

UNIVERSIDAD DE SONORA

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

**Modelación Molecular y Caracterización Bioquímica Parcial de la
Catepsina B del Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*)**

The seal of the University of Sonora is a large, light gray watermark in the background. It features a central shield with a lamp of knowledge and an open book. Above the shield is a banner with the motto "TODO LO ILUMINAN". Below the shield is a banner with the text "TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA". The shield is flanked by two figures holding a banner. The entire seal is encircled by the text "UNIVERSIDAD DE SONORA" and the year "1942" at the bottom.

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Kathia Itzel Ramírez Armenta

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

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Kathia Itzel Ramírez Armenta la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico .



Dra. Adriana Teresita Mulhia Almazán
Presidente



Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Secretario



Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Vocal



M.C. Guadalupe Miroslava Suárez Jiménez
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero para la realización de este trabajo mediante el proyecto con clave 177954: “Las proteasas ácidas digestivas e intracelulares de Crustáceos”.

A la Coordinación de Posgrado del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD A.C.) por el apoyo económico brindado para realización de este trabajo.

A la Doctora Adriana Muhlia por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su compromiso y por contribuir a mi crecimiento académico y personal.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Aldo Arvizu, Dr. Ramón Enrique Robles y a la MC. Miroslava Suárez por su interés y disponibilidad.

Al Dr. Fernando Luis García Carreño por abrirme las puertas de su laboratorio e iniciar este proyecto, por brindarme su apoyo y tiempo.

A la técnico María de los Ángeles Navarrete del Toro por su apoyo técnico durante mi formación en el laboratorio.

A la M.C. Claudia I. Maytorena Verdugo, la M.C. Betsaida Bibó Verdugo y la M.C. Diana Martínez Alarcón, por su interés, tiempo y apoyo técnico invaluable durante mi formación.

Al Dr. Arturo Sánchez Paz y a la M.C. Tania Enríquez por su disponibilidad y su apoyo durante la realización de este trabajo.

A la técnico Sandra Araujo y a la M.C. Cindy Chimeo Nuñez por el apoyo técnico brindado durante mi estancia en el laboratorio.

A mis padres, Raúl Ramírez y Lorena Armenta, por su amor y apoyo incondicional, por ser la fuerza que me impulsa a seguir adelante porque sé que mis logros también son suyos.

A mis compañeros Jesús León, Martí Wilson, Erick Armenta, Mariana Rodríguez, Oliviert Martínez, Ofelia Méndez, Patricia Olguín, Leonardo Luken y Carolina Gómez, sin orden de importancia, por sus enseñanzas, amistad y apoyo.

A mis amigos: Ashley, Víctor, Michelle, Bruno, Glenda, Gustavo, Astrid, Francisco, Christian, Mauricio, Luis, Ciara y Gallegos por su amistad y por todos los momentos juntos, por escucharme, apoyarme y siempre confiar en mí.

A mis maestros y a todos aquellos que con sus enseñanzas contribuyeron a mi formación y a la realización de este trabajo.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	2
General	2
Específicos.....	2
ANTECEDENTES.....	3
Sujeto de Estudio	3
Fisiología Digestiva de los Crustáceos	4
Las Proteasas y su Participación en el Proceso Digestivo.....	5
Clasificación de las proteasas.....	5
Las Proteasas digestivas de los crustáceos.....	6
Las Catepsinas	7
La catepsina B.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Diseño del Modelo <i>in silico</i> de la Estructura Tridimensional de la Catepsina B del Camarón Blanco	12
Obtención del Extracto Enzimático.....	12
Cuantificación de Proteína Soluble Total.....	13
Identificación de la Catepsina B en el Patrón Electroforético de un Extracto Enzimático de Glándula Digestiva.	13
Detección de proteasas por electroforesis nativa en gel de acrilamida (PAGE)	13
Detección de actividad de catepsina B en PAGE con sustrato específico.....	14
Detección de la actividad de catepsina B en diferentes tejidos por PAGE con sustrato específico	15
Aislamiento Parcial de la Catepsina B del Camarón.....	15
Evaluación de las fracciones en PAGE	16
Cuantificación de la Actividad Enzimática	16

Curva estándar.....	16
Ensayo de actividad.....	16
Determinación del pH y Temperatura Óptimas para la Actividad de la Catepsina B.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
Modelo <i>in silico</i> de Estructura Tridimensional de la Catepsina B del Camarón Blanco <i>L. vannamei</i>	18
Identificación de la Catepsina B en un Extracto Enzimático de Glándula Digestiva del Camarón Blanco	26
Detección de la actividad de catepsina B en PAGE con sustrato específico	28
Detección de la actividad de catepsina B en diferentes tejidos por PAGE con sustrato específico	30
Aislamiento Parcial de la Catepsina B del Camarón.....	32
Cuantificación de la actividad enzimática de la catepsina B del camarón con sustrato fluorogénico específico.....	33
Determinación del pH y Temperatura Óptima para la Actividad de la Catepsina B.....	34
CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de <i>Litopenaeus vannamei</i> (Adaptado de Brusca, 2003).....	3
Figura 2. Distribución de las principales células del túbulo hepatopancreático (Ribeiro y col., 2014).	5
Figura 3. Clasificación de las Proteasas, adaptado de Argarwal, (1990).....	6
Figura 4. Mecanismo de catálisis general para las cisteíno proteasas (Harrison, 1997).....	8
Figura 5. Estructura tridimensional de la catepsina B humana (Mort, 1977).....	9
Figura 6. Expresión relativa del ARNm de la catepsina B en diferentes tejidos (Stephens y col., 2012).	10
Figura 7. Alineamiento de las secuencias reportadas para la procatepsina B (Modificado de Stephens, y col. 2012).	21
Figura 8. Modelo predictivo de la estructura tridimensional de la procatepsina B de <i>L. vannamei</i>	23
Figura 9. Modelo predictivo del sitio activo de la Catepsina B de <i>L. vannamei</i>	24
Figura 10. Esquematación de la interacción entre la His188 y el residuo Asp100 que regula la activación de la enzima.....	25
Figura 11. Zimograma de actividad proteolítica de la glándula digestiva del camarón blanco <i>L. vannamei</i> (PAGE 15%).....	27
Figura 12. Zimograma de actividad de la glándula digestiva del camarón blanco <i>L. vannamei</i> (PAGE 12 %).	29
Figura 13. Evaluación de la actividad proteolítica con sustrato fluorogénico en distintos tejidos del camarón.....	31
Figura 14. Evaluación de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad.....	32
Figura 15. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad sobre el sustrato Z-Arg-Arg-AMC.....	33
Figura 16. Evaluación de la actividad enzimática a diferentes valores de pH.....	
Figura 17. Evaluación de la actividad enzimática a distintas temperaturas.	36

RESUMEN

La Catepsina B es una cisteíno proteasa lisosomal ampliamente estudiada en mamíferos debido a que se le ha relacionado con procesos de progresión de la metástasis tumoral. Se ha observado que tiene un papel clave en la infectividad y nutrición de parásitos helmintos, así como en el desarrollo embrionario y metamorfosis de algunos invertebrados. Recientemente, el transcrito de la catepsina B fue identificado en el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) y además se ha reportado la expresión de esta enzima en diferentes tejidos de este organismo. También se ha sugerido que la enzima participa no sólo en procesos digestivos degradando la proteína del alimento, sino que también se le ha relacionado con la respuesta inmune del camarón frente a la infección con el virus de la mancha blanca (WSSV). Por lo anterior, el estudio de las características bioquímicas y fisicoquímicas de la catepsina B del camarón blanco permitirá entender de mejor manera el rol fisiológico de esta enzima en los crustáceos. El objetivo de este trabajo fue realizar la modelación *in silico* y la caracterización bioquímica parcial de la enzima catepsina B de *L. vannamei*. Lo anterior mediante la construcción de un modelo tridimensional predictivo *in silico*, la identificación de la proteína en el extracto enzimático del camarón blanco, el aislamiento parcial y la realización de ensayos de actividad con sustrato fluorogénico específico para determinar sus parámetros óptimos. El modelo estructural predictivo sugiere que la catepsina B de *L. vannamei* posee las características típicas de una cisteíno proteasa lisosomal con actividad de endo y exopeptidasa. El patrón proteico de los extractos enzimáticos de la glándula digestiva de organismos adultos sanos mostraron una banda de un peso molecular aproximado a 26 kDa cuya actividad proteolítica fue afectada por el inhibidor específico de cisteín proteasas E-64; sin embargo, no se observaron bandas de proteínas con el peso molecular esperado en los extractos proteicos de tejidos no digestivos del camarón. Se confirmó que el sustrato fluorogénico Z-Arg-Arg-AMC, reportado como específico para determinar la actividad de la catepsina B, no sólo es hidrolizado por esta, sino también por las 3 isoformas de tripsina presentes en la glándula digestiva del camarón blanco. Las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad, libres de tripsinas, cuentan con una sola proteína activa, la catepsina B, que representa sólo el 3.56% de la actividad total reportada para el extracto completo. El pH y la temperatura óptima para estas fracciones fue de 5.5 y 45°C, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

Las proteasas son enzimas que participan de manera activa en el metabolismo de los organismos vivos en procesos como la digestión de la proteína de los alimentos, la reparación de tejido, el procesamiento de pro-enzimas y varios mecanismos de regulación del metabolismo celular. Entre estos últimos se incluyen el control genético, la activación de zimógenos y la inhibición de proteasas (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997). Las proteasas lisosomales, también llamadas catepsinas, son enzimas principalmente de las clases serino y cisteíno proteasas que catalizan la hidrólisis de una amplia variedad de sustratos proteicos, actividad clave para diversos procesos fisiológicos (Barret, 1977).

Las catepsinas se encuentran en diversos tejidos y células del organismo y su concentración varía dependiendo del tejido y su función (Argarwal, 1990). La catepsina B (EC 3.4.22.1) es una endopeptidasa de origen lisosomal de la clase cisteíno que ha sido ampliamente estudiada en mamíferos, sin embargo, en los crustáceos se tienen pocos reportes de esta enzima y sus características.

Estudios recientes han demostrado la presencia de la catepsina B en el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) cuyo transcrito se ha detectado tanto en tejidos digestivos como en no digestivos incluyendo hemocitos, branquias, músculo y ámpula terminal (Stephens y col., 2012). Se han reportado niveles altos de actividad de la enzima tanto en el jugo gástrico, como en la glándula digestiva de varias especies de crustáceos, lo cual confirma la participación de esta enzima proteolítica en el proceso digestivo. También se ha sugerido que la catepsina B tiene un papel clave en la hidrólisis de proteínas en los lisosomas debido al hallazgo de transcritos en tejidos no digestivos (Stephens y col., 2012).

De acuerdo con lo anterior, y basados en el hecho de que la información sobre la catepsina B de los crustáceos aún es escasa, este proyecto pretende realizar el modelado molecular y la caracterización parcial de la enzima catepsina B de la glándula digestiva del camarón blanco, para así poder estudiar sus principales características bioquímicas y fisicoquímicas.

OBJETIVOS

General

Realizar la modelación *in silico* y la caracterización parcial de la enzima catepsina B del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

Específicos

1. Diseñar un modelo *in silico* de la estructura tridimensional de la catepsina B.
2. Identificar la proteína correspondiente a la catepsina B en el patrón proteico de un extracto enzimático de la glándula digestiva del camarón mediante ensayos de electroforesis.
3. Evaluar la actividad de la catepsina B del camarón con un sustrato específico.
4. Evaluar el efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática de catepsina B.

ANTECEDENTES

Sujeto de Estudio

El camarón blanco del Pacífico cuyo nombre científico es *Litopenaeus vannamei* (Figura 1) es una de las especies con mayor importancia económica en el mercado internacional. Pertenece al orden Decapoda, el más diverso de los órdenes de los crustáceos y al suborden Dendrobrachiata que se caracteriza por tener, como su nombre lo indica, branquias además de quelas en los primeros 3 pereiópodos (Martin y Davis, 2001 ; Brusca y Brusca, 2003). Su coloración es normalmente blanca translúcida, pero puede cambiar dependiendo del sustrato, la alimentación y la turbidez del agua. La talla máxima que adquieren es de alrededor de 23 cm, comúnmente las hembras crecen más rápidamente y adquieren mayor talla que los machos (FAO, 2000).

El camarón blanco es nativo de la costa oriental del océano Pacífico, desde Sonora, México hasta Tumbes en Perú, en aguas cuya temperatura es normalmente superior a 20 °C durante todo el año. *Litopenaeus vannamei* es una especie que se encuentra en hábitats marinos tropicales. Los adultos viven y se reproducen en mar abierto, mientras que la post-larva migra a las costas para pasar a la etapa juvenil, la etapa adolescente y pre-adulta se desarrolla en estuarios, lagunas costeras y manglares (FAO, 2006).

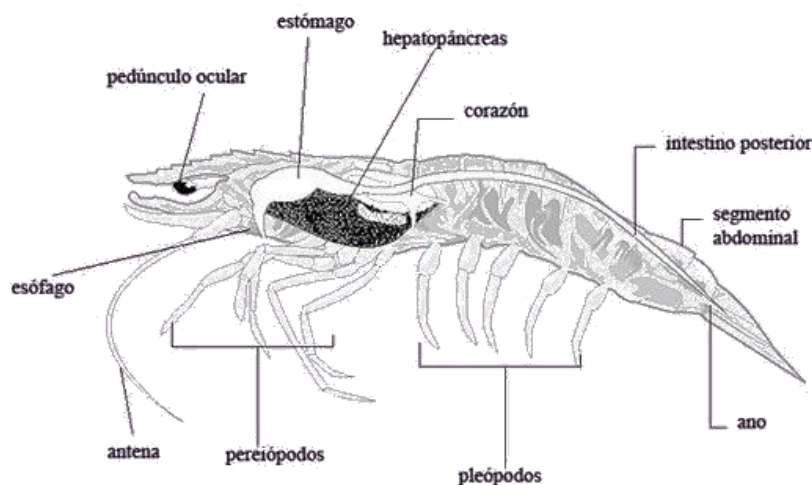


Figura 1. Anatomía de *Litopenaeus vannamei* (Adaptado de Brusca, 2003).

Fisiología Digestiva de los Crustáceos

El sistema digestivo del camarón y en general de todos los crustáceos está constituido principalmente por un esófago, una cámara gástrica dividida en dos secciones, una glándula digestiva o hepatopáncreas y un intestino (Rojo, 2010) (Figura 1).

El proceso de alimentación inicia en los maxilípedos, los cuales son apéndices que tienen la función de fragmentar mecánicamente el alimento y dirigirlo hacia la boca para que sea ingerido. El esófago juega un papel importante en el proceso de ingestión al secretar una serie de sustancias que facilitan dicho proceso. Posteriormente se encuentra la cámara gástrica, misma que está constituida por la cámara cardiaca o anterior y la cámara pilórica o posterior. La cámara cardiaca continúa con la desintegración mecánica del alimento a través de una serie de piezas calcáreas, espinas y filtros, mientras que la segunda cámara filtra los fragmentos resultantes y los conduce hacia la glándula digestiva en donde seguirán siendo procesados químicamente (Barker y Gibson, 1977).

La glándula digestiva ocupa gran parte del cefalotórax y está compuesta por un par de lóbulos bien desarrollados, los cuales a su vez están formados por hileras de tubos ciegos y túbulos cuya función es la de secretar enzimas y otros compuestos participantes en la digestión química del alimento.

Estudios histológicos de la glándula digestiva han demostrado que el epitelio de los túbulos está compuesto por una monocapa en la cual se localizan cinco tipos diferentes de células: E, R, F, B y M (Figura 2). Las células E se localizan únicamente en la porción distal del túbulo hepatopancreático, mientras que las células F se encuentran dispersas a lo largo del mismo. Estudios ultraestructurales han reportado que el citoplasma de las células F es rico en retículo endoplásmico rugoso, lo que confirma su papel en la síntesis de enzimas digestivas. Se cree que las células B son el mismo tipo de célula que la célula F pero en otro estadio morfológico. La presencia de vesículas en la porción apical y una gran vacuola central, permiten diferenciar a las células B de las F (Ribeiro y col., 2014).

La producción de enzimas digestivas se lleva a cabo solamente en las células F, en donde son sintetizadas en forma de zimógenos como una vía de regulación post-traducciona l y liberadas de manera holócrina al espacio intraluminal donde pueden ser autohidrolizadas para dar lugar a moléculas activas (Mikami, 1994; Mikami y Takashima, 2000; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2003). El material soluble es absorbido por las células R, que participan junto con las células M en el almacenamiento e incorporación de nutrientes (Alicorp, 1998).

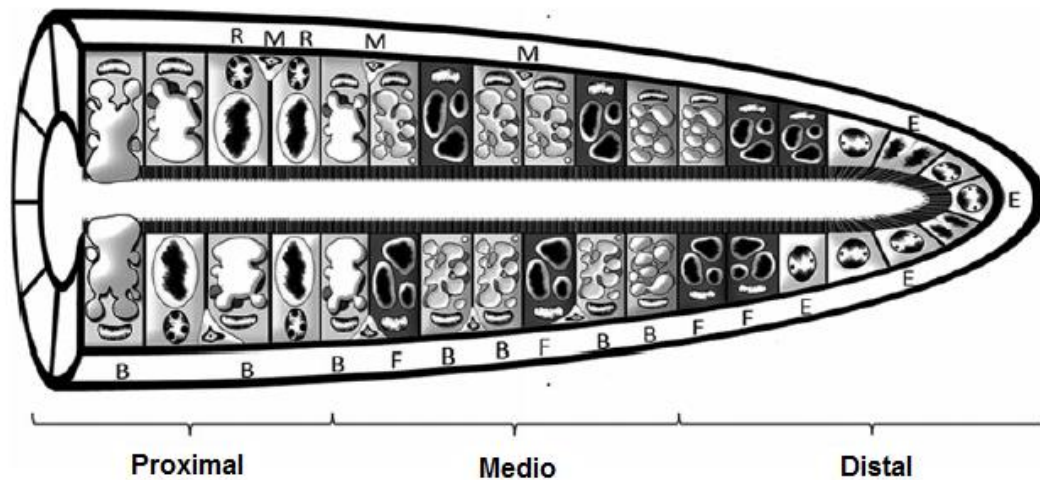


Figura 2. Distribución de las principales células del túbulo hepatopancreático (Ribeiro y col., 2014).

Las Proteasas y su Participación en el Proceso Digestivo

El proceso de digestión de los crustáceos, como en la mayoría de los organismos, se lleva a cabo gracias a la participación conjunta de diversas enzimas entre las que se han descrito lipasas, amilasas y proteasas. De manera particular la hidrólisis de las proteínas presentes en el alimento y la asimilación de los aminoácidos resultantes es facilitada por la acción de distintas clases de proteasas.

Clasificación de las proteasas

La clasificación de las enzimas proteolíticas está basada en el sitio de hidrólisis del polipéptido y en los mecanismos de catálisis de la molécula (Figura 3). Dos grandes grupos son reconocidos:

- 1) Las exopeptidasas cuya clasificación se da en función de su especificidad hacia: el tamaño o la identidad de los fragmentos liberados (dipéptidos, tripéptidos, etc.), el extremo de origen (aminopeptidasas o carboxipeptidasas) y la longitud del péptido susceptible (Argarwal, 1990);
- 2) Las endopeptidasas o proteinasas cuya clasificación está basada principalmente en la naturaleza química del aminoácido responsable de la actividad catalítica de la enzima, de tal

manera que existen cinco subclases reconocidas como: serino proteasas, cisteíno proteasas, aspártico proteasas, metalo-proteasas y treonin proteasas (Barret, 1994).

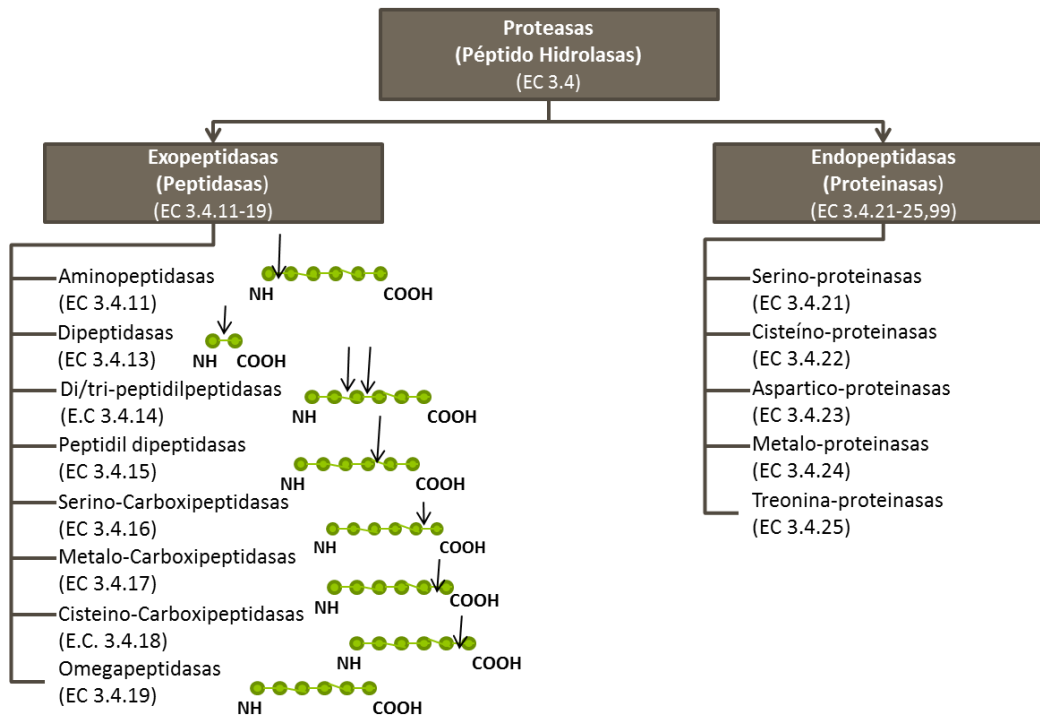


Figura 3. Clasificación de las Proteasas, adaptado de Argarwal, (1990).

Las Proteasas digestivas de los crustáceos

Entre las enzimas reconocidas como responsables del proceso de digestión de la proteína contenida en el alimento de los crustáceos decápodos se encuentran principalmente las de la clase serino proteasas. Las tripsinas y quimotripsinas son las enzimas de la glándula digestiva del camarón con mayor actividad a pH alcalino, cuya participación en el proceso digestivo ha sido mayormente reportada (Hernández y col., 1997; Fernández y col., 2001; Aoki y col., 2003; Sainz y col., 2004). Por otro lado, las catepsinas de la clase cisteíno-proteasas como las catepsinas B y L, son una familia de enzimas que hidrolizan el sustrato a pH ligeramente ácido y que en los últimos años han sido reportadas en la glándula digestiva de varias especies de crustáceos. Estas enzimas han cobrado importancia en los procesos de digestión y putativamente en la respuesta inmune de los organismos (Teschke y Saborowski, 2005; González-Meza, 2014).

Las Catepsinas

El término catepsina es referido a toda aquella enzima proteolítica de origen lisosomal. Las catepsinas tienen actividad óptima a pH ácidos y su masa molecular puede variar entre 14 y 650 kDa (Argarwal, 1990). Las catepsinas de la clase cisteíno proteasas, pertenecientes a la súper familia de la papaína, se encuentran distribuidas en una amplia variedad de organismos. Son sintetizadas como precursores inactivos y requieren la remoción proteolítica de un péptido N-terminal para su activación (Rawlings y Barret, 1994). Además, se encuentran en diversos tejidos y sus concentraciones varían dependiendo del tipo de célula (Argarwal, 1990).

La catepsina B

La catepsina B pertenece al clan CA de las cisteíno-proteasas, siendo la papaína (EC 3.4.22.2) la enzima más estudiada. Las proteasas que se agrupan en este clan tienen similitud en motivos estructurales y en los residuos responsables de la actividad catalítica. Para la catepsina B estos son: cisteína, histidina y asparagina, los cuales favorecen la formación de un centro electrofílico, conocido como hueco de oxianión (Figura 4b), que facilita la formación del intermediario tetrahedral (Polgar, 2004). En la figura 4a se ilustra el mecanismo por el cual se lleva a cabo la catálisis.

A la fecha se sabe que la catepsina B es el único miembro de la familia de la papaína que tiene actividad tanto de endopeptidasa, como de exopeptidasa. Se ha demostrado que como endopeptidasa presenta una ligera preferencia hacia residuos básicos o de fenilalanina en P2 (nomenclatura de Schechter y Berger, 1967). Además, muestra actividad de peptidil-dipeptidasa, liberando secuencialmente dipéptidos del extremo carboxilo.

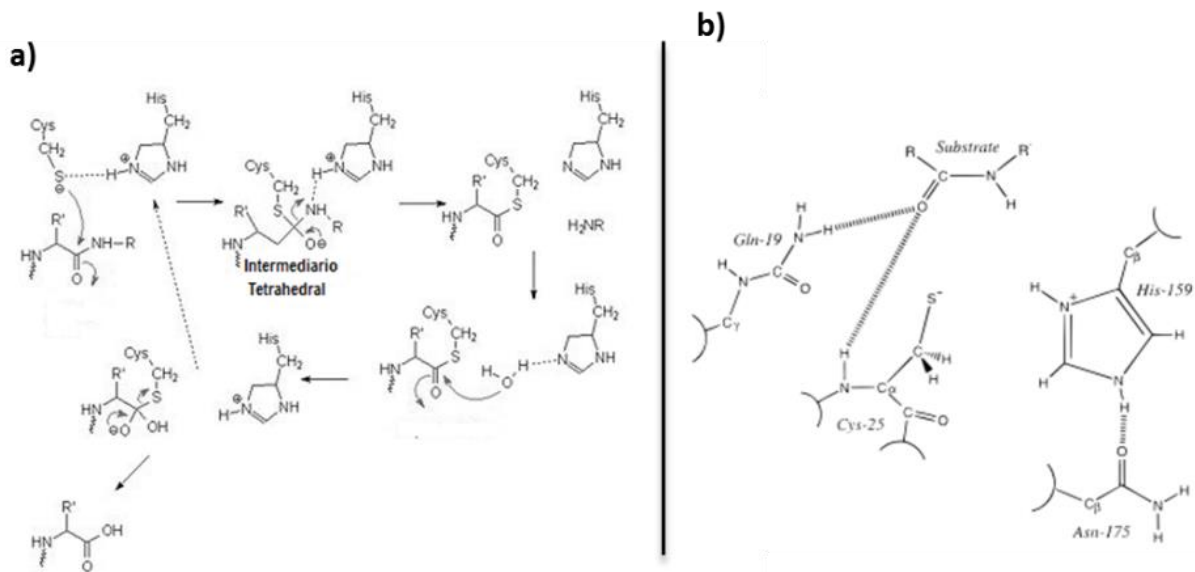


Figura 4. a) Mecanismo de catálisis general para las cisteíno proteasas. b) Formación del centro electrofílico (Harrison, 1997).

La estructura tridimensional de la cathepsina B revela un segmento de 20 residuos no observado en otros miembros de la familia de la papaína, mismo que se ha propuesto es el responsable de la actividad dipeptidasa de la enzima (Figura 5) (Musil, 1991; McGrath, 1999). Estudios previos de mutación dirigida en la secuencia de este segmento también conocido como bucle de oclusión, han demostrado que este participa en la estabilidad estructural de la enzima, así como en la accesibilidad al sitio activo (Illy y col., 1997). Se ha observado que existe una relación estrecha entre la estabilidad del bucle y el pH del medio y, estos a su vez se relacionan con el tipo de actividad catalítica de la enzima. Esta relación y dependencia puede explicarse con base en la inhibición competitiva entre el bucle y el propéptido. A pH bajo, el Asp122 forma un puente salino con el residuo de His110 estabilizando el bucle en su conformación cerrada. Cuando ocurre la desprotonación de la His110, al aumentar el pH, se pierde el puente salino y se desestabiliza la estructura (Quraishi y col., 1999). A pH 4.4 se estima que se da la transición entre una actividad y otra. En condiciones fisiológicas normales se puede observar un porcentaje ligeramente mayor en la actividad como endopeptidasa debido al pH lisosomal (Cathers y col., 2001).

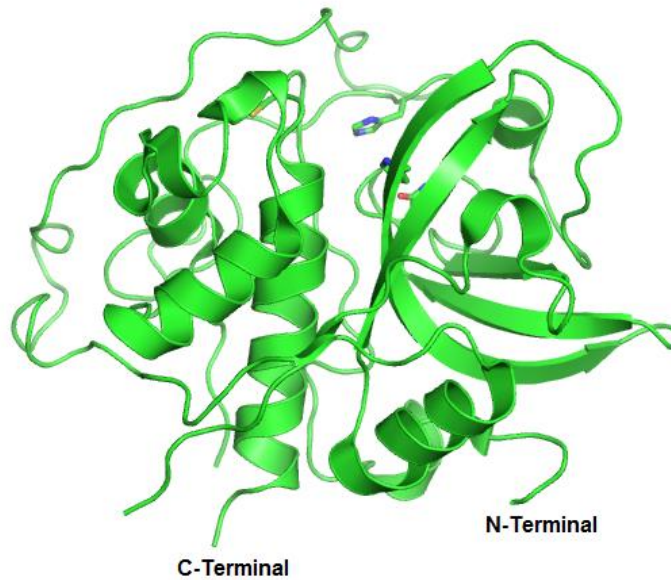


Figura 5. Estructura tridimensional de la catepsina B humana (Mort, 1977).

Se ha demostrado que la catepsina B se encuentra ampliamente distribuida en todos los taxos y participa en funciones clave para los organismos. En los últimos años se ha publicado una serie de estudios en los que se relaciona el incremento en la expresión de catepsina B con procesos patológicos como el crecimiento tumoral y la metástasis en mamíferos. Se ha propuesto que la degradación de las proteínas de la matriz extracelular es resultado de la secreción de catepsina B o de su asociación con la superficie celular (Scorilas y col., 2002; Roshy y col., 2003).

Si bien en los mamíferos la catepsina B ha sido ampliamente estudiada, en los invertebrados a pesar del gran número de especies existentes se tienen pocos reportes de la enzima y sus características (Cho y col., 2003; Takahashi y col., 1993; Aoki, 2003; Sang y col., 2005; Stephens y col., 2012).

A la fecha se sabe que la catepsina B actúa como enzima clave en diversos procesos importantes para el desarrollo de los organismos como son: la desintegración de la grasa del cuerpo larval durante la metamorfosis de la mosca *Sarcophaga peregrina* (Takahashi y col., 1993) y la degradación del saco vitelino embrionario en el mosquito *Aedes aegypti* (Cho y col., 1999). En especies de parásitos como los helmintos, la catepsina B cumple funciones relacionadas con la nutrición, la respuesta inmune y la invasión al hospedero (Sajid y col., 2002; Meemon y col., 2004; Na y col., 2006;).

En organismos invertebrados marinos como los crustáceos la información sobre esta enzima es aún más escasa. En 2003, Aoki y colaboradores reportaron la expresión de catepsina B exclusivamente en la glándula digestiva del camarón *Pandalus borealis*, sugiriendo que la enzima está adaptada para trabajar a bajas temperaturas. En este estudio, el análisis de la actividad enzimática específica de la catepsina B se efectuó utilizando distintos sustratos fluorogénicos donde de acuerdo a los resultados, Z-Arg-Arg-AMC fue uno de los que registró un mayor grado de hidrólisis (Aoki y col., 2003). Publicaciones más recientes han demostrado la existencia de catepsina B en el camarón blanco *L. vannamei* tanto en tejidos u órganos digestivos como la glándula digestiva, el intestino y el jugo gástrico, como en no digestivos, incluyendo hemocitos, branquias, músculo y ámpula terminal (Figura 6a). Debido a que la actividad registrada con sustrato fluorogénico (Z-Arg-Arg-AMC; SIGMA C5429) es mayor en el jugo gástrico, la glándula digestiva y el intestino del camarón en comparación con tejidos no digestivos (Figura 6b), se ha sugerido que la enzima tiene participación en el proceso de la hidrólisis de la proteína del alimento. Además de la función digestiva de las catepsinas, se ha sugerido que esta enzima tiene un papel clave en la hidrólisis de proteínas citosólicas, debido al hallazgo de transcritos en tejidos no digestivos (Stephens y col., 2012).

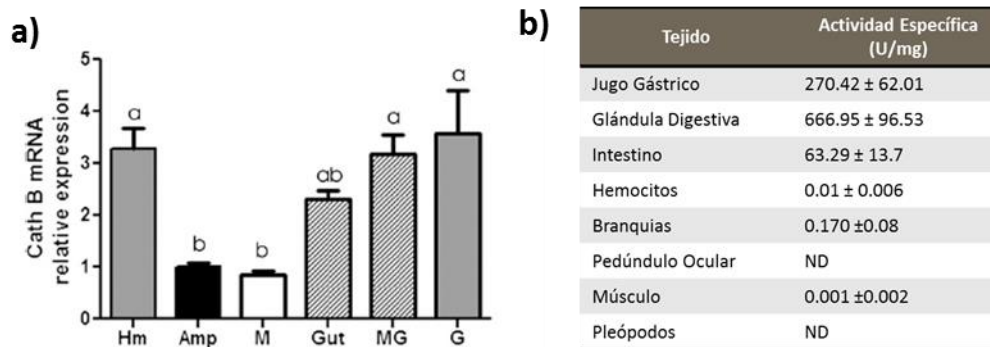


Figura 6. a) Expresión relativa del ARNm de la catepsina B en diferentes tejidos: Hemocitos (Hm), Ámpula terminal (Amp), Músculo (M), Intestino (Gut), Glándula digestiva (MG) y Branquias (G). b) Comparativo entre los valores de actividad enzimática registrada sobre el sustrato Z-Arg-Arg-7-amino-4-metilcoumarin en distintos tejidos (Stephens y col., 2012).

Estudios previos han sugerido que la catepsina B de *L. vannamei* es una proteína de 331 residuos de aminoácidos sintetizada como una pre-pro-enzima que incluye un segmento señal de 16 residuos. Además contiene un pro-péptido en las posiciones 21-60 de la región N-terminal de esta proteína. El sitio activo se encuentra entre los residuos 79 y 326. La forma madura de la proteína contiene 248 residuos de aminoácidos, con un peso molecular calculado de 26.9 kDa y un pI de 6.1. La secuencia deducida de aminoácidos de la catepsina B del camarón cuenta con 15 residuos de cisteína, con C107 en el sitio catalítico y doce cisteínas adicionales, las cuales se presume participan en la formación de seis puentes disulfuro altamente conservados en la gran mayoría de las especies. Estudios comparativos demuestran 3 residuos (C107, H276, N296) altamente conservados formando el sitio catalítico (Stephens y col., 2012).

Recientemente, se sugirió la posible participación de la catepsina B en procesos relacionados con la respuesta inmune del camarón blanco frente a la infección con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) al encontrarse un incremento en la expresión génica de la enzima después de 24 horas post-infección. Además, se encontraron diferencias significativas en la respuesta observada del nivel de transcritos frente a la infección entre distintos tejidos del camarón blanco (González-Meza, 2014).

Hasta el momento no existen estudios enfocados en conocer las características fisicoquímicas y estructurales de la catepsina B del camarón blanco, información relevante que permitirá comprender de una mejor manera la función de la enzima en especies de crustáceos con importancia económica, como lo es el camarón blanco del Pacífico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Modelo *in silico* de la Estructura Tridimensional de la Catepsina B del Camarón Blanco

Para desarrollar un modelo estructural predictivo de la catepsina B del camarón y determinar sus características estructurales esenciales se realizó un análisis bioinformático de secuencias y estructuras de proteínas depositadas en el banco de datos de proteínas (PDB) y el algoritmo Blast P (Altschul, y col. 1990). Se determinó la homología de la secuencia deducida de la proteína reportada para la catepsina B del camarón blanco (GenBank no. acceso: ADI80349.1; Stephens y col., 2012) con las de otras especies reportadas.

Posteriormente, utilizando como templado el modelo tridimensional de la pro-catepsina B humana (Turk, y col. 1996; PDB: 3PBH), se obtuvieron las coordenadas del modelo a través del Software SWISSPRO (Schwede y col., 2003) disponible en línea: <http://swissmodel.expasy.org>. Se evaluó la calidad estructural del modelo obtenido utilizando la herramienta analítica QMEANscore (Benkert y col., 2011) y se utilizó el paquete GROMOS 43B1 acoplado al software DeepView (van Gunsteren y col., 1996) para optimizar la geometría.

Obtención del Extracto Enzimático

Camarones adultos de la especie *L. vannamei* fueron sacrificados y el hepatopáncreas o glándula digestiva fue disectada de forma individual para la obtención del extracto proteico y la caracterización de la enzima, debido a que es en este órgano en donde se ha reportado la mayor actividad con sustrato específico (Stephens, y col. 2012).

La preparación de los extractos se llevó a cabo mediante un proceso de homogenización mecánica y centrifugación de las muestras según se describe a continuación: se pesaron 400 mg de tejido y se homogeneizaron en 1 mL de agua. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 10 000 x g y 4 °C por 30 min para eliminar detritos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y estéril para almacenarse a -20 °C hasta su uso.

Cuantificación de Proteína Soluble Total

La concentración de proteína soluble total de cada extracto se determinó por el método de Bradford, utilizando el kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bradford, 1976) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se construyó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA).

Identificación de la Catepsina B en el Patrón Electroforético de un Extracto Enzimático de Glándula Digestiva.

Detección de proteasas por electroforesis nativa en gel de acrilamida (PAGE)

Para la identificación de las proteínas presentes en el extracto de glándula digestiva se utilizaron alícuotas de 10 µg de proteína de cada muestra para cargarlas en el gel y proceder a su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% a 15 mA por gel y 4 °C, para después teñirlas por 2 h con una solución que contenía azul de coomassie al 0.2 % (p/v), metanol al 45 % y ácido acético al 10 % (Laemmli, 1970). Para la visualización de bandas, los geles fueron incubados por 1 h en una solución de metanol 40 % y ácido acético 7 %.

Adicionalmente, se evaluó la actividad proteolítica en gel siguiendo la técnica descrita por García-Carreño y colaboradores (1993). Brevemente, después de la separación de las proteínas y para revelar la actividad de las proteasas se utilizó como sustrato caseína al 3 % en buffer Tris-HCl 1.5 mM, pH 6.0. El gel se incubó en agitación por 30 min en el sustrato a 4 °C para favorecer la entrada del mismo en el polímero y después se mantuvo 90 min a temperatura ambiente para favorecer la actividad enzimática. Posteriormente, el gel fue lavado varias veces con agua destilada para eliminar los residuos de caseína y se tiñó toda la noche con solución de azul de coomassie como se explicó previamente.

Para la identificación de las proteasas del tipo cisteíno en el extracto enzimático se utilizó la misma técnica de electroforesis, previa incubación de las muestras con inhibidores específicos. Se utilizó el inhibidor E-64 (0.5 mM, *trans*-Epoxy succinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano, L-*trans*-3-Carboxioxiran-2-carbonil-L-leucilagmatino, N-(*trans*-Epoxy succinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida, SIGMA #E3132), que es irreversible y específico para cisteíno proteasas y el CA-074 (20 µM, N-(L-3-*trans*-propilcabamoiloxiran-2-carbonil)-L-isoleucil-L-prolina, SIGMA #C5732), un inhibidor derivado del E-64 que fue diseñado para unirse selectivamente e inhibir al sitio activo de catepsinas B (Murata y col., 1991; Sumiya, y col.,

1992); además se evaluó el efecto del ditioneitol (DTT, 2 mM), un agente reductor que actúa principalmente sobre los residuos de cisteína en la actividad enzimática del extracto.

El ensayo se realizó de la siguiente manera: 10 µg de proteína se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en una solución de DTT 2 mM, para después incubar la mezcla por 30 min con cada uno de los inhibidores antes mencionados; se incluyeron controles negativos para DTT con inhibidores. Posteriormente, las muestras se separaron en geles de poliacrilamida al 15% y al finalizar la electroforesis se incubaron en caseína al 3% en buffer Tris-HCl 1.5 M pH 6.0 por 30 min a 4°C y 90 min a temperatura ambiente (García-Carreño y col., 1993).

Detección de actividad de catepsina B en PAGE con sustrato específico

Para la detección de la banda proteica de la catepsina B en el gel se utilizó el sustrato fluorogénico Z-Arg-Arg-4-Amino-7-metilcoumarin, reportado como específico para la catepsina B (Szpadarska y Frankfater, 2001; Aoki y col, 2003; Cho y col., 2003; Stephens y col., 2012).

Como se describió anteriormente se cargaron 10 µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 12 % y se corrió la electroforesis a 4°C para evitar la pérdida de actividad enzimática. Tras finalizar la separación de las proteínas, el gel se incubó a temperatura ambiente en una solución de tritón X-100 al 2.5 % por 30 min y después por 5 min en el sustrato fluorogénico 10 µM en buffer de acetato de sodio 100 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 2 mM y Triton x-100 0.5%, pH 6.0. El gel se reveló con luz ultravioleta en un equipo Gel Z-Doc Imager (BioRad). Posteriormente se tiñó con azul de coomassie para contrastar la imagen fluorescente con el patrón previamente identificado de las proteínas.

De forma adicional se realizaron pruebas de inhibición incubando las muestras con los inhibidores E-64 (0.5mM), Pefabloc (0.3 mM) y CA-074 (20 µM) antes de evaluar la actividad con el sustrato específico de la catepsina B. Brevemente, se utilizó una alícuota del extracto con 10 µg de proteína y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en una solución de DTT 2 mM, para después incubar la mezcla por 30 min con cada uno de los inhibidores antes mencionados. Posteriormente, se procedió a separar las muestras por electroforesis y revelar el gel con sustrato fluorogénico como se describe en el párrafo anterior. Además, se cargó en uno de los carriles 5 µg de tripsina pura (Isoforma C) de la glándula digestiva de *L. vannamei* donada por el Laboratorio de Bioquímica del CIBNOR, que fue incubada previamente durante 10 min en DTT 2 mM.

Detección de la actividad de catepsina B en diferentes tejidos por PAGE con sustrato específico

Para evaluar la actividad de catepsina B en diversos tejidos del camarón, se obtuvieron muestras de intestino, ámpula terminal, branquias, músculo, pleópodos y glándula digestiva. Se incubaron 10 µg de extracto proteico de cada uno de ellos con DTT 2 mM por 10 min, se procedió a separar las muestras por electroforesis y a revelar el gel con sustrato fluorogénico como se describe en la sección anterior.

Aislamiento Parcial de la Catepsina B del Camarón

Con el objetivo de aislar parcialmente la catepsina B del extracto enzimático de la glándula digestiva y así poder evaluar los parámetros óptimos de actividad de la enzima en ausencia de otras proteasas como las isotripsinas, se realizó una separación cromatográfica de las proteínas. Al no existir en el mercado una matriz comercial específica para aislar la catepsina B por afinidad y con el objetivo de eliminar las enzimas de la clase de las serino-proteasas que se encuentran en mayor proporción en los extractos enzimáticos de *L. vannamei* (Hernández, 1997; Sainz, 2004) se procedió a realizar una separación inversa, utilizando una columna cuya matriz contenía el inhibidor reversible de serino proteasas *p*-aminobenzamidina. Las fracciones de interés fueron aquellas que se obtuvieron después de cargar los extractos a la columna y antes de eluir las moléculas unidas a la misma.

Se utilizó una columna abierta de 10 mL donde se empacó 1 mL de matriz compuesta por *p*-aminobenzamidina en agarosa al 6 % (SIGMA, #A8335). Esta fue regenerada con 3 ciclos de 3 volúmenes de buffer Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 7.0 seguidos de 3 volúmenes de buffer acetato de sodio 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 4.5. Posteriormente la columna se equilibró con 10 mL de buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0, para después introducir 1 mL de extracto de glándula digestiva con una concentración de 2 mg/mL de proteína. Los lavados se hicieron con 10 mL de buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 colectándose las primeras 8 fracciones de 500 µL cada una, mismas que contenían las proteínas del extracto sin la presencia de las isotripsinas.

La elución se realizó por un cambio en la fuerza iónica utilizando 10 mL de un buffer que contenía Tris-HCl 0.1 M además de NaCl 0.5 M, pH 7.0. Al final se recuperaron 3 fracciones de 500 µL cada una, correspondientes a la elución. Todas las fracciones fueron etiquetadas y almacenadas a -20 °C para ensayos posteriores. Para eliminar los residuos que pudieron haberse mantenido unidos a la matriz, esta se lavó con 5 mL de una solución de HCl 10 mM /

NaCl 1 M, pH 2.0 seguido de 2 volúmenes de HCl 50 mM, pH 1.12. Por último la columna se regeneró con los 3 ciclos descritos al inicio del ensayo.

Evaluación de las fracciones en PAGE

Para corroborar la eficiencia de la cromatografía las fracciones recuperadas se evaluaron mediante su separación en PAGE al 15 % y la detección de la actividad específica en gel como se describe en las secciones anteriores. Debido a que la concentración de proteína soluble recuperada era muy poca (0.1 y 0.02 mg/mL), fue necesario implementar la técnica de tinción con nitrato de plata de los geles de acrilamida (Chevallet y col. 2006) para evidenciar el patrón proteico de estas. Además la actividad enzimática específica de cada una de las fracciones se cuantificó en microplaca como se describe en la siguiente sección.

Cuantificación de la Actividad Enzimática

Curva estándar

Se preparó una curva estándar con concentraciones conocidas (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.25, 2.5, 5 y 7.5 μ M) del fluorocromo 4-Amino-7-MetilCoumarin (SIGMA, #A9891) en un volumen final de 100 μ L de una solución buffer que contenía acetato de sodio 100 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 2 mM y Triton x-100 al 0.05%. Cada punto de la curva se realizó por triplicado. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 440 nm.

El ensayo se realizó en un fluorómetro modelo Synergy 4 (Biotek). Se construyó la curva estándar graficando las unidades relativas de fluorescencia frente a los nanomoles correspondientes del fluorocromo para obtener la ecuación de la recta necesaria para el cálculo de la fluorescencia liberada por 1 nmol de AMC, información requerida para la estimación de la actividad enzimática (Stephens y col. 2012).

Ensayo de actividad

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron utilizando el sustrato fluorogénico: Z-arg-arg-7-amino-4-metilcoumarin (Z-Arg-Arg-AMC; SIGMA, #C5429), siguiendo la metodología descrita por Stephens y col. (2012). La cinética de cada reacción se monitoreó en un volumen final de 200 μ L, donde 0.5 μ g de proteína reaccionaron con una concentración final del

sustrato de 10 μ M, en un buffer de acetato de sodio 100 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 2 mM y Triton x-100 al 0.05%, pH 5.5, por 10 min con intervalos de lectura cada 30 s. La actividad específica se expresó en miliunidades de actividad por mg proteína (mU/mg). Una unidad de actividad fue definida como la liberación de 1 μ mol de AMC por minuto. La evaluación se llevó a cabo por triplicado.

La determinación de la actividad se realizó a través de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Unidades de Actividad}}{\text{mg de Proteína}} = \frac{\Delta FLU}{\text{Tiempo (min)}} \times \frac{1 \text{ nanomol}}{UFR} \times \frac{1 \text{ mmol}}{1000 \text{ nmoles}} \times \frac{1}{\text{mg de proteína}}$$

Donde Δ FLU corresponde a la diferencia entre los puntos final e inicial donde la enzima se comporta de manera lineal y el tiempo en min donde se observa este comportamiento. Las URF equivalen a las unidades de fluorescencia relativas correspondientes a la liberación de 1 nmol de AMC.

Determinación del pH y Temperatura Óptimas para la Actividad de la Catepsina B

Para determinar el pH óptimo de la catepsina B se cuantificó la actividad enzimática como se describió anteriormente, a pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0. Se construyó una curva de calibración para cada uno de los pH evaluados.

De igual manera se registró la actividad en un intervalo que comprendió las siguientes temperaturas 15, 25, 35, 45, y 55 °C. Para realizar este ensayo, el volumen correspondiente a 0.5 μ g de proteína de cada muestra fue ajustado a 10 μ L con buffer de acetato de sodio 100 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 2 mM y Triton x-100 0.5 %, pH 5.5 y se calentó por 5 min a la temperatura de interés. Simultáneamente se calentaron 90 μ L de sustrato Z-Arg-Arg-AMC a una concentración 111.11 μ M en buffer de acetato de sodio 100 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 2 mM y Triton x-100 0.5 %, pH 5.5. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron la enzima y el sustrato y se siguió la cinética de reacción como se describe en la sección anterior. El pH y la temperatura óptima son aquellas en donde se registró la mayor actividad de catepsina B.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modelo *in silico* de Estructura Tridimensional de la Catepsina B del Camarón Blanco *L. vannamei*

Para el diseño del modelo *in silico* fue necesario realizar el alineamiento de las secuencias de la pro-catepsina B reportadas en el banco de datos de proteínas para compararlas con la secuencia deducida de la catepsina B de camarón blanco reportada por Stephens y colaboradores (2012). El alineamiento múltiple de la Figura 7 permite hacer un análisis de las regiones conservadas y semiconservadas de las secuencias de la pro-catepsina B reportadas en diferentes especies. En el mismo pueden observarse los sitios relacionados con el reconocimiento, unión e hidrólisis del sustrato y la secuencia del bucle de oclusión, que mantiene los residuos de cisteína que flanquean la secuencia, además este contiene las histidinas responsables de mediar la actividad dual de la enzima. Igualmente, se encuentran altamente conservados los residuos que rodean y al mismo tiempo favorecen la orientación de los aminoácidos participantes en el proceso de catálisis.

El alineamiento de la Figura 7 muestra las 12 cisteínas conservadas en todas las especies analizadas, las cuales forman 6 puentes disulfuro para la estabilización de la estructura tridimensional. Se sabe que los puentes disulfuro estabilizan proteínas reduciendo la entropía del estado desnaturalizado e incrementando la entalpía en la proteína plegada por interacciones locales (Harrison y Sternberg, 1994; Wedemeyer y col., 2000). Estudios previos han establecido que la distancia mínima entre las cisteínas para la formación de un enlace disulfuro es de aproximadamente 2.5 Å, misma que se consideró para la valoración del modelo *in silico* (Rubinster y Fiser, 2007). Además, se encontró en todas las especies la Cys107 responsable de la actividad catalítica.

Dentro de las secuencias analizadas, el residuo Cys294 se encuentra presente exclusivamente en las especies de crustáceos y en los peces *H. hippoglossus* y *L. argentimaculatus*. De acuerdo al análisis estructural del modelo tridimensional de la catepsina B del camarón blanco generado en este trabajo (Figura 8), el residuo Cys294 se encuentra en la región interna de la enzima y, como se mencionó anteriormente, esta posición no le da la posibilidad de formar enlaces disulfuro debido a que no existe otro residuo de cisteína libre y a la distancia requerida para interactuar. Al respecto, Marino y Gladyshev (2012) sugieren que los residuos de cisteína pueden participar no sólo en la formación de enlaces disulfuro para la estabilidad de la estructura tridimensional y centro catalítico, sino que también su disposición en la molécula y su estado de óxido-reducción pueden otorgarles la capacidad de ser centros de

regulación post-traducciona. En el resto de los organismos analizados en el alineamiento, este residuo se presenta como valina o alanina, residuos neutros, por lo tanto la presencia de un aminoácido con una cadena lateral ionizable, como lo es la cisteína, puede añadir alguna otra característica a la catepsina B de los crustáceos que no ha sido estudiada a la fecha.

```

F. chinensis      ----MRAILG-LLVAAVAVN-----ASSHFLSDKFIKQLQSED-STWEAGR--NFNKHLISIKY 50
P. monodon      ----MRVILG-LLVAAVAVN-----ASSHFLSDKFIKQLQSED-STWEAGR--NFNKHLISIKY 50
L. vannamei     ----MRVILV-LSVVAVAVN-----ANSHFLSDKFIKLLQSED-STWEAGR--NFNKHLISIRY 50
M. japonicus   ----MRVIVGLLVAAVAVS-----ANNHFLSDKFIKMLQSED-STWEAGR--NFNHRLSIRY 51
M. nipponense  ----MQGILL-LLGLVCAAS-----AAIHPLSDKFIQLLQNEK-TTWKAGR--NFNKNLPMRY 50
P. caridea     ----MRSLLL-ILGVVCAAS-----AAVHPLSDKFIQLLQSEK-STWKAGR--NFNENLSMRY 50
S. peregrina   ----MRQHVIICIAFLAFGQVLANLDAENDLLSDEFLEIVRSKA-KTWTVGR--NYDKSVPRSH 58
G. morsitans   ----MRLQLTSIFLALLAL-----NVHGD-DILSDKFMEIVRQKA-KTWTVGR--NFHKLTPMSH 52
D. melanogaster ----MNLVVATAASVAA-----LTSGEPSLLSDEFIEVRSKA-KTWTVGR--NFDASVTEGH 53
A. aegypti     ----MKRYLLVVAALALIAIDHAACGQRRIHPLSQKFIDQINSKA-TTWKAGP--NFSPETSMF 59
C. rogercresseyi ----MKLLILFGLLLSTGTE---VLEAYSNSILSSEYIHSINEAS-EIWKAGR--NPHPETSSNY 55
C. clemense    ----MKLVIGYFLIYASLG----ASKTY-NSILSESIASVNEEA-QTWKAGP--NPHPETSSNY 54
T. infestans   ----MKELIPFSLICGIFS----ASIPTDPLSDEFIDYINSLQ-TTWWRAGR--NFAPNTPKY 53
P. borealis    ----MKVLLLLLVAASAE-----LDPLSDEFLELLQSKQ-MTWKAGR--NFAKDISKDF 49
H. sapiens     ---MWQLWASLCCLLVLANA--RSRP--SFHPVSDLVNIVNKRN-TTWQAGH--NFYN-VDMGY 54
M. musculus   ---MWSLLI LLSCLLAL TSA--HDKP--SFHPLSDDLINYNKQN-TTWQAGR--NFYN-VDISY 54
L. argentomaculatus ---MWR-AAFLLLAASLSVS--QARP--RLKPLSSEMVNINKNV-TTWKAGH--NFHN-VDFS 53
H. hippoglossus ---MWH-AALLLLAAGSVS--LARP--HLQPLSKEMVNINKNM-TTWKAGH--NFRD-VDYS 53
D. rerio       ---MWR-LAFLCVISALSVS--WARP--RLPPLSHEMVNFINKAN-TTWTAGH--NFRD-VDYS 53
I. ricinus     ---MLKSLLVGLLAAVCFG--REIHPKRWHPLSDQMINFINKIN-TTWKAGR--NFKSISMSY 57
F. gigantea    ----MNWLVFAIIAVVQAK---PNHKPQFEAFSDELIRFVNEESGASWKAARSTRFSNVDFHFKL 58
S. japonicus   MLKIAVYIVSLFTFLEAHVT---TRNNQRIEPLSDEMISFINEHPDAGWKADKSDRHFSLDDARI 63

```

. * . : : . . * . : .

→ Proteína Madura

```

F. chinensis      FRRLMGVHPDSKFHMPKYEYVHQIPENF-----EMPKEFDSRAAWPMCPTISEIRDQSGSCGSCW 108
P. monodon      FRRLMGVHPDSKFHMPKYEYVHQIPENF-----EMPKEFDSRAAWPMCPTIGEIRDQSGSCGSCW 108
L. vannamei     FRRLMGVHPDSKYHMPKYEYVHQIPENF-----ELPKEFDSRAAWPMCPTIGEIRDQSGSCGSCW 108
M. japonicus   FRRLMGVHPDSKYHMPGYEYVHQIPENF-----DMPKEFDSRAAWPMCPTIGEIRDQSGSCGSCW 109
M. nipponense  LKSLMGVHADSKFHMSPVHKKHPIPEGF-----KIPKEFDSRTAWSMCPTISEIRDQSGSCGSCW 108
P. caridea     IKGLMGVHPDSKYHMSPVHKKHQPANL-----EIPKEFDSRTAWPMCPTIGEIRDQSGSCGSCW 108
S. peregrina   FRRLMGVHPDAHKFTLHEKSLVLGEE--VGLADSDVPEEFDARKAWPNCPTIGEIRDQSGSCGSCW 121
G. morsitans   YRQLMGVHPDAHNYALPDKRMVLRREEELVGLGNMIPKDFDSRKQWPHCPTIWEIRDQSGSCGSCW 117
D. melanogaster IRRLMGVHPDAHKFALPDKREVLGDLY--VNSVD-ELPEEFDSRKQWPNCPPTIGEIRDQSGSCGSCW 116
A. aegypti     IRGLMGVHKDADKFMPP---VYLHEME---ADDDFPENFDSRTQWPNCPPTIGEIRDQSGSCGSCW 117
C. rogercresseyi LRSLMGVLPNHKDHLPPPLPSLLGTEA-----LPSDFDAREHWPNCPSIRLIRDQSGSCGSCW 112
C. clemense    IRSLMGVLPNHRDYLPPPLPNLLGTES-----IPDTFDAREHWPNCPSIRLIRDQSGSCGSCW 111
T. infestans   LKSLAGVHKDANNAFTLPKRQVSLDVT-----LPKEFDARKHWPNCPTISAEIRDQSGSCGSCW 110
P. borealis    LKSLNCRVKNPDIKPLPLKNVTPTEI-----PVEFDAREQWPHCPCIDEIRDQGNCGSCW 105
H. sapiens     LKRLCGTFLGGP--KPPQRMVFTEDLK-----LPASFDAREQWPCPTIKEIRDQSGSCGSCW 109
M. musculus   LKKLCGTVLGGP--KLPGRVAFGEDID-----LPETFDAREQWSNCPPTIGQIRDQSGSCGSCW 109
L. argentomaculatus VQRLCGTMLKGP--KLPIMVQYAGDMK-----LPKAFDSREQWPNCPPTLKEIRDQSGSCGSCW 108
H. hippoglossus VRRLCGTMLKGP--KLPIMVQYAGGLK-----LPAQFDSREQWPECPPTLKEIRDQSGSCGSCW 108
D. rerio       VKKLCGTFLKGP--KLPVMVQYTEGLK-----LPKNFDAREQWPNCPPTLKEIRDQSTCGSCW 108
I. ricinus     IRGLMGVNPKSKEYRLEPFVHEEIPDD-----LPESFDAREKWSHCASINLIRDQASCGSCW 114
F. gigantea    HLGALSETPEERNALRPTIKHDISKND-----LPESFDARSQWPCWTISEIRDQSRCGSCW 115
S. japonicus   LMGARKEDAEMKRNRRPTVDHHDLNVE-----IPSQFDSRKKWPHCKSISQIRDQSRCGSCW 119

```

* **:* * . * : ****.*****

F. chinnensis AFGAVEVMSDRQCIHSGKSNFHYSSLENLVSCCHL-CGFGCNGGFPGAAFKYVWHSGLVSGGSFN 172
P. monodon AFGAVEVMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHL-CGFGCNGGFPGAAFKYVWHSGLVSGGSFN 172
L. vannamei AFGAVEVMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHL-CGFGCNGGFPGAAFKYVWHSGLVSGGSFN 172
M. japonicus AFGAVEVMSDRQCIHSGKSNFHYSSLENLVSCCHL-CGFGCNGGFPGAAFKYVWHSGLVSGGSFN 173
M. nipponense AFGAVEVMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHL-CGFGCNGGFPGAAFQYVWHSGLVSGGFN 172
P. caridea AFGAVEVMSDRQCIHSGKSNFHYSSLENLVSCCHL-CGFGCNGGFPGAAFQYVWHSGLVSGGSFN 172
S. peregrina AFGAVEAMSDRQCIHSNATIHFFHSADDLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 185
G. morsitans AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 181
D. melanogaster AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 180
A. aegypti AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 181
C. rogercresseyi AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 174
C. clemense AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 173
T. infestans AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 174
P. borealis AVSAASVMTDRQCIDTEGLVDFRFSSENVAACCTE-CGNACYGGDEDTAFTHVWTKGFVSGGRHN 169
H. sapiens AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 174
M. musculus AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 174
L. argentomaculatus AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 172
H. hippoglossus AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 172
D. rerio AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 172
I. ricinus AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 178
F. gigantea ATAAASAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 179
S. japonicus AFGAVEAMSDRQCIHSGKSNFHYSAENLVSCCHT-CGFGCNGGFPGAAWAYWTRKGLVSGGPYG 183
* . * . . : * * * . * . : . : : * * * * . * * * * : . * * * : * . : *

F. chinnensis STQGCQPYEIAPECHEHVS-PRPKCSEG-GGTPKCAKTEKGY-IVVDYESDLHHGGKAYSIMKDE 234
P. monodon STQGCQPYEIAPECHEHVS-PRPKCSEG-GGTPKCAKTEKGY-IVVDYESDLHHGGKAYSIMKDE 234
L. vannamei STQGCQPYEIAPECHEHVS-PRPKCSEG-GGTPKCAKTEKGY-IVVDYESDLHHGGKAYSIMKDE 234
M. japonicus STQGCQPYEIAPECHEHVS-PRPKCSEG-GGTPKCAKTEKGY-IVVDYESDLHHGGKAYSIMKDE 235
M. nipponense STQGCQPYEIAPECHEHVS-PRPKCSEG-GGTPKCAKTEKGY-IVVDYESDLHHGGKAYSIMKDE 234
P. caridea STQGCQPYEIAPECHEHVS-PRPKCSEG-GGTPKCAKTEKGY-IVVDYESDLHHGGKAYSIMKDE 234
S. peregrina SSQGCQPYEIAPECHEHVS-TRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YKVDYKTDKHFGRSAYSISKNV 248
G. morsitans SSQGCQPYEIAPECHEHVS-TRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YKVDYKTDKHFGRSAYSISKNV 244
D. melanogaster SNQGCQPYEIAPECHEHVS-TRPPCAHG-GRTPKCSHVCSQSG-YTVDYAKDKHFGRSAYSISKNV 243
A. aegypti SDQGCQPYEIAPECHEHVS-SRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YNVYAKDKMYGKSSYSIANHE 244
C. rogercresseyi SHSGCQPYEIAPECHEHVS-TRPPCAHG-GRTPKCSHVCSQSG-YNVYAKDKMYGKSSYSIANHE 237
C. clemense SHKGCQPYEIAPECHEHVS-TRPPCAHG-GRTPKCSHVCSQSG-YNVYAKDKMYGKSSYSIANHE 236
T. infestans SKQGCQPYEIAPECHEHVS-TRPPCAHG-GRTPKCSHVCSQSG-YNVYAKDKMYGKSSYSIANHE 236
P. borealis SNEGCPYSVEEICHEHVS-TRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YKVDYKTDKHFGRSAYSISKNV 231
H. sapiens SHVGCQPYEIAPECHEHVS-TRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YKVDYKTDKHFGRSAYSISKNV 236
M. musculus SHVGCQPYEIAPECHEHVS-TRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YKVDYKTDKHFGRSAYSISKNV 236
L. argentomaculatus SHVGCQPYEIAPECHEHVS-TRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YKVDYKTDKHFGRSAYSISKNV 235
H. hippoglossus SHIGCRPYTIPPEICHEHVS-TRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YKVDYKTDKHFGRSAYSISKNV 235
D. rerio SHIGCRPYTIPPEICHEHVS-TRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YKVDYKTDKHFGRSAYSISKNV 235
I. ricinus TPDGCKPYSLAPICHEHVS-TRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YKVDYKTDKHFGRSAYSISKNV 240
F. gigantea NRTGCQPYEIAPECHEHVS-TRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YKVDYKTDKHFGRSAYSISKNV 243
S. japonicus NHTGCQPYEIAPECHEHVS-TRPPCEGEGGKTPKCVKRCQAS-YKVDYKTDKHFGRSAYSISKNV 246
. * * * : . * : * . * * * * * * * * * * * * * * :

F. chinnensis DQIKYEIMNNGPVEGAFTVYVDFLHYKSGVYQHRHGLPLGGHAIRVLGWGE--ENGTPLYWLCANS 297
P. monodon DQIKYEIMNNGPVEGAFTVYVDFLHYKSGVYQHRHGLPLGGHAIRVLGWGE--ENGTPLYWLCANS 297
L. vannamei DQIKYEIMNNGPVEGAFTVYVDFLHYKSGVYQHRHGLPLGGHAIRVLGWGE--ENGTPLYWLCANS 297
M. japonicus DQIKYEIMNNGPVEGAFTVYVDFLHYKSGVYQHRHGLPLGGHAIRVLGWGE--ENGTPLYWLCANS 298
M. nipponense TQIKYDINTNGPVEGAFTVYVDFLHYKSGVYQHRHGLPLGGHAIRVLGWGE--EDGTPYWLANS 298
P. caridea TQIKYDINTNGPVEGAFTVYVDFLHYKSGVYQHRHGLPLGGHAIRVLGWGE--EDGTPYWLANS 297
S. peregrina KDIQKEIMQNGPVEGAFTVYEDLILYKDGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGV--ENKTPYWLANS 311
G. morsitans HDIQEEIMTHGPVEGAFTVYEDLILYKDGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGV--EKDIPYWLANS 307
D. melanogaster REIQEEIMTNGPVEGAFTVYEDLILYKDGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGVWGEKIPYWLIGNS 305
A. aegypti KQIQKEIMTNGPVEGAFTVYEDLILYKDGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGV--EDGTPYWLANS 307
C. rogercresseyi KQIQLEIMDNGPVEAAFSVYSDFMNDKSGVYRHVKGSLGGHAIRILGWGV--EKGTPYWLANS 300
C. clemense KQIQMDIMTNGPVEAAFSVYSDFMNDKSGVYRHVKGSLGGHAIRILGWGV--EKGTPYWLANS 299
T. infestans KQIQAEILKNGPVEAAFTVYEDLVNYKEGVYQHVAGSVLGGHAIRILGWGV--ENDTPYWLANS 299
P. borealis TQIQEEIMTNGPVTAFAVYDFLHYKSGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGE--EDGTPYWLANS 294
H. sapiens KDIMAEIYKNGPVEGAFTVYEDLILYKDGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGV--ENGTPLYWLCANS 299
M. musculus KEIMAEIYKNGPVEGAFTVYEDLILYKDGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGV--ENGTPLYWLCANS 299
L. argentomaculatus AEIQYEIYKNGPVEGAFTVYEDLILYKDGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGE--ENGVYWLANS 298
H. hippoglossus EQIQAEISQNGPVEGAFTVYEDLILYKDGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGE--EDGTPYWLANS 298
D. rerio NSIMAEILKNGPVEGAFTVYEDLILYKDGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGE--ENGTPLYWLCANS 298
I. ricinus KQIQTEIFKNGPVEADFTVYADFLHYKSGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGT--ENGTPLYWLCANS 303
F. gigantea SYIMQEIYKNGPVEVTFVYADFLHYKSGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGV--ENGVNYWLANS 306
S. japonicus KVIQRDIMYGPVEAAFDVYEDLILYKDGVYQHVHGRELGGHAIRILGWGV--EKRTPYWLANS 309
* : : * * * * * : * : * : * : * : * * * * * * * * * * * * * * :

<i>F. chinensis</i>	WNTDWGDNGLFKILRGS ^C DHCGIESEISTGLPKLN-----	331
<i>P. monodon</i>	WNTDWGDNGLFKILRGS ^C DHCGIESEISAGLPKVN-----	331
<i>L. vannamei</i>	WNTDWGDNGLFKILRGS ^C DHCGIESEISAGLPKLN-----	331
<i>M. japonicus</i>	WNTDWGDNGLFKILRGS ^C DHCGIESEISAGLPKLN-----	332
<i>M. nipponense</i>	WNTDWGDNGYFKILRGS ^C DHCGIESEISAGLPKVE-----	331
<i>P. caridea</i>	WNSDWGDNGYFKILRGS ^C DHCGIESEISAGLPKVD-----	331
<i>S. peregrina</i>	WNTDWGNNGFFKMLRGEDHC ^C GIESAIAAGLPKV-----	344
<i>G. morsitans</i>	WNTDWGNNGFFKILRGKDH ^C GIESSISAGLPKI-----	340
<i>D. melanogaster</i>	WNTDWGDHGGFRILRGQDH ^C GIESSISAGLPKL-----	338
<i>A. aegypti</i>	WNSDWGDNGFFKILRGEDH ^L GIESSIAAGLPKV-----	340
<i>C. rogercreyessi</i>	WNTDWGDKGTFFKILRGS ^C DHCGIEGSVVTGLPR-----	332
<i>C. clemense</i>	WNTDWGDNGTFFKILRGS ^C DHCGIEDSVVAGLPR-----	330
<i>T. infestans</i>	WNTDWGNNGFFKILRGKDE ^C GIEIDVSAGLPR-----	331
<i>P. borealis</i>	WNTDWGDNGLFKILRGS ^C DECFEFGDMAAATYSSK-----	328
<i>H. sapiens</i>	WNTDWGDNGFFKILRGQDH ^C GIESEVVAGIPRTDQYWEKI	339
<i>M. musculus</i>	WNLDWGDNGFFKILRGENH ^C GIESEIVAGIPRTDQYWGRF	339
<i>L. argentomaculatus</i>	WNTDWGDNGFFKFLRGS ^C DHCGIESEIVAGIPK-----	330
<i>H. hippoglossus</i>	WNTDWGENGFFKILRGS ^C DHCGIESEIVAGIPK-----	330
<i>D. rerio</i>	WNTDWGDNGYFKILRGEDH ^C GIESEIVAGIPM-----	330
<i>I. ricinus</i>	WNEDWGDHGYFKILRGKDE ^C GIEDDINAGIPKDE-----	337
<i>F. gigantica</i>	WNEEWGNGYFRMVRGRNE ^C GIESEVVAGMPRL-----	339
<i>S. japonicus</i>	WNEDWGEKGLFRMVRGRDE ^C SIESDVVAGLIKT-----	342
	** :*:*: * :*:** :. :* : :.	

Figura 7. Alineamiento de las secuencias reportadas para la procatepsina B (Modificado de Stephens, y col. 2012). *Fenneropenaeus chinensis* (GenBank ADI80349-1); *Penaeus monodon* (GenBank AHA83423.1); *Litopenaeus vannamei* (GenBank ABQ10737.1); *Marsupenaeus japonicus* (GenBank ADO32581.1); *Macrobrachium nipponense* (GenBank: HM134079.1); *Palaemon carinicauda* (GenBank AFM82475.1); *Sarcophaga peregrina* (GenBank BAA04103.1); *Glossina morsitans morsitans* (GenBank AAK07477.2); *Drosophila melanogaster* (GenBank AAF48317.1); *Aedes aegypti* (GenBank XP_0016653890.1); *Caligus rogercresseyi* (GenBank ACO11618.1); *Caligus clemense* (GenBank ACO14731.1); *Triatoma infestans* (GenBank AAR12009.1); *Pandalus borealis* (GenBank BAC65419.1); *Homo sapiens* (GenBank AAH10240.1); *Mus musculus* (GenBank AAA37375.1); *Lutjanus argentimaculatus* (GenBank ACO82382.1); *Hippoglossus hippoglossus* (GenBank ABJ80691.1); *Danio rerio* (GenBank AAQ97764.1); *Ixodes ricinus* (GenBank ABO26563.1); *Fasciola gigantica* (GenBank AAO73003.1); *Schistosoma japonicum* (Uniprot p43157). Las secuencias correspondientes a crustáceos se resaltan en negritas. La flecha denota el inicio de la secuencia de la enzima madura. (C) denotan los residuos de cisteína conservados en todas las especies, (*) denotan residuos idénticos, (:) denotan sustituciones conservadas, y (.) denotan sustituciones semiconservadas. Se denota de color rojo la secuencia del bucle de oclusión y de color azul la secuencia del propéptido. Los aminoácidos involucrados en el proceso de catálisis están enmarcados con gris (C). La cisteína 294 presente exclusivamente en organismos marinos se resalta con fondo amarillo (C).

Durante el presente estudio se construyó un modelo predictivo del sitio activo de la proteína deducida de la catepsina B de *L. vannamei* (Figura 9). Se resaltan con barras las cadenas laterales de los residuos de His276, Asn296 y Gln101 de la secuencia de la procatepsina B del camarón, que corresponden con los residuos His199, Asn219 y Cys 29 según la numeración en *H. sapiens* para la catepsina B madura (Musil, 1991; Mort, 1997;), y que participan en la formación y estabilización del intermediario tetrahedral. La Cys 107 se presenta como el principal residuo asociado a la catálisis y se determinó mediante este análisis que la disposición espacial de las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la actividad catalítica de la catepsina B del camarón blanco concuerda con la mostrada en los modelos tridimensionales existentes para organismos vertebrados.

En las figuras 8 y 9 el bucle de oclusión está marcado en color rojo. Estudios previos han demostrado que este es un elemento clave tanto para la activación de la catepsina B, como para la transición entre las actividades de endopeptidasa y exopeptidasa de esta enzima (Musil, 1991; Illy y col, 1997; McGrath, 1999).

La Figura 10 ilustra la interacción electrostática que se genera entre la cadena lateral de la His188 del bucle de oclusión y el grupo carboxilo presente en el residuo Asp100. Estudios estructurales previos han demostrado que la composición aminoacídica de esta región hace factible que el residuo de His189 sea capaz de girar hasta 14 Å para favorecer la interacción entre la His188 y el Asp100 (Quraishi y col., 1999, Cathers y col. 2001). Este puente estabiliza la conformación cerrada del bucle de oclusión favoreciendo la actividad como exopeptidasa. Además se ha reportado que a pH ácido, el bucle es capaz de desplazar la región del péptido exponiéndolo para su proteólisis con la posterior activación de la enzima. Así, cuando la cadena lateral de la histidina 188 se desprotona, la interacción se desestabiliza y el bucle cambia a la conformación abierta, permitiendo la interacción del sustrato con el sitio de unión para la actividad de endopeptidasa.

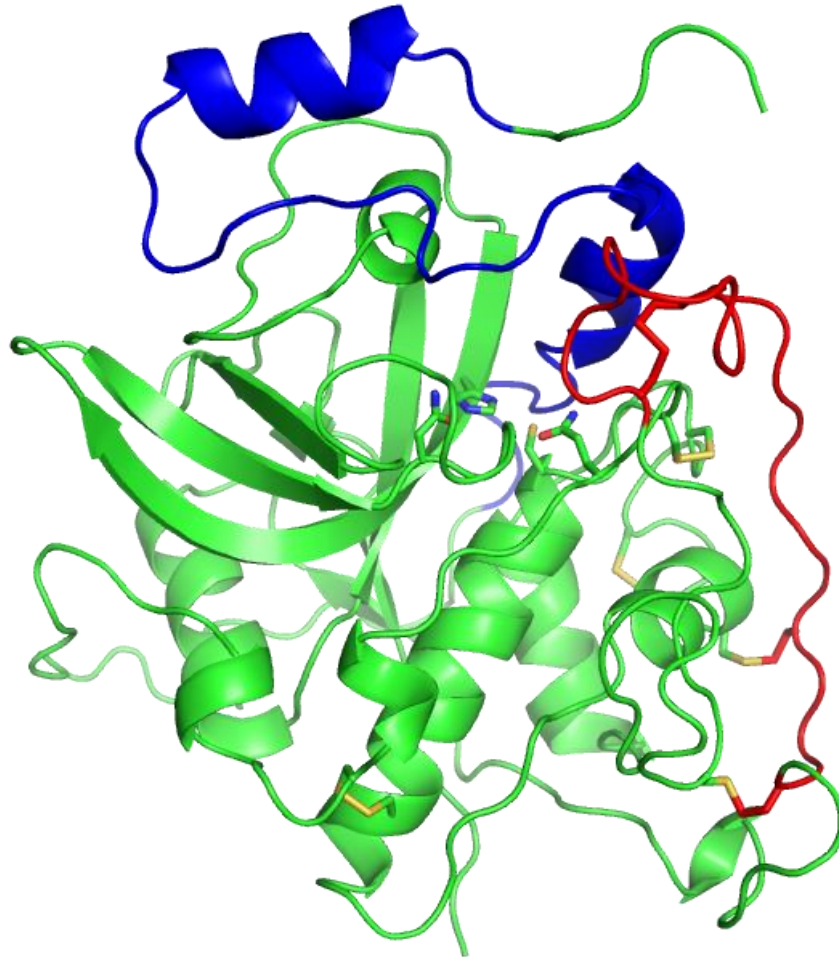


Figura 8. Modelo predictivo de la estructura tridimensional de la procathepsina B de *L. vannamei*. Los aminoácidos responsables de la catálisis y los puentes disulfuro se representan en forma de barras. De color azul se muestra la región correspondiente al propéptido y de color rojo el bucle de oclusión.

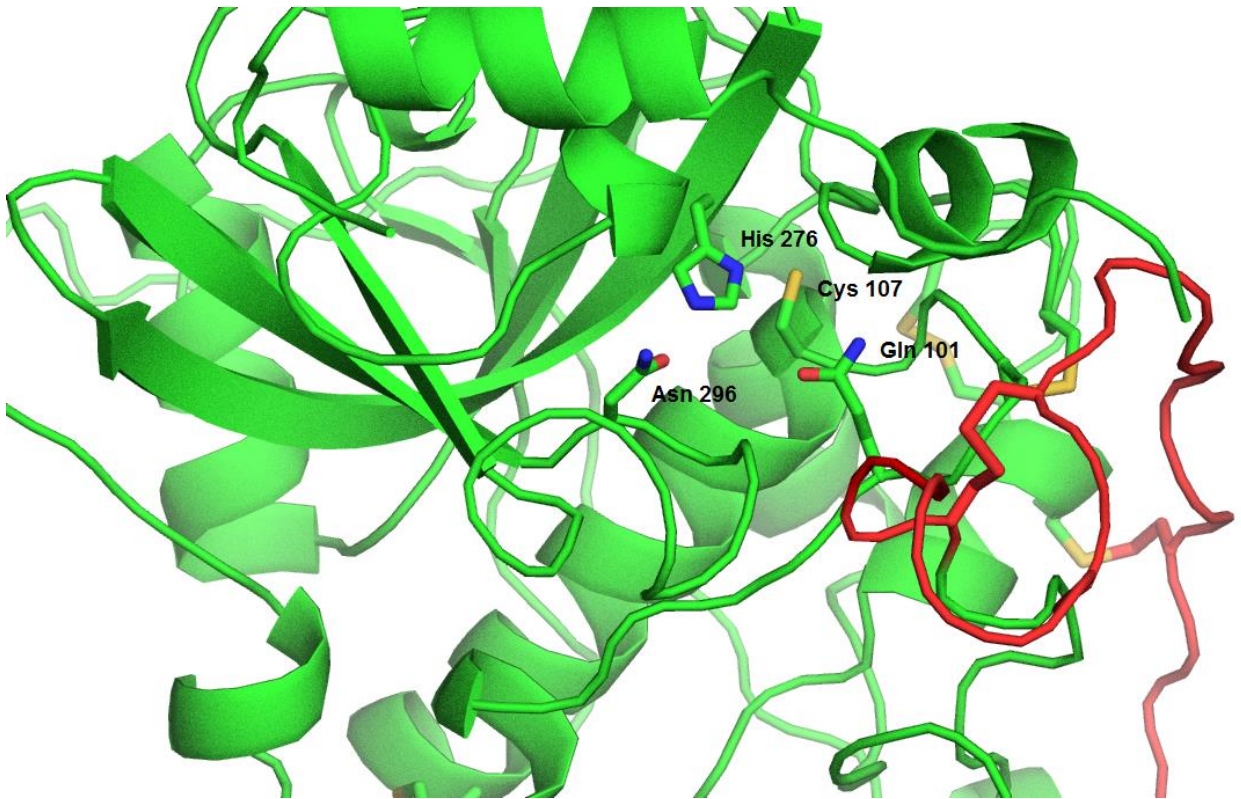


Figura 9. Modelo predictivo del sitio activo de la Catepsina B de *L. vannamei*.

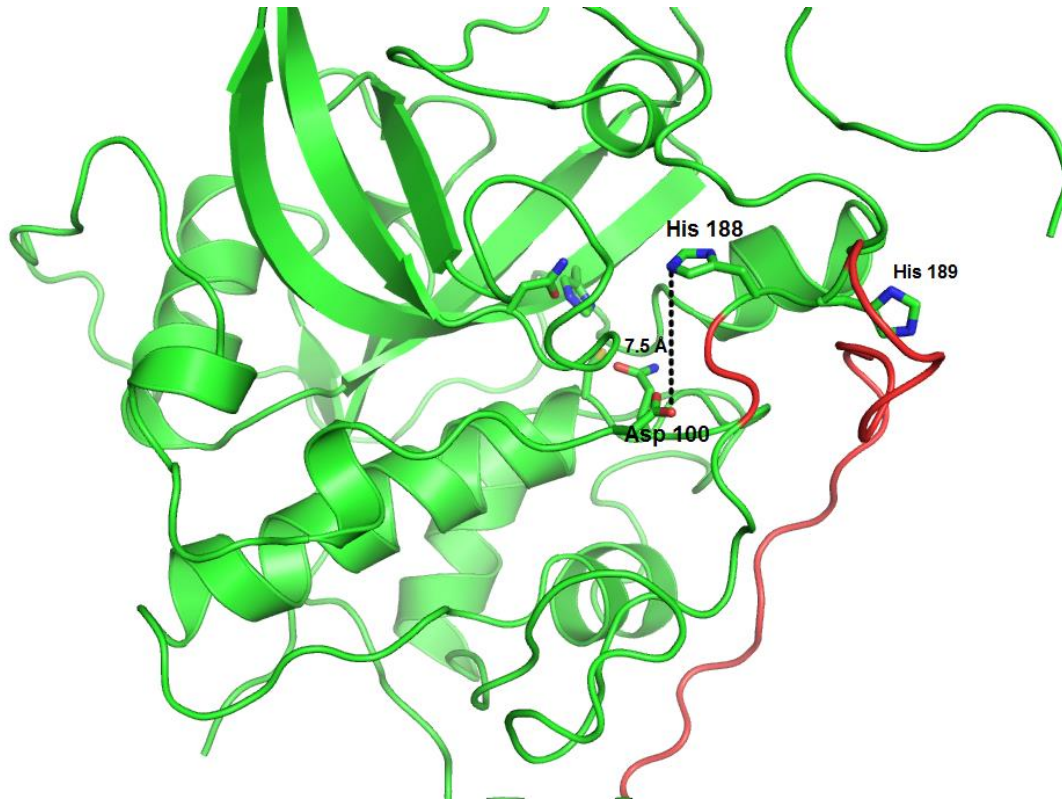


Figura 10. Esquematización de la interacción entre la His188 y el residuo Asp100 que regula la activación de la enzima así como la transición entre las actividades de exopeptidasa y endopeptidasa de la catepsina B.

Así, todos los elementos estructurales analizados en el modelo predictivo de la catepsina B del camarón blanco, sugieren que la enzima cuenta con las características típicas de una cistein-proteasa lisosomal funcional con actividad de endo y exopeptidasa.

Identificación de la Catepsina B en un Extracto Enzimático de Glándula Digestiva del Camarón Blanco

Para la identificación de la catepsina B de un extracto enzimático de glándula digestiva del camarón blanco se utilizaron geles de poliacrilamida del 12 %. Las muestras fueron sometidas a electroforesis a 4 °C para evitar la desnaturalización proteica y posteriormente teñidas con azul de coomassie para visualizar las proteínas presentes. La Figura 11 muestra el patrón electroforético de los extractos de la glándula digestiva del camarón y las bandas que tienen actividad proteolítica cuando el extracto es incubado con caseína al 3%. Se observa la presencia de una banda con un peso molecular aproximado de 26 a 27 kDa, misma que coincide con el peso teórico calculado de 26.9 kDa para la catepsina B de *L. vannamei* (Stephens y col. 2012). Así mismo, se muestra como dicha banda perdió actividad significativamente en presencia del inhibidor E-64, este resultado coincide con los hallazgos de Dalton y colaboradores (1996) quienes encontraron que la actividad de catepsina B de los extractos de *Schistosoma mansoni* sometidos a electroforesis eran inhibidos por E-64.

Opuesto a lo esperado, la intensidad de la banda de 27 kDa no fue afectada por el inhibidor CA-074 (Figura 11, líneas 7 y 8). Entre los posibles factores que podrían influir en este último resultado se pueden mencionar: la concentración utilizada del inhibidor y el tiempo de incubación con el mismo (Otto y Schimeister, 1997). Estudios han reportado que la inhibición de la actividad de catepsina B en gel por CA-074 podría observarse a través de la interacción de este con la enzima por un periodo de hasta 15 h (Hashimoto y col. 2001; Klose y col., 2006). Se ha comprobado también que la inhibición por CA-074 no es afectada por agentes que modifiquen el estado óxido-reducción del sitio de unión de la enzima (Mirkovic y col., 2011), lo cual explica porque no se observó efecto del DTT en la inhibición del CA-074 (Figura 11, línea 8).

La actividad enzimática en presencia del inhibidor E-64 disminuyó cuando el extracto fue tratado con DTT antes de ser incubado con el inhibidor, a diferencia de la muestra sin el DTT; lo anterior indica que de manera distinta a lo observado con el inhibidor CA-074 (Mirkovic y col., 2011), la interacción de E-64 si puede verse afectada por cambios en el estado óxido-reducción del sitio de unión.

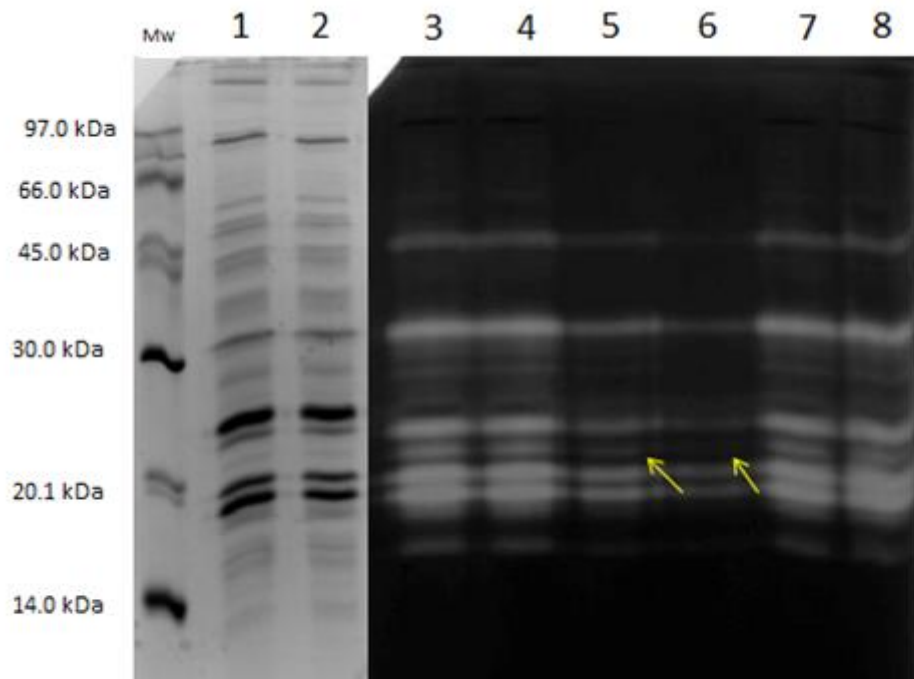


Figura 11. Zimograma de actividad proteolítica de la glándula digestiva del camarón blanco *L. vannamei* (PAGE 15%). MW. Marcador de peso molecular. 1) Extracto proteico de glándula digestiva (10 μ g); 2) Extracto proteico en DTT (2 mM); 3) Extracto enzimático con 10 mU de actividad; 4) Extracto enzimático con 10 mU de actividad en DTT (2 mM); 5) Extracto enzimático con 10 mU de actividad y E-64 (0.5 mM); 6) Extracto enzimático con 10 mU de actividad en DTT (2 mM) y E-64 (0.5 mM); 7) Extracto enzimático con 10 mU de actividad y CA-074 (20 μ M); 8) Extracto enzimático con 10 mU de actividad en DTT (2mM) y CA-074 (20 μ M). Sustrato: Caseína 3% en buffer Tris-HCl 1.5 mM, pH 6.0.

Detección de la actividad de catepsina B en PAGE con sustrato específico

Para confirmar la identidad de la banda correspondiente a la catepsina B en el patrón de bandeo del extracto enzimático del camarón se utilizó el sustrato fluorogénico Z-Arg-Arg-AMC. Las bandas brillantes observadas en el zimograma de la Figura 11 corresponden a las proteasas capaces de hidrolizar el sustrato en las condiciones descritas anteriormente. Estos resultados se compararon con el gel incubado con caseína al 3%, en donde se observó que la banda de mayor peso molecular capaz de hidrolizar al sustrato fluorogénico también es inhibida, aunque en menor medida, por el inhibidor específico para cisteína proteasas E-64 (carril 3). Lo cual sugiere que esta banda corresponde a la catepsina B del camarón blanco.

Sin embargo, en un estudio reciente González-Meza (2014) reportaron que el sustrato fluorogénico Z-Arg-Arg-AMC puede ser hidrolizado por otras proteasas presentes en la glándula digestiva del camarón, presuntamente de la clase serino, debido a la especificidad de estas enzimas por los residuos básicos como arginina y lisina. Lo anterior, explica la presencia de varias bandas con actividad en el gel (Figura 12).

Para corroborar lo anterior, en el carril 5 se incluyó como control de hidrólisis del sustrato por enzimas del tipo serino, a una de las tres isoformas de la tripsina reportadas en la glándula digestiva de *L. vanammei*. El resultado mostró que las bandas con actividad observadas por debajo de la catepsina B putativa, son serino proteasas, específicamente tripsinas. Estos resultados van de acuerdo con los hallazgos de Sainz y colaboradores (2004) quienes reportaron tres isoformas de tripsina en los extractos de la glándula digestiva del camarón blanco, con pesos moleculares de 22.0, 20.0 y 19.4 kDa, los cuales coinciden con los observados en las Figuras 11 y 12.

La hidrólisis del sustrato fluorogénico por parte de la isotripsina pura corrobora lo antes mencionado por González-Meza (2014), quien sugirió que el sustrato considerado como específico para catepsina B también era hidrolizado por otras proteasas. Como consecuencia de lo anterior, aquellos estudios en donde se determinó la actividad enzimática de la catepsina B en extractos proteicos que contienen enzimas del tipo tripsinas y usando como sustrato Z-Arg-Arg-AMC pudieran estar reportando valores de actividad superiores a los reales. Tal es el caso de los estudios realizados en el camarón del Norte *Pandalus borealis* (Aoki y col. 2003) y en el camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* (Stephens y col. 2012). Además, estos resultados sugieren que la banda fluorescente de mayor peso molecular observada en el gel de la Figura 12 es la catepsina B del camarón blanco del Pacífico.

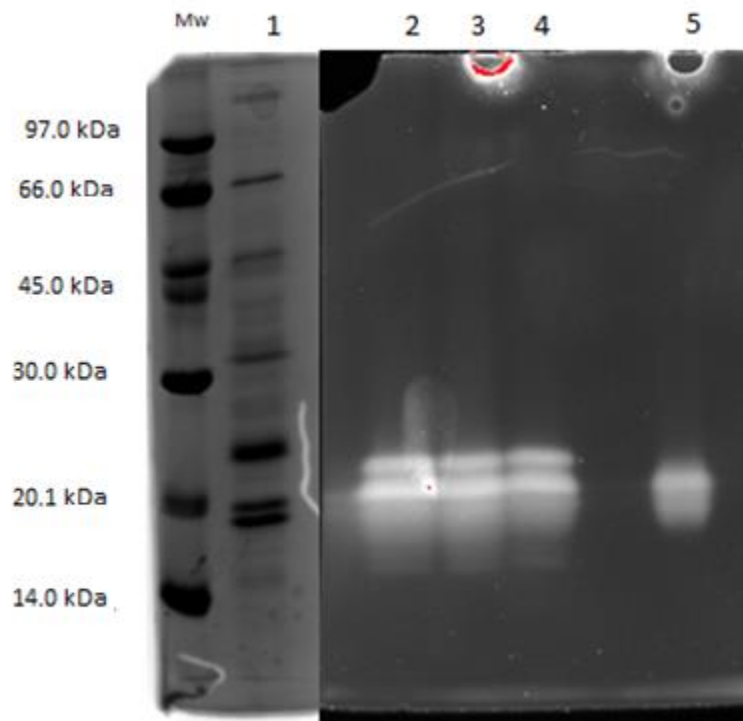


Figura 12. Zimograma de actividad de la glándula digestiva del camarón blanco *L. vannamei* (PAGE 12 %). Actividad proteolítica con sustrato específico Z-Arg-Arg-AMC a pH 6.0. MW: Marcador de peso molecular; 1) Extracto proteico de la glándula digestiva (10 µg); 2) Extracto enzimático con 5 mU de actividad con DTT (2 mM); 3) Extracto enzimático con 5 mU de actividad en DTT (2 mM) y E-64 (0.68 mM); 4) Extracto enzimático con 5 mU de actividad en DTT (2mM) y Pefabloc (0.3 mM); 5) 5 µg de tripsina pura (Isoforma C) en DTT (2 mM).

Detección de la actividad de catepsina B en diferentes tejidos por PAGE con sustrato específico

Los resultados anteriores tienen implicaciones importantes en este estudio, pues la actividad de la catepsina B debe ser evaluada en ausencia de otras proteasas capaces de hidrolizar el sustrato. Así, una alternativa para la detección de la actividad de catepsina B en un extracto sin la interferencia de las tripsinas, fue la evaluación de los extractos enzimáticos de distintos tejidos del camarón. Por lo que se llevó a cabo una la electroforesis en donde se cargó la misma cantidad de proteína del extracto enzimático de varios tejidos y órganos del camarón, incubando el gel con el sustrato fluorescente (Figura 13).

Los resultados no fueron concluyentes, pues mostraron que en los extractos de tejidos digestivos como la glándula digestiva y el intestino existen también varias enzimas de alto peso molecular, que pudieran ser tipo tripsina, capaces de hidrolizar el sustrato fluorogénico. Únicamente en la glándula digestiva se observa la banda de un peso aproximado a 27 kDa que representa a la catepsina B.

Por su parte, en los tejidos no digestivos evaluados como el ámpula terminal, las branquias, el músculo y los pleópodos, se pueden observar bandas fluorescentes en pesos moleculares distintos a los esperados y cuya naturaleza química aún no ha sido identificada. Estos resultados no coinciden con los publicados por Stephens y col. (2012) quienes reportaron la presencia del transcrito y de la actividad de la enzima en tejidos no digestivos. Para explicar este resultado, no se descarta la posibilidad de isoformas con pesos moleculares distintos al esperado para esta enzima en el camarón blanco, debido a que existen reportes en otros organismos en los que se avala la presencia de isoenzimas de catepsina B (Deval y col, 1990; Dvorak y col. 2005; Krepela y col. 2006).

Otra posible explicación para la ausencia de la banda esperada en tejidos no digestivos es derivada de la sensibilidad del método de detección. Se sabe que la actividad en microplaca puede ser detectada con una mayor sensibilidad que la que es visualizada en el gel a través de un equipo fotodocumentador. Esto nos lleva a sugerir que la actividad reportada en microplaca para tejidos no digestivos no es la suficiente para visualizarse en un gel de electroforesis. La poca información disponible para esta enzima en crustáceos no es la suficiente para contrastar los resultados obtenidos.

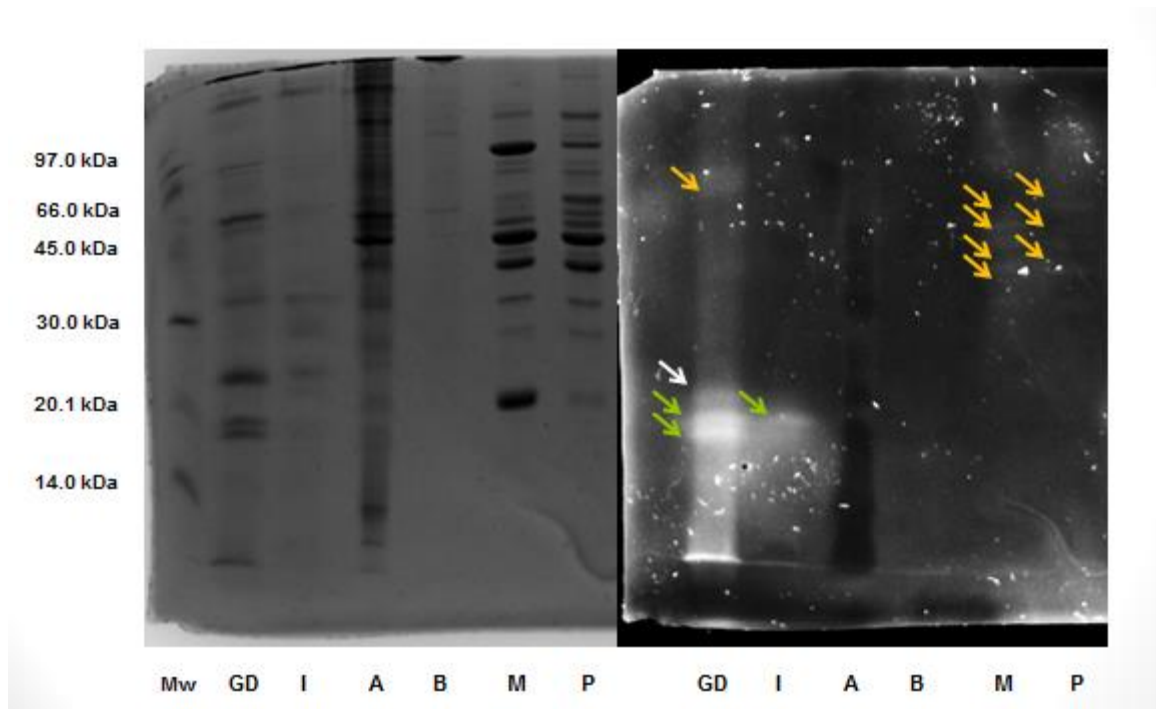


Figura 13. Evaluación de la actividad proteolítica con sustrato fluorogénico en distintos tejidos del camarón. Mw: Marcador de peso molecular; GD: Glándula digestiva; I: Intestino; A: Ámpula terminal, B: Branquias, M: Músculo, P: Pleópodos. Las flechas verdes indican bandas correspondientes a las tripsinas en los tejidos gástricos. La flecha blanca indica la banda que corresponde a la catepsina B putativa. Las flechas amarillas indican proteínas capaces de hidrolizar sustrato, no identificadas a la fecha.

Aislamiento Parcial de la Catepsina B del Camarón

Con el fin de evitar que la actividad de la catepsina B en placa fuera sobrevaluada por la presencia de otras proteasas capaces de hidrolizar el sustrato, se aisló parcialmente la catepsina B por cromatografía de afinidad. Se utilizó una matriz de agarosa acoplada al inhibidor reversible para tripsinas: *p*-amino benzamidina.

Los resultados de la Figura 14, muestran las 8 fracciones obtenidas en el lavado de la columna y previas a la elución, en donde las isotripsinas están ausentes pues se asume quedaron unidas al inhibidor *p*-amino benzamidina en la columna. Las fracciones muestran un patrón proteico (gel de la izquierda) y una sola banda con actividad (gel de la derecha) sin rastro de otras bandas que por su peso molecular pudieran indicar la presencia de las isoformas de tripsina en el extracto de glándula digestiva. Por lo tanto, dichas fracciones se hacen factibles para utilizarse en posteriores estudios de caracterización.

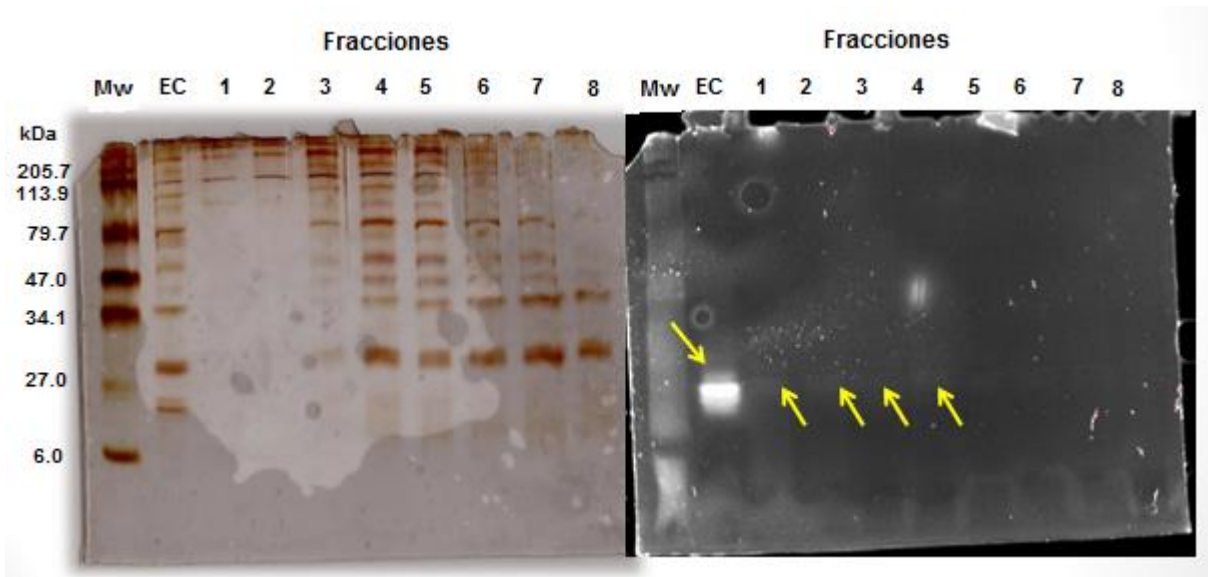


Figura 14. Evaluación de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad. El gel del lado izquierdo muestra el patrón electroforético teñido con nitrato de plata mientras que el gel de la derecha muestra la actividad proteolítica con sustrato fluorogénico. EC: Extracto crudo de la glándula digestiva del camarón. 1-8: Fracciones obtenidas de los lavados con buffer Tris-HCl pH 7.0. Las flechas amarillas indican la presencia de una banda fluorescente en todos los carriles.

Cuantificación de la actividad enzimática de la catepsina B del camarón con sustrato fluorogénico específico

Los ensayos de actividad enzimática del extracto enzimático y las fracciones de la cromatografía mostraron un valor de 890.57 mUA/mg para el extracto de glándula digestiva completo. El cual es comparable con lo reportado por Aoki y col. (2003) para la actividad de catepsina B de glándula digestiva del camarón del norte *Pandalus borealis*.

La Figura 15 muestra la actividad con sustrato fluorogénico de las muestras obtenidas después de la cromatografía. La fracción 1, con una actividad de 31.73 mUA/mg, representa un valor del 3.56 % de la actividad registrada para el extracto completo. Este resultado sugiere una menor contribución de la catepsina B dentro de la glándula digestiva del camarón blanco en la hidrólisis de proteína. Esto contrarresta con lo reportado anteriormente para crustáceos, donde los valores de actividad son derivados del uso de los extractos completos (Aoki y col., 2003; Stephens y col, 2012).

La fracción 1 será la utilizada para las siguientes determinaciones. Las fracciones 2-8 fueron descartadas debido a que la actividad enzimática que presentaban una disminución a pesar de mantener constante la cantidad de proteína (0.5 μ g de proteína por ensayo).

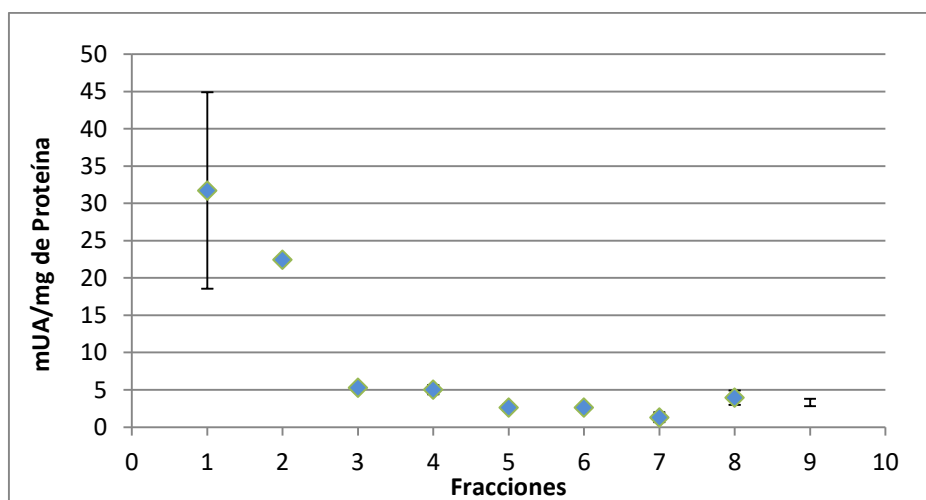


Figura 15. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad sobre el sustrato Z-Arg-Arg-AMC (100 μ M) en buffer de acetato de sodio 100 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 2 mM y Triton x-100 0.5 %, pH 5.5. Longitud de onda de excitación: 360nm. Longitud de onda de emisión: 440 nm. Cada punto representa la media de 3 mediciones realizadas con sus respectivas desviaciones estándar. Una unidad de actividad está definida como la liberación de 1 μ mol de AMC por minuto.

Determinación del pH y Temperatura Óptima para la Actividad de la Catepsina B

Una vez determinada la fracción en donde se encontró mayor actividad de catepsina B y como parte de la caracterización bioquímica de la enzima, se realizaron ensayos para determinar el pH y la temperatura a la cual la enzima parcialmente aislada presenta una mayor actividad. Como puede observarse en la figura 16, el extracto crudo completo de glándula digestiva (Fig. 16a) mostró valores cercanos a 890 mUA por mg de proteína a pH 5.5; mientras que en la primera fracción obtenida de la cromatografía (Fig. 16b), la actividad disminuyó hasta 31.7 mUA por mg de proteína, pero el pH de actividad máxima se mantiene. Por lo tanto, evaluando la hidrólisis del sustrato en un intervalo de pH desde 4.0 hasta 6.0 se demostró que la catepsina B del camarón blanco tiene una actividad de endopeptidasa óptima a pH 5.5, lo cual coincide con estudios previos realizados en otros organismos tanto invertebrados como vertebrados (Cho y col. 1999; Almeida y col. 2000; Giusti y col. 2008).

Cabe resaltar que aún y cuando el pH de los lisosomas varía entre 4.5 - 5.5, la región del pre-propéptido mantiene a la enzima inactiva como parte de los mecanismos de regulación enzimática presentes en la mayoría de los organismos y no es hasta cuando esta región es removida que la enzima adquiere funcionalidad.

Se evaluó la hidrólisis del sustrato Z-Arg-Arg-AMC en un intervalo de temperaturas de 10 a 50 °C, las reacciones se registraron a un pH de 5.5 encontrándose un máximo de actividad a 45 °C (figura 17). Estos resultados coinciden con lo reportado por Sun y colaboradores (2011) para la catepsina B del pepino de mar *Stichopus japonicus* y Aranishi y col. (1997) para la catepsina B de la carpa *Cyprinus carpio*. Estudios en otros organismos, mamíferos principalmente, han demostrado que la enzima aún permanece activa hasta 65 °C (Christensen, y col. 2011). Análisis posteriores serán necesarios para evaluar la estabilidad térmica de la catepsina B del camarón blanco.

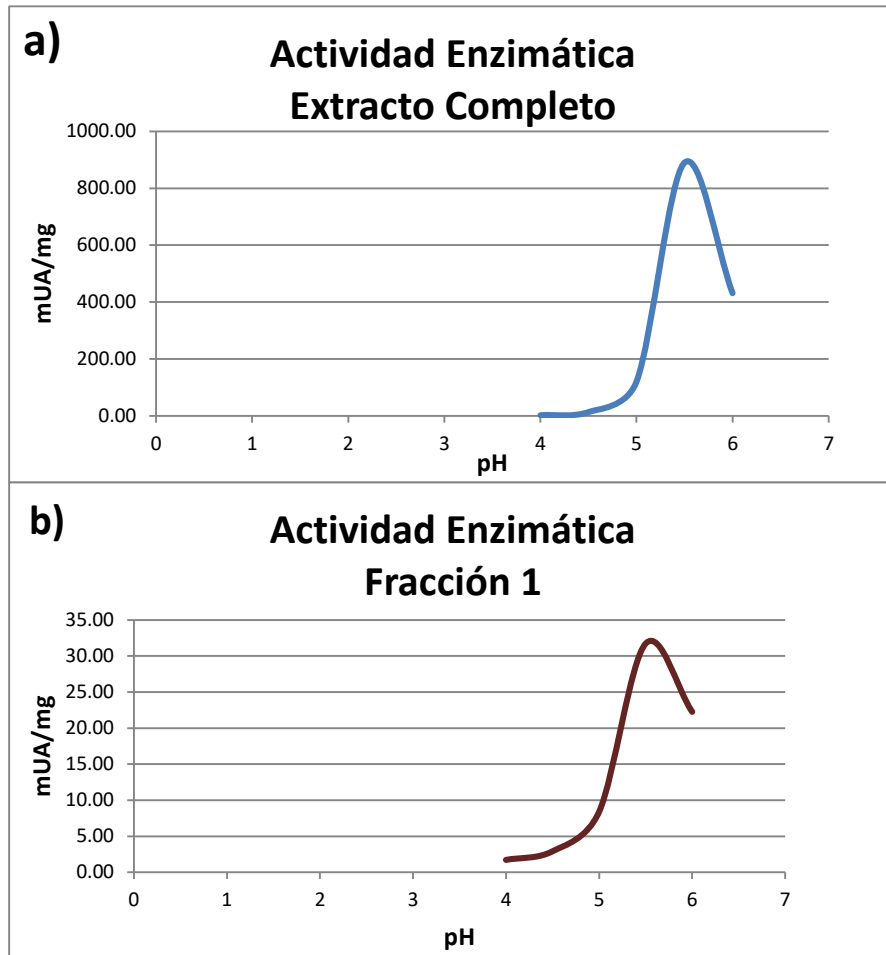


Figura 16. Evaluación de la actividad enzimática a diferentes valores de pH sobre el sustrato Z-Arg-Arg-AMC (100 μ M) en buffer de acetato de sodio 100 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 2 mM y Triton x-100 0.5 %. Longitud de onda de excitación: 360nm. Longitud de onda de emisión: 440 nm. Una unidad de actividad está definida como la liberación de 1 μ mol de AMC por minuto. a) Extracto Completo b) Fracción 1.

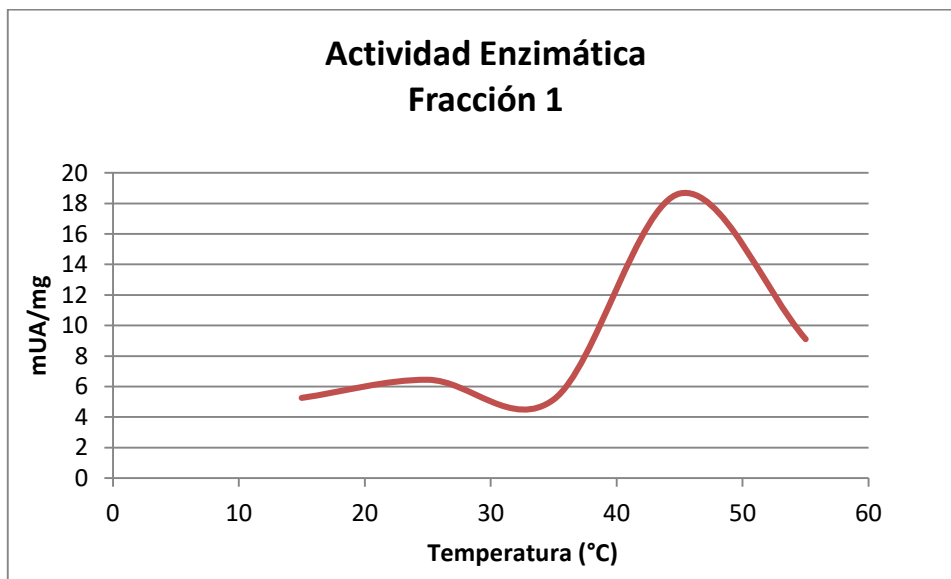


Figura 17. Evaluación de la actividad enzimática de la fracción 1 a distintas temperaturas sobre el sustrato Z-Arg-Arg-AMC (100 μ M) en buffer de acetato de sodio 100 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 2 mM y Triton x-100 0.5 %. Longitud de onda de excitación: 360nm. Longitud de onda de emisión: 440 nm. Una unidad de actividad está definida como la liberación de 1 μ mol de AMC por minuto.

CONCLUSIONES

1. El modelo estructural *in silico* desarrollado para la catepsina B del camarón blanco del Pacífico cuenta con los elementos estructurales característicos de una cisteín proteasa con actividad de endo y exopeptidasa.
2. La banda identificada en el patrón electroforético del extracto de glándula digestiva con peso aproximado de 26 kDa tiene actividad hidrolítica sobre el sustrato sintético Z-Arg-Arg-AMC reportado como específico para catepsina B y se ve inhibida por el agente E-64.
3. El sustrato sintético Z-Arg-Arg-AMC reportado como específico para la catepsina B es hidrolizado también por las isotripsinas presentes en el hepatopáncreas de *L. vannamei*. Lo anterior pone en duda la especificidad del sustrato y sugiere una sobrestimación de la actividad reportada en estudios previos para otras especies de crustáceos cuya enzima fue evaluada con el mismo sustrato en un extracto enzimático.
4. La actividad hidrolítica máxima encontrada para las fracciones libres de tripsina fue de 31.73 mUA por miligramo de proteína, lo que representa un 3.56% de la actividad reportada para el extracto completo.
5. El pH y la temperatura óptima para la catepsina B del camarón blanco del Pacífico fueron similares para los reportados en otras especies de vertebrados e invertebrados.

RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se sugiere realizar un aislamiento y purificación de la enzima en estudios posteriores para lograr una caracterización completa que incluya, además de lo analizado en el presente trabajo, la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima, así como de la estabilidad térmica de la misma.

Además, se recomienda se recomienda realizar un estudio de difracción por rayos X de los cristales de la enzima purificada o, en su caso, de la proteína recombinante para la determinación de la estructura tridimensional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal, S. K. (1990). Proteases cathepsins — A view. *Biochemical Education* 18(2): 67-72.
2. Alicorp. 1998. Boletín nicovita: Camarón del Mar. 30:10. Disponible en : http://www.alicorp.com.pe/ohs_images/nicovita/boletines/biologia/bole_9810_02.pdf
3. Almeida, P., Nantes, I., Chagas, J., Rizzi, C., Faljoni, A., Carmona, E., Juliano, L., Nader, H., Tersario, I. 2001. Cathepsin B Activity Regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 276(2): 944-951.
4. Altschul, S.F., Gish, W. Miller, W. Myers, E. Lipman D. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*. 215, 403-410.
5. Aoki, H., et al. (2003). Molecular cloning and characterization of cathepsin B from the hepatopáncreas of northern shrimp *Pandalus borealis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 134(4): 681-694.
6. Aranishi, F., Hara, K., Osatomi, K., Ishihara, T. (1997). Purification and characterization of cathepsin B from hepatopáncreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 118:531-537.
7. Barker P, Gibson R. (1977). Observations on the feeding mechanism, structure of the gut and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 26: 297-324.
8. Barrett, A J. (1977). *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*, pp 181-208, Elsevier, Amsterdam
9. Barrett, A. J. (1994). Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*, Academic Press. 244: 1-15.
10. Benkert, P., Biasini, M., and Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343.
11. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*. 72, 248–254.
12. Brusca R, Brusca G. (2003). *Invertebrates*. Second Edition. Sinauer. Chapter 16: Phylum Arthropoda: The Crustacea. 512-586.
13. Cathers, B. Barret, C. Palmer. J. Rydzewski. (2001). pH Dependence of inhibitors targeting the occluding loop of cathepsin B. *Bioorganic Chemistry*. 30(4):264-275.
14. Chevallet, M. Luche, S. y Rabilloud T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*. 1(4):1852-1858.

15. Cho, W., Tsao, S., Hays, A., Walter, R., Chen, J., Snigirevskaya, E. y Raikhel A. (1999). "Mosquito Cathepsin B-like Protease Involved in Embryonic Degradation of Vitellin Is Produced as a Latent Extraovarian Precursor." *Journal of Biological Chemistry* 274(19): 13311-13321.
16. Christensen, L., Ertbjerg, P., Aaslyng, M. y Christensen, M. (2011). Effect of prolonged heat treatment from 48 °C to 63 °C on toughness, cooking loss and color of pork. *Meat Science*. 88:280-285.
17. Dalton, J., Clough, K., Jones, M. y Brindley, P. (1996) Characterization of the Cathepsin-Like Cysteine Proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity*. 1328-1334.
18. Deval, C., Bechet, D., Obled, A. y Ferrara, M. 1990. Purification and properties of different isoforms of bovine cathepsin B. *Biochemistry and Cell Biology*. 68 (4): 822-826.
19. Dvorak, J., Delcroix, M., Rossi, A., Vopálenky, V., Pospíšek, M., Sedinová M., Mikes, L., Sajid, M., Sali, A., McKerrow, J., Horák, P. y Caffrey, C. 2005. Multiple Cathepsin B isoform in schistosomula of *Trichobilharzia regenti*: identification, characterization and putative role in migration and nutrition. *International Journal for Parasitology* 35: 895-910.
20. FAO (1980).FAO CATALOGUE Vol.1 - Shrimps and Prawns of the World. An Annotated Catalogue of Species of Interest to Fisheries.L.B. Holthuis 1980. FAO Fisheries Synopsis No.125, Volume 1 [online]. Updated. Cited: 29 May 2013.
21. FAO (2000-2013). A world overview of species of interest to fisheries. *Penaeus vannamei*. FIGIS Species Fact Sheets. Text by SIDP - Species Identification and Data Programme. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome.
22. Fernández, A., García, F., Navarrete, M., y Fenucci, J. (2001). Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 130(3): 331-338.
23. García-Carreño F. L., Dimes L. E. y Haard N. (1993). Substrate-Gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*. 214(1): 65-69.
24. García-Carreño, F.L. y Navarrete del Toro, M.A. (1997). Classification of proteases without tears. *Biochemical Education*. 25: 161-167
25. Giusti, I., D'Ascenzo, S., Millimaggi, D., Taraboletti, G., Carta, G., Franceschini, N., Pavan, A. y Dolo, V. 2008. Cathepsin B Mediates the pH-Dependent Proinvasive Activity of Tumor-Shed Microvesicles. *Neoplasia*, 10(5): 481-488.

26. González-Meza, G. (2014). Las catepsinas lisosomales como parte del Sistema de defensa del camarón blanco. Tesis Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC. México.
27. Harrison, M. Burton, N. y Hillier, I. (1997). Catalytic Mechanism of the Enzyme Papain: Predictions with a Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Potential. *Journal of the American Chemical Society*. 119; 12285-12291.
28. Harrison, P. y Sternberg, M. (1994). Analysis and classification of disulphide connectivity in proteins. The entropic effect of cross linkage. *Journal of Molecular Biology*. 244:448-463.
29. Hashimoto, Y., Kakegawa, H., Narita, Y., Hachiya, Y., Hayakawa, T., Kos, J., Turk, V. y Katunuma, N. (2001). Significance of Cathepsin B Accumulation in Synovial Fluid of Rheumatoid Arthritis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 283: 334-339.
30. Hernández-Cortés, P., Whitaker, J. y García, F. (1997). Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (crustacea: decapoda). *Journal of Food Biochemistry* 21(1): 497-514.
31. Illy, C. Quraishi, O. Wang, J. Purisima, E. Vernet, T. y Mort, J. (1997). Role of the Occluding Loop in Cathepsin B Activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 272; 1197-1202.
32. Klose, A., Zigrino, P., Denhöfer, R., Mauch, C. y Hunzelmann, N. (2006). Identification and discrimination of extracellular active cathepsins B and L in high-invasive melanoma cells. *Analytical Biochemistry*. 353:57-62.
33. Krepela E., Prochazka, J., Mynarikova, H., Karova, B., Polak, J., Cermak, J. y Roubkova, H. 2006. Multiple forms of cathepsin B in human lung cancer. *International Journal of Cancer*. 61(1):44-53.
34. Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
35. Marino, S. y Gladyshev, V. 2012. Analysis and Fuctional Prediction of Reactive Cysteine Residues. *Journal of Biological Chemistry* 287(7): 4419-4425.
36. Martin, G y Davis, J (2001). An Update Classification of the Recent Crustacea. *Science Series No. 39*. Natural History Museum of Los Angeles County. USA.
37. McGrath, M. E. (1999). The Lysosomal Cysteine Proteases. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 28(1): 181-204.
38. Meemon, K. Grams R. Vichasri-Grams, S. Hofmann, A. Korge, G, Viyanant, V. Suchart, E. Habe, S. y Sobhon, P. (2004) Molecular cloning and analysis of stage and tissue-

- specific expression of cathepsin B encoding genes from *Fasciola gigantica*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 26;1-10.
39. Mikami S. y Takashima F. (2000). Functional morphology of the digestive system. En: Philips B.F. y J. Kitaka. *Spiny Lobsters: Fisheries and Culture*. Blackwell. USA 601-610.
 40. Mikami, S., Greenwood, J. y Takashima, F. (1994). Functional Morphology and Cytology of the Phyllosomal Digestive System of *Ibacus ciliatus* and *Panulirus japonicus* (Decapoda, Scyllaridae and Palinuridae). *Crustacean* 67(2): 212-225.
 41. Mircovic, B., Sosic, I., Gobec, S. y Kos, J. (2011). Redox-Based Inactivation of Cysteine Cathepsins by Compounds Containing the 4-Aminophenol Moiety.
 42. Mort, J. S. y D. J. Buttle (1997). Cathepsin B. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29(5): 715-720.
 43. Mulhia-Almazán, A. y García-Carreño FL. (2003). Digestion physiology and proteolytic enzymes of crustacean species of the Mexican Pacific Ocean. *Contributions to the study of East Pacific Crustaceans* (2):77-91. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. 303.
 44. Murata, M., Miyashita, S., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., Hatayama, K., Towatari, T., Nikawa, T. y Katunuma, N. (1991). Novel epoxysuccinyl peptides: selective inhibitors of cathepsin B, in vitro. *Federation of European Biochemical Societies*. 230(2):307-310.
 45. Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T. y Katunuma N. (1991). The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO Journal* 10(9): 2321-2330.
 46. Na, B. Kim ., Lee, G. Kim, T. Bae, Y. Kang, I. Yu, J. Sohn, W. Cho, S. y Kong, Y. (2006), Critical roles for excretory–secretory cysteine proteases during tissue invasion of *Paragonimus westermani* newly excysted metacercariae. *Cellular Microbiology*, 8: 1034–1046.
 47. Otto, H. y Schimeister T. (1997). Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chemical Reviews*. 97(1):133-171.
 48. Polgar, L. (2004). En *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 ed. (Barrett,A.J., Rawlings,N.D. & Woessner,J.F), p.1072-1079, Elsevier, London.
 49. Quraishi, O. Nägler, D. Fox, T. Sivaraman, J. Cygler, M. Mort, J. y Storer, A. (1999). The Occluding loop in Cathepsin B Defines the pH Dependence of Inhibition by Its Propeptide. *Biochemistry*. 38(16); 5017-5023.
 50. Rawlings, N.D. y Barrett, A.J., (1994). Families of cysteine peptidases. *Methods of Enzymology*. 244, 461–486.

51. Ribeiro, K. Papa, L. Vicentini, C. y Franceschini-Vicentini I. (2014) The ultrastructural evaluation of digestive cells in the hepatopáncreas of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture Research*,1-9.
52. Rivas, M. (2000). Efecto del contenido de proteína en el alimento de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) cultivado sobre la actividad proteolítica y parámetros calorimétricos y su relación con la pérdida de textura durante su almacenamiento en congelación. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Universidad de Sonora: División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Hermosillo, México.
53. Rojo, L. (2010). Proteinasas aspárticas de las langostas queladas: *Homarus gammarus* y *Homarus americanus*: Caracterización bioquímica y molecular. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, México.
54. Roshy, S. Sloane, B. y Moin K. (2003). Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer and Metastasis Reviews*. 22;271-286.
55. Rubinstein, R. y Fiser, A. (2007). Predicting disulfide bond connectivity in proteins by correlated mutations analysis. *Bioinformatics*. 24(4):498-504.
56. Sainz, J., García, F., Sierra, A. y Hernández, P. (2004). Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology* 24(2): 266-273.
57. Sainz, J., García-Carreño, F. y Hernández-Cortés, P. (2004) *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 138: pp. 155-162.
58. Sajid, M. y Mckerrow, J. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 120;1-21.
59. Sang, L., Jung, S., Moo, K., Sang, J., Hyun, D., Ki, Kim, Nam Gyu Park, Joong Kyun Kim, Joon Ki Chung y Hyung Ho Lee, Molecular cloning and characterization of Cathepsin B from a scuticociliate, *Uronema marinum*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*.142(3):283-292.
60. Schechter, I. y Berger, A. (1967) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27,157-162
61. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31(13), 3381-5.
62. Scorilas A, Fotiou S, Tsiambas E, Yotis J, Kotsiandri F, Sameni M, Sloane BF, Talieri M. (2002). Determination of cathepsin B expression may offer additional prognostic information for ovarian cancer patients. *Biological Chemistry* 383(7/8): 1297–1303.

63. Stephens, A., Rojo, L., Araujo, S., García, F. y Muhlia A. (2012). Cathepsin B from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence analysis, tissues-specific expression and biological activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 161(1): 32-40.
64. Sumiya, S., Yoneda, T., Kitamura, K., Murata, M. Yokoo, C., Tamai, M., Yamamoto, A., Inoue, M. e Ishida, T. (1992). Molecular Desing of Potent Inhibitor Specific for Cathepsin B Based on the Tertiary Structure Prediction. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 40(2):299-303.
65. Sun, L., Zhu, B., Wu, H., Yu, L., Zhou, D., Dong, X., Yang, J., Li, D., Ye, W. y Murata, Y. (2011) Purification and characterization of cathepsin B from the gut of the sea cucumber (*Stichopus japonicas*). *Food Science and Biotechnology*, 919–925
66. Szpaderska, A. y Frankfater, A. (2001). An intracelular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Research*. 15;61(8):3493-500
67. Takahashi, N.; Kurata, S. y Natori, S. (1993), Molecular cloning of cNDA for the 29 kDa proteinase participating in decomposition of the larval fat body during metamorphosis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *FEBS Letters*. 334, 153-157.
68. Teschke, M. y Saborowski, R. (2005). "Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of and (Decapoda: Caridea)." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 316(2): 213-229.
69. Turk, D., Podobnik, M., Kuhelj, R., Dolinar, M. y Turk, V. (1996). Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Letters*. 384(3), 211-214.
70. Van Gunsteren, W., Billeter, S., Eising, A., Hünenberger, P., Krüger, P. Mark, A., Scott, W., y Tironi, I. (1996) *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*, Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich, Switzerland, pp. 1-1042.
71. Wedemeyer, W., Welker, E., Narayan, M. y Scheraga, H. (2000). Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*. 39(23):7032