

CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES DE TRIPSINA EN CAMARÓN

Mariana Díaz-Tenorio y Patricia Hernández-Cortés

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Apartado Postal 128. C.P. 23000. La Paz, BCS. México. Fax: (52) (112) 53625. ldiaz@cibnor.mx

Palabras claves: *Penaeus*, inhibidor, tripsina

Introducción. Las proteasas son enzimas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos y, entre muchas de sus funciones, regulan procesos fisiológicos donde se requiera la modificación de proteínas. La tripsina de mamíferos es una enzima digestiva secretada como zimógeno, forma inactiva de la proteasa, junto con su inhibidor. Si el zímógeno se activa innecesariamente, el inhibidor es capaz de regular la actividad proteolítica. El inhibidor pancreático bovino (PSTI) pertenece a la familia Kazal (1), posee un peso molecular de 6 a 8 kDa, un pI aproximado de 5 y consta de 56 aminoácidos (2). Sólo se cuentan con un reporte de inhibidores en camarón que pudieran estar relacionados con la función del PSTI (3).

El objetivo del trabajo es la caracterización de los inhibidores de proteasas en el camarón *Penaeus californiensis*.

Metodología. Se utilizó el hepatopáncreas del camarón como fuente proteica; este órgano hace las veces de hígado y páncreas en vertebrados. Se realizó una precipitación ácida para la extracción de los inhibidores con ácido tricloroacético (3), seguida de una precipitación por temperatura. La fracción soluble, donde se encuentran los inhibidores, se concentró por medio de sulfato de amonio y se eliminaron las sales por medio de una cromatografía de exclusión molecular. Los inhibidores fueron liofilizados. La presencia de los inhibidores se determinó por medio de su actividad en gel o en tubo (3). Se utilizó enzimas de diferentes fuentes para determinar la especificidad.

Resultados y Discusión. La combinación de precipitación ácida y térmica elimina la mayor parte de proteínas del hepatopáncreas. Las proteínas que permanecen en solución son de bajo peso molecular (Fig. 1). Se identificaron al menos cuatro bandas como potenciales inhibidores. Se utilizó tripsina bovina, porcina, bacalao y de camarón para los ensayos de especificidad. Solamente se detectó inhibición (55%) con las enzimas de fuentes marinas. La mezcla de inhibidores es estable a pH ácidos reteniendo hasta 80% de su actividad inhibitoria (180 min, pH 2). Sin embargo, a pH alcalinos los inhibidores pierden sus propiedades biológicas. Después de ser incubada a 100°C por 30 min éstas biomoléculas retienen 75% de su actividad. La mayor parte de los inhibidores relacionados a funciones de digestión de proteínas están formados por al menos tres enlaces disulfuro, lo que les confiere su gran estabilidad. Dado que la clasificación e identidad de los inhibidores de serin proteasas se basa en la posición y número de cisteínas y por tanto la conexión de sus puentes disulfuro, estamos en

proceso de purificar los inhibidores encontrados y determinar su secuencia amino terminal. Además de las funciones biológicas que podrían tener esos inhibidores, tienen gran potencial de uso en la industria de los alimentos, salud, entre otros, por su particular especificidad.

Conclusiones. Los crustáceos como el camarón *P. californiensis* poseen inhibidores cuyas características son

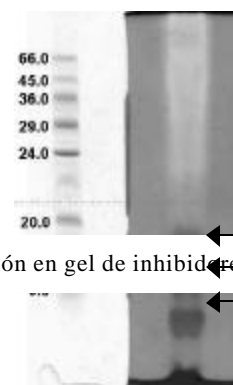


Fig. 1. Detección en gel de inhibidores de camarón.

similares a los inhibidores tipo kazal por lo que se presume que están relacionados con la regulación de la digestión de proteína.

Agradecimientos. Este proyecto es financiado por CONACYT (J33750-N) y el CIBNOR (PAC 28).

Bibliografía

1. Laskowski, M. y Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 49:593-626
2. Kido, H., Yokogoshi, Y. y Katunuma. (1990). N. A low-molecular-mass Kazal-type protease inhibitor isolated from rat hepatocytes is identical to rat pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Eur. J. Biochem.* 188:501-566.
3. García-Carreño, F.L., Carrillo, O. y Navarrete-del-Toro, M.A. (1999). Control of digestive functions in shrimp, I. An inhibitor of trypsin activity in the hepatopáncreas. *Proc. Fourth International Crustacean Congress.* Amsterdam: 915-922.