

## **CARACTERIZACION DE LAS TRIPSINAS Y AMILASAS DE *PENAEUS VANNAMEI* (CRUSTACEA DECAPODA): ADAPTACION A LA COMPOSICION DEL REGIMEN ALIMENTICIO**

*Alain Van Wormhoudt, G. Le Moullac, B. Klein y D. Sellos.*

**Station de Biologie Marine du Muséum National d'Histoire Naturelle et du Collège de France, BP 225, 29200, Concarneau.**

**E-mail: avw@sb-roscoff.fr**

**Traducción: Denis Ricque Marie y José María Viader**

### **RESUMEN**

Las tripsinas, entre las proteasas, y las amilasas, entre las carbohidrasas, son las enzimas más activas en *Penaeus vannamei*, un camarón de interés comercial, especialmente en Latinoamérica. Estas enzimas y sus cDNAs fueron caracterizados. En lo que respecta a las tripsinas, se reconocieron cinco isoformas y se analizaron sus cDNAs correspondientes, los cuales codifican una preproenzima de 225 aminoácidos conteniendo un supuesto precursor peptídico de 14 residuos y una secuencia señal altamente hidrofóbica de 14 aminoácidos. Dentro de la secuencia del zimogeno, se detectaron algunos sitios autocatalíticos (Int. J. Biochem. Cell Biol. 1996, 28, 551-563). Con respecto a las amilasas, dos isoformas fueron purificadas y caracterizadas; se hizo una selección en una biblioteca de cDNAs hepatopáncreaticos fue "cribada", y se aisló y determinó la secuencia completa de los dos cDNAs correspondientes. Se caracterizó una preenzima de 511 residuos conteniendo una señal hidrofóbica de 16 aminoácidos (J. Mol. Evol., 1996, 42, 543-551).

Se produjeron anticuerpos específicos para estas enzimas, los cuales permitieron determinaciones cuantitativas y estudios inmunocitoquímicos. Las enzimas estuvieron presentes en las células F y B, pero solo las células F parecen ser capaces de sintetizarlas.

Se estudió la adaptación al nivel de caseína dietarias en larvas y adultos, y los resultados obtenidos dependen de parámetros fisiológicos, especialmente el estadio de muda, de las condiciones de cultivo y de la relación de proteínas/carbohidratos en las dietas. En premuda, se encontró una estimulación de la síntesis de tripsina cuando la caseína aumentaba y los carbohidratos quedaban constantes; al contrario se encontró una inhibición cuando el incremento de la caseína era compensado por una disminución del almidón. No se observó respuesta con otras fuentes proteicas (gelatina, proteína de calamar o concentrado de solubles de pescado).

Respecto a las amilasas, una disminución de actividad se midió cuando la caseína dietaria aumentaba. Un resultado similar se obtuvo cuando el aumento de la caseína fue compensado por una disminución del almidón, sugiriendo que el nivel de proteína es igual de importante que el nivel de carbohidratos en el control de la actividad a-amilasica.

Se presentaron dos isoformas mayores cuando la dieta contenía 25% de proteína, y una sola cuando 40%. Para establecer el nivel de polimorfismo, un fragmento de 378 pares de bases se obtuvo por RT-PCR y fue secuenciado en los dos experimentos. Una posición discriminante mostró, en el caso de la dieta con 25% de caseína, que adenosina o guanosina eran presentes, dando asparagina o ácido aspártico y una diferencia en la carga eléctrica de las dos isoformas. Sin embargo, en la dieta con 40% de caseína, la adenosina fue encontrada en 100% de los cDNAs, lo que podría explicar la presencia de una sola isoforma (J.Exp. Mar. Biol. Ecol., 1996, en prensa).

Para entender los mecanismos de tales regulaciones, los genes correspondientes fueron estudiados. Los primeros resultados se obtuvieron con respecto a la caracterización de las secuencias de genes y confirmaron la existencia de dos familias, como sugerido por el análisis de las enzimas y de sus cDNAs, y la presencia de solo dos intrones. Los estudios sobre los promotores darán información sobre los elementos regulatorios presentes en los genes.

## **INTRODUCCION**

La a-amilasa y la tripsina son las dos enzimas digestivas más importantes en el camarón *Penaeus vannamei*, cada una con su especificidad. La a-amilasa cataliza la hidrólisis del enlace  $\alpha$ -1-4 de los azúcares. La tripsina, endoproteasa de la familia de las serin-proteasas, se caracteriza por un mecanismo catalítico común, implicando tres residuos aminoácidos (histidina, ácido aspártico y serina) hidrolizando el enlace peptídico del lado carboxílico de la arginina o de la lisina. En los vertebrados esta enzima es sintetizada bajo la forma de un zimógeno inactivo, pero ningún zimógeno ha sido caracterizado en crustáceos.

La caracterización de las secuencias de ARN mensajeros codificando para estas enzimas en *Penaeus vannamei*, permite entender mejor la estructura, la función y la evolución de estas moléculas pero igualmente disponer de herramientas para estudiar la evolución de esos ARN mensajeros a lo largo de los ciclos biológicos y en particular en función de la adaptación nutricional. En los vertebrados, esta adaptación está muy bien establecida (Howard y Yalkim, 1963; Puigserver et al. 1985; Dagorn, 1986. Scheele, 1993). El efecto inductor de la caseína en la síntesis de la tripsina ha sido demostrado (Johnson et al., 1977): este efecto se sitúa a nivel de la transcripción (Lhoste et al., 1994). Asimismo, respecto a la amilasa, el efecto inductor del almidón se ha demostrado en la rata (Reboud et al., 1961; Johnson et al., 1977; Wicker et al., 1983; Giorgi et al., 1994). En los crustáceos, una adaptación de este tipo ha sido descrita en el camarón (Van Wormhoudt et al., 1980; Lee et al., 1984; Lee y Lawrence, 1982-1985; Moreau et al., 1993; Le Vay et al., 1993; Rodríguez et al., 1994). Sin embargo, este efecto es controvertido, y en la langosta no se ha podido poner en evidencia ninguna adaptación (Hoyle, 1973). Hemos retomado este trabajo con *Penaeus Vannamei*. La elección de la caseína como una buena fuente

de proteína fue evidente (Boghen et al., 1982; Aquacop, 1990; Cuzon et al., 1994) así como la selección del almidón soluble como una fuente de glucidos (Cruz-Suárez et al., 1994).

## MATERIALY MÉTODO

En un primer experimento se alimentaron juveniles de *P. vannamei*, haciendo variar la tasa de caseína del alimento de un 25 a un 40%, mientras la tasa de glucidos se mantuvo constante. En un segundo experimento, se probó la calidad de proteína y dos concentraciones de ésta (25 y 40%), utilizando gelatina, harina de calamar, hidrolizado concentrado de pescado y caseína como referencia. La actividad específica de la tripsina y de las amilasas se midió al fin de la premuda (D1<sup>''</sup>-D2) y al inicio de la misma (estadio D0) con substratos específicos y por inmunoelectroforesis. A nivel molecular, la cantidad de ARN mensajero de tripsina fue estimada por hibridación en mancha (dot-blotting) y el polimorfismo de los ARN mensajeros de la amilasa fue estimado por ensayos de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y posterior secuenciación.

Los camarones *P. vannamei*, se cultivaron en el centro Ifremer del Pacífico (Tahiti) y los experimentos se realizaron en Concarneau (ver Le Moullac et al., 1996). La temperatura del agua marina fue de 25°C. La composición de las dietas se presenta en la Tabla 1. El experimento tuvo una duración de 21 días y al final los camarones se seleccionaron de acuerdo a su estado de muda (Drach y Tchernigotzveff, 1967), se pesaron y sus hepatopáncreas fueron muestreados 15 horas después de la última alimentación.

**Tabla 1: Ingredientes incluidos en las dietas usadas para probar el efecto del nivel de caseína sobre la adaptación de las enzimas digestivas**

Ingredientes (%)	CAS25	CAS31	CAS40	CAS48
Caseína	25	31	40	48
DL-metionina	0.8	1	1.3	1.5
L-Arginina	0.4	0.5	0.7	0.9
L-Lisina	0.6	0.75	1	1.25
Almidón	17	17	17	17
Celulosa	22.7	16.2	6.7	0
Otros	33.3	33.3	33.3	33.3
Energía teorica <sup>a</sup> (kcal/100g)	254	281	324	357

Otros ingredientes: aceite de hígado de bacalao 4%; lecitina de soya 4%; colesterol 0.7%; colina 0.2%; glucosamina 0.5%; sacarosa 3.5%; vitaminas\* 2.6%; vitamina C 0.08%; minerales\* 5.1%; fosfato disódico 7%; gelatina 3% (aglutinante); agar agar 3% (aglutinante).

\*Kanazawa et al., 1977

<sup>a</sup>Chow, 1980

## **ANALISIS BIOQUIMICOS E INMUNOQUIMICOS**

Los hepatopáncreas fueron homogeneizados con un Ultraturrax a 4C en un buffer de fosfatos 10 mM, pH7.5, y centrifugados 20 min a 55000g. Las proteínas del sobrenadante fueron cuantificadas por el método de Folin (Lowry et al., 1951), las tripsinas por el método de Erlanger et al. (1981) con BAPNA (N-Benzoil-L-Arginina-naphtyl amida) como sustrato y la amilasa con glucógeno como sustrato (Bernfeld, 1955). Los métodos de purificación ya han sido descritos (Le Moullac et al., 1996; Van Wormhoudt y Sellos, 1996). Se obtuvieron anticuerpos específicos de cobayo para tripsina y de conejo para amilasa. La dosificación inmunológica se realizó con el método de Weeke (1975) en "rocket".

### **"TAMIZAJE" DEL BANCO DE CDNA Y ANALISIS DE PCR**

El banco de cDNA utilizado contiene  $5.8 \times 10^6$  fagos independientes y a sido construido en el vector lamda-ZAP II (Stratagene). El tamizaje con oligonucleotidos fue descrito tanto para la amilasa (Van Wormhoudt y Sellos, 1996) como para la tripsina (Klein et al., 1996).

Los ARN fueron extraídos a partir de muestras individuales de hepatopáncreas. Los ensayos de PCR se realizaron con la TaqPfu polimerasa y los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector PCR-script (Stratagene). La secuencia de los fragmentos así clonados se analizó utilizando el kit USB de secuenciación doble cadena.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **1. Caracterización de la a-amilasa**

La a-amilasa fue purificada a partir de la glándula digestiva de *Penaeus vannamei*. Dos isoformas estuvieron presentes en iguales cantidades así como otra isoforma débilmente representada (Figura 1b). Con el fin de obtener información sobre sus secuencias, se realizó un hidrolizado tripsico y se determinó la secuencia de un peptido mayor. Un oligonucleótido degenerado permitió entonces al tamizaje de un banco de cDNA de hepatopáncreas previamente construido en el vector lamda-Zap. Aproximadamente un 0.2% de los clones se hibridaron con esta sonda, y los fragmentos más largos obtenidos fueron secuenciados. La a-amilasa madura se presenta bajo la forma de una cadena de 495 aminoácidos para las 3 isoformas secuenciadas (Figura 2). Diez nucleótidos y cuatro aminoácidos difieren entre la isoforma a y la isoforma b. En contraste, la isoforma c presenta 145 cambios nucleotídicos y 57 aminoácidos diferentes (Van Wormhoudt y Sellos, 1996), sugiriendo una evolución más antigua. Los tres aminoácidos del sitio catalítico (Asp, Glu, Asp.) están presentes así como 10 cisteínas. Un análisis por agrupamiento de los aminoácidos hidrófobos (HCA) demostró que la zona catalítica (zona A) se presenta bajo la forma de un barril de 8 hojas b paralelas rodeadas de 8 hélices a. Esta estructura es común para todas las glucosidasas y fue confirmada por cristalografía de rayos X en enzimas porcinas. Una comparación de las secuencias y un análisis filogenético muestra que la a-amilasa de camarón presenta el mismo grado de identidad con la porcina o de drosófila,

sugiriendo una antigua divergencia. Un anticuerpo específico permitió localizar la amilasa en las células F (Figura 3a y b).

## **2. Caracterización de la tripsina**

La actividad de la tripsina presente en el jugo gástrico fue revelada con un sustrato específico (BAPNA). Tres isoformas mayores y dos menores se encontraron de este modo (Figura 1c). La enzima fue purificada por cromatografía de afinidad (Klein et al., 1996), y representa aproximadamente el 10% de la actividad proteasica total. El peso molecular, determinado por electroforesis con SDS (dodecilsulfato de sodio), se encuentra entre 31 y 31 kDa. La enzima se inactiva a pH inferior a 5 y el calcio le afecta poco, en contraste con la enzima de los vertebrados. La  $K_m$  medida con los BAPNAs como sustrato es de 0.01 mM aproximadamente, muy inferior a la del salmón (0.05 mM) o del res (0.5 mM). La eficiencia catalítica, medida por la relación  $kat/K_m$ , es de 300 mM/sec aproximadamente y es mucho más fuerte que para la tripsina de vertebrado.

Una secuencia consenso incluyendo los residuos 212 a 219 permitió definir un oligonucleótido y tamizar el banco de cDNA. El 1% de los clones fueron positivos. Después de varios tamizajes (Klein et al., 1996), cinco variantes fueron aisladas y secuenciadas. El inserto secuenciado más largo contiene una secuencia codificante completa de 801 pares de bases (pb) incluyendo el codón de iniciación y de terminación, así como una secuencia 3' de 51 pb no traducible (Figura 4). Esta parte 3' es común para las 3 variantes, aunque las otras dos son muy diferentes. Todas contienen el sitio de poli-adenilación AT(T/A)AA.

La parte traducible contiene 256 aminoácidos incluyendo el codón de iniciación de la metionina, un péptido señal de 14 aminoácidos y una secuencia zimógena de 14 residuos. El peso molecular deducido es de 25kDa, inferior a lo encontrado por electroforesis con SDS, lo que sugiere que la proteína es glicosilada. Todas las pepsinas presentan los aminoácidos del sitio catalítico, histidina 57, aspartato 102 y serina 195. También están presentes el ácido aspártico 189 importante para la fijación del sustrato y los residuos glutamato 70, asparagina 72, valina 75, glutamato 77 y glutamato 80 los cuales participan en la fijación del calcio. Se caracterizaron ocho cisteínas mientras solo seis fueron encontradas determinadas en *Astacus* y 12 en los vertebrados.

La comparación de las secuencias sugiere que las tripsinas secuenciadas pueden ser divididas en dos familias. La composición difiere entre las dos familias por 23 aminoácidos, mientras que dentro de una misma familia solo seis aminoácidos varían.

La secuencia señal presenta el mismo carácter hidrofóbico que todas las secuencias señal, así como un residuo lisina, ubicado inmediatamente después de la metionina, y un residuo alanina que precede a la secuencia zimógena. Esta secuencia se caracteriza por la presencia de dos parejas arginina-lisina y arginina-arginina que podrían responder a sitios de autocatalisis. No se detectó ninguna secuencia Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, de las que pueden ser reconocidas por enterocinasas en vertebrados. Las únicas homologías con la secuencia zimógena de un vertebrado conciernen la presencia de una prolina en segunda posición, así como el sitio de corte

lisina-isoleucina característico de la liberación de la proteína madura.

De un punto de vista evolutivo, la tripsina de *Penaeus* es muy cercana a la de *Astacus* y presenta alrededor de un 40% de similitud con la tripsina de insecto y la de vertebrado.

En lo que concierne la localización de la tripsina, el hecho sobresaliente es su presencia en las células B, al lado de las células F (Fig. 3c y d). Sin embargo, un análisis fino de la reacción permite pensar que la síntesis de la tripsina ocurre únicamente en las células F, confirmando los resultados obtenidos para la amilasa y para la astacina por Vogt. El papel de las células B consistiría en reciclar las macromoléculas y en particular ciertas enzimas fuertemente expresadas y muy estables, como es el caso de la tripsina. Eso podría explicar que el volumen de producción aparente de esas enzimas en el jugo gástrico es siempre muy elevado, y refleja lo encontrado en vertebrados, mientras la estabilidad de los ARNs mensajeros correspondientes es corta (Fig.5).

### **3. Adaptaciones nutricionales**

La estabilidad sobresaliente de las enzimas digestivas en el jugo gástrico y la nueva interpretación del papel de las células B nos llevaron a utilizar, a parte de la medida de la actividad específica (que puede variar independientemente de la concentración de enzima) y de la medida de la cantidad de enzima por inmunodosificación (que mide tanto las enzimas nuevamente producidas como todas las presentes en las células del hepatopáncreas), la medida de la cantidad de ARN mensajero específico la cual, ella si, refleja la cantidad de enzima susceptible de ser sintetizada rápidamente.

En lo que concierne la  $\alpha$ -amilasa, la disminución de la actividad y de la cantidad observada (Figura 6 a y b), cuando la cantidad de caseína aumenta de 25 a 40% en la dieta, corresponde a la desaparición de una isoforma (Fig. 6c). Se observan dos isoformas principales para un nivel de caseína de 25%, mientras una sola para un nivel de 40%. Con el fin de determinar el nivel al cual se establece esta regulación, los ARN mensajeros fueron extraídos en las dos condiciones experimentales. Un fragmento de 378 pares de bases fue obtenido usando oligonucleótidos consenso en ensayos de PCR. La clonación y la secuenciación de los clones obtenidos permitió mostrar que en el caso de las dietas conteniendo 25% de caseína, 1/3 de los clones incluyen una adenosina en posición 8 (Fig.2) y 2/3 una guanosina, mientras en el caso de las dietas con 40% de caseína, todos tienen una adenosina en esta posición. El cambio de una base genera un cambio de aminoácido entre ácido aspártico y aspargina, y conlleva un cambio de carga correspondiente a una isoforma de la amilasa. Con cualquier proteína utilizada, siempre se observa esta expresión diferencial (Le Moullac et al., 1996).

En lo que concierne a la tripsina, la actividad específica aumenta con el contenido en caseína de la dieta, aparentemente .sin ningún cambio en las diferentes isoformas. Esos cambios también son medidos por inmunoelectroforesis (Figura 7 a y b). La cantidad de los ARN mensajeros también es proporcional a la actividad específica lo que confirma que se trata de un efecto transcripcional (Figura 7c). Sin embargo, esas variaciones son pequeñas comparadas con las encontradas en los vertebrados. Además, en el estadio D0, se observa un efecto negativo (Figura

8) e igualmente en el fin de la pre-muda cuando el regimen se mantiene isoenergético haciendo variar el nivel de almidón (Le Moullac et al., 1996).

Así, en el caso de un cambio nutricional de larga duración (21 días), la medida de la actividad específica de las enzimas digestivas si refleja lo que pasa a diferentes niveles de regulación. Cuando se trata de una adaptación a corto plazo, conviene sin embargo utilizar la medida de la cantidad de ARN mensajero en lugar de la actividad enzimática para estimar la tasa de variación. En los crustáceos, también la elección del estado de muda es primordial, como ya lo vimos, y podría explicar los resultados diferentes obtenidos por varios autores de experimentos de adaptación nutricional.

#### **4. Caracterización del gen de la tripsina**

Con el fin de ir más lejos en el conocimiento de los mecanismos de regulación, un estudio de los genes es indispensable. Este estudio ya fue iniciado para la tripsina de *P. vannamei*, el conjunto de la parte codificante del gen de la tripsina corresponde a tres exons y dos introns muy cortos, mientras que en la rata, corresponde a cinco intrones. Esta particularidad se encuentra también en los insectos en donde dos intrones se observan en *Choristoneura* y ninguno en la drosófila. Además, en el camarón las dos familias se caracterizan por intrones de diferente tamaño (Figura 9). Se están desarrollando experimentos para investigar la parte reguladora con el fin de estudiar los mecanismos de control.

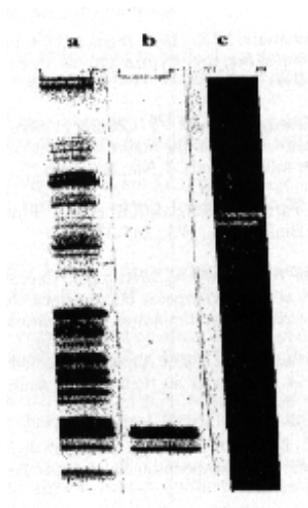
#### **REFERENCIAS**

- Aquacop (1990). Influence of the quality of protein on growth and survival of three penaeid species. In "Proc. Adv. Tropical Aquaculture, Tahiti, Feb-20-March-4th 1989, IFREMER, p 9.
- Bernfeld P. (1955). Sur une méthode de dosage des amylases a et b. In "Methods in Enzymology" Colowick, Kaplan ed., Acad. Press N.Y.,1 : 149-154.
- Boghen A.D., Castell J.D., Conklin D.E. (1982). In search of a reference protein to replace "vitamin-free casein" in Lobster nutrition studies. *Can. J. Zool.*, 60 : 2033-2038.
- Chow K.W. (1980). Nutritional bioenergetics in feedstuffs. in "Fish Feeds Technology" ADCP eds., FAO Rome, 80/11, 22-27 ; 113-168.
- Cruz-Suarez L.E., Ricque-Marie D., Pinal-Mansilla J.D., Wesche-Ebelling D. (1994). Effect of different carbohydrate sources on the growth of *Penaeus vannamei*; economical impact. *Aquaculture*, 123 ; 349-360.
- Cuzon G., Guillaume J., Cahu C. (1994). Composition, preparation and utilization of feeds for Crustacea. *Aquaculture*, 124 : 253-267.
- Dagorn J.C. (1986). Mechanism of pancreatic adaptation to diet. *Biochimie*, 68 : 329-331.

- Davis B.J. (1964). Disc electrophoresis-II : method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 : 404-427.
- Drach P., Tchernigovtzeff C. (1967). Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie et Milieu*, 18 ; 595-617.
- Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. (1961). The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95 : 271-278.
- Giorgi D., Bernard R., Lapointe R., Dagorn J.C. (1984). Regulation of amylase messenger RNA concentrations in rat pancreas by food content. *The Embo J.* , 3 (7) ; 1521-1524.
- Howard F., Yarkin J. (1963). Effect of dietary change upon the amylase and trypsin activities of the rat pancreas. *Brit. J. Nutr.*, 17 ; 281-294.
- Hoyle J. (1973). Digestive enzyme secretion after dietary variations in the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board Canada*, 30 : 1647-1653.
- Johnson A., Hurwitz R., Kretchmer N. (1977). Adaptation of rat pancreatic amylase and chymotrypsinogen to changes in diet. *J. Nutr.*, 107 ; 87-96.
- Kanazawa A., Teshima S., Tokiwa S. (1977). Nutritionnal requirements of prawn. VII Effect of dietary lipids on growth. *Nippon Suisan Gakkaiashi*, 43 : 849-856.
- Klein B., Le Moullac G., Dellos D., Van Wormhoudt A. (1996). Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 28 ; 551-563.
- Lee P.G., Lawrence A.L. (1982). A quantitative analysis of digestive enzymes in penaeid shrimp; influence of diet, age and species. *Amer. Physiol.*, 25 : 241-249.
- Lee P.G., Smith L., Lawrence A. L. (1984). Digestive protease of *Penaeus vannamei* Boone : relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture*, 42 : 225-239.
- Lee P.G., Lawrence A.L. (1985). Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp, *Penaeus setiferus* Linnaeus. *J. World Maricul. Soc.*, 16 ; 275-287.
- Le Moullac G., Van Wormhoudt A., AQUACOP (1994). Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fiber levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Living Resour.* 7 : 203-210.
- Le Moullac G., Klein B., Sellos D., Van Wormhoudt A. Adaptation of trypsin, chymotrypsin

- and  $\alpha$ -amylase to casein and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). (1996) *J Exp. Mar Biol Ecol.* (en prensa)
- Le Vay L., Rodriguez A., Kamarudin M.S., D.A. Jones (1993). Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture*, 118 : 287-297.
- Lhoste E.F., Fiszlewicz M., Gueugneau A.M., T. Corring (1994). Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: effect of the nature of protein and rat strain on enzyme induction and messenger mRNA levels. *J. Nut. Biochem.*, 5 : 84-94.
- Lowry O., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.S. (1951). Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- Moreau G., Henocque Y., Van-Wormhoudt A., Martin B.J., Ceccaldi H.J. (1985). Adaptations biochimiques à des aliments composés et croissance chez le homard juvénile, *Homarus americanus* L. : résultats préliminaires. *Aquaculture*, 48 ; 313-321.
- Puigserver A., Wicker C., Gaucher C. (1985). Aspects moléculaires de l'adaptation des enzymes pancréatiques et intestinales au régime alimentaire. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 25 ; 787-802.
- Reboud J.P., Ben Abdeljlil A., Desnuelle P. (1961). Variation de la teneur en enzymes du pancréas de rat en fonction de la composition des régimes. *Bioch. Biophys. Acta*, 58: 326-337.
- Rodriguez A., Le Vay L., Mourente G., Jones D.A. (1994). Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Mar. Biol.*, 118: 45-51.
- Scheele G.A; (1993). Regulation of pancreatic gene expression in response to hormones and nutritional substrates in " The Pancreas : Biology, Pathology and disease. " II edition, Vay Liang W., GO et al, Raven Press N.Y. ; 103-119.
- Van-Wormhoudt A., Ceccaldi H.J., Martin B. (1980). Adaptation de la teneur en enzymes digestives de l' hépatopancréas de *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda) à la composition d' aliments expérimentaux. *Aquaculture*, 21 ; 63-78.
- Van-Wormhoudt A., Sellos D. (1996). Molecular cloning and sequencing of three cDNAs that encode amylase in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *J. Mol. Evol.* 42, 543-551.
- Weeke B. (1975). Rocket immunoelectrophoresis. In *A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis*. Oslo University. (Edited by Axelsen N., Kroll J. and Wechen B.), 37-46.
- Wicker C., Scheele G., Puigserver A. (1983). Adaptation au régime alimentaire du niveau des

ARNm codant pour l'amylase et les protéases à sérine pancréatique chez le rat. C.R. Acad. Sc., 297 : 281-284.



**Figura 1. Caracterización de las proteínas del hepatopáncreas (a), de la tripsina (b), y de la alfa-amilasa (c) de *Penaeus vannamei*.**



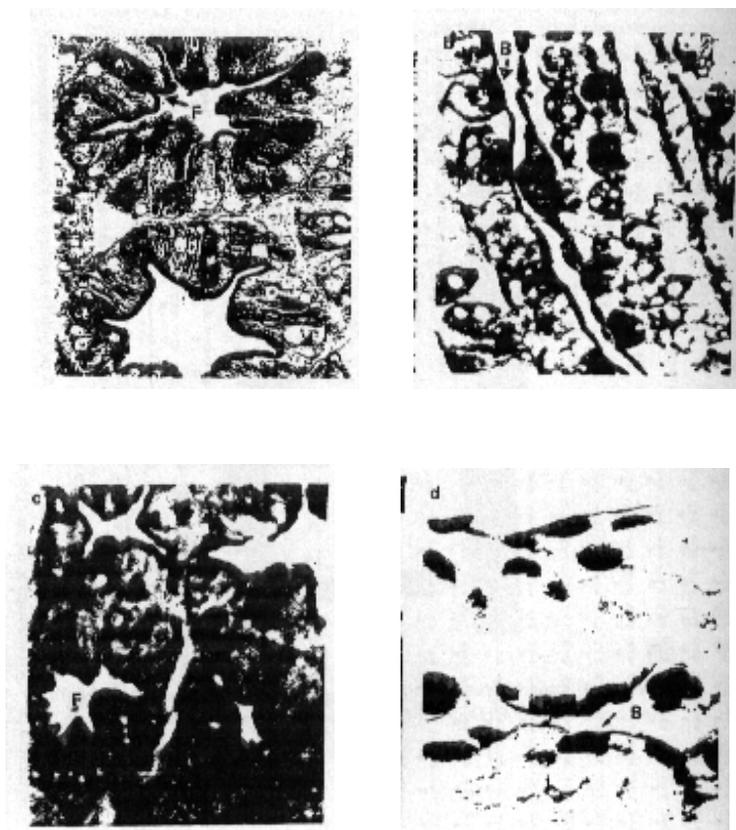
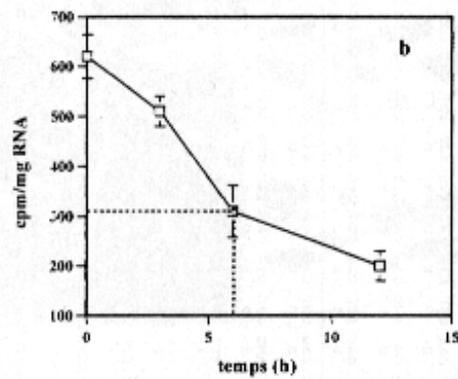
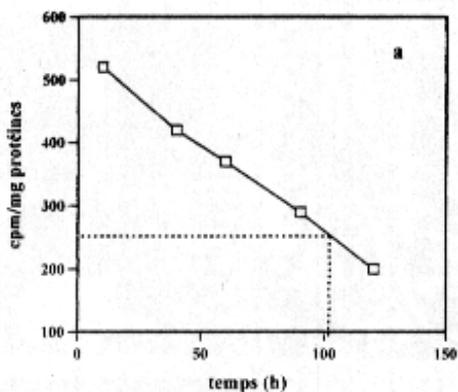


Figura 3. Localización inmunocitoquímica de la alfa-amilasa y de la tripsina en *Penaeus vannamei*.

- a) Corte transversal de los túbulos del hepatopáncreas mostrando la existencia de numerosos gránulos en las células F gracias al anticuerpo anti-amilasa.
- b) Corte longitudinal idem a.
- c) Corte transversal de túbulos del hepatopáncreas mostrando la existencia de numerosos granulos en las células F con el anticuerpo anti-tripsina.
- d) Corte longitudinal idem c: algunas células B muestran una fuerte reacción inmunocitoquímica en donde se distingue rastros de fusión de lisozomas con vesículas de endocitosis.





**Figura 5. Estabilidad de las proteínas del hepatopáncreas y de los ARN mensajeros de la tripsina del camarón.**

a) Proteínas: después de haber marcado las proteínas a saturación con leucina triada, las proteínas son extraídas y la radioactividad medida a diferentes tiempos (“temps”).

b) ARN mensajero: después de haber inyectado actinomicina D, los ARN totales son extraídos, hibridados con una sonda específica de la tripsina y denominados.

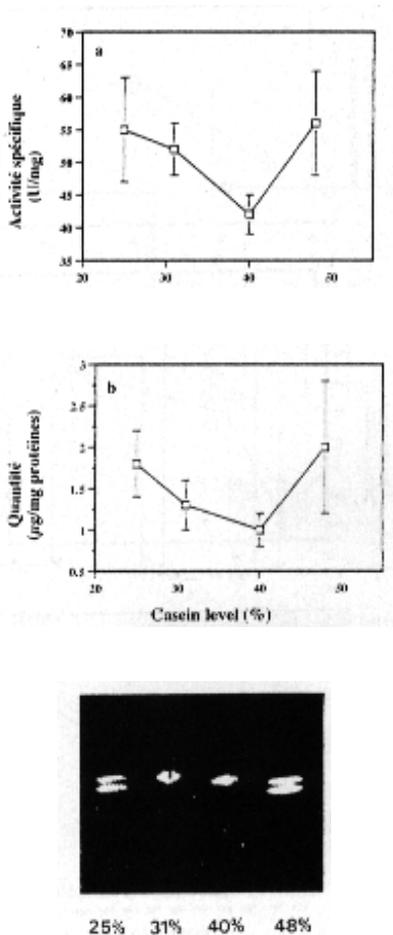


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de caseína del régimen alimenticio sobre la alfa-amilasa de *Penaeus vannamei* en estadio D2 del ciclo intermuda.

- a) Actividad específica.
- b) Cantidad medida por inmunoelectroforesis.
- c) Isoformas reveladas por electroforesis (Van Wormhoudt y Sellos, 1996).

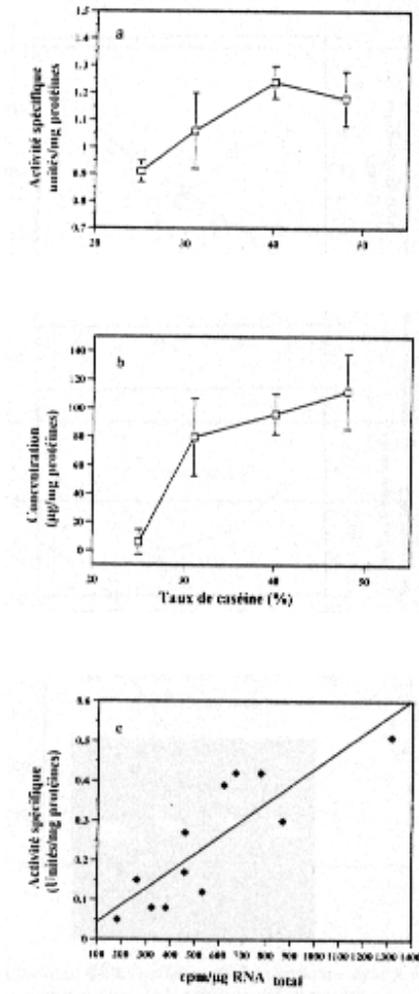


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de caseína (%) en la dieta sobre la tripsina de *Penaeus vannamei* en el estadio D2 del ciclo de intermuda.

- a) Actividad específica.
- b) Cantidad medida por inmunoelectroforesis
- c) Relación entre la actividad específica y la cantidad de ARN mensajeros específicos.

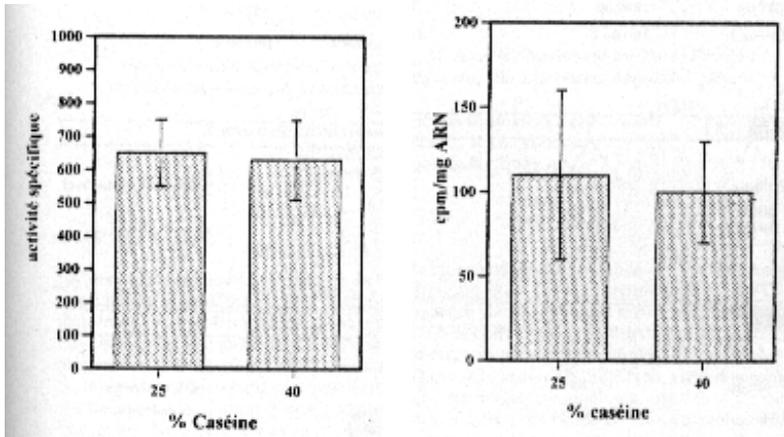


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de caseína en el régimen alimenticio sobre la tripsina de *Penaeus Vannamei* en estado D0 del ciclo de intermuda.

a)Actividad específica; b)Cantidad de ARN mensajeros.

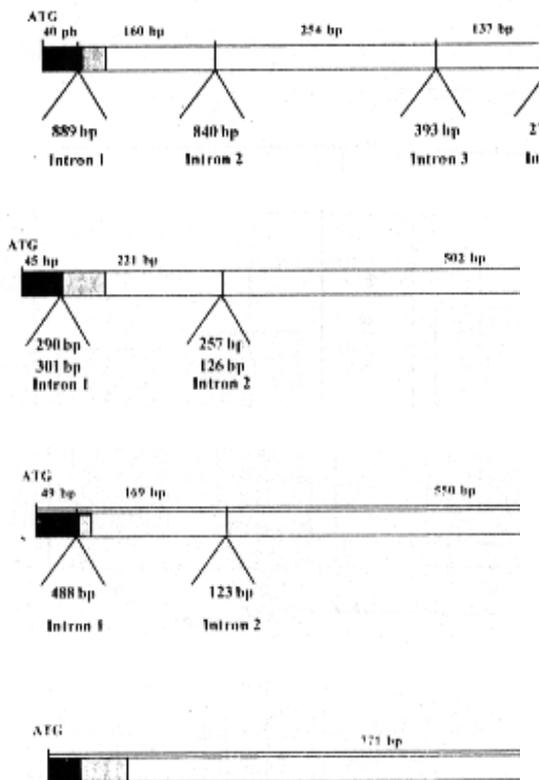


Figura 9. Estructura comparada de los genes de la tripsina en diferentes especies.