como tripsina I, tripsina III, elastasa y la misma quimotripsina en diversos peces incluyendo la sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), en los cuales se ha recopilado información sobre sus aplicaciones, se han realizado estudios de caracterización biofísica y molecular, y en algunos casos se han establecido sus secuencias y analizado su estructura. Shahidi y Janak (2001) recopilaron información sobre una gran variedad de enzimas de peces e invertebrados acuáticos caracterizadas y aisladas por diversas investigaciones y mencionó sus aplicaciones en la industria alimentaria (tabla 3). De igual manera Klomklao (2008) recopiló información sobre proteinasas digestivas de organismos marinos y sus aplicaciones también (tabla 4).

Castillo y col. (2004, 2005, 2006, 2009) estudiaron en particular las enzimas de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), en donde primero caracterizaron las enzimas proteolíticas ácidas de vísceras (Castillo y col., 2004) Posteriormente, Castillo y col. (2005) aislaron y caracterizaron tripsina de ciegos pilóricos. Seguidamente, Castillo y col. (2006) purificaron y caracterizaron bioquímicamente quimotripsina también de ciegos pilóricos. Asimismo, Castillo y col. (2009) caracterizaron bioquímicamente una isoforma de quimotripsina de vísceras de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), y la compararon con quimotripsina bovina. Por otra parte, Félix (2006) también caracterizó biofísica y molecularmente la tripsina de sardina Monterey y su estudio encontró una secuencia parcial del quimotripsinógeno II.

Por otra parte, Anaya (2008) secuenció por completo el gen que codifica el tripsinógeno II de sardina Monterey, analizando secuencias extraídas de clones provenientes de librerías genómicas donde fueron transformadas bacterias con ADNc incompletos provenientes de ARNm codificantes de tripsinógenos y quimotripsinógenos de los ciegos pilóricos de la sardina Monterey. Finalmente Arvizu y col. (2012) estudiaron la actividad termodinámica y analizaron estructuralmente la tripsina I de sardina Monterey. En el presente trabajo se tomo como base la secuencia parcial obtenida por Félix (2006) y el ADNc sintetizado por Anaya (2008) para poder obtener los extremos 5' y 3' del ADNc codificante del quimotripsinógeno II de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

Pelágicos Menores

A los peces que nadan en las aguas superficiales se les conoce como “pelágicos” (Cifuentes y col., 1997). Los peces pelágicos se caracterizan por carecer de colores vistosos (en general son pardos o azul oscuro sobre el dorso y plateados en las partes ventrales), son alargados y fusiformes (Cognetti y col., 2001). Muchas especies de pelágicos, en su mayoría los pelágicos menores (especies costeras de pequeño y mediano tamaño como las sardinas, anchovetas, macarelas, arenques, etcétera) tienden a agregarse en bancos o cardúmenes que pueden contener cientos de miles de millones de individuos y efectúan migraciones estacionales. Una característica común de las especies pelágicas costeras es la naturaleza altamente dinámica de sus poblaciones con respecto a la circulación, su biomasa, y la disponibilidad para la pesca.

Por esta naturaleza altamente dinámica, los pelágicos menores particularmente la sardina, anchoveta y arenques, son los grupos de especies más capturadas en el mundo. De acuerdo al anuario de estadística de pesca y acuicultura de la FAO (2008) se estimó una captura de 20,144,345 t en todo el mundo para estas especies en particular, lo que representó un 22.44% de la pesca total mundial y una captura mayor que la de cualquier otro grupo de especies registrado capturadas en ese año. Recientemente, México ocupa año tras año entre el 6º y 4º lugar mundial en la captura de sardina, anchoveta y similares. En el 2009 logró el 4º lugar con 880,000 t capturadas (INEGI, 2011). Por ello los pelágicos menores constituyen su principal recurso pesquero y dentro de este grupo la sardina constituye el 60% de los mismos (Consejo Mexicano para la promoción de la Sardina, 2008).

Sardina

Las sardinas como grupo de especies, son peces pelágicos pequeños que forman cardúmenes y habitan en las aguas costeras tropicales y templadas, cuya distribución mundial se restringe a la latitud 60º N y 50º S. Cifuentes y col. (1997). Clasificaron a las sardinas dentro de los géneros *Sardina*, *Sardinops* y *Sardinella*. El género *Sardinops* es considerado monotípico, se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo, especialmente en las aguas costeras y obedeciendo una distribución antitropical (Norte oriental y Pacífico Sur, Sur de África, Australia y Nueva Zelanda). Es por eso que se ha localizado en las corrientes al margen oriental del Atlántico y el Pacífico, así como en las

corrientes limítrofes occidentales de los océanos Índico-Pacífico. Estudios recientes indican que las sardinas de Alguhas, Benguela, California, Kuroshio, y las corrientes de Perú, de Nueva Zelanda y de Australia son una sola especie (*Sardinops sagax*), pero debido a su presencia en tan diferentes áreas del mundo se pueden dividir a nivel de subespecies (Hill y col., 2005).

Sardina Monterey. La sardina del Pacífico, *Sardinops sagax*, miembro de la familia del arenque, (familia *Clupeidae*), también conocida como “California *pilchard*” en Estados Unidos; “*pilchard*” en Canadá; o sardina Monterey en México, es una de las 18 especies de tres géneros en todo el mundo. Perteneció al género *Sardinops* y es miembro de la subfamilia *Clupeinae*. La sardina Monterey es plateada en los costados y en el vientre, su superficie dorsal es color azul oscuro o verde, tiene finas estrías en el opérculo, aletas especializadas en la aleta de la cola, y puntos negro en el lado del cuerpo visibles a través de las escamas (figura 1) (DFO, 2004). Cuando la población de sardina del Pacífico ha sido grande, ésta ha llegado a ser varias veces la especie de peces más abundante de la corriente de California, abarcando desde la punta de Baja California (23° latitud N) hasta el sureste de Alaska (57° de latitud norte), y en todo el Golfo de California, aunque en la parte norte de su región, la presencia de ella tiende a ser estacional (figura 2).

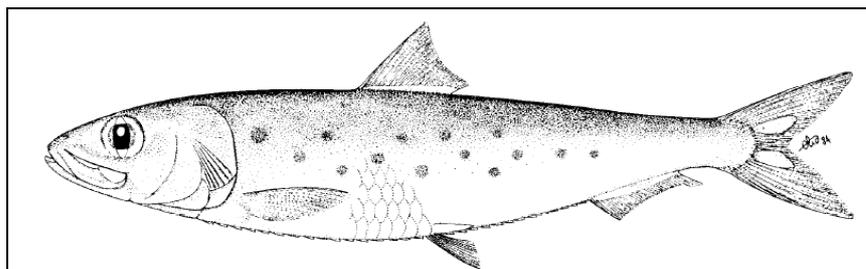


Figura 1. Morfología de la especie *Sardinops sagax caerulea*.

Fuente: Whitehead, 1985.

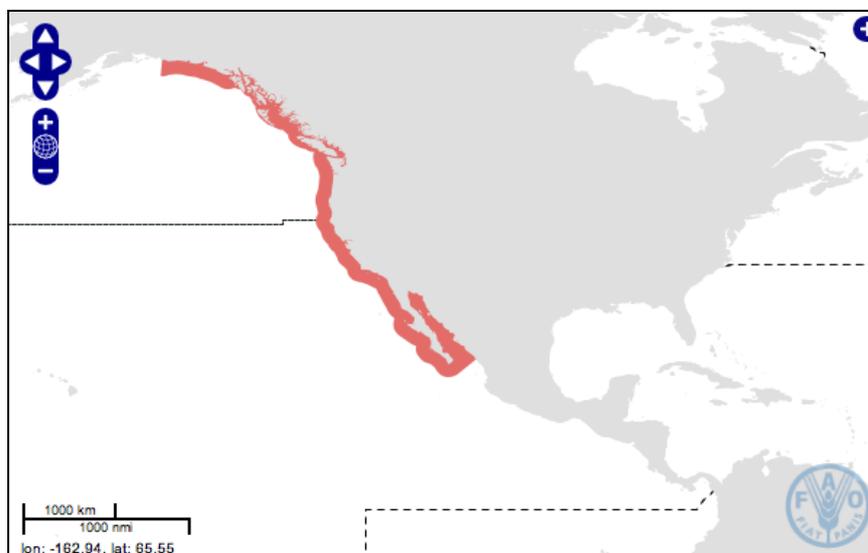


Figura 2. Distribución geográfica de la sardina *Sardinops sagax caerulea* (sombreada en rojo).

Fuente: FAO, 2013.

Dentro de la sardina de la corriente de California, existe una clasificación basada en técnicas serológicas, que clasifica a la población total de sardinas de la costa oeste de América del norte en tres sub-poblaciones o grupos, una subpoblación del norte (norte de Baja California a Alaska), una subpoblación del sur (Baja California), y una subpoblación de Golfo de California. Recientemente, a esta teoría también la apoya un estudio sobre la temperatura de captura, sin embargo, un estudio de electroforesis encontró, que no existía alguna variación genética entre la sardina del centro y el sur de California, la de la costa del Pacífico de Baja California y la del Golfo de California (Leet y col., 2001).

Las sardinas juveniles y adultas son consumidas por peces de importancia comercial como jurel, barracuda, bonito, atún, marlin, merluza, salmón, y tiburones, así como también por especies de peces en peligro de extinción en cuya dieta habitual también se puede encontrar la anchoveta. Actualmente, se puede observar un aumento de la población de sardinas debido a la sobrexplotación de estos cazadores naturales cuya función es mantener un control en la población de peces pequeños que se alimentan de plancton y es probable que la sardina se vuelva más importante como presa (Derbyshire, 2011).

Pesca de sardina en el Golfo de California. Actualmente Sonora es el principal productor de sardina del país y sus principales puertos de desembarque son Guaymas y

Yávaros. En 2010 se capturaron 404,684 t. lo que representa un 64% de la producción total en ese año (INEGI, 2011). Para 2011 a pesar de haber bajado su volumen de captura a 382,016 t. siguió siendo el principal productor aportando un 55.8% del total de sardina capturadas (CONAPESCA, 2011). Las principales especies de sardinas capturadas en el Golfo de California son la sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), la sardina crinuda (*Opisthonema libertate*, *medirastre*, *bulleri*, entre otras) y sardina japonesa (*Entrumeus teres*) (tabla 1).

La sardina Monterey y sardina crinuda son las dos principales especies capturadas, ya que ellas presentan desde hace años una tendencia de captura que varía año con año pero que representa entre el 85 y 95% del total de sardina capturada en el Golfo (Martínez y col, 2006; INAPESCA, 2006; Martínez y col, 2010) (figura 3). Diversas fuentes nombran a las especies *Opisthonema* ssp. y *Entrumeus teres* tanto como arenques y/o sardinas, pero los informes nacionales de pesca nombran a la sardina crinuda como *Opisthonema* ssp. y a la sardina japonesa como *Entrumeus teres*, por lo que para reportar los nombres y porcentajes nacionales de producción pesca para cada especie en particular se toma esta última nomenclatura. A través de los años la captura de sardina Monterey (*Sardinops sagax*), se fue incrementado, pues entre 1972 y 1991 se incrementó a una tasa anual del 50%. Particularmente para el Golfo de California, durante la temporada de pesca 1995-1996, el 99% de las capturas fueron aportadas principalmente por la sardina Monterey, seguida por la sardina crinuda, la anchoveta y la macarela (Guerrero y col., 2006; Manrique, 2000).

De acuerdo al Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA) en su informe de sustentabilidad y pesca responsable en México publicado en 2006, para el periodo 2000/01 a 2003/04 en los puertos de Yávaros y Guaymas, del total de pelágicos menores desembarcados, 74% perteneció a especies de sardina, mientras que un 20.7% fue de anchoveta (*Cetengraulis mysticetus*), una especie comúnmente conocida como “sardina bocona”. De las especies de sardina capturadas, la Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) registró un desembarque de 55.9% y la crinuda (*Opisthonema* spp.). 17.4%.

Tabla 1. Captura (t) de la flota sardinera que desembarca en el estado de Sonora, temporada de pesca 2007-2008.

Espece	Captura (t)
Sardina monterey	488,640
Sardina crinuda	25,726
Macarela	3988
Japonesa	688
Anchoveta	5886
Sardina bocona	12,303
Sardina piña	238
Revoltura	1190
Total	538,669

Fuente: Martínez y col, 2010.

Para la temporada 2002/03 según datos también del INAPESCA la captura total fue de 318,379 t, de las cuales se registraron 228,016 t en Guaymas y 90,363 t en Yávaros, siendo la sardina Monterey la que continuó aportando la mayor proporción de la captura con el 62.4% (198,757 t) de la captura total y la sardina crinuda incrementó su captura representando 29.8% (94,957 t). En la temporada 2007/08 se logró un record histórico para la pesquería del Golfo. El total desembarcado para el estado de Sonora fue de 538,699 t y el 90.7% correspondió a sardina Monterey (488,640 t) (Martínez y col., 2010). En temporadas recientes (2009/10 a 2011/12) la sardina Monterey ha bajado en gran medida su porcentaje de captura viéndose incrementados los porcentajes de las otras especies capturadas (sardina crinuda, macarela, sardina bocona y anchoveta). Esto se debe a que se presentaron eventos anómalos de “El Niño-La Niña” y dichos eventos cuando van de una intensidad de moderada a fuerte tienden a tener un efecto negativo tanto en la distribución como en la abundancia de la población de sardina Monterey (Nevarez y col., 2012).

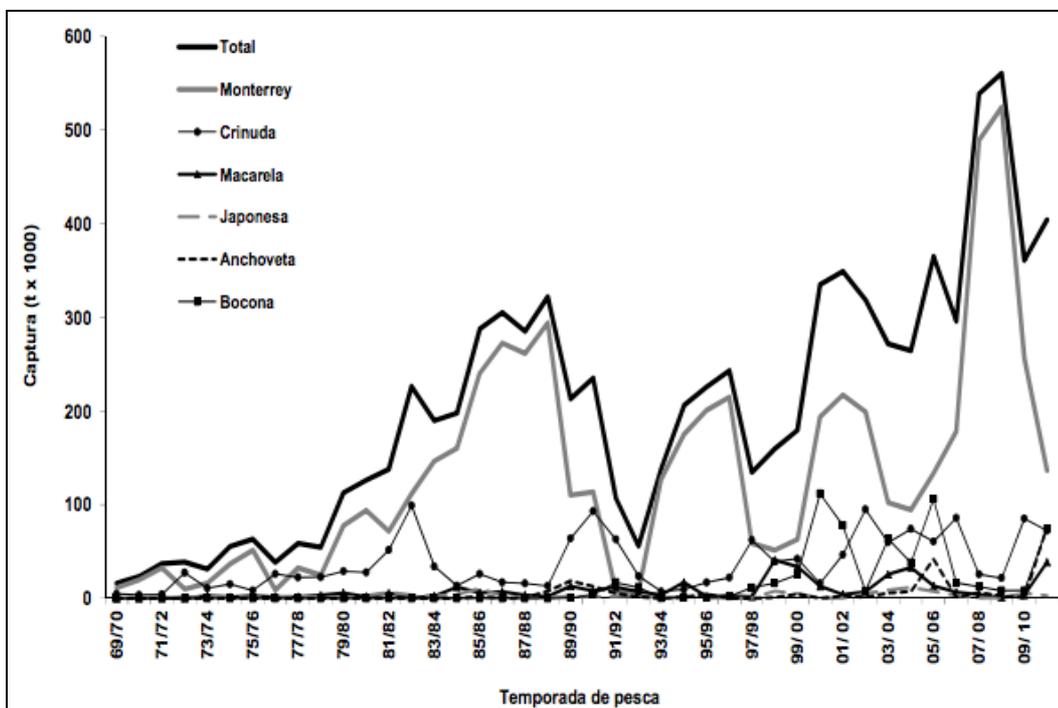
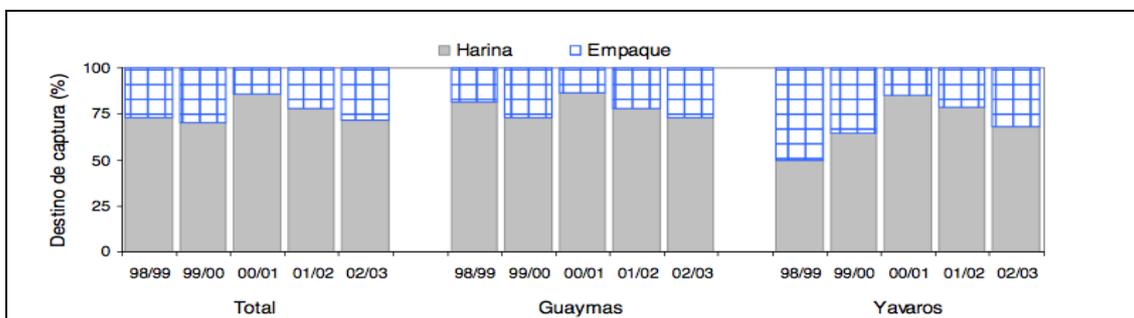


Figura 3. Comportamiento histórico de los desembarcos comerciales, en Sonora, de peces pelágicos menores capturados en el Golfo de California.

Fuente: Nevarez y col., 2012.

La sardina Monterey por su gran volumen de captura ha sido una de las más importantes especies del Golfo de California y pertenece a la categoría de las llamadas sardinias verdaderas, mundialmente es bien cotizada y por su valor nutricional se recomienda destinarla sólo para el consumo humano directo (Micheline y Monteforte, 2008). La sardina Monterey también ha sido la más apreciada por la industria enlatadora debido a sus características que la hacen idónea para este proceso, por su gran volumen de captura y valor nutricional también ha sido la sardina más estudiada por los científicos en el Golfo (Doode, 1999). Sin embargo, el destino real que se le da en nuestro país es muy diferente al idóneo y éste se le atribuye principalmente a la falta de la cultura del consumo de sardina en el país así como a las condiciones en que ésta es desembarcada. En las cinco temporadas 1998/99 a 2002/03, la mayor proporción de la captura total se destinó a la reducción para elaboración de harina (figura 4). En Guaymas, más del 70% de la descarga registrada fue destinada para la reducción y el resto al enlatado (empaquete) para consumo humano y en Yávaros los porcentajes destinados a la reducción también fueron altos (+ 60%), aunque ligeramente menores a los de Guaymas (Instituto Nacional de la Pesca, 2006).



Figur

a 4. Destino de la captura total de peces pelágicos menores en Sonora, durante las temporadas de pesca 1998/99 a 2002/03.

Fuente: Martínez y col., 2006.

Contaminación ambiental por la industria sardinera. En Sonora, los problemas ambientales en ecosistemas marinos son causados principalmente por la actividad pesquera (Pacheco y col., 2009). La sobreexplotación de los recursos pesqueros, ya se ha dejado sentir, en especies comerciales como la sardina y el camarón (Luque y Gómez, 2007). Los puertos han desarrollado una gran infraestructura integrada, poseyendo astilleros, plantas procesadoras y congeladoras, todas desarrolladas para satisfacer el crecimiento económico que demandan actividades como la pesca, almacenamiento y procesamiento de los principales productos pesqueros del estado como sardina, camarón y atún (Pacheco y col., 2009).

Una de las consecuencias de la instalación de estas plantas industriales, en particular de las plantas reductoras, ha sido la contaminación de bahías como las de Guaymas y Yávaros, debido a la descarga de sus desechos (agua de cola, agua de bombeo y desechos del corte principalmente) sobre las aguas marinas (Pacheco y col., 2009). Por esta razón un problema siempre presente y nunca resuelto de la actividad sardinera ha sido la contaminación de las aguas marinas (Doode, 1999).

Consecuencias de la contaminación ambiental de la industria sardinera. Los flujos de residuos de las industrias del pescado generalmente tienen una demanda bioquímica de oxígeno muy alta (BOD). La carga de residuos generados está directamente relacionada con las consideraciones de manejo a bordo del barco y las prácticas de procesamiento una vez que los peces son llevados a la costa (Martin y William, 1986). Los ecosistemas circundantes a las industrias sardineras que son contaminados por los afluentes de las mismas debido a la adición de residuos orgánicos, como lo son escamas,

sanguaza, agua de cola, combustibles y grasas, se caracterizan por generar la formación de sedimentos negruzcos con olores sulfurosos. Esto conlleva a alteraciones en el sedimento y el agua de mar y a su vez estas alteraciones causan un desequilibrio en sus propiedades físicas, químicas y biológicas, pues se ven afectadas por cambios en la salinidad, disminución del oxígeno disuelto, incremento de la demanda bioquímica de oxígeno (BOD), incremento de los nutrientes, alta carga de sulfuros y amonio en sedimentos e incremento de la temperatura. Todas estas alteraciones al equilibrio del ecosistema pueden llevar a un proceso de eutrofización, teniendo como consecuencia final la rápida oxigenación del fondo y posterior muerte de organismos vivos (García y col., 2009).

Existen dos formas de manejar los grandes volúmenes de desechos que se generan: la en vertederos o la recuperación a través del procesamiento de los subproductos. La primera opción no es recomendada en absoluto, por el impacto ambiental que conlleva. Las regulaciones ambientales para la eliminación de residuos en los vertederos, o por vertimiento en los océanos o ríos se han vuelto cada vez más restrictivas, por lo tanto, ha habido un creciente esfuerzo para convertir materiales de desecho de la industria marina a productos valiosos. Actualmente, un área a la que se le ha dado un gran interés es al manejo de los desechos de procesos para su posterior conversión a productos comercializables a través de la recuperación y/o utilización de los mismos para el desarrollo de nuevos productos (An y Visessanguan, 2000).

Composición de las aguas de cola de la industria sardinera. La composición química de las aguas residuales de las plantas de procesamiento de pescado se caracteriza por ser rica en compuestos proteicos y aceites (Martin y William, 1986). Los residuos generados por el procesamiento de productos marinos son uno de los mayores recursos proteicos sin explotar. Durante su procesamiento la recuperación de las partes comestibles ha sido tradicionalmente baja (20 a 30%) y solo recientemente estos residuos se han transformado en otros productos, principalmente de bajo valor, como alimentos para animales y fertilizantes naturales.

Los principales tipos de residuos encontrados en las aguas residuales de procesamiento de productos marinos son la sangre, los productos de despojos, vísceras, las aletas, cabezas de pescado, conchas y pieles (Martin y William, 1986). Se estima que los desechos típicos del procesamiento de pescados como lo son las vísceras, cabezas, huesos, agua de cola y efluentes de procesamiento, generados por el uso de agua limpia para lavar, descongelar, transportar, cocinar, formular y/o envasar representan más del 70% del peso total de ellos, pues se sabe que tan solo los órganos internos de los peces constituyen

aproximadamente el 7.5% del peso corporal (Klomklao, 2008). La mayor parte de los residuos, aproximadamente el 60%, es generado por la operación de fileteado y se compone de cabeza, columna vertebral, y las vísceras (An y Visessanguan, 2000). Debido a estos tan grandes volúmenes de materia descartada durante el procesamiento de pescado, junto con sus subproductos típicos, la gestión de su eliminación plantea importantes problemas.

Vísceras de la sardina como subproducto. Entre los subproductos, las vísceras de pescado son fuentes potenciales de las enzimas (Klomklao, 2008). La obtención de proteasas a bajo costo podría desarrollar nuevas aplicaciones industriales para la misma. Recientemente se han recuperado y caracterizado enzimas de diversas especies de peces marinos y estos estudios han resultado en la aparición de nuevas e interesantes aplicaciones, sobre todo en el procesamiento de alimentos. Además como ya se mencionó la recuperación y utilización de estas enzimas procedentes de residuos de la industria pesquera, es una forma de contribuir a la disminución de los problemas de contaminación presentes en los ecosistemas circundantes a las plantas procesadoras de pescados.

Enzimas

Una enzima es una proteína que actúa como catalizador biológico, permitiendo que se lleven a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades (multiplicando su velocidad por un millón de veces e incluso más), no se consume durante la reacción y en general presenta un elevado grado de especificidad (Badui, 2006). La función de las enzimas está estrechamente relacionada con las reacciones metabólicas, por lo que todas las células existentes, desde microorganismos hasta organismos superiores, las poseen y son parte esencial de su ciclo vital.

Las características más sobresalientes de los enzimas son su poder catalítico y su especificidad. La catálisis tiene lugar en un centro específico de la enzima llamado centro activo (Berg y col., 2008), la alta especificidad de las enzimas actúa tanto en la reacción que catalizan como en la selección de las sustancias reaccionantes (sustratos), ya que una sola enzima cataliza solo una reacción química específica o un grupo de reacciones muy relacionadas entre sí. Otra ventaja de las reacciones catalizadas es que en ella son raras las reacciones colaterales que conducen a la formación de productos secundarios, reacciones que son comunes en las reacciones químicas convencionales no catalizadas.

Para lograr este alto grado de especificidad y catalizar una gran diversidad de reacciones químicas, las enzimas proteicas utilizan fuerzas intermoleculares, de esta forma logran unirse a las moléculas y acercan los sustratos hasta lograr una orientación óptima. Una enzima no puede alterar las leyes de la termodinámica y por lo tanto no puede alterar el equilibrio de una reacción química, el cual depende de la energía libre entre reactantes y productos (ΔG), sin embargo, logran disminuir la energía de activación (Berg y col., 2008) (figura 5).

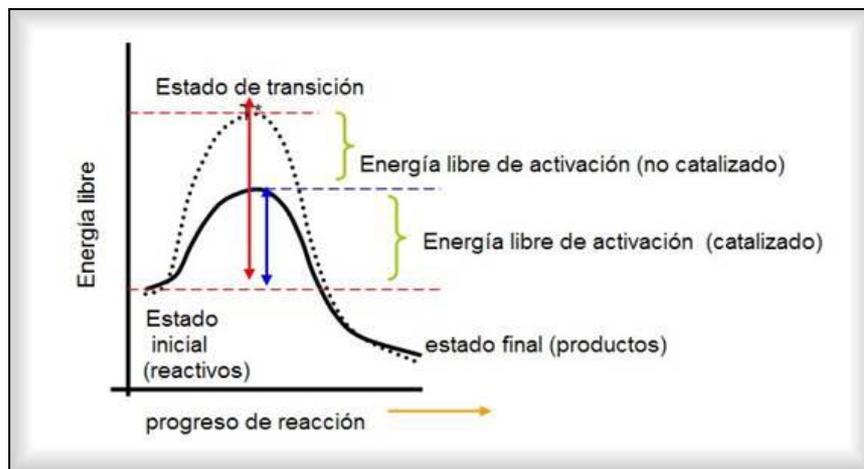


Figura 5. Disminución de la energía libre de activación por el efecto catalítico de las enzimas.

Fuente: UNAM, 2003.

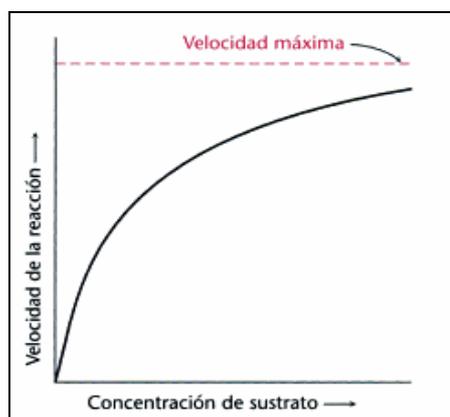


Figura 6. Relación velocidad de reacción Vs. concentración del sustrato durante la catálisis enzimática.

Fuente: Berg y col., 2008.

Para facilitar los estados de transición las enzimas acercan sus sustratos en orientaciones favorables dentro de los complejos enzima-sustrato, así los sustratos quedan unidos al centro activo, el cual participa directamente en la formación o ruptura de enlaces. Debido a su naturaleza o características intrínsecas se puede concluir que las enzimas proporcionan una serie de ventajas sobre el uso de productos químicos, como lo son su alta especificidad y eficiencia de catálisis conservadas incluso a temperaturas moderadas, además de su naturaleza amigable con el medio ambiente (An y Visessanguan, 2000).

Enzimas Alimentarias

El área de mayor desarrollo e impacto biotecnológico dentro del sector alimentario, es la que conlleva la aplicación de enzimas (biocatálisis a los alimentos). Las enzimas actúan como herramientas para mejorar la calidad de los alimentos o las operaciones de procesamiento de alimentos debido a su comportamiento como catalizadores biológicos capaces de acelerar las reacciones químicas y biológicas (An y Visessanguan, 2000). Actualmente, la aplicación de la tecnología enzimática dentro del sector alimentario consume un 65% de las enzimas que se producen industrialmente, el restante 35% lo comparte la industria de los detergentes con las proteasas alcalinas (25%) y la industria farmacéutica y analítica (10%) (García y col., 2004).

Las enzimas alimentarias mayormente utilizadas son las hidrolasas dominando el mercado industrial de las ventas de enzimas con un 97%. Dentro de las hidrolasas las proteasas ocupan el segundo lugar en el mercado y sus aplicaciones en procesamiento de alimentos son tan diversas que se pueden utilizar en alimentos horneados, cerveza, vino, cereales, leche y productos lácteos como el queso, chocolate, huevos y ovoproductos, carne y productos de pescado, legumbres, para la producción de hidrolizados de proteínas o extraer el sabor (An y Visessanguan, 2000). El estudio de las enzimas en el campo de los alimentos ha sido de gran interés desde su descubrimiento, pues ellas son las responsables de algunos cambios químicos que sufren los alimentos cuyo resultado puede resultar tanto beneficioso (maduración de tejidos) y por lo tanto deseado, o perjudicial (oxidaciones o reacciones de oscurecimiento enzimática) y por lo tanto se busca detenerlo o ralentizarlo (Badui, 2006).

El uso de enzimas endógenas dentro del el procesamiento de los alimentos, se remonta muchos siglos atrás en procesos como ablandamiento de tejidos, coagulaciones o fermentaciones. Sin embargo, no fue hasta el siglo XX que con las tecnologías necesarias

para su aislamiento, purificación, caracterización, comprensión de su cinética y mecanismo de acción, entre otras, que se comprendieron las reacciones bioquímicas que llevan a cabo en el alimento, ya sean enzimas añadidas o producidas por microorganismos en los procesos fermentativos. La mayoría de las enzimas utilizadas en la industria alimentaria se derivan de fuentes microbianas, aunque existen ciertos casos donde enzimas importantes desde un punto de vista tecnológico y comercial, se obtienen de subproductos de órganos animales (quimosina, tripsina, quimotripsina etc.) o de plantas (papaína, bromelina, etc.). Dentro de las enzimas recuperadas de tejidos animales, las enzimas de los peces se usan como coadyuvantes de elaboración, pero estas enzimas marinas cada vez van despertando mayor interés posicionándose mejor debido a sus características únicas (An y Visessanguan, 2000).

Por razones fundamentalmente toxicológicas, se buscan y se han adaptado procesos, para que un gran número de enzimas industriales sean producidas por un número reducido de microorganismos, los reconocidos generalmente como seguros por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA). *Bacillus subtilis* y *Aspergillus niger* son las principales fuentes microbianas naturales de enzimas y *Escherichia coli* (*E. coli*) el principal microorganismo a transformar para la producción de enzimas de origen no microbiano. Por razones de índole energética, las enzimas industriales que catalizan reacciones de hidrólisis no requieren cofactores, en contraparte a las reacciones de catálisis química convencionales que sí, sin embargo las reacciones de síntesis siguen siendo inviables fuera de la célula, ante la dificultad de producir y regenerar cofactores económicamente (García y col., 2004). En la actualidad los procesos que involucran tecnología enzimática se enfocan en la conservación ya sea del alimento en su totalidad o de algunos de sus componentes (por ejemplo, vitaminas), en el uso más eficiente de materias primas (recuperación de subproductos), mejoramiento de la calidad sensorial de los alimentos (sabor, textura), producción de alimentos light o sucedáneos (síntesis de edulcorantes, sucedáneos de grasas), eliminar compuestos antinutricionales y producción de materias primas de aplicación en alimentos (producción de jarabes fructosados), entre otras (Badui, 2006).

Para desarrollar aplicaciones industriales de las enzimas dentro del sector alimentario es necesario estudiar a las enzimas desde el punto de vista fisicoquímico, ya que como consecuencia de su estructura proteica, la actividad catalítica de las enzimas depende del pH y de la temperatura de reacción, parámetros que resultan de suma importancia dentro de la industria alimentaria. Así, pues, para desarrollar aplicaciones en procesamiento de alimentos primero se debe caracterizar, activar o inhibir enzimas endógenas, para de esta manera poderlas aplicar de manera eficiente dependiendo del

alimento, aprovechar su termoestabilidad para asociar su desactivación con tratamientos térmicos y emplearlas como parámetros de control de calidad o simplemente, aprovecharlas como herramienta analítica (García y col., 2004).

Enzimas Gástricas de Origen Marino

La gran diversidad existente de especies marinas adaptadas a una variedad de condiciones climáticas ha sido la causante de centrar una atención considerable hacia el medio ambiente acuático, pues contiene una amplia variedad de material genético y, por lo tanto, representa un enorme potencial para la utilización de diferentes enzimas (Shahidi y Janak, 2001) (tabla 2). Las enzimas de origen marino tienen tolerancia a altos niveles de sal y muy a menudo están adaptadas al frío, para compensar la dureza del medio ambiente donde actúan, ya que los animales marinos viven en un hábitat donde las temperaturas son a menudo inferiores a 4°C y en algunos casos incluso por debajo de 0°C, como en el Ártico.

Cuando se emplean tratamientos químicos o mecánicos convencionales durante el procesamiento de alimentos a menudo se puede dañar la materia prima y/o reducir la recuperación del mismo alimento. Con las enzimas de peces e invertebrados acuáticos, se pueden desarrollar métodos suaves que eviten la protección de sustratos o productos de la degradación, la reducción de las reacciones secundarias, y la prevención de la destrucción de otras sustancias relacionadas con las materias primas. Además, después del tratamiento enzimático no habrá necesidad de realizar pruebas toxicológicas de las materias primas con el fin de demostrar su seguridad, ya que se obtienen de los tejidos comestibles de origen animal (Shahidi y Janak, 2001). Otra ventaja de que las enzimas marinas de los organismos de agua fría tengan mayor actividad molecular a temperaturas más bajas, lo cual permite que sus reacciones puedan llevarse a cabo a temperaturas más bajas, es que también se reducen las necesidades de energía. De igual forma, la inestabilidad térmica hace que sea posible llevar a cabo la reacción en condiciones de temperaturas leves y dar por terminado el proceso con un tratamiento térmico suave minimizando la actividad bacteriana (Shahidi y Janak, 2001).

Tabla 2. Enzimas gástricas extracelulares recuperadas de peces, invertebrados acuáticos y mamíferos marinos.

Grupo	Familia	Enzima	Organismo
Proteasas gástricas	Proteasas aspártico	Pepsina	Eperlano americano, sardina, capelán, bacalao de Groenlandia, salmón, caballa, perca emperador, palometa, atún (aleta azul).
		Pepsinógeno	Trucha arco iris, atún (aleta azul), tiburón.
		Quimosina	Foca.
		Gastricsina	Merluza, bacalao del Atlántico.
Proteinasas intestinales	Serina proteasas	Tripsina	Sardina, capelán, bacalao de Groenlandia, cunner, bacalao del Atlántico, salmón keta, salmón del Atlántico, salmón coho, anchoveta, palometa corvina blanca del Atlántico, carpa, tilapia hibrida, krill, cangrejo del río, ostra.
		Quimotripsina	Capelán, arenque, bacalao del Atlántico, mielga, trucha arco iris, escalope, abulón, camarón blanco, carpa herbívora.
		Colagenasa	Cangrejo violinista, camarón de agua dulce, cangrejo de río, bacalao del Atlántico, cangrejo real.
		Elastasa	Carpa, bagre, bacalao del Atlántico.

Fuente: Shahidi y Janak, 2001.

Las enzimas marinas ofrecen una amplia gama de aplicaciones únicas, incluyendo descamado de peces y despielado de calamares, purificación y limpieza de las huevas de pescado para la producción de caviar, extracción de caroteno-proteínas que se encuentran en los descartes que ocurren durante el procesamiento de mariscos. De igual manera, también se pueden usar enzimas gástricas de peces como un sustituto de cuajo en la

fabricación de queso, la maduración de los pescados, la producción de salsa de pescado y la producción de hidrolizados de proteínas de pescado (Shahidi y Janak, 2001) (tabla 3). Particularmente las enzimas proteolíticas tiene cabida dentro de una gran variedad de procesos de diferentes grupos alimenticios, tales como los de la industria de los cereales, productos horneados, huevo y ovo productos, carnes, pescados, legumbres, lácteos y de bebidas fermentadas (tabla 4).

Tabla 3. Aplicaciones de enzimas de peces e invertebrados acuáticos.

Área de aplicación	Ejemplos
Degradación selectiva de tejidos	Descamado de peces e invertebrados acuáticos Purificación de hueva de pescado (producción de caviar) Remoción de la membrana de hígado de bacalao Remoción del exoesqueleto de crustáceos Producción de vejiga natatoria salada de bacalao
Fermentación y curado del pescado	Producción de salsa de pescado Producción de ensilado de pescado Producción de arenque marinado (matjes)
Producción de productos hidrolizados	Hidrolizado de proteína de pescado Compuestos del sabor
Extracción de pigmentos	Recuperación enzimática de pigmentos de desechos de crustáceos
Coagulación de proteínas	Aplicación de quimosina como un sustituto de cuajo en la producción de queso Remoción de sabores oxidados en la leche
Manejo de desechos	Tratamiento enzimático del agua de cola (reducción de la viscosidad del agua de cola)
Otras aplicaciones potenciales	Ablandamiento de carne Extracción enzimática de aceite de pescado Enzimas antibacterianas Enzimas antioxidantes Producción de concentrados de ácidos grasos ω -3

Fuente: Shahidi y Janak, 2001.

Tabla 4. Algunos usos de enzimas proteolíticas en la industria alimentaria.

Alimento	Aplicación
Cereales, productos horneados	Aumenta la velocidad de secado de las proteínas, mejorar el manejo del producto. Características: disminuye el tiempo de mezclado de la masa, mejora la textura de y volumen de la hogaza de pan.
Huevos y ovo-productos	Mejora la calidad de los productos secados.
Carnes	Ablandamiento, recuperación de proteína de los huesos, hidrólisis de proteínas de la sangre.
Pescado	Hidrolizados de proteínas de pescado, reducción de la viscosidad, eliminación de la piel, procesamiento de las huevas.
Legumbres	Tofu, salsa de soja, hidrólisis de proteínas, eliminación de mal sabor de leche de soja.
Lácteos	Formación de requesón; acelera el envejecimiento del queso, elaboración de pudines de cuajo.
Cerveza	Auxiliar de la fermentación y filtración, eliminación de los polipéptidos o polifenoles y para mejorar su estabilidad física (<i>chillproofing</i>), Disminución de la formación de espuma, promoción la fermentación maloláctica.
<i>Winecoco</i>	Facilita la fermentación para la producción de chocolate.

Fuente: Klomklao, 2008.

Proteasas de peces. El papel de las proteasas en los seres vivos es esencial para el crecimiento y la supervivencia, en la naturaleza las proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos, catalizando la polifuncional degradación hidrolítica de las proteínas, tanto en plantas, animales y microorganismos. Los animales marinos se han adaptado a diferentes condiciones ambientales, y estas adaptaciones, junto con las inter e intraespecíficas variaciones genéticas, están asociadas con ciertas propiedades únicas de sus proteasas, en comparación con las enzimas de contraparte de los animales de tierra, plantas y microorganismos. Algunas de estas propiedades distintivas incluyen una mayor eficiencia catalítica a baja temperatura y baja estabilidad térmica (Klomklao, 2008).

En el sistema de la comisión enzimática (EC) para la nomenclatura de las enzimas, todas las proteasas (péptido hidrolasas) pertenecen a la subclase 3.4, que se divide en exopeptidasas para la 4.3.11-19, y endopeptidasas o proteinasas para la 3.4.21-24 (figura 7). Las endopeptidasas rompen la cadena polipeptídica en los particularmente susceptibles enlaces peptídicos distribuidos a lo largo de la cadena, mientras que las exopeptidasas hidrolizan un aminoácido N terminal (aminopeptidasas) o desde el C terminal (carboxipeptidasas). Las exopeptidasas, especialmente aminopeptidasas, son muy abundantes, pero menos disponibles como productos comerciales, ya que muchas de ellas son intracelulares o unidas a la membrana (Klomklao, 2008).

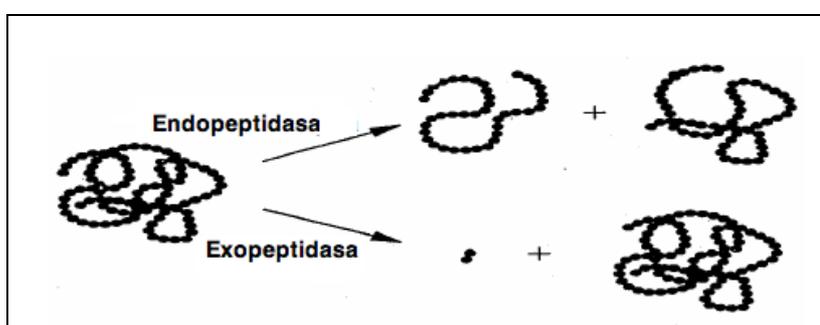


Figura 7. Acción de las endopeptidasas y exopeptidasas en la estructura proteica.

Fuente: Klomklao, 2008.

Estudios sobre enzimas de peces han demostrado que las proteasas digestivas son responsables de la degradación rápida abdominal (Castillo y col., 2004), por este motivo los pelágicos menores teleósteos como la sardina Monterey después de la muerte son muy susceptibles a la degradación autolítica abdominal, lo que hace que sus vísceras sean una posible fuente de enzimas proteolíticas para uso industrial.

Las proteasas de peces e invertebrados acuáticos, se pueden clasificar en base a sus propiedades *in Vitro*, como la gama de pH sobre la que actúan, existiendo dos tipos: las enzimas proteasas clasificadas como proteasas ácidas y neutras y las alcalinas musculares. También se pueden clasificar en función de su capacidad de hidrolizar proteínas específicas, en función de su mecanismo de acción, la respuesta a inhibidores específicos o también en base a su naturaleza química. De igual manera estas proteasas también pueden ser agrupadas en base a la estructura química de su sitio catalítico en cuatro grupos: proteasas ácidas y aspártico, serina-proteasas, tiol o cistina-proteasas y metalo-proteasas (Shahidi y Janak, 2001).

Las enzimas proteolíticas de peces e invertebrados acuáticos incluyen proteasas gástricas, intestinales y hepato-pancreáticas, las proteasas intestinales de los peces son secretadas normalmente a partir de los ciegos pilóricos o el páncreas. Los dos principales grupos de proteasas son la pepsina y tripsina y se encuentran en las vísceras, la primera en el estómago y es activa en medio ácido, mientras que la tripsina en los ciegos pilóricos y el intestino y se activa en condiciones neutras o alcalinas, pero la distribución de las proteasas varia dependiendo de las especies y sus órganos. Tripsina y quimotripsina (proteasas recuperadas de los ciegos pilóricos) pertenecen al grupo de las serina-proteasas y son también las principales serina proteinasas purificadas y caracterizadas de animales marinos.

Las proteasas de serina distribuidas en el intestino de los peces poseen una alta actividad en pH alcalino en vez de neutro, por esta razón las tripsinas de pescado son generalmente estables a pH alcalino. Otras enzimas también recuperadas e identificadas a partir de vísceras intestinales son las colagenasas, elastasas y carboxipeptidasas (Shahidi y Janak, 2001).

Serina-Proteasas

De acuerdo al sistema EC para nomenclatura de las enzimas, las serina-proteasas comparten los mismos primeros tres dígitos (EC: 3.1.21). pertenecen a un grupo de endoproteinasas que poseen un residuo serina en su sitio catalítico, junto a un grupo imidazol y otro carboxilo-aspartil. Como grupo, las proteasas de serina son inhibidas por la *di-isopropil phosphofluoride* (DFP), se activan a pH neutro y alcalino, y son inactivas o inestables a pH ácido. Existen grandes similitudes entre las serina-proteasas quimotripsina, tripsina y elastasa (figura 8 y 9), pues en ellas se pueden observar homologías de secuencia y estructurales lo que indica que estas proteínas evolucionaron por medio de duplicaciones génicas de un antepasado de serina-proteasa seguido por la evolución divergente de las enzimas resultantes (Voet y Greenwald, 2006). Recientemente, se ha prestado cada vez mas atención a las proteasas alcalinas (Klomklao, 2008).

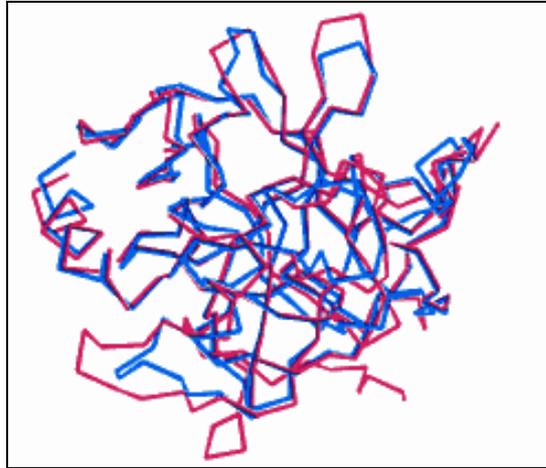


Figura 8. Semejanzas estructurales entre tripsina (azul) y quimotripsina (rojo).

Fuente: Berg y col., 2008.

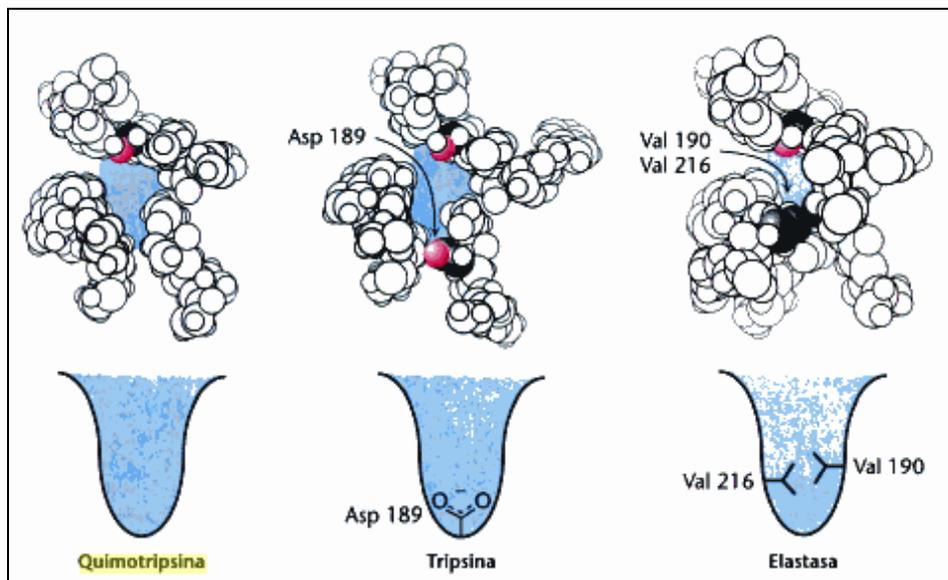


Figura 9. Semejanzas estructurales y diferencias en los bolsillos S1 de quimotripsina, tripsina y elastasa.

Fuente: Berg y col., 2008.

Quimotripsina. La quimotripsina posee un peso molecular similar al de la tripsina: aproximadamente 25 kDa, en comparación con la tripsina, los estudios e investigaciones sobre quimotripsina de peces han sido menos, pero también se ha concluido que sus propiedades cinéticas, en comparación con sus contrapartes de mamíferos, se debe a la

misma respuesta de adaptación hacia los hábitats de baja temperatura (tabla 5). En conjunto la quimotripsina es esférica y consta de tres cadenas polipeptídicas (que se muestran en forma de cintas de color naranja, azul y verde en la figura 10) enlazadas por puentes disulfuro, se sintetiza como un polipéptido único, denominado quimotripsinógeno, que se activa por la ruptura proteolítica del polipéptido para proporcionar tres cadenas. El centro activo de la quimotripsina, señalado por la serina 195, se encuentra en una hendidura sobre la superficie del enzima. La estructura del centro activo explica la especial reactividad de la serina 195, la cadena lateral de la serina 195 forma un puente de hidrógeno con el anillo imidazol de la histidina 57, el grupo $-NH$ de este anillo imidazol, se encuentra, a su vez formando un puente de hidrógeno con el grupo carboxilato del ácido aspártico 102. Esta constelación de residuos se denomina triada catalítica (Berg y col., 2008).

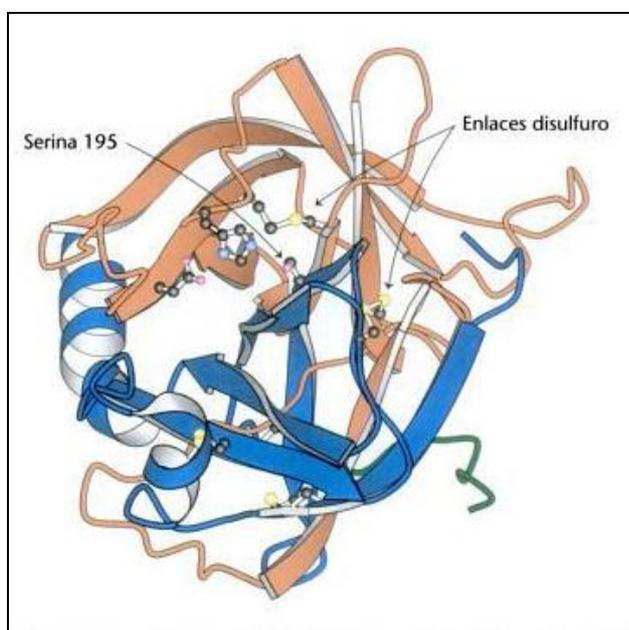


Figura 10. Localización del centro activo de la quimotripsina.

Fuente: Berg y col., 2008.

Las quimotripsinas de peces han revelado similitud con sus contrapartes bovina y porcina, debido a su procedencia del mismo antepasado evolutivo, sin embargo se han detectado algunas diferencias importantes, como una actividad catalítica mayor, una menor estabilidad térmica y algunas diferencias en la composición polipeptídica de sus aminoácidos. Muchos Estudios han encontrado que en peces es común encontrar dos isoformas de esta enzima, pero con la misma actividad específica (Castillo y col., 2006). Al

igual que las quimotripsinas de mamíferos son endopeptidasas que rompen el enlace peptídico de las proteínas en el lado carboxilo de la fenilalanina, tirosina y triptófano. También rompen diversos sustratos sintéticos, tienen un rango óptimo de actividad a un pH entre 7.5 - 11 y temperatura entre 45 - 55°C y son inestables a temperaturas > 55°C y condiciones de acidez (Castillo y col., 2006).

Tabla 5. Estabilidad térmica, estabilidad al pH y propiedades cinéticas de quimotripsina de peces e invertebrados acuáticos ^a.

Especie	Temp. óptima (°C)	pH óptimo	K _m ^b (Mm)	Energía de activación de Arrhenius (Kcal/mol)	Referencia
Bacalao de Groenlandia	40	7.5	1.670	8.20	Simpson (1984), Simpson, <i>et al.</i> (1989)
Bacalao de Groenlandia	40	7.5	0.260	7.00	Simpson y Haard (1984b)
Bacalao del Atlántico	40	7.5-8.0	1.480	12.80	Simpson (1984), Simpson, <i>et al.</i> (1989a)
Bacalao del Atlántico	55	8.0	0.077	7.57	Asgeirsson <i>et al.</i> (1989)
Bacalao del Atlántico	40	7.5	1.480	8.90	Simpson (1984), Simpson, y Haard <i>et al.</i> (1990)
Bacalao del Atlántico	43	8.5-9.0	-	-	Han (1993)
Bacalao del Atlántico	52	7.8	0.510	-	Asgeirsson and Bjarnason (1991)
Cunner	50	8.0	0.730	11.90	Simpson (1984), Simpson, <i>et al.</i> (1989)
Cunner	45	8.5	-	11.80	Simpson y Haard (1985a)
Salmón del Atlántico	45	8.5	-	-	Reece (1988)
Corvina blanca del Atlántico	60	9.5	0.081	-	Pavlisko, Rial y Coppes (1997)
Palometa (<i>Parona signata</i>)	65	8.5	-	-	Pavlisko, Rial, Vecchi y Coppes (1997)
Cangrejo de río	50	6.0	-	-	García-Carreno y Haard (1993)
Cangrejo de río	50	6.0	0.226	-	García-Carreno <i>et al.</i> (1994)
Ostra	60	8.0	-	-	Tasao and Nagayama (1991)
Tilapia híbrida	40	9.0	2.500	8.7-8.9	El-Shemy (1997)
Camarón blanco	-	8.0	1.600	-	Hernández-Cortés <i>et al.</i> (1997)

^a Valores de condiciones experimentales publicadas por diferentes autores, no son los mismos, por lo tanto, se debe prestar atención a la hora de hacer comparaciones.

^b K_m = Constante de Michaelis.

Fuente: Shahidi y Janak, 2001.

Un estudio sobre la purificación y caracterización bioquímica de quimotripsina procedente de las vísceras de sardina Monterey realizado por Castillo y col. (2006) proporcionó datos específicos sobre esta enzima, como su peso molecular (26 kDa), el cual es similar a los reportados para la quimotripsina de mamíferos y peces (22 - 30 kDa) y su punto isoeléctrico de 4.3 que apoya la hipótesis de que esta enzima es aniónica por naturaleza, similar a otras quimotripsinas de peces. En cuanto a la actividad mostrada para la hidrólisis de *succinyl-L-ala-alapro-L-phenylalanine-p-nitroanilide* (SAAPNA) a 25°C los datos obtenidos por Castillo y col. (2006) arrojaron que la enzima retuvo más del 80% de actividad en un pH entre 5-10 y mantuvo una considerable actividad incluso a temperatura ambiente, pues la actividad relativa de la enzima a 25°C fue de un 60% de la actividad máxima. En resumen, los resultados de los ensayos de quimotripsina de sardina Monterey la posicionaron como un catalizador eficaz, las características de la quimotripsina aislada resultaron muy interesantes tecnológicamente, especialmente la actividad óptima a pH 8,0, su actividad relativamente alta de pH 5 a 10, la temperatura óptima de actividad a 50°C y su baja termoestabilidad.

Más adelante, Castillo y col. (2009) caracterizaron una isoforma (quimotripsina II) de Sardina Monterey y la compararon con la quimotripsina I de sardina Monterey y quimotripsina bovina; su peso molecular fue de 25.5 kDa, lo cual la colocaba entre la isoforma I (26 kDa) y la quimotripsina bovina (25 kDa) y su punto isoeléctrico de aproximadamente 5.8. Los estudios demostraron que la quimotripsina bovina y las dos isoformas de la sardina mostraron un comportamiento similar en cuanto al pH óptimo de actividad para la hidrólisis de SAAPNA a 25°C en un rango de pH de 4 a 8, siendo 8 su pH óptimo, pero en el rango de 8 a 11 quimotripsina I mostró mayor actividad. Todas las enzimas mostraron baja actividad a pH ácido (4-5), y una considerable actividad a un pH de 6 a 9, mientras que la quimotripsina I mostró la mayor actividad a pH alcalino (7-11). En cuanto a la estabilidad al pH los datos arrojaron que quimotripsina II fue la más estable de las isoformas de sardinas evaluadas (alta estabilidad a pH 5 a 11) e incluso resultó más estable que la quimotripsina bovina a pH's alcalinos altos (9 a 11) (figura 11). La reducción de la estabilidad a pH inferior a 5 fue atribuida a un cambio en su carga neta, típico de las enzimas cuando se encuentran a un pH por debajo de su pI, que tiene como consecuencia una afectación a su estructura terciaria, lo cual no sucede tan marcado en quimotripsina bovina pues las quimotripsinas de organismos de sangre caliente son también extremadamente estables a valores de pH ácidos.

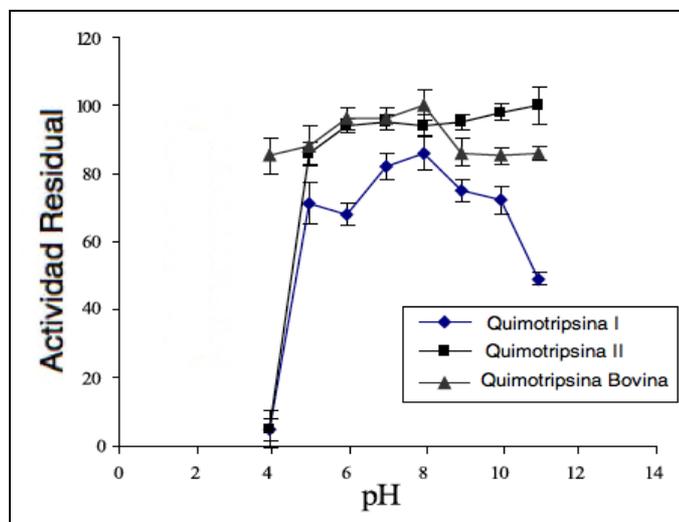


Figura 11. Estabilidad de quimotripsina I y II de sardina Monterey y quimotripsina bovina al pH.

Fuente: Castillo y col., 2009.

En el estudio realizado por Castillo y col. (2009) se encontró que las quimotripsinas de sardina Monterey mostraron mayor actividad a bajas temperaturas que su contraparte bovina, siendo la isoforma II la que mostró actividad a más bajas temperaturas (intervalo de 10 a 45°C) y también la que mostró menor termoestabilidad, pues perdió su actividad a 50°C (Castillo y col., 2009) (figura 12). De lo anterior se puede deducir que la isoforma II es la enzima mayormente utilizada para catalizar la hidrólisis proteolítica cuando la sardina se ve sometida a temperaturas ambientales muy bajas, lo que se infiere sabiendo que la sardina Monterey efectúa migraciones de aguas subtropicales hacia regiones con temperaturas cercanas a 0°C y que sus isoformas son la respuesta evolutiva para adaptarse a los ambientes extremos.

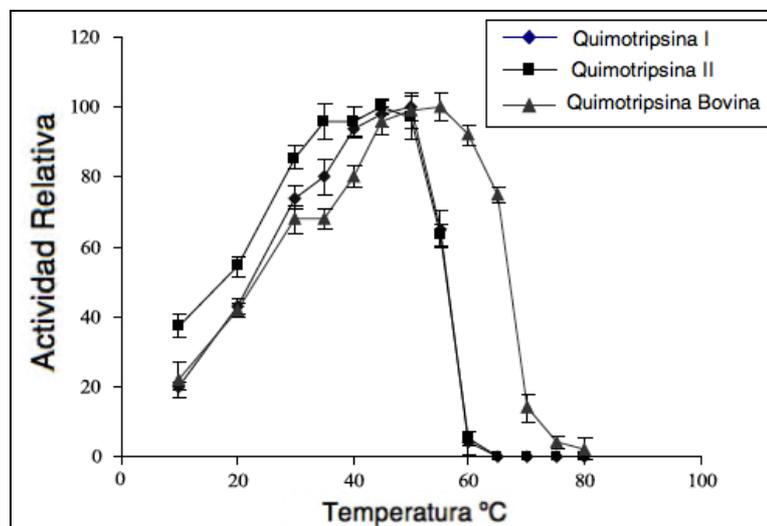


Figura 12. Temperatura óptima de quimotripsina I y II de sardina Monterey y bovina.

Fuente: Castillo y col., 2009.

Las quimotripsinas de sardina Monterey mostraron eficiencias catalíticas (K_{cat}/K_m) significativamente mayores que la de la quimotripsina bovina, siendo 251 para la isoforma I, 100 para la isoforma II y $21 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ para la quimotripsina bovina. También fueron mayores que las de otras quimotripsinas de peces como la anchoveta (*E. japonica*), trucha arco iris (*O. mykiss*) y carpa (*C. carpio*). La enzima menos eficiente fue la quimotripsina bovina (Castillo y col., 2009) (tabla 6). Esto indica que las proteasas digestivas de los peces se han adaptado a los hábitats de baja temperatura mejorando su eficiencia.

Tabla 6. Constantes cinéticas de quimotripsina de la sardina Monterey y otros peces.

Quimotripsina	K_m (mM)	K_{cat} (seg-1)	K_{cat}/K_m ($\text{seg}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
Quimotripsina I de Sardina Monterey	0.074	18.6	251
Quimotripsina II de Sardina Monterey	0.048	4.8	100
Quimotripsina Bovina	0.090	1.9	21
Anchoveta (<i>E. japonica</i>)	0.089	14.7	165
Trucha arco iris (<i>O. mykiss</i>)	0.035	2.2	62.8
Carpa (<i>C. carpio</i>)	0.300	4.4	15

Sustrato: Succinil-L-Ala-Ala-Pro-L-phenilalanine-p-nitroanilida (SAAPNA).

Fuente: Castillo y col., 2009.

Aplicaciones de la quimotripsina. La quimotripsina ha demostrado mejorar el valor nutricional de las proteínas de los alimentos, así como bajar la temperatura de desnaturalización de las proteínas y la especificidad de escisión. También se reporta su uso en fermentaciones y producción de hidrolizado de proteínas (Zhou y col., 2011). En alimentos de origen animal como la carne y la industria láctea se puede utilizar para enterneamiento de la carne y la eliminación de las proteínas del hueso o en conjunto a tripsina para hidrolizar la caseína, además el hidrolizado de caseína mejora sus propiedades funcionales (actividad antioxidante, conversión de la angiotensina, inhibición de la enzima y la capacidad antibacteriana) (Zhou y col., 2011). Particularmente, en la industria del queso, en conjunto con tripsina controla la hidrólisis de las proteínas de suero de queso y β -lactoglobulina. Fuera de las aplicaciones alimentarias, quimotripsina también a resultado una enzima de interés en el campo de la industria química (mejora la capacidad de descontaminación de detergentes), la producción de cuero y la medicina (utilizada en el tratamiento de la dispepsia y anorexia, extracción de cataratas, infertilidad, mordedura de serpiente y como un fármaco con actividad antiinflamatoria) (Zhou y col., 2011).

La quimotripsina II de sardina Monterey debido, a la dependencia de la actividad al pH y temperatura que mostró en los ensayos, podría ser una alternativa biotecnológica para el procesamiento de alimentos como en la maduración del pescado, la producción de salsa de pescado y de hidrolizado de proteína de peces, así como en otros procesos emergentes, ya que en todos estos son necesarias bajas temperaturas. Además, esta enzima junto con otras proteasas de las vísceras de sardina podría ayudar en el tratamiento enzimático del agua de cola.

Biología Molecular

Secuenciación de un Gen

Al momento de secuenciar un gen, un sitio de secuencia específica (STS) resulta de gran importancia para poder amplificar cuando menos parte de él. Un STS es una secuencia única de ADN que ocurre sólo una vez, cuya ubicación exacta y orden de las bases se conocen, se pueden amplificar por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y utilizar en la construcción de mapas físicos y genéticos (Brown, 2002). Las fuentes más comunes de los STS's son: los sitios de secuencia expresada EST's, (una cadena de ADNc

que es secuenciada a fin de obtener un acceso rápido a los genes de un genoma); los polimorfismos de longitud de secuencia simple o SSLP's, (una serie de secuencias repetidas que muestran variaciones en su longitud) y las secuencias genómicas al azar (secuencias obtenidas mediante la secuenciación de piezas aleatorias de ADN clonado genómico, o simplemente mediante la descarga de secuencias que han sido depositados en las bases de datos) (Brown, 2002).

Si el STS cumple los requisitos de un EST, esta secuencia expresada conocida se vuelve muy valiosa como un medio rápido de acceder a la secuencias de genes importantes, incluso si sus secuencias son incompletas. Esto es debido a que el ARNm de una célula se deriva de los genes codificadores de las proteínas y los ADNc's y EST's obtenidos a partir de ellos representan los genes que están siendo expresados en la célula desde la cual se preparó el ARNm.

Las técnicas de hibridación *Northern Blot* y *Zoo-Blotting* habilitan la presencia o ausencia de genes en un fragmento de ADN determinado, pero no dan ninguna información posicional relativa a la ubicación de esos genes en la secuencia del ADN, de nuevo la forma más fácil de obtener esta información es la secuencia de los ADNc's correspondientes. Un ADNc es una copia de un ARNm, por lo tanto, éste corresponde a la región codificante de un gen; comparando una secuencia de ADNc con una secuencia de ADN genómico se delinea la posición del gen relevante y se revelan los límites exón-intrón (Brown, 2002). Para preparar ADNc se necesita la conversión del ARNm en ADN de doble cadena, esto es logrado por una enzima de un virus de ARN que construye una cadena de ADN complementaria sobre un transcrito de ARNm y después, otras enzimas retiran el ARN de la molécula híbrida ARNm/ADNc y sustituyen una cadena complementaria de ADN, dando como resultado final un ADNc de doble cadena (Starr y Taggart, 2004).

ARN. Los ARN's (ARNr: ARN ribosomal, ARNt: ARN de transferencia, ARNnh: ARN nuclear heterogéneo, ARN viral y ARNm,) son moléculas de ácidos nucleicos que generalmente también pueden ser analizados por PCR. El ARNm se puede definir como el transcrito de un gen que codifica una proteína. Los ARNm que codifican para genes en células eucariotas por lo general contienen secuencias de intrones (sin expresión). La molécula de ARN no es un objetivo apropiado para las ADN polimerasas dependientes de ADN, que se usan en las amplificaciones normales de PCR, para poder amplificar ARN éste debe sufrir un proceso de copiado que lo transforme a ADNc de cadena sencilla o monocatenario. La enzima que logra esta transformación es llamada transcriptasa inversa (RT) y a este proceso se le conoce como PCR de transcripción inversa o RT-PCR.

Si solo se sintetizan fragmentos cortos de ADNc, éstos no pueden contener las secuencias complementarias contra la cuales han sido diseñados los iniciadores específicos de PCR, por lo que es de suma importancia que se sintetice una copia de ADNc de longitud completa durante el proceso de transcripción inversa de la RT-PCR. Sin embargo, esto no suele ser un grave problema, pues usualmente las copias de transcripción inversa de cadena completa suelen ser sintetizadas, ya que la mayoría de las moléculas de ARNm son de menos de 3 kpb, de largo (van Pelt-Verkuil y col., 2008).

PCR de transcripción inversa. En la práctica, para obtener la secuencia de una molécula de ARN, normalmente se convierte a ADNc y posteriormente se realiza su secuenciación por un método de terminación de la cadena (Brown, 2002). En el proceso de transcripción inversa, siempre existe la posibilidad de que una u otra de las cadenas sintetizadas en la reacción no se transcriban hasta su extremo final de terminación, lo cual resulta en un ADNc truncado o incompleto. Los ADNc's incompletos al carecer de datos como los puntos de inicio o final de un gen, no son muy útiles para identificar los límites exón-intrón analizando sus secuencias. La presencia de pares de bases intramoleculares en el ARN puede impedir la obtención de un ADNc de longitud completa. El proceso de RT-PCR aplicado a fragmentos de aproximadamente más de 5-10 kb rara vez tienen éxito, debido a diversos factores como: la presencia de estructuras secundarias dentro de las moléculas de ARN, la ubicuidad de las enzimas degradantes del ARN en el ambiente (RNasa) y la actividad RNasa H de la transcriptasa inversa (la degradación y la eliminación de la cadena de ARN a partir de moléculas híbridas RNA/ADNc) (van Pelt-Verkuil y col., 2008).

Un problema que requiere una atención especial, si se quiere lograr un proceso de RT-PCR de alta calidad, confiable y consistente, es la necesidad de mantener la mezcla de reacción durante el proceso RT, libre de las enzimas degradantes RNasas, las cuales son excepcionalmente estables, algunas incluso resisten condiciones de esterilización (aunque todas las RNasas pueden ser destruidos por calentamiento a 180 - 200°C en calor seco, durante 6 horas o más) (van Pelt-Verkuil y col., 2008).

Síntesis de ADNc. El trabajo que conlleva poder identificar y aislar ADNc de longitud completa puede ser una experiencia frustrante y consumir mucho tiempo y ésta se intensifica aun más si se está trabajando especialmente con genes con una baja abundancia de expresión o de gran tamaño de transcripción. Para poder obtener un ADNc de longitud

completa con rapidez y sin tener que construir o analizar una biblioteca de ADNc, se pueden combinar la rápida amplificación de extremos de ADNc (RACE) con la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la cual ofrece un producto final de longitud completa y de alta fidelidad (Bartlett y Stirling, 2003).

La síntesis de ADNc, a partir de ARNm se basa en que el ARNm tiene presente una cola de adeninas (cola poli-A) en su extremo terminal 3', la cual se utiliza como una ventaja en el paso de transcripción inversa. De la misma manera que la ADN polimerasa, la transcriptasa inversa, también requiere de un iniciador para comenzar la transcripción. Un iniciador oligo (dT) complementario a la cola poli-A, reconocerá esta secuencia, se hibridará y comenzará el proceso de transcripción inversa, utilizando el ARNm como templado para producir la copia de ADNc de cadena sencilla (Dale y Von Schantz, 2002).

Iniciadores para la síntesis de ADNc. Para hacer más eficiente la síntesis de ADNc se han desarrollado diversos métodos, donde se pueden usar diferentes tipos de iniciadores, dependiendo de qué regiones del ARN queremos amplificar o de que tanto conocemos la secuencia del gen que queremos amplificar. Para el proceso de RT se pueden usar 3 diferentes tipos de iniciadores: iniciadores oligo- dT (fragmentos de ADN que contienen solo múltiples residuos de timidina), hexanucleótidos al azar, o iniciadores gen específico (figura 13). También es posible utilizar un iniciador de PCR en la mezcla de reacción RT en lugar de un iniciador diseñado específicamente RT, solo que para esto hay que considerar que este iniciador tiene que ser complementario a la molécula de ARN que se transcribe o no se unirá a la molécula de ARN de cadena simple. Al utilizar iniciadores al azar el rendimiento de ADNc específico obtenido por PCR se ve disminuido, ya que los productos finales son miles de fragmentos de todos los ARN presentes que se transcribieron de forma inversa, la otra opción, los iniciadores oligo-dT además de poseer residuos timidina, también se les pueden agregar secuencias deseadas, para poder encontrar los extremos de las moléculas de ADNc con más facilidad y realizar PCR's anidados subsecuentemente. Además estos iniciadores oligo-dT son específicos para realizar la transcripción inversa de los ARNm que se encuentran dentro del conjunto de ARN totales, debido a la cola poli-A que caracteriza a los ARNm, lo que aumenta el rendimiento de la transcripción inversa para dichas moléculas en específico (van Pelt-Verkuil y col., 2008).

La forma más fácil y específica de transcribir inversamente el ARNm del gen de interés es usando un iniciador gen específico, este iniciador es generalmente uno de los mismos que se utilizan en los protocolos de amplificación de PCR posteriores y como tal su secuencia debe ser complementaria a la molécula de ARNm que se desea transcribir de

forma inversa. Para optimizar aún más este proceso, y con el fin de facilitar la eficiencia de su recorrido, lo ideal es que el iniciador se una a una región de ARN que no posea un alto grado de estructura secundaria. El uso de iniciadores gen específico de transcripción inversa (en lugar de hexanucleótidos al azar y oligo-dT) facilita el incremento de las temperaturas de incubación durante la transcripción, sin embargo, requieren de la abundancia relativa de la molécula de ARN y depende de la cinética de la reacción (van Pelt-Verkuil y col., 2008).

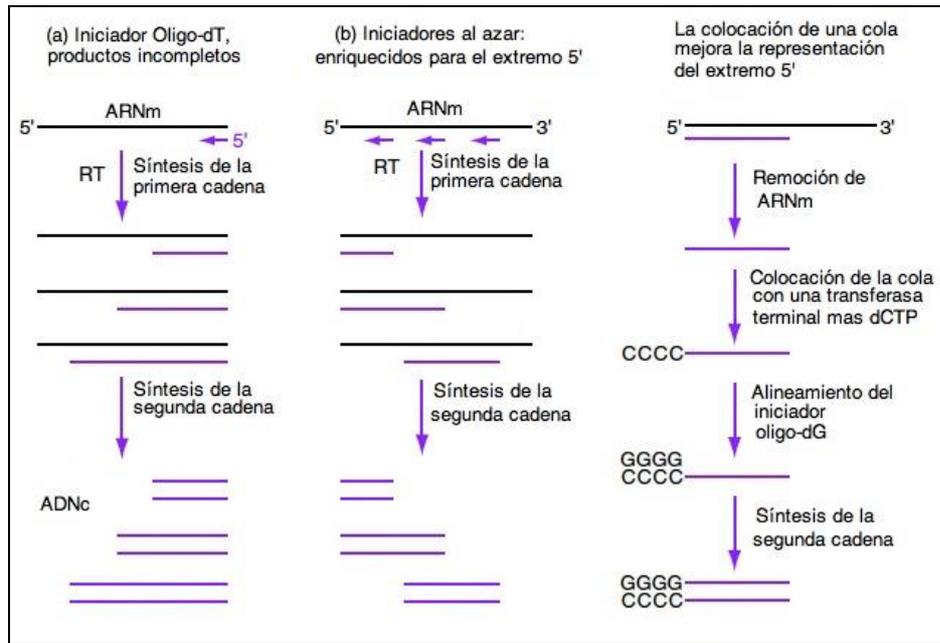


Figura 13. Síntesis de ADNc: representación de la amplificación de los extremos terminales 5' del ARNm.

Fuente: Dale y Von Schantz, 2002.

Rápida Amplificación de Extremos de ADNc (RACE). La técnica de RACE requiere el conocimiento previo de una secuencia de la región central del ARNm específico que se transcribe de forma inversa, así como los datos de la secuencia 5' y 3' terminal e iniciadores diseñados que contengan sitios de restricción específicos (van Pelt-Verkuil, 2008). El principio de la RACE es simple, se añade al final del ADNc una secuencia de anclaje para ser utilizada como sitio de unión para un iniciador de PCR, después se añaden un iniciador complementario a la secuencia de anclaje junto con un iniciador de genes específicos (basado en una secuencia corta conocida del ARNm de interés) para realizar una PCR que permita amplificar las regiones con secuencia desconocida (Bartlett y Stirling,

2003). Si no se logró obtener la secuencia de longitud completa del ARNm, y se quieren conocer las secuencias terminales, entonces se pueden usar los protocolos de 3' y 5' RACE.

En moléculas de ARNm largas la síntesis completa de ADNc es a menudo problemática, el principal problema es la carencia del extremo 5' de la molécula de ADNc transcrito inversamente. La RACE puede proporcionar una solución a este problema y de esta forma dar a conocer la secuencias de esta región permitiendo la amplificación de ARNm desde una región con secuencia interna conocida (a través de una secuencia desconocida) hacia cualquiera de los 3' o 5' finales del ARNm objetivo. Una vez obtenidos los productos de la 3' y 5' RACE, estos ya pueden ser secuenciados directamente o ser utilizados para generar sondas. Además utilizando RACE e iniciadores de PCR para aplicar sitios de restricción a los productos RACE, estos posteriormente pueden ser clonados o ligados entre sí para generar copias de ADNc de longitud completa a partir de la molécula de ARNm objetivo original. Para poder aislar un ADNc de longitud completa con ayuda de la tecnología del PCR anidado se han desarrollado varias estrategias, que se basan en la adición de secuencias de anclaje al final del ADNc (Bartlett y Stirling, 2003) (figura 14).

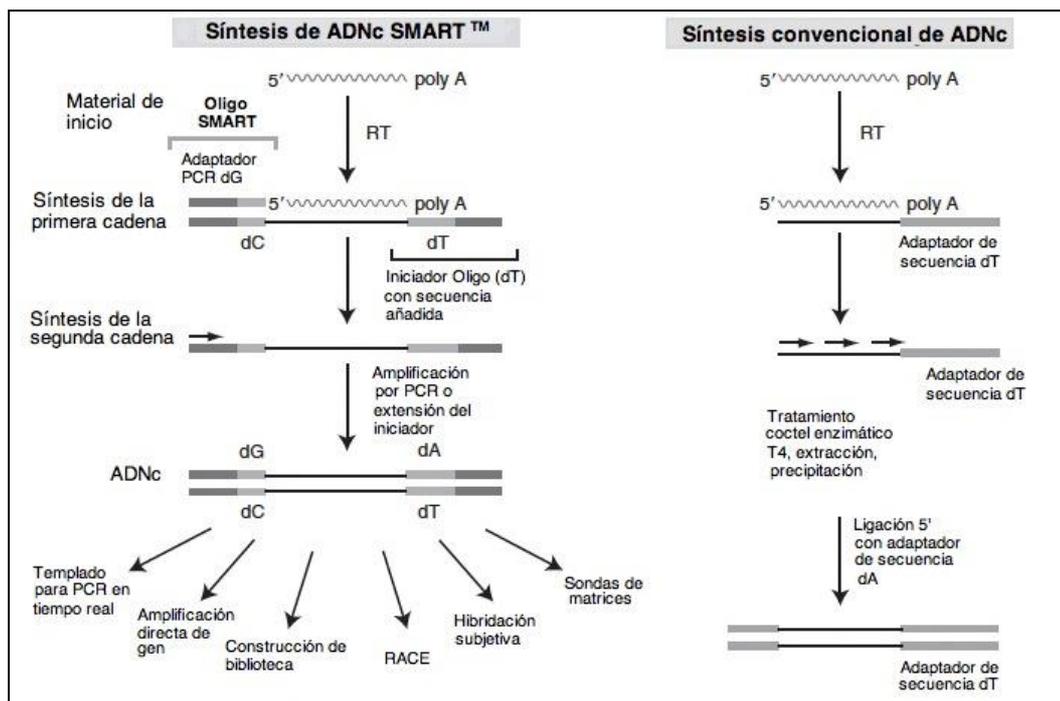


Figura 14. Esquema de la Rápida Amplificación de Extremos de ADNc (RACE).

Fuente: van Pelt-Verkuil y col., 2008.

5' RACE. Este método solo transcribe un pequeño segmento del ARNm (menos longitud que un ADNc de longitud completa), por lo que se espera que la síntesis de ADNc no termine prematuramente y alcance el extremo del ADNc que corresponde exactamente con el inicio del ARNm (figura 15). En un protocolo típico de 5' RACE, un iniciador está diseñado para unirse a una secuencia interna del ARNm objetivo para que la síntesis de la primera cadena (transcripción inversa) sea realizada hacia el extremo 5' de la molécula de ARNm objetivo. A continuación, la molécula de ADNc es cerrada en su extremo 3' con una cola de adeninas o citosinas utilizando desoxiadenosina trifosfato (dATP) o desoxicitidina trifosfato (dCTP) y una transferasa terminal, posteriormente una amplificación por PCR es realizada utilizando un iniciador oligo-dT u oligo-dG según se requiera y que contenga una secuencia de anclaje, y un iniciador gen específico por el otro lado para convertir el ADNc monocatenario en una molécula de doble hebra. La molécula se seguirá amplificando posteriormente a medida que avancen los ciclos de PCR. Una forma de incrementar la especificidad de los productos finales obtenidos es realizando una amplificación por PCR anidada (usando un iniciador diseñado para hibridar en la región conocida proporcionada por el iniciador que contiene la región de anclaje y un segundo iniciador anidado específico del gen, en lugar del primer iniciador gen-específico). De esta manera dicho protocolo permite la amplificación de una secuencia exón conocida del extremo 5' del ARNm objetivo a través de las regiones de la secuencia desconocidas y la secuencia de esta molécula amplificada revelará la posición precisa del inicio de la transcripción.

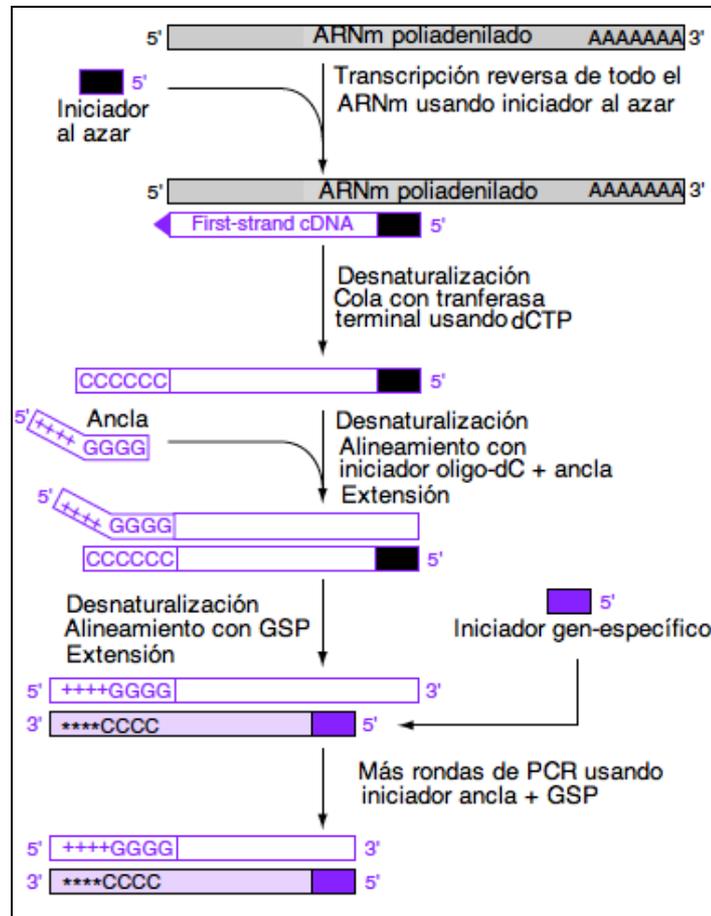


Figura 15. Esquema de 5' RACE.

Fuente: Dale y Von Schantz, 2002.

3' RACE. El protocolo 3' RACE es el tipo más sencillo de RACE, permite la amplificación de regiones de secuencia desconocida partiendo de una región exón conocida y finalizando en la cola poli-A del ARNm objetivo (van Pelt-Verkuil y col., 2008) (figura 16). 3' RACE, amplifica ADNc correspondiente al extremo 3' del ARNm utilizando primero un iniciador oligo-dT para realizar la transcripción inversa de la molécula de ARNm objetivo, valiéndose de la cola poli-A, para alinearse y comenzar la transcripción en dirección 5' a 3' hacia el centro de la molécula de ARNm objetivo y así asegurar la síntesis de la primera hebra de ADNc. El iniciador oligo-dT tiene una secuencia adicional conocida, que al funcionar como sitio de anclaje proporciona un sitio más eficaz para la amplificación posterior (y con frecuencia incluye un sitio de restricción para ayudar en la clonación subsiguiente). A continuación, se añade a la mezcla un iniciador que se hibrida a una secuencia exón conocida (iniciador gen específico) en la nueva cadena recién sintetizada de ADNc y se realiza un PCR, el ADN de doble cadena resultante puede ser amplificado por los

procedimientos habituales de PCR, volviendo a utilizar los iniciadores originales, o reemplazando el iniciador oligo-dT-ancla por uno que sólo contiene la secuencia de anclaje (Dale y Von Schantz, 2002). De esta forma, y usando además PCR anidada con un iniciador anidado a la secuencia de anclaje y otro segundo iniciador anidado (también específico para el gen en cuestión), la especificidad de los productos finales puede ser mejorada.

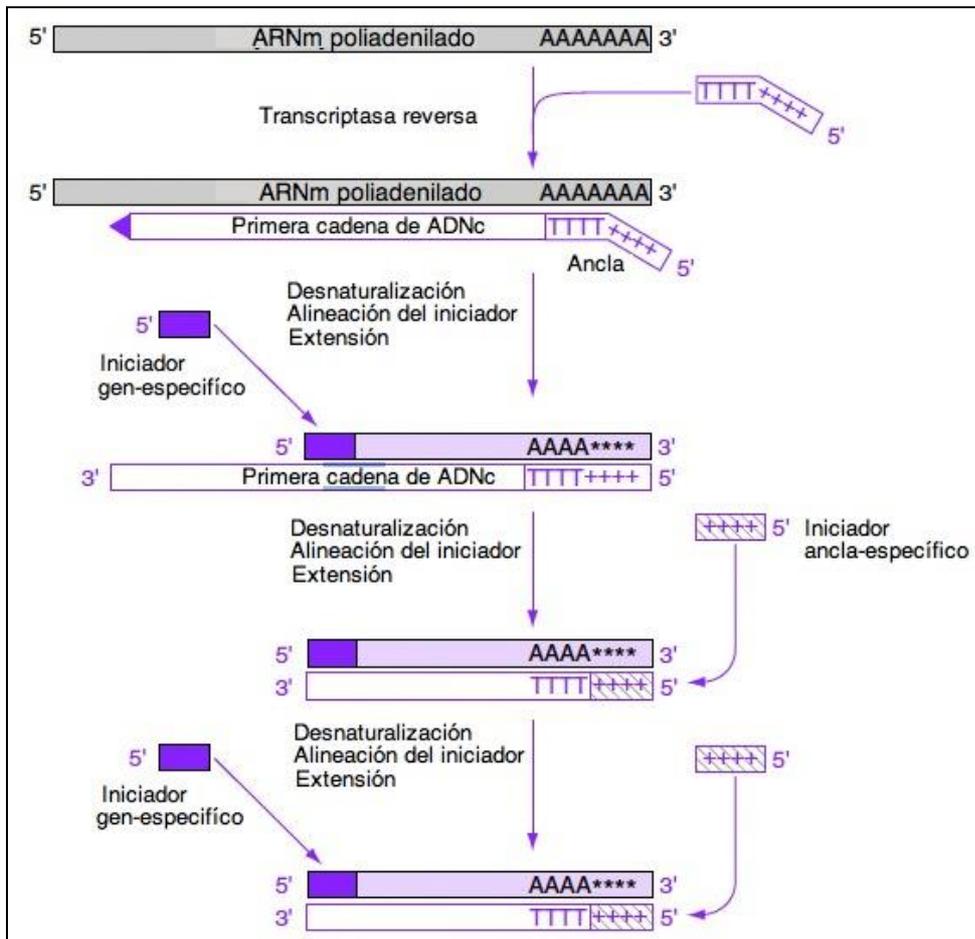


Figura 16. Esquema de 3' RACE.

Fuente: Dale y Von Schantz, 2002.

MATERIALES Y MÉTODOS

Al inicio de este trabajo se contaba con una secuencia parcial central de 543 nucleótidos del ADNc codificante del quimotripsinógeno II de sardina Monterey obtenida por Félix (2006) (figura 17). En la figura 18 se muestra la estrategia utilizada en la presente investigación para la obtención de los extremos 5' y 3' del quimotripsinógeno II. En base a la secuencia parcial reportada por Félix (2006) se diseñaron iniciadores (figura 19) para obtener las secuencias del inicio y fin de traducción del gen del quimotripsinógeno II de sardina Monterey mediante un protocolo 3' y 5' RACE (figura 20). Para realizar los protocolos 5' y 3' RACE se utilizó como templado el ADNc sintetizado por Anaya (2008) a partir de un banco de genes de ADNc preparado con ARN extraído de los ciegos pilóricos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*). La muestra se encontraba almacenada a - 80°C en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del CIAD Hermosillo hasta su uso. También se diseñó un iniciador RT-PCR para generar una nueva molécula de ADNc en caso de que la muestra de ADNc empleada se encontrara desnaturalizada, contaminada o no hubiera sido viable por cualquier otro motivo (figura 19; tabla 7).

```

Reverse Frame 3:

  1  G Y H F C G G S L I N E N W V V T A A H
  3  GGATACCACTTCTGTGGCGGCTCCCTGATTAACGAGAACTGGGTTGTTACTGCTGCCAC

21  C S V R T S H R V I V G E H D K G A S G
63  TGCAGTGTTAGAACCCAGCCACCGTGTGATCGTTGGAGAGCAGGATAAGGGTGCCTCCGGC

41  E A I Q T M R V S K V F T H P Q W N A Q
123 GAGGCCATCCAGACCATGAGAGTGTCTAAGGTGTTCACCCACCCTCAGTGGAAATGCTCAG

61  T I N N D I A L I R L T A P V Q M S A T
183 ACCATCAACAACGACATTGCCCTCATCAGGCTGACCGCTCCCGTCCAGATGAGCGCCACT

81  V S P V C L A E T S D E F A P G M T C V
243 GTGTCTCCTGTGTGCCTGGCTGAGACCAGCGATGAGTTCGCCCTGGAATGACCTGCGTG

101 T S G W G L L R S S A M F T P N Q L Q Q
303 ACCTCCGGCTGGGGTCTTCTGAGATCATCCGCTATGTTACCCCCAACCAGCTGCAGCAG

121 A A L P L L S K S Q C Q Q H W G S N I S
363 GCTGCCCTGCCTCTGCTGTCCAAAAGTCAGTGCCAGCAGCACTGGGGAGCAACATCTCC

141 D V M I C A G A S G V S S C M G D S G G
423 GACGTCATGATCTGCGCTGGTGCCTCTGGTGTCTCCTCTTGCATGGGTGACTCTGGTGGC

161 P L V C Q K N N V W T L V G V V S W G Y
483 CCCCTGGTGTGCCAGAAGAACAACGTCTGGACCCTGGTGGGTGTTGTGTCCTGGGGCTAT

181  G
543  GGAT

```

Figura 17. Secuencia parcial del quimotripsinógeno II establecida por Félix (2006).

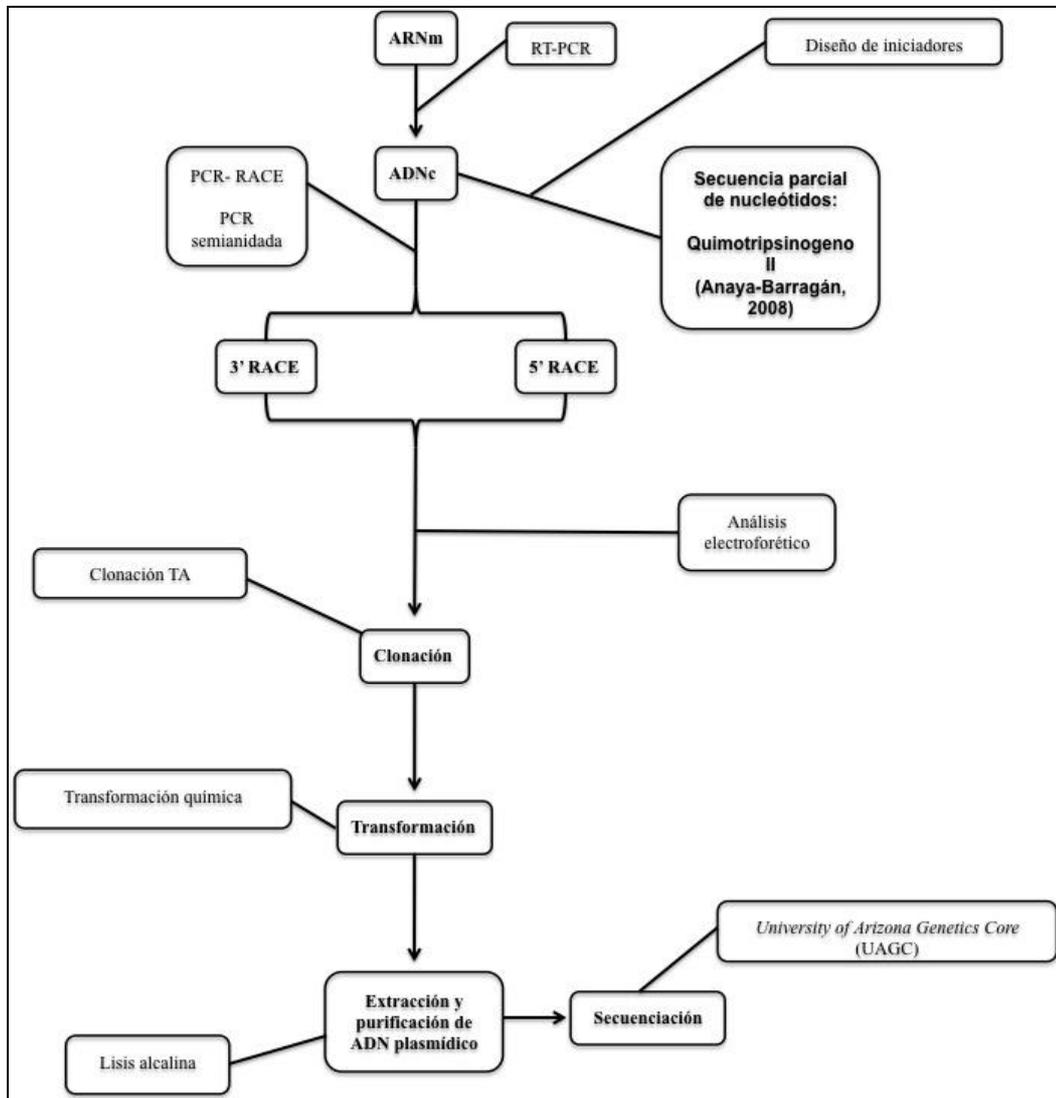


Figura 18. Diagrama de la metodología utilizada en el experimento.

Reactivos

Para todo los protocolos realizados se utilizaron reactivos de grado biología molecular, la polimerasa Platinum® Taq DNA Polymerase, las células de *Escherichia coli* (*E. coli*) químicamente competentes TOP 10 y el kit de clonación TOPO TA Cloning® fueron adquiridos de Invitrogen Life Technologies™, mientras que la agarosa fue adquirida de Sigma-Aldrich®.

Diseño de los Iniciadores Gen Específicos

Para realizar los protocolos RACE, se diseñaron dos iniciadores reversos, dos *forward* y un iniciador para RT-PCR (figura 19; tabla 8), éste último para que en caso de que la muestra de ADNc, se encontrara desnaturalizada, contaminada o no hubiera sido viable por cualquier otro motivo se pudieran obtener dos moléculas de ADNc del quimotripsinógeno II. Las moléculas de ADNc recién sintetizado se hubieran obtenido a partir de ARNm de ciegos pilóricos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) mediante PCR de transcripción reversa (RT-PCR) y posteriormente también se hubieran sometido a un protocolo 5' y 3' RACE. Los iniciadores fueron diseñados a partir de la región parcial conocida del quimotripsinógeno II reportada previamente por Félix (2006).

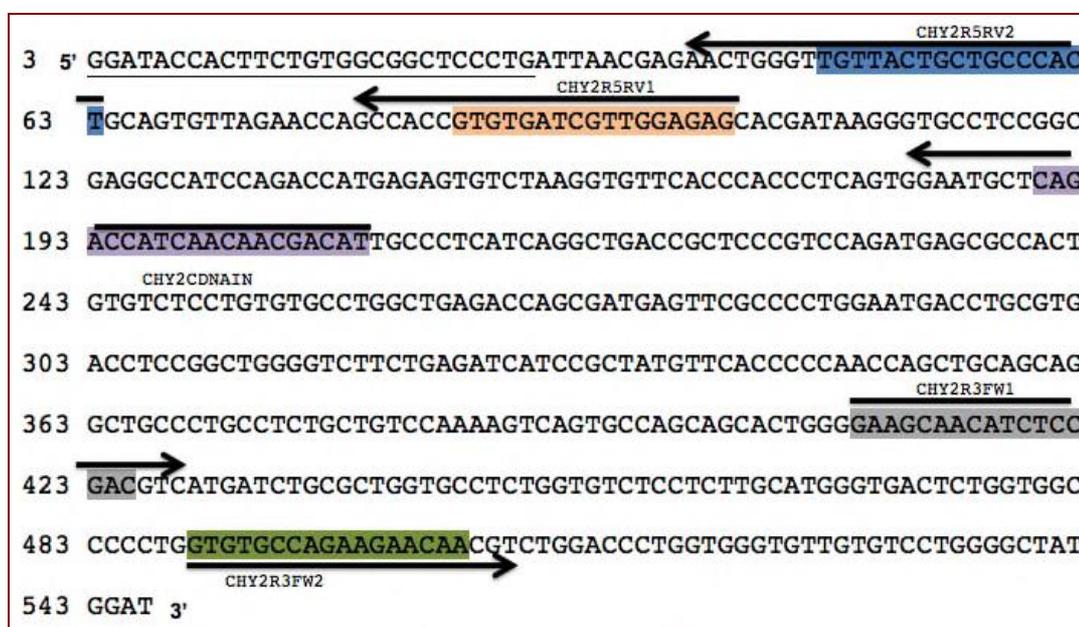


Figura 19. Iniciadores diseñados para la obtención del gen codificante del quimotripsinógeno II de sardina Monterey.

Tabla 7. Propiedades de los iniciadores diseñados para 5' y 3' RACE.

Nombre	Secuencia	Bases	Peso molecular (gr/mol)	% ^a GC	Tm °C ^b (50 mM NaCl)
CHY2R3FW1	5'- GAA GCA ACA TCT CCG AC -3'	17	5184.4	52.9	50.4
CHY2R3FW2	5'- GTG TGC CAG AAG AAC AA -3'	17	5252.5	47.0	49.8
CHY2R5RV1	5'- CTC TCC AAC GAT CAC AC -3'	17	5059.3	52.9	49.7
CHY2R5RV2	5'- AGT GGG CAG CAG TAA CA -3'	17	5268.5	52.9	53.8
CHY2CDNAIN	5'- ATG TCG TTG TTG ATG GTC TG -3'	20	6185.0	45%	52.9

^a %GC = Contenido de guanina y citosina.

^b Tm = Temperatura de hibridación.

Obtención del Extremo 3' del Gen Codificante del Quimotripsinógeno II de Sardina Monterey: 3' RACE

Para la obtención del extremo 3' del ARNm se utilizó como templado la muestra de ADNc sintetizada por Anaya (2008), la cual se obtuvo utilizando el *kit* de construcción de bibliotecas de ADNc (*SMART*[™]). Este sistema proporcionó una secuencia de anclaje cuando inició la transcripción. Para el protocolo 3' RACE se utilizaron los iniciadores CHY2R3FW1, CHY2R3FW2 y 3' *SMART*. El iniciador 3' *SMART* es complementario a la secuencia de anclaje proporcionada por el iniciador oligo-dT del *kit SMART*[™] (*CDS III/3' PCR Primer*) que se utilizó para la síntesis del ADNc obtenido por Anaya (2008).

En el protocolo 3' RACE a seguir la primera amplificación por PCR se obtuvo utilizando los iniciadores CHY2R3FW1 y 3' *SMART*. El iniciador CHY2R3FW1 se encuentra diseñado para hibridar en una región ubicada en el centro del ADNc. La molécula de ADNc

en su extremo 3' final contiene la secuencia de anclaje proporcionado por el iniciador oligo-dT cuando se realizó la síntesis de la primera hebra, por lo que el iniciador 3' *SMART* es complementario a esta secuencia. Una vez obtenido el producto amplificado por estos iniciadores, la reacción se utilizó como templado en una segunda reacción de PCR semianidada, con los iniciadores CHY2R3FW2 (un iniciador diseñado para hibridar más hacia el extremo 3' en la molécula de ADNc obtenida) y de nuevo el iniciador 3' *SMART*. Para la reacción de PCR semianidada posterior el iniciador CHY2R3FW2 está diseñado para hibridarse más hacia el extremo 3' de la molécula templado que resultó de los iniciadores CHY2R3FW1 y el iniciador 3' *SMART*.

Las mezclas de reacción de los protocolos 3' RACE, se amplificaron en un termociclador TC-5000 de TECHNE Inc. Las composición de las mezclas de reacción de los protocolos 3' RACE se pueden observar en la tabla 8. Los programas para los protocolos 3' RACE utilizados por el termociclador comenzaron con un precalentamiento de la tapa a 105°C y una fase de desnaturalización inicial (94°C por 5 minutos). Después siguieron 35 ciclos que consintieron en una desnaturalización (94°C por 60 segundos), después la alineación (52°C por 30 segundos, tanto para el 1º PCR como para el 2º semianidado), luego una extensión (72°C por 60 segundos) y finalizó con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Tabla 8. Composición de la mezcla de reacción de PCR para los protocolos 3' y 5' RACE.

Componente	Volumen	Concentración final
Agua mQ	18.5	-
PCR <i>buffer</i> , Minus Mg 10X	2.5 µL	1X
dNTP'S 10 mM	1 µL	400 µM
50 mM MgCl ₂	0.8 µL	1.6 mM
Iniciador reverso 20 µM	0.5 µL	400 µM
Iniciador <i>forward</i> 20 µM	0.5 µL	400 µM
ADNc templado	1 µL	-
Platinum® Taq ADN	0.2 µL	1.0 U
Polimerasa		
Volumen total	25 µL	

Obtención del Extremo 5' del Gen Codificante del Quimotripsinógeno II de Sardina Monterey; 5' RACE

Para el protocolo 5' RACE se utilizó también el ADNc obtenido por Anaya (2008), en el cual al momento de ser sintetizada la primera cadena se le añadió una cola (dC) mediante RT. En el presente trabajo se llevaron a cabo dos protocolos RACE, uno utilizó iniciadores degenerados de quimotripsinógenos (CHYRV1 Y CHYFW1) y el otro utilizó para la primera amplificación el iniciador gen específico reverso CHY2R5RV1 y el iniciador 5' *SMART*. Después se hizo un PCR semianidado utilizando de nuevo el iniciador 5' *SMART* y el iniciador reverso CHY2R5RV2.

El iniciador 5' *SMART* está diseñado para hibridarse en una secuencia conocida cercana a la cola (dC) situada en el extremo del ADNc, la cual fue proporcionada por el iniciador *SMART IV* cuando se sintetizó el ADNc. El iniciador CHY2R5RV1 es un iniciador gen específico diseñado para hibridar en una región cercana al extremo 5' del gen, y el iniciador CHY2R5RV2 se diseñó para hibridar en una región más cercana al extremo 5' que la región de donde partió iniciador CHY2R5RV1. De esta manera con un PCR semianidado el producto amplificado se vuelve más específico en la segunda reacción y se incrementa la posibilidad amplificar la molécula de ADNc deseada hasta el extremo 5' final. La secuencia de esta molécula amplificada revelará la posición precisa del inicio de la traducción del gen.

Las mezclas de reacción de los protocolos 5' RACE, se amplificaron en un termociclador TC-5000 de TECHNE Inc. Las composición de las mezclas de reacción de los protocolos 5' RACE se pueden observar en la tabla 8. Los programas para los protocolo 5' RACE utilizados por el termociclador comenzaron con un precalentamiento de la tapa a 105°C y una fase de desnaturalización inicial (94°C por 5 minutos). Después siguieron 35 ciclos que consintieron en una desnaturalización (94°C por 60 segundos), después la alineación (50°C por 30 segundos, tanto para el PCR con iniciadores degenerados como para el 1º PCR y el 2º semianidado con iniciadores gen específicos), luego una extensión (72°C por 60 segundos) y concluyó con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

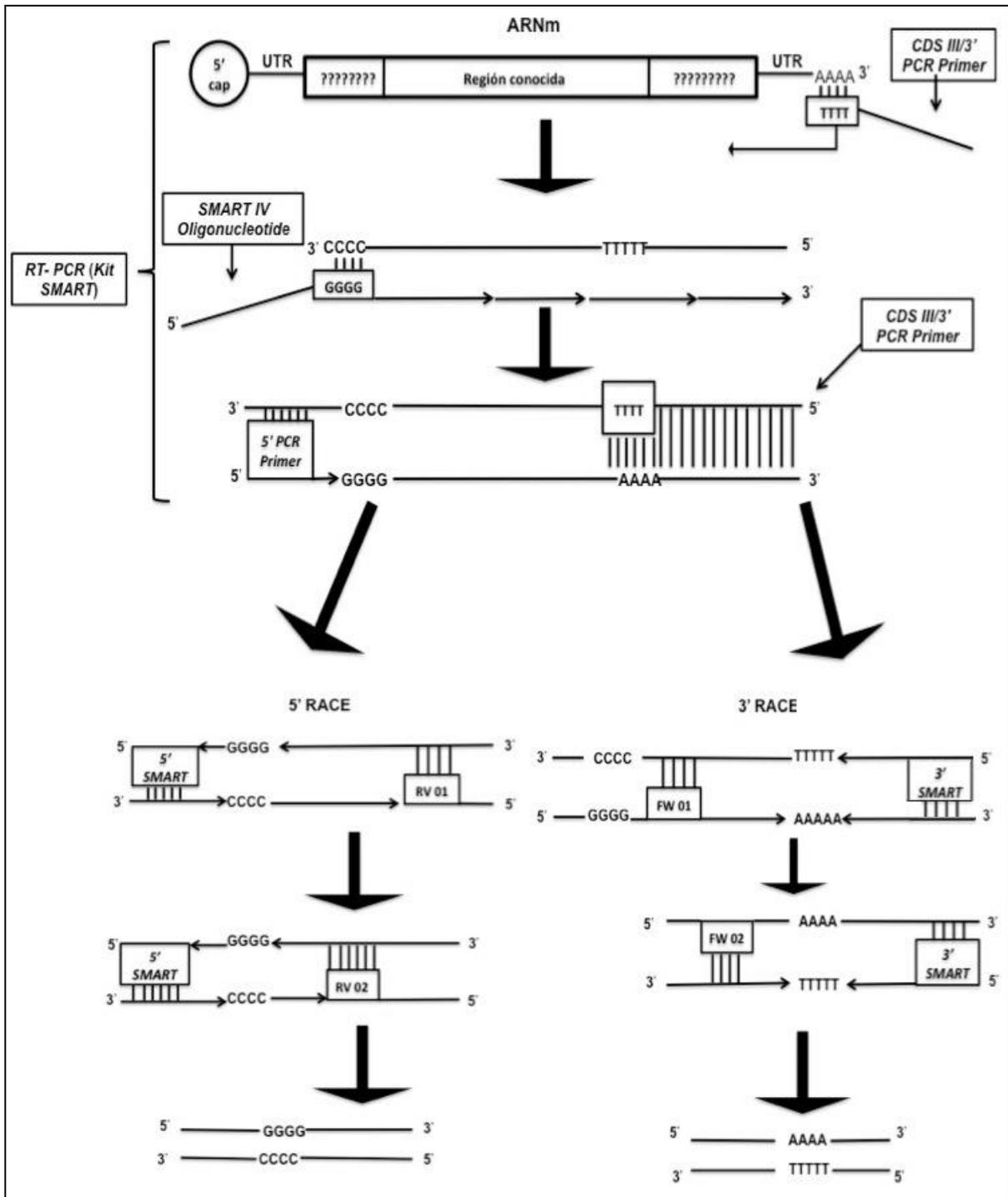


Figura 20. Diagrama de la metodología a seguir para la obtención de los extremos 5' y 3' del ADNc.

Análisis Electroforético

Todos los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% preteñido con *SYBR® Safe DNA Gel Stain* a una concentración 0.02 µL/mL, utilizando como solución de corrida *buffer* TAE (40 mM Tris-Acetato, 1mM de EDTA, pH 8.0). Tanto los productos de amplificación 3' como los 5' RACE se sometieron análisis electroforético para conocer el tamaño de los productos amplificados, y si estos concordaban al tamaño esperado proceder a clonarlos. Asimismo, se realizó un análisis electroforético del ADN plasmídico de las colonias transformadas, para conocer el tamaño del producto insertado en el vector y de igual manera si estos coincidían al tamaño esperado proceder a realizar la extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina con dodecilsulfato sódico (SDS) conocido como minipreparación de lisis alcalina.

Los pozos de los geles corridos para analizar los protocolos 5' y 3' RACE se cargaron con 8 µL de reacción por 1 µL de *buffer* carga tipo III (0.25% (p/v) azul de bromofenol, 0.25% (p/v) xileno cianol FF, 30% (v/v) glicerol en H₂O) y los pozos de los geles corridos para analizar los amplicones de los PCR de colonia se cargaron con 7 µL de reacción por 0.7 µL de *buffer* carga tipo III. El voltaje de corrida fue de 80 V y se dejó correr por 35 minutos. Una vez terminada la electroforesis se procedió a visualizar el gel bajo la luz ultravioleta y se fotografió usando una cámara digital Kodak.

Clonación del ADNc Bicatenario

Los extremos 3' y 5' del ADNc codificante del quimotripsinógeno II se clonaron utilizando el vector pCR[®]2.1-TOPO[®]. Para clonar estos fragmentos, el método TOPO TA necesitó un residuo 3'-A final desapareado en el producto de PCR a clonar, la cual es añadida normalmente por una *Taq* polimerasa. El vector pCR[®]2.1-TOPO[®] es un plásmido linealizado que contiene un único residuo 3'-T "voladiza" que es compatible con la 3'-A desapareada en el producto de PCR. La ligación es posible debido a la atracción por complementariedad de las dos bases (A-T) que producen un extremo cohesivo muy corto, pero suficientemente estable para formar posteriormente una ligadura muy eficiente, valiéndose de la enzima topoisomerasa de ADN I del virus *Vaccinia* (TOPO). La enzima topoisomerasa se encuentra unida covalentemente a los grupos fosfato en los extremos 3' del vector linealizado y para

llevar a cabo la reacción de ligación transfiere los enlaces fosfato a los extremos el 5' del fragmento, logrando de esta manera la inserción del fragmento al vector.

Para llevar a cabo la reacción de ligación, la topoisomerasa I del virus de *Vaccinia* se une al ADN de cadena doble en sitios específicos, y rompe la columna fosfodiéster después del 5'-CCCTT en una hebra. La energía procedente de la ruptura de la columna fosfodiéster se conserva mediante la formación de un enlace covalente entre el 3'-fosfato de la hebra escindida y un residuo tirosil (Tyr-274) de la topoisomerasa I. El enlace fosfo-tirosil entre el ADN y la enzima posteriormente puede ser atacado por la 5'-hidroxilo de la hebra escindida originalmente, logrando invertir la reacción y liberando la topoisomerasa.

El vector PCR® 2.1-TOPO® consta de 3931 nucleótidos y para facilitar la selección de las bacterias transformadas de interés contiene un fragmento *LacZ α* , como sitio de inactivación insercional, además contiene como marcador seleccionable un marco abierto de lectura de resistencia a la kanamicina y un marco abierto de lectura de resistencia a la ampicilina y como sitio para el inicio de la replicación un origen f1 y un origen pUC.

La mezcla de reacción de clonación tanto para el producto 3' RACE como para el producto 5' RACE fue la siguiente: 3 μ L del producto de PCR RACE fresco, 1 μ L de solución salina (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂), 1 μ L de vector pCR® 2.1-TOPO® y 1 μ L de agua mQ. La mezcla se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se almacenó en congelación a -20°C.

Transformación Bacteriana

Para multiplicar los productos 3' y 5' RACE ligados con anterioridad, el plásmido recombinante se utilizó para transformar bacterias químicamente competentes de *E. coli*. Este proceso se fundamenta en someter a un choque térmico a las células para que estas capturen el ADN exógeno. Las células químicamente competentes de *E. coli* son altamente sensibles a los cambios de temperatura y a la lisis mecánica causada por el pipeteado, por lo que hay que ser extremadamente cuidadoso al trabajar con ellas.

Para llevar a cabo el protocolo de transformación, las reacciones de clonación de los productos 3' y 5' RACE fueron descongeladas, después se centrifugaron y se tomó una alícuota de 2 μ L para cada reacción. Esta cantidad se añadió a un vial que contenía 50 μ L de células químicamente competentes de *E. coli*. Las mezclas se colocaron en hielo por 30

minutos, seguido de un baño maría a 42°C por 30 segundos. Pasados los 30 segundos, inmediatamente se enfriaron en hielo por 2 minutos. Posteriormente, se agregaron 250 µL de medio S.O.C. (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) y se incubó en agitación durante 1 hora a 37°C a 250 rpm. Finalmente, se sembraron 3 placas para cada vial de células, cada una con 50 µL, 100 µL y 150 µL del medio S.O.C donde se realizó la transformación. Las placas contenían medio LB Amp (*Lysogeny broth* con 1.5% de bacto agar y 100 µg/mL de ampicilina) y se incubaron por 18 horas a 37°C.

Extracción de ADN Plasmídico

De las 9 placas con bacterias transformadas con los productos 5' y 3' RACE (3 placas con bacterias transformadas con el producto de PCR 5' RACE amplificado con los iniciadores degenerados, 3 placas con bacterias transformadas con el producto de PCR 5' RACE amplificado con los iniciadores gen específicos y 3 placas con bacterias transformadas con el producto de PCR 3' RACE amplificado con los iniciadores gen específicos), se seleccionaron 10 colonias aisladas de cada juego de placas. Todas las colonias fueron resembradas en una placa réplica y se colocó a cada una en un microtubo con 50 µL de agua mili-Q (mQ). Las células de *E. coli* contenidas en los microtubos se sometieron a lisis en un termociclador mediante un programa que consistió en un precalentamiento de la tapa a 105°C y una desnaturalización a 94°C por 5 minutos.

Una vez finalizado dicho programa se realizó un PCR de colonias usando las mismas condiciones de los protocolos RACE. Posteriormente se realizó un análisis electroforético para confirmar que los fragmentos se hubieran clonado correctamente. En base a este análisis las colonias positivas se seleccionaron de las placas réplicas. Las colonias se inocularon en 5 mL de caldo LB estéril (*Lysogeny broth*) + Ampicilina (100 µg por mL) a 37°C por 18 horas con agitación (225 rpm). Las composición de las mezclas de reacción para los PCR de colonias se pueden observar en la tabla 9.

Tabla 9. Composición de la mezcla de reacción para los PCR de colonias.

Componente	Volumen	Concentración final
Agua mQ	11.5	-
PCR <i>buffer</i> , Minus Mg 10X	2.0 μ L	1X
dNTP'S 10 mM	0.8 μ L	400 μ M
50 mM MgCl ₂	0.7 μ L	1.7 mM
Iniciador reverso 20 μ M	0.4 μ L	400 μ M
Iniciador <i>forward</i> 20 μ M	0.4 μ L	400 μ M
ADNc templado	4 μ L	-
Platinum® Taq ADN Polimerasa	0.8 μ L	1.0 U
Volumen total	20.6 μL	

El ADN plasmídico de las colonias se extrajo y purificó utilizando el método de minipreparación de lisis alcalina (Sambrook y Rusell, 2011). Este protocolo permite lisar las bacterias de *E. coli* utilizando el detergente SDS para liberar el ADN plasmídico. Para aislar el ADN plasmídico se tomo una alícuota de 1.5 mL del caldo con los cultivos de las colonias (caldo LB estéril + Ampicilina), se transfirió cada una a un microtubo y se centrifugaron a 10,000 xg por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en 250 μ L de solución I (50mM glucosa, 25mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0), homogenizando la mezcla con un vortex. Esta solución por su naturaleza isotónica, debido a la glucosa, evita el estallamiento de las células manteniendo la presión osmótica. La función del Tris es mantener las células a pH 8, mientras que el EDTA debilita la membrana celular, ya que por su naturaleza quelante, une los cationes divalentes en la capa lipídica antes de la lisis y después de la lisis une los iones Mg⁺² limitando así la degradación del ADN, ya que las nucleasas bacterianas requieren de estos como cofactor.

Posteriormente, se agregaron a los microtubos 250 μ L de solución II recién preparada (0.2 N NaOH, 1% p/v SDS), se mezcló por inversión 5 veces y se incubó en hielo hasta que se aclaró (10 minutos). Estas suspensiones bacterianas al contener SDS (un detergente aniónico fuerte) y estar a pH alto tienen la capacidad de romper las membranas celulares, desnaturalizar el ADN cromosómico y proteínas, y liberar el ADN plasmídico en el sobrenadante. Aunque la solución alcalina trastorna por completo el apareamiento de bases, los filamentos de ADN plásmido circular cerrado no son capaces de separarse unos de otros

porque están topológicamente entrelazados. Mientras la intensidad y la duración de la exposición a OH⁻ no sea demasiado grande, las dos hebras de ADN del plásmido nuevamente aparean sus bases cuando el pH se devuelve a la neutralidad (Sambrook y Rusell, 2011).

Durante el procedimiento de lisis, se forman grandes complejos recubiertos con SDS que contuvieron a las proteínas bacterianas, las membranas celulares rotas y el ADN cromosómico desnaturalizado. Posteriormente se adicionaron 250 µL de solución III fría (Solución 3 molar con respecto al potasio y 5 molar con respecto al acetato), se mezcló por inversión e incubó de nuevo en hielo por 5 minutos. Pasados los 5 minutos los complejos formados durante la lisis fueron precipitados de la solución cuando se remplazaron los iones sodio por iones potasio, además el cambio de pH como se mencionó anteriormente permitió la reunificación del ADN plasmídico por puentes de hidrógeno.

El material desnaturalizado se eliminó por centrifugación y el ADN plasmídico nativo se recuperó del sobrenadante. Para ello se sometieron las mezclas a 12,000 xg por 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron los sobrenadantes a nuevos microtubos a los cual se le añadieron 500 µL de isopropanol a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 xg por 30 minutos. Se eliminaron los sobrenadantes por decantación cuidando no perder el pellet de ADN y éste se lavó dos veces con etanol frío al 70% centrifugándolo a 12,000 xg por 3 minutos y removiendo el etanol entre cada lavado. El producto final (como pellet de ADN) se resuspendió en 50 µL de agua estéril y se almacenó a - 20°C. Posteriormente, el producto final se sometió a PCR utilizando los iniciadores M13 los cuales están diseñados para hibridar específicamente en una región del vector que se utilizó durante el protocolo de clonación. Finalmente se realizó un posterior análisis electroforético en gel de agarosa, para confirmar la calidad de la extracción y el pellet de ADN que se suspendió en agua estéril fue secuenciado.

Secuenciación y Análisis de los Fragmentos Clonados

Las muestras de ADN plasmídico con los extremos 5' y 3' clonados fueron secuenciados por el *University of Arizona Genetics Core* (UAGC) de la Universidad de Arizona. Las secuencias obtenidas de estos extremos fueron comparadas con la región conocida del centro del gen reportada previamente por Anaya (2008) para encontrar las regiones empalmadas y deducir el gen completo. Como primer paso una vez localizados los iniciadores, los sitios de restricción del vector y sobrepuesto las regiones empalmadas, las

secuencias de los extremos obtenidos se sometieron a un análisis de marco de lectura y se tradujeron a aminoácidos. Posteriormente, estas secuencias se sometieron a una búsqueda de alineamiento local básico (*protein blast*) (Altschul y col., 1990) para comparar la secuencia obtenida con las secuencias de proteínas de especies registradas en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Una vez obtenidos los resultados, si estos mostraban un elevado porcentaje de coincidencia ya sea con la enzima o con la familia de la enzima de interés, se prosigió a empalmar las regiones de los extremos recién descubiertas con la región central conocida obtenida por Anaya (2008) para de nuevo realizar un análisis *protein blast*, pero ahora con una región del gen más completa. Finalmente, se realizó un análisis de alineamiento de secuencias múltiples (*ClustalW2*) (Larkin y col., 2007) tanto de la última secuencia sometida a *protein blast* como también de las secuencias de los genes completos de diversas especies que se obtuvieron también en dicho *protein blast*, para alinear las secuencias y mostrar las regiones conservadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación, Clonación y Transformación del Extremo 3'

Los productos tanto del primer PCR 3' RACE como del PCR semianidado subsecuente, después de un análisis electroforético, arrojaron una banda a los 400 pb. La banda de la reacción de la reacción semianidada fue de mayor intensidad lo cual puede deberse a que esta reacción fue de mayor especificidad, puesto que al usar como templado la primera reacción, para la segunda amplificación, hubo una gran cantidad de material genético específico donde hibridar, pues el primer iniciador dejó un región específica para el segundo cuando realizó la amplificación. Posteriormente, cuando se clonó el producto del PCR semianidado y se transformaron las bacterias, hubo buen crecimiento en el medio LB Amp, lo cual indica que gran cantidad de bacterias captaron el plásmido. Se seleccionaron 10 colonias aisladas de las 3 placas sembradas para ser inoculadas en una palca réplica y colocadas en un microtubo con 50 μ L de agua mQ, las cuales después de lisarlas y someterlas a un PCR de colonias con los iniciadores específicos CHY2R3FW1 y CHY2R3FW2, todas excepto la 7 mostraron una banda a los 400 pb (figura 21). La colonia 1 y la 6 fueron las que mostraron las bandas más intensas, por lo que fueron estas ultimas colonias a las que se les extrajo y purificó al ADN plasmídico para ser secuenciado.

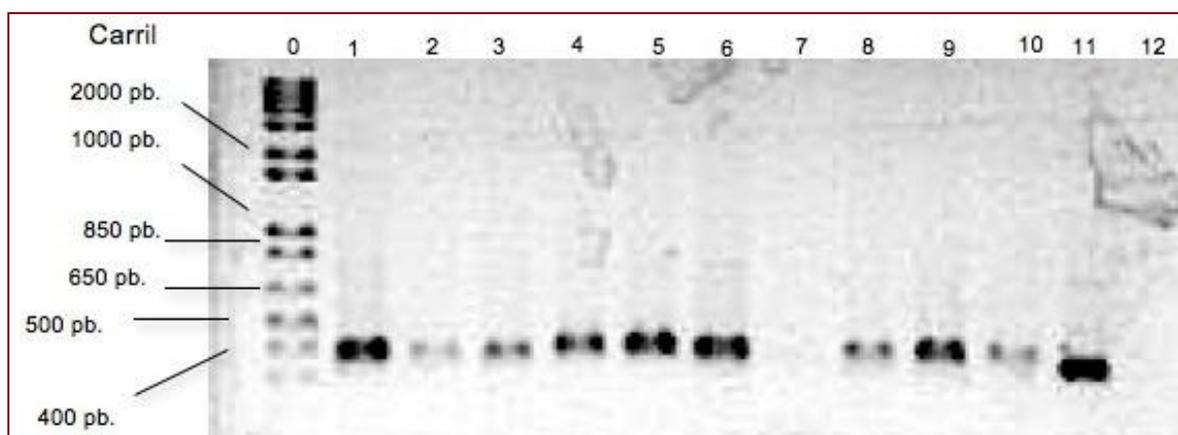


Figura 21. Análisis electroforético del PCR colonial de bacterias transformadas con el producto de clonación del protocolo 3' RACE. Carril 0: Marcador de P.M. Carril 2-11: ADN plasmídico amplificado con iniciadores gen específicos CHY2R3FW1, CHY2R3FW2. Carril 12 y 13: Control positivo y negativo.

Amplificación, Clonación y Transformación del Extremo 5'

El producto del primer protocolo 5' RACE donde se utilizó solo una reacción de PCR con los iniciadores degenerados, arrojó después de un análisis electroforético una banda aproximadamente a los 450 pb. Mientras que el producto del otro protocolo 5' RACE que utilizó 2 reacciones de PCR (un 1º PCR con iniciador gen específico *reverse* y un 2º PCR semianidado subsecuente utilizando otro iniciador gen específico *reverse*), mostró una banda aproximadamente a los 300 pb. Cuando se procedió a clonar el producto del PCR semianidado y el producto amplificado con iniciadores degenerados y se transformaron las bacterias empleadas hubo también buen crecimiento en las 6 placas con medio LB Amp. Durante el análisis electroforético del PCR de las 10 colonias seleccionadas transformadas con el plásmido recombinante donde se ligó el producto de los iniciadores gen específicos CHY2R5RV1 y CHY2R5RV2, se observó que la colonia 1 presentaba un barrido a una altura aproximada a los 300 pb con una banda más intensa a la altura de los 200 pb; la colonia 2 presentó una banda intensa ligeramente más abajo; y la colonia 9 mostró una banda muy tenue a los 100 pb; por lo que se seleccionaron estas 3 colonias para la extracción y purificación del ADN plasmídico.

De las otras 10 colonias seleccionadas transformadas con el plásmido recombinante donde se ligó el producto de los iniciadores degenerados CHYRV1 Y CHYFW1, se observó que las colonias 2 y 4 presentaban una banda a los 450 pb. Los productos finales de la extracción por el método de lisis alcalina (pellet de ADN suspendido en agua estéril) después de someterse a un análisis electroforético usando los iniciadores M13 *forward* y M13 *reverse* arrojaron una banda a los 650 pb, para la extracción del ADN plasmídico de las 2 colonias transformadas con el plásmido recombinante donde se ligó el producto de los iniciadores degenerados CHYRV1 Y CHYFW1 y una banda a los 400 pb para la colonia 1, a los 350 pb para la colonia 2 y a los 300 pb para la colonia 9 (estas 3 colonias fueron transformadas con el plásmido recombinante donde se ligó el producto de los iniciadores gen específicos CHY2R5RV1 y CHY2R5RV2. Estas bandas fueron de mayor tamaño debido a que las regiones donde hibridan los iniciadores M13 se encuentran más allá del sitio de restricción en donde se une el fragmento clonado (figura 22).

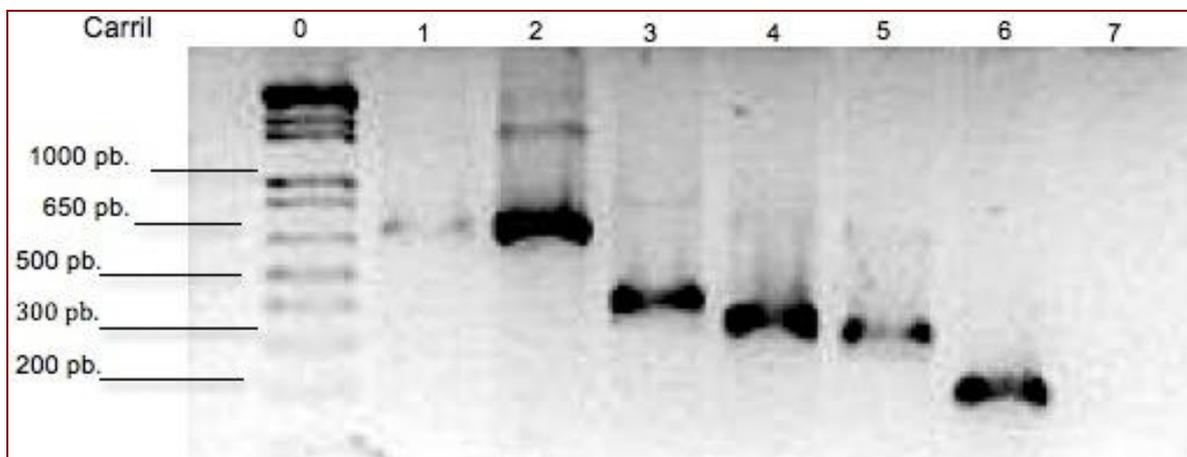


Figura 22. Análisis electroforético del PCR colonial de bacterias transformadas con el producto de clonación de los protocolos 5' RACE y amplificadas con los Iniciadores M13. Carril 0: Marcador de P.M. Carril 2-3: ADN plasmídico proveniente de bacterias transformadas con el con el plásmido recombinante donde se ligó el producto de los iniciadores degenerados CHYRV1 Y CHYFW1. Carril 4-6: ADN plasmídico proveniente de bacterias transformadas con el plásmido recombinante donde se ligó el producto de los iniciadores gen específicos CHY2R5RV1 y CHY2R5RV2. Carril 6 y 7: Control positivo y negativo.

Traslape del Extremo 3' Obtenido con la Región Central Parcial Conocida

Durante el traslape del extremo 3' obtenido con la región central parcial conocida se observó una discrepancia en los resultados para el nucleótido número 523 mostrado en azul en la figura 23. El resultado de la secuenciación de la región parcial de donde se diseñaron los iniciadores reportado por Anaya (2008) arrojó una guanina para dicha posición, lo que discrepaba al resultado de la secuenciación del extremo 3' recién obtenido donde se mostraba una adenina (figura 23). Se optó por seleccionar adenina una vez que se dedujo el gen (aminoácido 550 mostrado en azul, figura 25). La selección de adenina en vez de guanina se debió a dos factores.

Una vez traducidos los codones de las secuencias a sus respectivos aminoácidos, el codón que contenía guanina se traducía para una valina (figura 23), mientras que si el codón contenía adenina se traducía para una isoleucina. Se realizó un análisis donde se comparaban tanto las secuencias de quimotripsinógenos II de especies marinas como de especies mesofílicas con el quimotripsinógeno II de sardina Monterey. En dicho análisis se observó que para todas las especies que se incluyeron, incluyendo *Sardinops melanostictus*

(GenBank: BAM62884.1), la cual arrojó un 99% tanto de identidad como de similitud, la región en cuestión era una región conservada donde el aminoácido para dicha posición resultaba ser una adenina y el codón que formaba se traducía a una isoleucina. Además la región en cuestión correspondía a un extremo de la región parcial reportada por Anaya (2008) y se sabe que los análisis de secuenciación pierden sensibilidad hacia los extremos. Sin embargo hacen falta estudios posteriores de secuenciación para confirmar la presencia de adenina en vez de guanina para la especie *Sardinops sagax caerulea*.

Región Conocida	G Y H F C G G S L I N E N W V V T A A H	20
	<u>GGATACCACCTTCTGTGGCGGCTCCCTGATTAACGAGAAGTGGGTGTTACTGCTGCCAC</u>	60
Región Conocida	C S V R T S H R V I V G E H D K G A S G	40
	<u>TGCAGTGTTAGAACCAGCCACCGTGTGATCGTTGGAGAGCACGATAAGGGTGCCTCCGGC</u>	120
Región Conocida	E A I Q T M R V S K V F T H P Q W N A Q	60
	<u>GAGGCCATCCAGACCATGAGAGTGTCTAAGGTGTTCAACCACCTCAGTGAATGCTCAG</u>	180
Región Conocida	T I N N D I A L I R L T A P V Q M S A T	80
	<u>ACCATCAACAACGACATTGCCCTCATCAGGCTGACCGCTCCCGTCCAGATGAGCGCCACT</u>	240
Región Conocida	V S P V C L A E T S D E F A P G M T C V	100
	<u>GTGTCTCCTGTGTGCCTGGCTGAGACCAGCGATGAGTTCGCCCCCTGGAATGACCTGCGTG</u>	300
Región Conocida	T S G W G L L R S S A M F T P N Q L Q Q	120
	<u>ACCTCCGGCTGGGGTCTTCTGAGATCATCCGCTATGTTCAACCCCAACCAGCTGCAGCAG</u>	360
Región Conocida	A A L P L L S K S Q C Q Q H W G S N I S	140
	<u>GCTGCCCTGCCTCTGCTGTCCAAAAGTCAGTGCCAGCAGCACTGGGGAAGCAACATCTCC</u>	420
Región Conocida	D V M I C A G A S G V S S C M G D S G G	160
	<u>GACGTCATGATCTGCGCTGGTGCCTCTGGTGTCTCCTCTGCATGGGTGACTCTGGTGCC</u>	480
Región Conocida	P L V C Q K N N V W T L V G V S W G S	180
	<u>CCCCTGGTGTGCCAGAAGAACAACGCTCTGGACCCTGGTGGGTGTTGTCTCTGGGG</u>	
Región descubierta	AACGCTGGACCCTGGTGGGTATTGTCTCTGGGGTAGC	540
	*****.*****	
Región descubierta	S T C S T S T P A V Y A R V T M L R S W	200
	<u>AGCACTTGCTCCACCTCCACCCCTGCCGTGTACGCCCGTGCACCATGCTCCGTAGCTGG</u>	600
Región descubierta	V D Q T L A A N -	208
	<u>GTGGACCAGACCCTGGCTGCCAACTAAATGGAAGTGACAGTGTCAACTTAAAGCCAACCTC</u>	660
Región descubierta	ATGTCACGCAAATGACAAATATCTCACCCTGTATATACTACTGTGGGAAATGCCCTGTCA	720
Región descubierta	GTTGCACAATGAATTTAACACCTTTCTGTGTATGTCTGAAATGAACTCTCATTTCATCAC	780
Región descubierta	AATAAAAACAGTGACATCCGCAAAATAATCAGAAAAAAAAAAAAA	827
<p>== Región central parcial conocida</p> <p>== Avance en el extremo 3' utilizando los iniciadores gen específicos</p> <p>*** Sitio donde se empalman el resultado de la secuenciación con la región central parcial conocida.</p>		

Figura 23. Traslapo del extremo 3' obtenido con la región central parcial conocida.

Traslape del Extremo 5' Obtenido con la Región Central Parcial Conocida

Durante el empalme del extremo 5' obtenido con la región central conocida parcialmente, también se observó una discrepancia en un nucleótido (nucleótido número 501, figura 24). En el resultado de la secuenciación del extremo 5' el nucleótido correspondía a una citosina, mientras que el resultado de la secuenciación de la región parcial reportada por Anaya (2008) correspondía a una timina. Cabe mencionar que a diferencia de la discrepancia mencionada anteriormente, cuando se hacía la traducción de las secuencias a aminoácidos el codón formado se traducía para una serina independientemente de si al nucleótido en cuestión era una citosina o una timina.

También es importante mencionar que la región donde se encuentra dicho aminoácido es una región conservada. Todas las especies analizadas presentan serina en la posición mencionada, pero difieren en que las especies *Sardinops melanostictus* (GenBank: BAM62884.1), que es la que presenta mayor grado de identidad (99%), *Pagrus major* (GenBank: BAL14141.1), *Danio rerio* (NCBI Reference Sequence: NP_001017724.1), y *Thunnus orientalis* (GenBank: BAL14137.1), presentan timina mientras que *Salmo salar* (NCBI Reference Sequence: NP_001134565.1) y *Gadus morhua* (GenBank: CAB43766.1) presentan una citosina.

En el ensamblado del gen codificante del quimotripsinógeno II se optó por colocar una timina (figura 25) ya que la mayoría de las especies y la especie más parecida a la sardina Monterey también presentaban dicho nucleótido en la región en cuestión, pero se requieren más estudios de secuenciación para confirmar un solo nucleótido.

Región descubierta	W Q V S L Q D W S G F H F C G G S L I N	20
Región Conocida	<u>TGGCAGGTGTCACTGCAGGATTGGTCTGGCTTCCACTTCTGCGGAGGCTCCCTGATTAAC</u>	60
	GGCTCCCTGATTAAC	*****
Región descubierta	E N W V V T A A H C S V R T S H R V I V	40
Región Conocida	GAGAACTGGGTTGTTACTGCTGCCACTGCAGTGTTAGAACCAGCCACCGTGTGATCGTT	120
	GAGAACTGGGTTGTTACTGCTGCCACTGCAGTGTTAGAACCAGCCACCGTGTGATCGTT	*****
Región descubierta	G E H D K G A S G E A I Q T M R V S K V	60
Región Conocida	GGAGAGCACGATAAGGGTGCCTCCGGCGAGGCCATCCAGACCATGAGAGTGTCTAAGGTG	180
	GGAGAGCACGATAAGGGTGCCTCCGGCGAGGCCATCCAGACCATGAGAGTGTCTAAGGTG	*****
Región descubierta	F T H P Q W N A Q T I N N D I A L I R L	80
Región Conocida	TTCACCCACCTCAGTGGAAATGCTCAGACCATCAACAACGACATTGCCCTCATCAGGCTG	240
	TTCACCCACCTCAGTGGAAATGCTCAGACCATCAACAACGACATTGCCCTCATCAGGCTG	*****
Región descubierta	T A P V Q M S A T V S P V C L A E T S D	100
Región Conocida	ACCGTCCCGTCCAGATGAGCGCCACTGTGTCTCCTGTGTGCCTGGCTGAGACCAGCGAT	300
	ACCGTCCCGTCCAGATGAGCGCCACTGTGTCTCCTGTGTGCCTGGCTGAGACCAGCGAT	*****
Región descubierta	E F A P G M T C V T S G W G L L R S S A	120
Región Conocida	GAGTTCGCCCTGGAATGACCTGCGTGACCTCCGGCTGGGGTCTTCTGAGATCATCCGCT	360
	GAGTTCGCCCTGGAATGACCTGCGTGACCTCCGGCTGGGGTCTTCTGAGATCATCCGCT	*****
Región descubierta	M F T P N Q L Q Q A A L P L L S K S Q C	140
Región Conocida	ATGTTACCCCCAACCCAGCTGCAGCAGGCTGCCCTGCCTCTGTGTCCAAAAGTCAGTGC	420
	ATGTTACCCCCAACCCAGCTGCAGCAGGCTGCCCTGCCTCTGTGTCCAAAAGTCAGTGC	*****
Región descubierta	Q Q H W G S N I S D V M I C A G A S G V	160
Región Conocida	CAGCAGCACTGGGGAAGCAACATCTCCGACGTCATGATCTGCGCTGGTGCCTCTGGTGTC	480
	CAGCAGCACTGGGGAAGCAACATCTCCGACGTCATGATCTGCGCTGGTGCCTCTGGTGTC	*****
Región descubierta	S S C M G D S G G P L V C Q K N N V W T	180
Región Conocida	TCCTCTTGCATGGGTGACTC <u>CGGTGGCCCCCT</u>	540
	TCCTCTTGCATGGGTGACTC <u>CGGTGGCCCCCTGGTGTGCCAGAAGAACAACGTCTGGACC</u>	*****
Región Conocida	L V G V V S W G Y G	190
	<u>CTGGTGGGTGTGTGTCTGGGCTATGGAT</u>	571

== Región central parcial conocida

== Avance en el extremo 5' utilizando los iniciadores degenerados

*** Sitio donde se empalman el resultado de la secuenciación con la región central parcial conocida.

Figura 24. Traslapo del extremo 5' obtenido con la región central parcial conocida.

Ensamblado del Gen Codificante del Quimotripsinógeno II de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*)

Una vez realizado el empalmado de los fragmentos obtenidos de los extremos 3' y 5' con la región central parcial conocida obtenida por Félix (2006) se pudo ensamblar casi en su totalidad el gen codificante del quimotripsinógeno II de sardina Monterey. El fragmento 3' obtenido constó de 266 pb que codifica para 41 aminoácidos y el fragmento 5' constó de 467 pb que codifica para 156 aminoácidos. De esta forma se avanzó en la secuencia del gen logrando llegar hasta los 841 pb deducidos que codifican para 217 aminoácidos.

El extremo 5' obtenido no llegó hasta el inicio de traducción del gen, ni tampoco mostró la secuencia del péptido señal. Esto puede ser debido a que el ADNc obtenido fue incompleto. Las causas posibles de esto pueden ser debido a que los iniciadores no hibridaron correctamente o cayeron antes de completar toda la amplificación. Una solución sería realizar protocolos 5' RACE que permitan llegar hasta el inicio de traducción del gen usando indicadores más cercanos al extremo 5' (en la región recién descubierta o basándonos en la secuencia de la especie *Sardinops melanostictus* (GenBank: BAM62884.1)). Diversos estudios donde se busca obtener el extremo 5' del ADNc de tripsina en diversas especies incluyendo la sardina Monterey utilizando técnicas como la RACE, cambiando las muestras de ARNm por muestras más recientes o a través de estrategias como *gene walking*, han carecido del residuo Met inicial, así como de la región no traducida en 5' (UTR). Esto se atribuye a la estabilidad del ARNm o la presencia de nucleasas presentes en el tejido digestivo (Arvizu y col., 2012; Peterson y col., 1994)

En base a los análisis que se realizaron cuando se comparó la secuencia deducida del quimotripsinógeno II de sardina Monterey con los quimotripsinógenos de otras especies, se estima que el quimotripsinógeno II de sardina Monterey consta de 245 aminoácidos y su forma activa la quimotripsina consta de 230 aminoácidos por lo que faltaron de deducir 28 aminoácidos para completar el gen que codifica para el quimotripsinógeno y 13 para completar la quimotripsina, pero hasta que se logre completar el extremo 5' se conocerá con exactitud su secuencia.

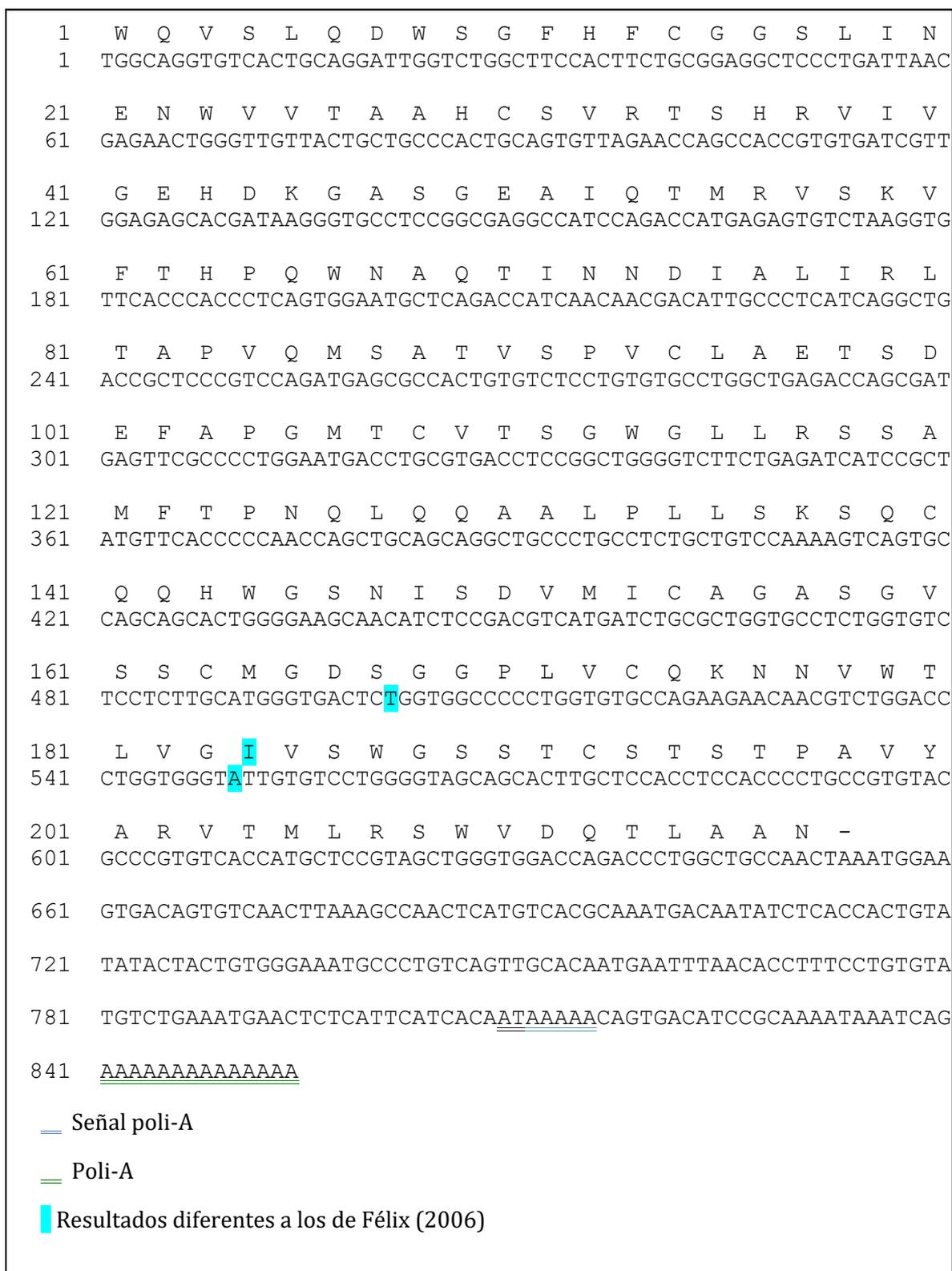


Figura 25. Ensamblado del gen codificante del quimotripsinógeno II de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

Comparación del Quimotripsinógeno II de *Sardina Monterey* (*Sardinops sagax caerulea*) con Quimotripsinógenos II de Otros Peces.

Se comparó la secuencia de aminoácidos deducida del quimotripsinógeno II de sardina Monterey con los quimotripsinógenos II de las siguientes especies marinas: *Sardinops melanostictus* (GenBank: BAM62884.1) (Kishimura and Nakamura, No publicado), *Pagrus major* (GenBank: BAL14141.1), *Danio rerio* (NCBI Reference Sequence: NP_001017724.1), *Thunnus orientalis* (GenBank: BAL14137.1), *Salmo salar* (NCBI Reference Sequence: NP_001134565.1) y *Gadus morhua* (GenBank: CAB43766.1). Dicha secuencia de aminoácidos presentó hasta un 99% de identidad con la especie *Sardinops melanostictus* 76% con *Salmo salar* 75% con *Danio rerio* y 74% con las especies *Gadus morhua* y *Pagrus major* (tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos deducidos del quimotripsinógeno II de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) con quimotripsinógenos II de otros peces.

Peces	% de similitud	% de identidad
<i>Sardinops melanostictus</i>	99%	99%
<i>Salmo salar</i>	87%	76%
<i>Danio rerio</i>	84%	75%
<i>Gadus morhua</i>	84%	74%
<i>Pagrus major</i>	83%	74%
<i>Thunnus orientalis</i>	83%	67%

En la figura 26 se muestra un alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos con los quimotripsinógenos de las especies anteriores, en la cual se observa el aminoácido número 1 de la molécula del quimotripsinógeno que corresponde a una cisteína. También se observa que la secuencia de aminoácidos de la proteína activa (IVNG) se encuentra conservada, en esta región es donde se realiza la ruptura específica del quimotripsinógeno en su enlace peptídico Arg15-Ile16 para formar la π -quimotripsina que posteriormente actúa sobre otras π -quimotripsinas para eliminar específicamente dos dipéptidos, Ser14-Arg15 y Thr147-Asn148, dando lugar a la enzima activa ya en su forma estable conocida como α -quimotripsina o quimotripsina (Claros y col., 2010; Berg, 2008).

También se puede observar en todas las secuencias analizadas la triada catalítica típica de la quimotripsina reportada en la bibliografía (Ser 195, His 57, Asp 102), donde la serina 195 forma un puente de hidrógeno con el anillo imidazol de la histidina 57 y el grupo –NH de este anillo imidazol se encuentra, a su vez, formando un puente de hidrógeno con el grupo carboxilato del ácido aspártico 102 (Berg, 2008). Cabe mencionar que para la quimotripsina II de sardina Monterey estos aminoácidos concuerdan exactamente al número de residuo proporcionado por la bibliografía para la quimotripsina. De igual manera se puede observar en las secuencias, que la región donde se localiza el bolsillo hidrofóbico catalítico (Ser 189, Ser 190, Met 192, Trp 215, Gly 216, Ser 217, Gly 226), también es una región conservada y en la secuencia deducida de aminoácidos de la sardina Monterey estos aminoácidos coinciden con el número de residuo proporcionado en la bibliografía para la quimotripsina, exceptuando el residuo 226 en donde se presenta una alanina en vez de una glicina y de todas las especies alineadas solo en el caso de *Danio rerio* y *Thunnus orientalis* dicho residuo si corresponde a una glicina.

Se sabe que el bolsillo hidrofóbico de la quimotripsina es más amplio que el de tripsina y elastasa, por eso los residuos con cadenas laterales voluminosas pueden ser hidrolizados por la enzima con facilidad. Al cambiar una alanina por glicina en el residuo número 226, las dimensiones del bolsillo no varían mucho ya que ambos residuos son aminoácidos muy pequeños, por lo que se asume que la presencia de uno en vez de otro no produce un efecto estérico y por lo tanto no afecta mucho la actividad de la enzima.

B parcial(<i>Sardinops melanostictus</i>)	-----VPHSWPWQVS	10
II (<i>Sardinops sagax caerulea</i>)	----- WQVS	4
II (<i>Pagrus major</i>)	MAFLWIISCLAFVSAAYGCGNPAIPPQVTGYARIVNGEEAVPHSWPWQVS	50
B precursor (<i>Salmo salar</i>)	MAFLWVSVCLAFVSAAYGCGIPAIKPEVSGYARIVNGEEAVPHSWPWQVS	50
B precursor (<i>Gadus morhua</i>)	--MGHEVSCFAFISAAAYGCGSPAIQPQVTGYARIVNGEEAVPHSWPWQVS	48
B II precursor (<i>Danio rerio</i>)	MAFLWLLSCVAFVSAAYGCGVPAIPVVSQYARIVNGEEAVPHSWPWQVS	50
II (<i>Thunnus orientalis</i>)	MAFLWILSCLAFAGAAAYGCGTPAIPPVITGYSRIVNGEEAVPHSWPWQVS	50

B parcial(<i>Sardinops melanostictus</i>)	LQDWSGFHFCGGSLINENWVVTAAHCSVRTSHRVIVGEHDKG--ASGEAI	58
II (<i>Sardinops sagax caerulea</i>)	LQDWSGFHFCGGSLINENWVVTAAHCSVRTSHRVIVGEHDKG--ASGEAI	52
II (<i>Pagrus major</i>)	LQSSGFHFCGGSLINENWVVTAAHCNVRTYHKVAGEHNRYG-STEDI	99
B precursor (<i>Salmo salar</i>)	LQQTSGFHFCGGSLINENWVVTAHCNVATYHRVIGEHKKGSGNNAEDI	100
B precursor (<i>Gadus morhua</i>)	LQQSNGFHFCGGSLINENWVVTAHCNVRTYHRVIVGEHDKS-RASDENI	97
B II precursor (<i>Danio rerio</i>)	LQDFTGFHFCGGSLINEFWVVTAHCNVRTSHRVILGEHNKKGKSNQEDI	100
II (<i>Thunnus orientalis</i>)	LQDYTGFFHFCGGSLISENWVVTAHCNVKTYHRVVLGEHDKS--SNAEDV	98
	** : .*****.* *****.* * * : : * : . . * :	
B parcial(<i>Sardinops melanostictus</i>)	QTMRVSKVFTHPQWNAQTINNDIALIRLTAPVQMSATVSPVCLAETSDEF	108
II (<i>Sardinops sagax caerulea</i>)	QTMRVSKVFTHPQWNAQTINNDIALIRLTAPVQMSATVSPVCLAETSDEF	102
II (<i>Pagrus major</i>)	QVLKPTKVFTHPQWNPYITINNDIALIKLSSPARLGTNVSPVCLAGTNDNY	149
B precursor (<i>Salmo salar</i>)	QILKPAKVFTHPKWPSTINNDISLIKLPVAVLNTNVSPVCLAETADV	150
B precursor (<i>Gadus morhua</i>)	QILKPSMVFTHPKWDRTINNDISLIKLPVAVLGTNVSPVCLGESSDVF	147
B II precursor (<i>Danio rerio</i>)	QTMKVSQVFTHPQYNSNTIENDIALVKLTPASLNAHVSPVCLAESDNF	150
II (<i>Thunnus orientalis</i>)	QVMKVGKVFHPRYNGFTINNDILLIKLPASQALNMRVSPVCLAETADNF	148
	* : : * . * : : : * . * * * * : : : * . : . * * * * . : * :	
B parcial(<i>Sardinops melanostictus</i>)	VPGMTCVTSWGLLRSSAMFTPNQLQQAALPLLSKQSQQHWG-SNISDV	157
II (<i>Sardinops sagax caerulea</i>)	APGMTCVTSWGLLRSSAMFTPNQLQQAALPLLSKQSQQHWG-SNISDV	151
II (<i>Pagrus major</i>)	AAGMTCVTSWGLTRYNAANTPNQLQQAALPLLSNEQCKKTWG-SNISDV	198
B precursor (<i>Salmo salar</i>)	APGMTCVTTWGLLRYNALNTPNELQQAALPLLSNEQCKTHWG-SSISDV	199
B precursor (<i>Gadus morhua</i>)	APGMKCVTSWGLTRYNAPGTPNKLQQAALPLMSNEECSQTWGNMISDV	197
B II precursor (<i>Danio rerio</i>)	ASGMTCVTSWGVTRYNALFTPDDELQQVALPLLSNEDCKNHWG-SNIRD	199
II (<i>Thunnus orientalis</i>)	PGMKCVTTWGLTRYNAPDTPALQQAALPLLTNDQCKRYWG-NKISNL	197
	* . * * * : * * * : * . * * * * * : : : * . * * . * :	
B parcial(<i>Sardinops melanostictus</i>)	MICAGASGVSSCMGDSGGPLVCQKNNVWTLVGVISWGSSTCSTSTPAVYA	207
II (<i>Sardinops sagax caerulea</i>)	MICAGASGVSSCMGDSGGPLVCQKNNVWTLVGVISWGSSTCSTSTPAVYA	201
II (<i>Pagrus major</i>)	MICAGGDGATSCMGDSGGPLVCQNGAWTLVGVISWGSSTCSTSTPAVYA	248
B precursor (<i>Salmo salar</i>)	MICAGGAGATSCMGDSGGPLVCEKDNVWTLVGVISWGSSTCSTSTPAVYA	249
B precursor (<i>Gadus morhua</i>)	MICAGAAGATSCMGDSGGPLVCQKDNVWTLVGVISWGSSTCSTSTPAVYA	247
B II precursor (<i>Danio rerio</i>)	MICAGAAGASSCMGDSGGPLVCQKDNVWTLVGVISWGSSTCSTSTPAVYA	249
II (<i>Thunnus orientalis</i>)	MICAGAAGASSCMGDSGGPLVCEKAGAWTLVGVISWGSSTCSTSTPAVYA	247
	****. * .*****: : . *****:*****. : * .**.	
B parcial(<i>Sardinops melanostictus</i>)	RVTMLRSWVDQTLAAN	223
II (<i>Sardinops sagax caerulea</i>)	RVTMLRSWVDQTLAAN	217
II (<i>Pagrus major</i>)	RVTELRGWVDQILAAN	264
B precursor (<i>Salmo salar</i>)	RVTELRGWVDQTLAAN	265
B precursor (<i>Gadus morhua</i>)	RVTELRGWVDQILAAN	263
B II precursor (<i>Danio rerio</i>)	RVTELRDWVDQILASN	265
II (<i>Thunnus orientalis</i>)	RVTELRWVDQTLAAN	263
	*** * * * * : * : *	
C	Inicio del quimotripsinógeno.	
I	Inicio de la quimotripsina en su forma activa.	
Bolsillo hidrofóbico catalítico (Ser189. Ser190. Met192. Trp215. Glv216. Ser217. Glv226).		

Figura 26. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del quimotripsinógeno II de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) obtenida, con quimotripsinógenos II de otros peces.

Comparación del Quimotripsinógeno II de *Sardinops sagax caerulea* con Quimotripsinógeno de *Gadus morhua* Adaptado al Frío y Otros Quimotripsinógenos Mesofílicos.

La secuencia de aminoácidos deducida del quimotripsinógeno II de sardina Monterey se comparó con el quimotripsinógeno A adaptado al frío perteneciente a bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) (UniProtKB/Swiss-Prot: P47796.1) (Guthmundsdóttir y col., 1994) y con el de los siguientes organismos mesófilos: *Sus scrofa* (NCBI Reference Sequence: XP_003355797.1), *Bos taurus* (NCBI Reference Sequence: NP_001098800.1) y *Homo sapiens* (NCBI Reference Sequence: NP_001897.4).

En todas las secuencias analizadas se observa la triada catalítica típica de quimotripsina reportada en la bibliografía (Ser 195, His 57, Asp 102) (mostrada en azul en la figura 26), de igual manera se puede observar la región donde se localiza el bolsillo hidrofóbico catalítico (Ser 189, Ser 190, Met 192, Trp 215, Gly 216, Ser 217, Gly 226) (mostrado en gris en la figura 27) (M. G. Claros y col., 2010). Como se mencionó anteriormente en el quimotripsinógeno de sardina Monterey el aminoácido Gly 226 se ve sustituido por una Ala 226 y dicho cambio no ocurre en el quimotripsinógeno A adaptado al frío de *Gadus morhua* (UniProtKB/Swiss-Prot: P47796.1). Spilliaert y Gudmundsdóttir (2000) mencionan que es más común encontrar una glicina en la posición 226 en quimotripsinas del tipo A, mientras que la quimotripsina B de *Gadus morhua*, como sus análogos vertebrados de tipo B, tienen una alanina en esa posición. Algunos cambios notables en la secuencia de aminoácidos del quimotripsinógeno adaptado al frío del bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) y el quimotripsinógeno II de sardina Monterey en comparación a quimotripsinógenos de organismos mesófilos son mostrados en rojo en la figura 27.

Mientras que los organismos mesófilos analizados presentan una secuencia conservada en Leu 83, Lys 84 e Ile 85, tanto el quimotripsinógeno de *Gadus morhua* (UniProtKB/Swiss-Prot: P47796.1) como el de *Sardinops sagax caerulea* presentan una metionina en la posición 83 y una valina en la posición 85. De igual manera también difieren de quimotripsinógenos mesofílicos en el residuo número 84 solo que en el caso del bacalao éste presenta una treonina mientras que sardina Monterey presenta una arginina. Otro cambio notable en los quimotripsinógenos de bacalao y sardina en comparación a quimotripsinógenos mesofílicos es el cambio de Pro 124 por Ala 124. Cabe mencionar que en el quimotripsinógenos de bacalao también se sustituye una Pro 28 por Ser 28, pero en quimotripsinógenos de sardina Monterey no se pudo constatar dicho cambio porque en la secuencia deducida no se avanzó hasta dicho residuo. Las prolinas influyen notablemente

En cuanto a la composición de los aminoácidos, en la tabla 11 se observa como el número de residuos de arginina, histidina y metionina, son preferidos por el quimotripsinógenos adaptado al frío de *Gadus morhua* (UniProtKB/Swiss-Prot: P47796.1) y por el quimotripsinógeno II de sardina Monterey en comparación a los otros quimotripsinógenos mesofílicos, mientras que lisina es preferida por quimotripsinógenos mesofílicos. Enzimas adaptadas al frío reportan un alto contenido de metionina, la cual puede conferir flexibilidad debido a su alto grado de libertad y porque carece de ramificación y carga o interacciones dipolo. Además un alto contenido de metionina, como es en el caso de tripsinas adaptadas al frío provenientes de peces, puede reflejar una adaptación halofílica (Siddiqui y Cavicchioli, 2006).

Como ya se ha mencionado anteriormente quimotripsina de Sardina Monterey es una enzima de naturaleza aniónica, lo que concuerda con estudios de algunas enzimas adaptadas al frío donde se observa un aumento de la carga de la superficie, en particular una carga negativa. De igual manera también es común encontrar parches de residuos ácidos en las superficies. Debido a que este tipo de enzimas catalizan reacciones a bajas temperaturas (cercas a 0°C), el coste energético de romper las redes de puentes de hidrógeno es muy alto debido a la alta viscosidad y alta tensión superficial del agua a temperaturas tan bajas, pues la constante dieléctrica del agua aumenta de 55.5 Debye (ϵ_r) a 100°C a 88 ϵ_r a 0°C (Siddiqui y Cavicchioli, 2006). Para compensar éste coste energético las enzimas adaptadas al frío contienen aminoácidos cargados o polares en la superficie que interactúan con las moléculas de agua de una alta constante dieléctrica, permitiendo así una solvatación apropiada y mantener la flexibilidad (Siddiqui y Cavicchioli, 2006).

La histidina cargada positivamente ($pK_a \approx 7$) puede desempeñar un papel en la mejora de la flexibilidad a baja temperatura logrando una mejor interacción con el solvente, pues ella contiene un grupo imidazol, un anillo que puede estar cargado positivamente. El grupo imidazol, con un valor de pK_a cercano a 6 puede estar sin carga o cargado positivamente en las proximidades del pH neutro, dependiendo del entorno local (Berg y col., 2008). Además a parte de su alto ΔH de ionización, una disminución de la temperatura favorece su protonación.

Tabla 11. Composición de aminoácidos de la quimotripsina II de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) obtenida y su comparación con quimotripsina de *Gadus morhua* adaptada al frío y otras quimotripsinas mesofílicas. ^a

Aminoácido	<i>Sardinops sagax caerulea</i>	<i>Gadus morhua</i> (Adaptada al frío)	<i>Sus scrofa</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Homo sapiens</i>
Ala (A)	19	19	22	20	20
Arg (R)	7	7	4	4	5
Asn (N)	10	13	6	6	8
Asp (D)	7	9	12	12	14
Cys (C)	9	9	9	9	9
Gln (Q)	14	10	9	10	9
Glu (E)	5	7	3	6	5
Gly (G)	17	22	18	19	19
His (H)	6	5	2	2	2
Ile (I)	9	7	9	7	10
Leu (L)	15	18	17	17	17
Lys (K)	4	8	11	11	15
Met (M)	7	6	2	4	2
Phe (F)	5	6	6	7	7
Pro (P)	8	8	9	9	9
Ser (S)	27	14	22	20	20
Thr (T)	17	17	22	23	17
Trp (W)	9	7	7	7	7
Tyr (Y)	1	4	4	3	2
Val (V)	21	21	23	21	20
Pyl (O)	0	0	0	0	0
Sec (U)	0	0	0	0	0

^a La composición se empieza a contar a partir del Trp 29 para todas las quimotripsinas, ya que es hasta este aminoácido hasta donde se avanzó en la secuenciación del extremo 5' para la RACE del ADNc de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

CONCLUSIONES

El fragmento de ADNc obtenido en el protocolo 3' RACE muestra la poliadeninación en su extremo 3' por lo que el gen codificante del quimotripsinógeno II de sardina Monterey se logró deducir hasta el final de su traducción. La presencia de la cola poli-A, es sinónimo de que el ADNc fue obtenido a partir de ARNm maduro (sin presencia de exones), la presencia de la cola poli-A le confiere al ARNm una vida más larga, pues lo hace más resistente a la degradación.

El fragmento de ADNc obtenido en el protocolo 5' RACE no logró llegar hasta el inicio de traducción del gen ni al péptido señal, pero el avance obtenido en éste, sumado a la región central previamente conocida más el extremo 3' obtenido hasta el fin de traducción, permiten deducir gran parte del gen, sobre todo en regiones de interés que es donde se presentan las diferencias estructurales que le dan a la quimotripsina II de sardina Monterey su alta actividad catalítica a bajas temperaturas, su mayor flexibilidad y baja termoestabilidad.

La secuencia de aminoácidos de la quimotripsina II de sardina Monterey deducida en este trabajo presentó una composición y distribución de aminoácidos semejante a la de quimotripsinas de especies adaptadas al frío. Más específicamente presentó una composición y distribución de aminoácidos semejante a la quimotripsina A adaptada al frío de *Gadus morhua*. Quimotripsina adaptada al frío de *Gadus morhua* y quimotripsina II de sardina Monterey mostraron similitudes entre sí en regiones específicas que se encontraban conservadas en los organismos mesófilos analizados. Además estudios de caracterización bioquímica la han posicionado como un catalizador eficaz a bajas temperaturas por lo que podría ser una alternativa biotecnológica para el procesamiento de alimentos ya que minimizaría los requerimientos de energía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alasalvar C, Shahidi F, Miyashita K, Wanasundar U. 2011. Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications. 1ª ed. Oxford. Ed. Wiley-blackwell. 395, 397 p.

Altschul, SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990 "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215 (3): 403-410.

An H, Visessanguan W. 2000. Recovery of Enzymes from Seafood Processing Wastes. Marcell Dekker. New York. Ed. Haard, N.F. & Simpson, B.K. 641, 642, 644, 646 p.

Anaya BC. 2008. Tesis Profesional Practica de Químico-Biólogo Especialidad en Tecnología de Alimentos. Obtención del ADNc del Tripsinógeno Tipo III de Vísceras de Sardina Monterey. [Tesis]. [Departamento de Ciencias Químico-Biológicas]. [Universidad de Sonora].

Arvizu FAA, Quintero RIE, Felix LM, Islas OMA, Yepiz PG , Pacheco AR, Navare A, Facundo MF, Velazquez CEF, Sotelo MRR, Castillo YFJ. 2012. Thermodynamic activation and structural analysis of trypsin I from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). Food Chem. 133 (3): 898-904.

Badui DS. 2006. Química de los alimentos. 4ª ed. México. Ed. Pearson education. 301, 302, 306, 307 p.

Bartlett JMS, Stirling D. 2003. Vol. 226: Methods in molecular biology - PCR protocols. 2ª ed. Ed. Totowa (NJ) Humana press Inc. 105, 106 p.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2008. Bioquímica. 6ª ed. Barcelona España. Ed. Reverté. 29, 31, 205-206, 210, 212-213, 245-246, 249, 290 p.

Brown AT. 2002. Genomes. 2ª ed. Oxford. Ed. Jhon Wiley & Sons, Inc. BIOS Scientific Publishers, Ltd. 221-223 p.

Castillo YFJ, Pacheco AR, García CFL, Navarrete del TML. 2004. Characterization of Acidic Proteolytic Enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) Viscera. Food Chem. 85 (3): 343-350.

Castillo YFJ, Pacheco AR, García, CFL, Navarrete, del TML. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 140 (1): 91-98.

Castillo YFJ, Pacheco AR, García, CFL, Navarrete, del TML. 2006. Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). *Food Chem.* 99 (2): 252-259.

Castillo YFJ, Pacheco AR, Lugo SME, García SG, Quintero RIE. 2009. Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin *Food Chem.* 112 (3): 634-639.

Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa [ILCE], Biblioteca Digital La Ciencia Para Todos. 1997. [Internet]. Cifuentes L JL, Torres GP, Frías MM. El Océano y sus Recursos X. Pesquerías. 2ª Ed. México. Ed. Fondo De Cultura Económica. Cap. VI. Peces. Pesquería de sardinas y anchoas. Recuperado el 20 de febrero de 2013 de http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/087/htm/sec_21.htm

Cognetti G, Sarà M, Magazzù G. 2001. *Biología Marina*. 1ª ed. Barcelona España. Ed. Ariel. S. A. 360 p.

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca [CONPESCA]. 2011. Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2011. Mazatlán, Sinaloa Mexico. 36 p.

Consejo Mexicano para la promoción de la Sardina. 2008. [Internet]. Proyecto: Campaña de promoción al consumo de la sardina mexicana en el mercado nacional, 2008. Recuperado el 19 de febrero de 2013 de http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/c_m_sardina

Dale JW, Von Schantz, M. 2002. *From Genes to Genomes*. 1ª ed. West Sussex, England. Ed. Jhon Wiley & Sons LTD. 112-116, 154-157 p.

del Monte LP. 2008. La Pesquería de Pelágicos Menores en el Golfo de California: Efectos a Nivel Ecosistema y en Especies No-Objetivo. Informe técnico para la Cámara Nacional de la Industria Pesquera Delegación Sonora. México. pp. 2.

Derbyshire D. 2011. Los Océanos se Llenan de Sardinas por Falta de Depredadores. [Internet] *Universitam*. Recuperado el 20 de febrero del 2013 de <http://universitam.com/academicos/?p=8836>

[DFO] Department of Fisheries and Oceans. 2004. Pacific Sardine DFO Can. Sci. Advis. Sec. Stock Status Report 2004/037. Fisheries and Ocean Canada Science: 1-5.

Doode MOS. 1999. Los Claro-Oscuros de la Pesquería de la Sardina en Sonora: Contradicciones y Alternativas para un Desarrollo Equilibrado. 1ª ed. Mexico Ed. CIAD-CIESAS-Colmich. 51, 156, 184 p.

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2010. Anuario FAO 2008 Estadísticas de pesca y acuicultura. Roma, Italia. Ed. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 10, 11 p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. [Internet]. Fisheries and Aquaculture Department Site. Recuperado el 19 de febrero del 2013 de <http://www.fao.org/fishery/species/2894/en>

Felix LM. 2006. Caracterización biofísica y molecular de la tripsina de sardina (*Sardinops sagax caerulea*) [Tesis de maestría] [Tecnología de Alimentos de Origen Animal]. [CIAD. A.C.].

Feller G, Gerday C. 1997. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. CMLS, Cell. mol. life sci. 53 (10): 830-841.

García GM, Quintero RR, López MCA. 2004. Biotecnología Alimentaria. 5ª ed. Mexico. Ed. LIMUSA S. A. de C. V. 103-105 p.

García SCO, Pacheco AR, Valdez HS, Márquez RE, Lugo SME, Ezquerro BJM. 2009. Impacto del Agua de Cola de la Industria Pesquera: Tratamientos y Usos. CyTA - Journal of Food. 7 (1): 67-77.

Guerrero MR, Ramírez UJ, Bracho RL. 2006. Las ballenas del Golfo de California. 1ª ed. México. Instituto Nacional de Ecología [INE-SEMARNAT]. 55 p.

Guthmundsdóttir A, Oskarsson S, Eakin AE, Craik CS, Bjarnason JB. 1994. Atlantic cod cDNA encoding a psychrophilic chymotrypsinogen. Biochim Biophys Acta. 1219 (1): 211-214.

Hill KT, Lo NCH, Macewicz BJ, Felix UR. 2005. Assessment of the Pacific sardine (*Sardinops sagax caerulea*) population for U.S. management in 2006. Portland (OR). Pacific Fishery Management Council. 12, 13 p.

[INEGI]. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2011. El Sector Alimentario en México 2011 serie de estadísticas sectoriales. 25ª ed. México. 1.2, 3.1.1.2, 3.1.1.6, 8.17, 8.19. p.

[INAPESCA] Instituto Nacional de la Pesca. 2006. Sustentabilidad y Pesca Responsable en México Evaluación y Manejo. México. 266, 267 p.

Klomklao S. 2008. Digestive Proteinases from Marine Organisms and their Applications. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30 (1): 37-46.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23 (21): 2947-2948.

Leet WS, Dewees CM, Klingbeil M, Larson EJ. 2001. California's Living Marine Resources: A Status Report. California Department of Fish and Game. Richmond (CA). 293, 300 p.

Luque AD, Gómez E. 2007. La Construcción de la Región del Golfo de California desde lo Ambiental y lo Indígena. Ra Ximhai. 3 (1): 83-116.

M. G. Claros y col. 2010. BioROM2011: ayudas al aprendizaje de bioquímica, biotecnología y biología molecular [Internet]. <http://www.biorom.uma.es/> Recuperado el 25 de febrero de 2013 de <http://www.biorom.uma.es/contenido/UIB/Jmoldesarrollo/quimotripsinajmol/quimotripsinajmol.html>

Manrique FA. ~~2000~~ 2000. Ecología alimenticia de los pelágicos menores del Golfo de California, México. Rev. Transferencia. 13 (50): 21-23.

Martin GJG, William WC. 1986. Reduction In Waste Load From a Seafood Processing Plant. Pollution Prevention Program, North Carolina Department Of Environment, Health, And Natural Resources. 9, 14 p.

Martínez ZML, Nevárez MMO, Anguiano CML, Santos MJP, Godínez CAR. 2006. Diagnóstico de la Pesquería de Pelágicos Menores en el Golfo de California, temporadas de pesca 1998/99 a 2002/03. México. Instituto Nacional de la Pesca - Centro Regional de Investigación Pesquera Guaymas, Sonora. 5, 10, 11 p.

Martínez ZML, Nevárez MMO, Anguiano CML, Santos MJP, Godínez CAR. 2010. Captura de peces pelágicos menores en el Golfo de California, temporada de pesca 2007-2008. Ciencia pesquera. 18 (2): 5-18.

Micheline CM, Monteforte M. 2008. Del Saqueo a la Conservación: Historia Ambiental Contemporánea de Baja California Sur, 1940 - 2003. 1ª ed. México. Instituto Nacional de Ecología. 318 p.

Nevárez MMO, Martínez ZML, Santos MJP. 2012. Opinión Técnica sobre las perspectivas de la pesquería de pelágicos menores del Golfo de California en 2011-2012. Mexico. 4, 7 p.

Pacheco AR, Leyva SP, Carvallo RG, García CLF, Márquez RE. 2009. Efecto de la Concentración de Quitosano y pH Sobre la Remoción de Sólidos en Agua de Cola de la Industria Sardinera. *Interciencia/Caracas*. 34 (4): 274-279.

Peterson AM, Barillas MCV, Wells MA. 1994. Sequence of three cDNAs encoding an alkaline midgut trypsin from *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*. 24(5): 463-471.

Sambrook JF, Russell DW. 2011. *Molecular Cloning Laboratory Manual Volumen 1*. 3ª ed. C Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1.31-1.34 p.

Shahidi F, Janak KYVA. 2001. Enzymes from Fish and Aquatic Invertebrates and their Application in the Food Industry. *Trends Food Sci Tech*. 12 (12): 435-464.

Siddiqui SK, Cavicchioli, R. 2006. Cold-Adapted Enzymes. *Annu. Rev. Biochem*. 75 (1): 403-433.

Spilliaert R, Gudmundsdóttir A. 2000. Molecular cloning of the Atlantic cod chymotrypsinogen B. *Microb Comp Genomics*. 5 (1): 41-50.

Starr C., Taggart, E. R. 2004. *Biología La Unidad Y Diversidad De La Vida*. 10ª ed. México. Ed. Thomoson. 255 p.

UNAM. 2003. ¿cómo funciona una enzima?. *Bioquímica y biología molecular en línea [Internet]*. Recuperado el 25 de febrero de 2013 de <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/funcion%20enzima.html>

van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. 2008. Principles and technical aspects of PCR amplification. The Netherlands. Ed. Springer. 44, 45, 53-56 p.

Voet DH, Greenwald VJ. 2006. *Bioquímica*. 3ª ed. Buenos Aires, Argentina. Ed. Medica panamericana. 538 p.

Whitehead, P.J.P. 1985. *FAO species catalogue*. Vol. 1.7. Clupeoid fishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, anchovies and wolfherrings. Part I - Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. *FAO Fish.Synop*. 7 (125): 57-62 p.

Zhou L, Budge SM, Ghaly AE, Brooks MS, Dave D. 2011. Extraction, Purification and Characterization of Fish Chymotrypsin: A Review. *Am. J. Biochem. & Biotech.*, 7 (3): 104-123.