

DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE ZIMOGENOS EN PENAEIDOS

Juan Carlos Sainz-Hernández, Arturo Sierra-Beltronez y Ma. Patricia Hernández-Cortes

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. A.P 128, La Paz, B.C.S. Mex.

Fax. 112 54710, e-mail jcsainz@cibnor.mx

Palabras claves: proteasas, zimogenos, penaeidos

Introducción. La organización funcional del sistema digestivo en penaeidos ha sido estudiada desde el punto de vista histológico, morfológico y anatómico. Sin embargo, no se conoce del todo el funcionamiento de las enzimas digestivas. Los penaeidos están adaptados para alimentarse de pequeños organismos bentónicos. El alimento entra en la glándula digestiva y se mezcla con un complejo de enzimas digestivas, entre las cuales se encuentra la tripsina. Esta enzima no es sintetizada en su forma final activa. En lugar de ello, la proteasa es sintetizada en una cadena de amino ácidos ligeramente más larga, catalíticamente inactiva llamada zimógeno. Los zimógenos deben ser proteolíticamente hidrolizados para lograr su conversión a la forma activa (2). En otros organismos los zimógenos no existen.

Esta proteasa aparece en su forma activa después de homogenizar la glándula digestiva de penaeidos. Sin embargo, nadie conoce con certeza si las enzimas se producen como zimógenos, como ocurre la conversión a la enzima activa, si son almacenados, su estructura y sus cambios estructurales durante la activación. La existencia de tripsinógeno en decápodos no es clara (1). La secuencia y la longitud del péptido de activación del tripsinógeno en decápodos, obtenidos a través de cDNA, es diferente que en bovinos. Estas diferencias hacen que el tripsinógeno en decápodos tengan una diferente estabilidad y senda de conversión a tripsina. Es necesario saber si existen los zimógenos en los ensayos de actividad enzimática porque estos son totalmente activados durante la homogenización del tejido. Estos ensayos tienen implicaciones importantes en la investigación bioquímica y biotecnológica, por ejemplo: ubicando el sitio de activación de los zimógenos, cuantificando los zimógenos en relación con la enzima madura, la generación de zimógenos bajo diferentes condiciones de alimentación y un mejor entendimiento para el manejo y conversión de alimento en músculo.

Metodología. Se produjeron anticuerpos contra los péptidos de activación del tripsinógeno (PSRKPTFRRGLNK) (1) y una secuencia altamente antigénica de las enzimas maduras tripsina (FNDNVRAIDIPA) y quimotripsina (GLPSDSALGISD). Los anticuerpos se confrontaron contra cortes histológicos de la glándula digestiva con western blotting con muestras de extractos de la glándula digestiva de *Penaeus vannamei* y *P. Californiensis* presipitadas con acetona en frío y resuspendidas en PBS conteniendo un cocktail de inhibidores.

Resultados y Discusión. El análisis western blotting demostró que el suero anti-TAP reconoce 5 bandas proteicas en *P. Vannamei* y el suero anti-tripsina reconoce 2 bandas (Fig 1). Los anticuerpos anti-TAP y anti-tripsina, encontraron sus epítopes en los gránulos que se encuentran dentro de las células "F" (Fig. 2). Las evidencias encontradas sugieren que en la glándula digestiva de *P. vannamei*, la proteasa tripsina se sintetiza y se almacena en forma de zimógeno

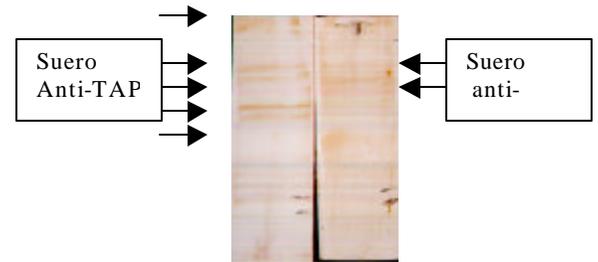


Fig 1. Análisis por western blotting para detectar zimógenos y las enzimas maduras

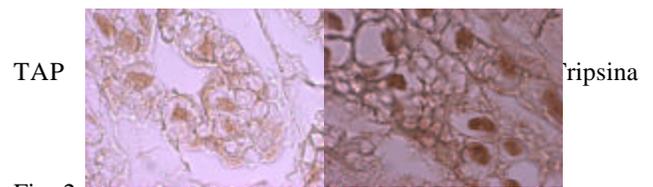


Fig. 2 Suero anti-TAP y anti-tripsina confrontadas con cortes histológicos de la glándula digestiva de *P. vannamei*.

y su activación podría estar controlada por factores diversos. Sin embargo, a diferencia de lo que pasa en vertebrados, todo el zimógeno que se encuentra almacenado en la glándula digestiva se activa cuando se homogeniza el tejido.

Conclusiones. Los anticuerpos generados con los péptidos obtenidos de la secuencia de amino ácidos, demuestran la existencia de tripsinógeno almacenado en gránulos dentro de las células "F". Por otro lado, la conservación de la secuencia del péptido de activación en las 5 tripsinas encontradas anteriormente se demuestra por el revelado de 5 bandas. Con respecto a el suero anti-tripsina, reconoce solo dos tripsinas porque la secuencia escogida, no es conservada en las 5 tripsinas.

Agradecimientos. Este trabajo está siendo financiado por CONACyT, dentro del proyecto con clave (). En la parte técnica se agradece de manera especial al Tec. Arturo Sierra Beltrones

Bibliografía

1. Klein B. Le Moullac G. Sellos D. y Wormhoudt V. 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression during the molt cycle. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28(5):551-563.
2. Mithöfer K., Fernández-del Castillo C., Mandavilli U., Rattner D.W. y Warshaw A.L. 1995. Quantitative assay of trypsinogen by measurement of cleaved activation peptide after activation with enterokinasa. *Anal. Biochem.* 130, 348-350.
3. Sellos D y Van-Wormhoudt. 1992. Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotrypsin and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda) *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 209,(3) 219-224.