

Purificación de isoformas de proteasas tipo tripsina de crustáceos

Javier Rodríguez-Casariego¹, Rolando Perdomo-Morales², Erick Perera^{1*}

- (1) Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, Calle 16 No. 114, Playa, CP 11300, Ciudad de La Habana, Cuba.
- (2) Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, CITMA, Ave. 26 No. 1605 esq. Puentes Grandes, Plaza de la Revolución, CP 10400, Ciudad de La Habana, Cuba.
- (*) Autor para la correspondencia: erickpb@cim.uh.cu

RESUMEN

Las tripsinas son las principales peptidasas digestivas de crustáceos. En los últimos años se han producido revisiones sobre las tripsinas de invertebrados, así como de crustáceos, e incluso de las presentes en determinada especie de crustáceo. Sin embargo, los aspectos relacionados con la purificación de estas enzimas (y sus isoformas) no se han abordado en estas revisiones. En la presente revisión se exponen los procedimientos más empleados en la purificación de tripsinas de crustáceos, las dificultades en la separación de isoformas, y se discuten las experiencias de los autores en la purificación de isoformas de tripsina en la langosta espinosa *Panulirus argus*, las cuales pudieran ser de interés para los que se inicien en el campo de la purificación de enzimas tipo tripsina de crustáceos. Se excluyen los aspectos básicos relacionados con los principios de cada método y con la purificación de proteínas en general, los cuales pueden ser encontrados en la vasta literatura publicada tanto en revisiones como en libros especializados.

Palabras clave: Cromatografía, Crustáceos, Isoenzimas, Isoformas, Purificación, Tripsina.

ABSTRACT

Trypsins are the main digestive proteinases in crustaceans. Some reviews have been published on the trypsin enzymes in invertebrates and particularly for crustaceans only few species have been analyzed. However, these reviews have not included the purification of the enzymes and their isoforms. The most employed procedures for the purification of crustacean trypsins are appraised in the present work, as well as the difficulties to separate the different isoforms. We discuss our own experience on the purification of the spiny lobster *Panulirus argus* trypsins. Aspects related with the principles of each method and the purification of proteins in general were omitted since they can be found in many published reviews and books.

Key words: Chromatography, Crustaceans, Isoforms, Isozymes, Purification, Trypsins.

INTRODUCCIÓN

La tripsina bovina fue purificada por cristalización a principios de la década del 1930 (Northrup y Kunitz, 1931) y fue una de las primeras peptidasas aisladas con suficiente pureza y cantidad para llevar a cabo análisis bioquímicos (Northrup *et al.*, 1948). Casi toda la secuencia de aminoácidos del zimógeno se había logrado conocer en los años 1960 (Walsh *et al.*, 1964; Walsh y Wilcox, 1970) y con el advenimiento de la cristalografía de rayos X, la estructura tridimensional de la tripsina bovina fue resuelta en los años 1970 (Huber *et al.*, 1974; Sweet *et al.*, 1974; Kossiakoff *et al.*, 1977). En la actualidad, las serino-peptidasas tipo tripsina han sido objeto de estudio en gran variedad de organismos, incluyendo invertebrados, por su importancia en varios procesos fisiológicos (fundamentalmente la digestión) y su aplicación en varios procesos biotecnológicos.

Las tripsinas se agrupan en el clan PA, familia S1 según la clasificación utilizada por la base de

datos MEROPS (URL: <http://www.merops.co.uk>). Se caracterizan por poseer una tríada catalítica constituida por los residuos de His57, Asp102 y Ser195 (numeración de la quimotripsina) e hidrolizan enlaces peptídicos del extremo carboxílico de los residuos Arg y Lys en posición P1. Los elementos estructurales que determinan la especificidad de las tripsinas de vertebrados han sido objeto de varias revisiones (Perona y Craik, 1995; Hedstrom, 1996).

Las serino-peptidasas digestivas de crustáceos fueron, a partir de 1992, agrupadas bajo el término "braquiurinas" (EC 3.4.21.32) por el Comité de Nomenclatura (sucesor de la Comisión de Enzimas) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), debido a su capacidad de degradar diferentes sustratos (Tsu y Craik, 1998; Barret *et al.*, 1998). Las braquiurinas se dividen en tres tipos (Ia, Ib y II) dependiendo de su especificidad: El primero incluye enzimas con

especificidad amplia, que muestran actividad de tipo tripsina, quimotripsina y elastasa (serino-proteasas colagenolíticas de crustáceos); el tipo Ib presenta especificidades similares al grupo anterior pero muestran una reducción drástica de la actividad tipo tripsina (quimotripsinas de crustáceos); el tipo II agrupa enzimas con especificidad tipo tripsina únicamente. Por sus características tan distintivas, varios estudios estructurales se han llevado a cabo con las serino-proteasas colagenolíticas, conociéndose en la actualidad las bases estructurales de su amplia especificidad (Perona *et al.*, 1997; Tsu *et al.*, 1997). Sin embargo, hasta la fecha, solo se ha dilucidado por métodos cristalográficos la estructura de la tripsina del langostino *Astacus leptodactylus* (Fodor *et al.*, 2005), aunque Heheman *et al.* (2007) logran la cristalización preliminar de una tripsina del cangrejo *Cancer pagurus* y Perera *et al.* (2010a) modelaron la estructura tridimensional de varias tripsinas de la langosta *Panulirus argus* utilizando como molde la tripsina del langostino. La poca información que existe apunta a que las tripsinas de crustáceos comparten los elementos estructurales esenciales para la especificidad con sus contrapartes de vertebrados (Fodor *et al.*, 2005; Heheman *et al.*, 2007; Perera *et al.*, 2010a).

Una de las características distintivas de las tripsinas de invertebrados es su gran cantidad de isoformas. Mientras que los vertebrados inferiores como los peces también presentan múltiples isoformas para esta enzima, se conoce que en los mamíferos existen muy pocas. En humanos (Figarella *et al.*, 1975), bovinos (Puigserver y Desnuelle, 1971), cerdos (Voytek y Gjessing, 1971) y perros (Ohlsson y Tegner, 1973) solo se han descrito dos tripsinas, una aniónica y otra catiónica. Esta reducción en el número de isoformas de tripsina en vertebrados ha estado acompañada de un incremento de la complejidad dentro de la familia de las serino-peptidasas, con varios genes que contienen dominios adicionales, además del dominio tripsina (Patthy, 1999).

Se conoce que en crustáceos los genes que codifican enzimas tipo tripsina se agrupan en familias multigénicas con un alto grado de polimorfismo (Klein *et al.*, 1998). La presencia de isoformas se ha descrito en un gran número de crustáceos (Brockhoff *et al.*, 1970; Galgani y Nagayama, 1987; 1988; Tsai *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 1996; Sainz *et al.*, 2004, 2005; Perera *et al.*, 2008a). En dependencia de la combinación de isoformas de tripsina, se han definido varios fenotipos en el camarón *Litopenaeus vannamei* (Sainz *et al.*, 2004; Sainz *et al.*, 2005) y en la langosta espinosa *P. argus* (Perera *et al.*, 2010b).

Las diferencias entre isoformas en cuanto a su actividad, resistencia a inhibidores, estabilidad, y otras características, han sido demostradas para una gran variedad de enzimas, jugando papeles importantes en la regulación de muchos procesos

fisiológicos. De las enzimas digestivas de invertebrados, el caso más conocido es el de dos amilasas de *Drosophila*, que difieren en la habilidad de hidrolizar el almidón y se selecciona la forma más activa cuando las larvas se cultivan en un medio rico en almidón (Kirpichnikov y Muske, 1980). Sin embargo, aunque se han descrito diferencias cinéticas (y de otra naturaleza) entre las diferentes isoformas de tripsina del camarón *L. vannamei* (Sainz *et al.*, 2004) y otros crustáceos, el efecto de estas diferencias en la digestión de proteínas solo ha sido estudiado en la langosta *P. argus* (Perera *et al.*, 2010b) y en *Daphnia* (Schwarzenberger *et al.*, 2010), aunque se ha sugerido para camarones peneidos (Sainz y Córdova-Murueta, 2009). A diferencia de la poca información que hay al respecto en crustáceos, las ventajas de presentar determinadas isoformas de tripsina en la digestión ha sido estudiada con profundidad en salmónidos (ver revisión de Rungruangsak-Torrissen y Male, 2000).

Por las razones antes expuestas, los estudios derivados de la purificación de diferentes isoformas de tripsina presentes en una misma especie de crustáceo, no solo tributan al campo de la bioquímica comparada, sino que pudieran aportar información importante para comprender mejor el polimorfismo de estas enzimas desde el punto de vista fisiológico. Sin embargo, la purificación de las isoformas de una enzima es un reto desde el punto de vista técnico, debido a que no existen grandes diferencias en cuanto a tamaño, carga, hidrofobicidad y/o especificidad. Aunque en la actualidad existen métodos con una alta capacidad de resolución, capaces de separar cientos de proteínas en mezclas complejas, la mayoría de éstos se emplean en la identificación de proteínas (Gevaert y Vandekerckhove, 2000) y no permiten la obtención de las enzimas activas, o en cantidades suficientes.

En los últimos años se han producido revisiones sobre las tripsinas de invertebrados (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008), sobre las tripsinas de crustáceos (Carrillo *et al.*, 2008), o incluso sobre las tripsinas presentes en determinada especie de crustáceo (Sainz y Córdova-Murueta, 2009). Sin embargo, los aspectos relacionados con la purificación de estas enzimas en crustáceos (y sus isoformas) no se han abordado con profundidad en estas revisiones, y son escasos en la literatura los trabajos de purificación de tripsinas en crustáceos. En la presente revisión se exponen los procedimientos más empleados en la purificación de tripsinas de crustáceos, y se discuten las experiencias de los autores en la separación de isoformas.

2. Purificación de isoformas de tripsina

Actualmente, para la obtención de proteínas puras se pueden emplear dos estrategias diferentes:

- La expresión recombinante de la proteína de interés.
- La purificación a partir de su fuente natural.

2.1. Estrategia recombinante

Los avances en la tecnología del ADN recombinante han hecho posible la producción de proteínas en diversos sistemas heterólogos de expresión tales como la bacteria *Escherichia coli* (Sorensen y Mortensen, 2005), la levadura *Pichia pastoris* (Cereghino *et al.*, 2002), baculovirus (King y Possee, 1992) y plantas (Yoshida y Shinmyo, 2000). En el caso de las tripsinas de crustáceos, se han descrito numerosos problemas respecto a la factibilidad de obtener tripsinas recombinantes, principalmente los efectos nocivos al vector y los bajos rendimientos. Por ejemplo, la expresión de tripsinas del camarón *L. vannamei* en *P. pastoris* afecta la biosíntesis y vida media de las enzimas peroxisomales (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2001). En otros casos, la proteína recombinante se degrada en el interior de la levadura o durante el proceso de secreción (Escamilla-Treviño *et al.*, 1999). Un reflejo de estas dificultades es el hecho que los únicos dos estudios cristalográficos sobre tripsinas de crustáceos (Fodor *et al.*, 2005; Heheman *et al.*, 2007) se hayan realizado a partir de enzimas obtenidas de extractos naturales. Dado que varias tripsinas de crustáceos (y sus isoformas) han sido ya clonadas (Klein *et al.*, 1996; Perera *et al.*, 2010), los estudios encaminados a lograr la expresión recombinante de estas enzimas en su forma activa, contribuirán a salvar las dificultades que hoy existen en la purificación de proteínas tan similares a partir de extractos crudos complejos.

2.2. Métodos cromatográficos

Aunque algunos investigadores han separado exitosamente las isoformas de tripsinas de crustáceos cortando las bandas correspondientes directamente de geles de poliacrilamida (*L. vannamei*, Sainz *et al.*, 2004), este procedimiento no es el óptimo pues sólo las enzimas con diferentes movilidades electroforéticas pueden ser separadas. Estudios en nuestro laboratorio con las tripsinas de la langosta *P. argus* mostraron que a medida que se aplican métodos cromatográficos más resolutivos, aparecen varias peptidasas tipo tripsina y otras proteínas con la misma movilidad electroforética, o muy parecida. Por tanto, lo más acertado es utilizar métodos cromatográficos y, en consecuencia son los más utilizados.

Los métodos cromatográficos se basan en las características de la proteína: forma y tamaño, carga, hidrofobicidad y biopropiedades (Scopes,

1994). En el caso de la separación de isoformas, la naturaleza semejante de estas proteínas dificulta excesivamente la estandarización de una metodología. Muchas son las técnicas disponibles en el campo de la cromatografía y varias son las variantes que han sido utilizadas para la purificación de tripsinas en crustáceos (ver más adelante).

La preparación de extracto es uno de los pasos críticos en la purificación de proteínas pues determina la cantidad inicial de la proteína blanco y la cantidad de contaminantes a eliminar durante la purificación. El jugo gástrico de crustáceos es rico en enzimas tipo tripsina (Perera *et al.*, 2008) y en ocasiones se ha utilizado como material de partida para la purificación de las mismas (Fodor *et al.*, 2005). En este sentido, dos grandes ventajas del jugo gástrico son que contiene muy pocas proteínas contaminantes en comparación con otros tejidos, y que la cantidad de lípidos es muy baja. No obstante, la obtención de cantidades suficientes de jugo gástrico en ocasiones es engorrosa, sobre todo en especies de pequeño tamaño. La purificación de tripsinas de crustáceos en la mayoría de los casos se ha llevado a cabo a partir de extractos de la glándula digestiva. Este órgano tiene un alto contenido de humedad, por lo que puede ser homogenizado sin, o prácticamente sin la adición de tampón. Estudios en nuestro laboratorio con *P. argus* mostraron que esto no compromete la estabilidad de las enzimas tipo tripsina, a la vez que evita la dilución de las mismas. Por otra parte, la glándula digestiva es el principal sitio de reserva de lípidos en crustáceos, por lo que luego de la homogenización es necesario un paso de delipidización. Un método que usualmente brinda resultados excelentes es el uso de acetona, y por tanto es el más utilizado.

Por otra parte, la glándula digestiva de crustáceos es rica en hemolinfa con una alta actividad fenoloxidasa (Perdomo-Morales *et al.*, 2007, 2008) y sustratos endógenos (ej. tirosina), por lo que los extractos son propensos a la melanización. Durante este proceso se producen especies reactivas del oxígeno y quinonas que son capaces de interactuar con las proteínas y ocasionar cambios en la estructura de las mismas [ej. las quinonas son muy reactivas con los residuos de cisteína (Whitehead *et al.*, 2001; LaVoie *et al.*, 2005)]. Este aspecto no se ha tenido en cuenta al purificar proteínas de la glándula digestiva de crustáceos y puede estar relacionado con bajos rendimientos. De ser necesario, la inclusión de inhibidores de las enzimas con actividad fenoloxidasa (fenoloxidasa, hemocianina) pudiera resultar beneficioso. En nuestro laboratorio, hemos utilizado con éxito el dietilditiocarbamato de sodio (Rescigno *et al.*, 2002; Amin *et al.*, 2010) para evitar la melanización de los extractos como medida de precaución.

2.2.1. Cromatografía de afinidad

Aunque no existe un esquema único de purificación, y en cada caso la estandarización de una metodología se produce mediante un largo proceso de prueba y error, se reconoce que es conveniente utilizar algún método de captura en las etapas iniciales de la purificación. Esto permite eliminar la mayor cantidad de contaminantes, concentrar la proteína de interés y estabilizar las enzimas. En este sentido, la cromatografía de afinidad ha sido considerada como la cromatografía más eficiente para la separación y purificación de proteínas (Polanowski *et al.*, 2003). Su elevado factor de purificación y su alto rendimiento, provoca que el uso de la cromatografía de afinidad se haya evaluado al abordar la purificación de tripsinas de crustáceos y otros organismos.

El primer aspecto a valorar es la determinación del ligando adecuado para cada caso. El inhibidor de tripsina de la soja (SBTI) ha sido utilizado como ligando con buenos resultados en peces (Klomklao *et al.*, 2007), no siendo así para crustáceos. Varios estudios en crustáceos (Zwilling *et al.*, 1969; Dendinger y O' Connor, 1990) refieren la imposibilidad de separar las tripsinas en su forma activa de la matriz-SBTI utilizando condiciones ácidas de elución, las cuales son las más utilizadas. Sin embargo, existe un informe en crustáceos del uso exitoso de SBTI-Sepharosa, que logra eluir las tripsinas activas a pH básico (Fodor *et al.*, 2005). En nuestro laboratorio se evaluó la matriz SBTI-Sepharosa como método de captura de tripsinas de la langosta *P. argus*, y no se tuvo éxito en la obtención de las enzimas activas en condiciones ácidas o básicas de elución, a pesar de la utilización de agentes protectores (glicerol), caotrópicos (KCl) y detergentes (Tween).

Martínez *et al.*, (1988) y Kim *et al.*, (1992) utilizaron con éxito la cromatografía de afinidad con Benzamidina-Sepharosa en peces y crustáceos, respectivamente, como primer paso cromatográfico en la purificación de serino-proteasas. La venzamidina es, por tanto, un ligando más apropiado que el SBTI para este tipo de cromatografía en crustáceos. Un inconveniente de la benzamidina como ligando es que al eluir (usualmente) con altas concentraciones de benzamidina en la fase móvil, ésta luego resulta difícil de remover completamente mediante los métodos convencionales de desalado, lo que determina bajos rendimientos. Ahsan y Watabe (2001) describen que es necesario el uso de una gel filtración resolutive en sistema de FPLC para eliminar la mayor parte de la benzamidina de la fracción con actividad triptica, durante la purificación de tripsinas de la anchoveta.

Por otra parte, las isoformas de tripsina presentan afinidades similares por la benzamidina, al igual que otras serino-proteasas presentes en los extractos crudos, por lo que generalmente las isoformas

eluyen juntas de la matriz. En correspondencia, la mayoría de los procedimientos de purificación de isoformas de tripsina donde se emplea la cromatografía de afinidad, también se combinan otros métodos cromatográficos para la obtención de enzimas puras, como el intercambio iónico [Martínez *et al.*, 1988 (peces); Fodor *et al.*, 2005 (crustáceos); Lam *et al.*, 2000 (insectos)]. No obstante, en un estudio se lograron separar cuatro tripsinas diferentes del insecto *Sesamia nonagrioides*, mediante un solo paso de cromatografía de afinidad con benzamidina y un gradiente por pasos de venzamidina en la fase móvil (Díaz *et al.*, 2005). Aunque existen otros ligandos para cromatografía de afinidad (sustratos, análogos de sustratos, inhibidores específicos) (Polanowski *et al.*, 2003), éstos han sido poco utilizados en la purificación de tripsinas de crustáceos.

Aunque el uso de la cromatografía de afinidad resulta muy atractiva, es interesante que en algunos casos los resultados obtenidos en cuanto a rendimiento no son superiores a los que se pueden obtener con otros métodos como la filtración en gel (Roy *et al.*, 1996), la cual es más barata y menos agresiva, pues toda la corrida cromatográfica se puede llevar a cabo en una fase móvil que garantice la estabilidad de las enzimas.

2.2.2. Filtración en gel

La cromatografía de exclusión molecular, o filtración en gel, es uno de los métodos más utilizados en la purificación de proteasas de peces y crustáceos (Kim *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 1996; Klomklao *et al.*, 2007b; Kishimura *et al.*, 2006; Klomklao *et al.*, 2009). Aunque es un método muy útil en las últimas etapas de la purificación, para remover los remanentes con características superficiales similares a la proteína de interés (Fu *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008) o como herramienta para realizar cambios de tampón, en el caso de los estudios de purificación de tripsinas de crustáceos generalmente ha sido empleada antes de emplear las técnicas adsorptivas de purificación. Debido al tamaño de las tripsinas descritas en crustáceos, la matriz Sephadex G-75 produce muy buenos resultados, permitiendo la remoción de un gran número de proteínas contaminantes.

2.2.3. Intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se encuentra dentro de los métodos más utilizados en los esquemas de purificación de tripsinas de crustáceos. Es una técnica de alto poder resolutive que es capaz de separar moléculas que difieren muy poco en la carga superficial. Sin embargo, la riqueza de isoformas de tripsina en crustáceos ocasiona que no en todos los casos se puedan separar las isoenzimas.

En algunos estudios en los langostinos *Astacus leptodactylus* (Zwilling *et al.*, 1969) y *Procambarus clarkii* (Guizani *et al.*, 1992), el cangrejo *Callinectes sapidus* (Dendinger y O' Connor, 1990) y el krill (Wu *et al.*, 2008) no se lograron separar las isoformas de tripsina con este tipo de cromatografía. En otros casos si se han podido separar las isoformas, pero sólo se ha obtenido pura alguna de ellas. Las isoformas de tripsina de *A. leptodactylus* fueron purificadas usando intercambio iónico por Fodor *et al.*, (2005), aunque solo la isoforma más abundante fue obtenida pura. Igualmente, Sjö Dahl *et al.* (2002) lograron la separación de tres fracciones con actividad triptica del krill (TL I, TL II, TL III), de las cuales solo TL III carecía de impurezas. Resultados similares fueron obtenidos para el cangrejo *Cancer pagurus* (Hehemann *et al.*, 2008), donde solo se obtiene pura una de las isoformas (C.p.TryIII) luego de un paso de intercambio aniónico. Los mayores éxitos en cuanto a la obtención de mayor cantidad de isoformas puras se han logrado con dos pasos de intercambio aniónico sucesivos, ya sea utilizando diferentes matrices, o la misma pero variando las condiciones de elución (Kim *et al.*, 1992; Hehemann *et al.*, 2007). Dos cromatografías sucesivas de intercambio iónico también han sido empleadas para la separación de isoformas en otros grupos como los insectos (Lam *et al.*, 2000, 3 isoformas) y los peces (Klomklao *et al.*, 2006, 2 isoformas).

Los estudios realizados en nuestro laboratorio con el fin de separar las isoformas de tripsina en la langosta *P. argus* mostraron que el intercambio iónico puede ser una herramienta muy útil en la separación de estas enzimas. No obstante, las condiciones cromatográficas deben ser cuidadosamente establecidas en dependencia del efecto deseado en la separación. El pH tiene un efecto importante en la resolución; a pesar que la mayor parte de los estudios que emplean este método en crustáceos utilizan pH 7-8, la resolución empleando intercambio aniónico en la separación de las tripsinas de la langosta mejora significativamente a pH 5.5 y más aún a pH 5. Contar con un estimado del punto isoeléctrico de las proteínas de interés es muy conveniente para seleccionar el pH de la fase móvil. No obstante, la estabilidad de las enzimas a estos valores tan bajos de pH es un aspecto que requiere una evaluación preliminar. En la experiencia de los autores, a veces es imprescindible trabajar a pH bajos y tolerar cierta pérdida de rendimiento debido a la precipitación isoeléctrica, a la desnaturalización irreversible, o a ambas, en vistas a lograr separar la mayor cantidad de isoformas.

Además, la separación de isoformas de tripsinas de crustáceos mediante intercambio iónico mejora en la medida que se utilicen matrices con un tamaño de partícula pequeño y homogéneo (ej. MonoQ™ 5/50, GE Healthcare Bio-Science). La

velocidad de paso del solvente (flujo bajo) es otra condición que mejora la resolución, así como la utilización de gradientes extremadamente largos y poco comunes en este tipo de cromatografía (ej. 100 volúmenes de columna). Algunas isoformas, no obstante estas condiciones, son difíciles de separar totalmente y la obtención de fracciones sin contaminación cruzada de isoformas es engorrosa. Ahsan y Watabe (2001) plantean que en ocasiones, el análisis mediante zimografía de las diferentes fracciones de un paso de purificación es imprescindible antes de pasar al siguiente paso, con vistas a evitar la contaminación cruzada. Este procedimiento ha resultado muy útil en nuestro laboratorio en la purificación de isoformas de tripsina en la langosta *P. argus*, aunque baja significativamente los rendimientos producto de la exclusión voluntaria de fracciones.

2.2.4. Cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC)

Los procedimientos de cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) actualmente se emplean en muchos trabajos de purificación de péptidos y/o proteínas, sobre todo en los estudios analíticos con proteínas. En esta cromatografía se utilizan solventes orgánicos como modificadores de la tensión superficial, y reactivos que forman pares iónicos a bajos pH. Esta característica es la principal limitante para su uso en la purificación de tripsinas, pues implica la desnaturalización de las enzimas y la subsecuente pérdida de su actividad. La renaturalización de las tripsinas luego de ser sometidas a esta cromatografía es extremadamente difícil, a pesar de que se cuenta con una importante cantidad de información sobre los procesos involucrados en la renaturalización y con varios métodos para la misma como por ejemplo la revisión de Jungbauer y Kaar (2007) o la base de datos REFOLD (<http://refold.med.monash.edu.au>). Metodologías recientes permiten incluso evaluar una gran cantidad de condiciones de renaturalización en microplacas (Dechavanne *et al.*, 2011), por lo que ésta es un área donde se requieren más estudios con las tripsinas de crustáceos, aplicables a la renaturalización tanto de tripsinas purificadas por RP-HPLC, como de tripsinas de crustáceos obtenidas por vía recombinante.

3. Conclusiones y perspectivas

Amén de las diferencias especie-específicas, la cantidad de isoformas de tripsina purificadas de diferentes crustáceos depende en gran medida de la estrategia de purificación empleada, como resultado de las dificultades en separar proteínas tan similares de extractos crudos complejos. La cromatografía de afinidad o la filtración en gel como

pasos iniciales de purificación, y el intercambio iónico como paso(s) final(es) han sido los procedimientos más exitosos para separar isoformas de tripsina de crustáceos. En algunos crustáceos, otros esquemas de purificación han conducido a la obtención de pocas isoformas o enzimas parcialmente purificadas. Aunque se puede avanzar ligeramente en la obtención de mayores resoluciones y rendimientos en la separación cromatográfica, las mayores perspectivas en la obtención de isoformas de tripsina de crustáceos están en la posibilidad de expresarlas de manera recombinante. En este sentido, poco se ha hecho en la búsqueda de vectores de expresión apropiados y métodos de renaturalización. Una vez establecidas estas condiciones, se aumentarían significativamente las posibilidades de estudiar y comprender el polimorfismo de estas enzimas, el papel fisiológico de las múltiples tripsinas en crustáceos y su valor adaptativo.

REFERENCIAS

- Ahsan, M.M., Watabe, S (2001) Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*. *J. Protein. Chem.* **20**(1): 49-58.
- Amin, E., Saboury, A.A., Mansouri-Torshizi, H., Zolghadri, S., Bordbar, A.K. (2010) Evaluation of p-phenylene-bis and phenyl dithiocarbamate sodium salts as inhibitors of mushroom tyrosinase. *Acta Biochem. Pol.* **57**(3): 277-283.
- Barret, A., Rawlings, N., Woessner, J. (1998) *Handbook of proteolytic enzymes* (2nd Ed.) Academic Press, San Diego. 1666 pp.
- Brockeroff, H., Hoyle, R.J., Hwang, P.C. (1970) Digestive enzymes of the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Bd. Canada.* **27**, 1357-1370.
- Carrillo, O., Forrellat-Barrios, A., Guerrero-Galván, S., Vega-Villasante, F. (2007) A review of digestive enzyme activity in penaeid shrimps. *Crustaceana* **80**, 257-275.
- Cereghino, G.P., Cereghino, J.L., Ilgen, C., Cregg, J.M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Op. Biotech.* **13**, 329-332.
- Dechavanne, V., Barrillat, N., Borlat, F., Hermant, A., Magnenat, L., Paquet, M., Antonsson, B., Chevalet, L. (2011) A high-throughput protein refolding screen in 96-well format combined with design of experiments to optimize the refolding conditions. *Protein Expression and Purification* **75**, 192-203.
- Dendinger, J.E., O'Connor, K.L. (1990) Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the midgut gland of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **95B** (3), 525-530.
- Díaz, M., Ortego, F., García de Lacoba, M., Magaña, C., de la Poza, M., Farinós, G.P., Castañera, P., Hernández-Crespo, P. (2005) Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 1005-1020.
- Escamilla-Treviño, Y., Viader-Salvadó, J.M., Van-Wormhoudt, A., Sepúlveda-Saavedra, J., Leal-González, R.M., Guerrero-Olazarán, M.G. (1999) Expression studies of shrimp trypsin and trypsinogen in *Pichia pastoris*. *Current Topics in Gene Expression Systems-Meeting. Invitrogen Corporation and Reasearch Corporation Technologies*, San Diego, California (U.S.A.).
- Figarella, C., Negri, G.A., Guy, O. (1975) The two human trypsinogens. Inhibition spectra of the two human trypsins derived from their purified zymogens. *Eur. J. Biochem.* **53**, 457-463.
- Fodor, K., Harmat, V., Hetényi, C., Kardos, J., Antal, J., Perczel, A., Patthy, A., Katona, G., Gráf, L. (2005) Extended intermolecular interactions in a serine protease-canonical inhibitor complex account for strong and highly specific inhibition. *J Mol. Biol.* **350**, 156-169.
- Fu, X., Xue, C., Miao, B., Li, Z., Yang, W., Wang, B. (2005) Study of a highly alkaline protease extracted from digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Food Research International* **38**, 323-329.
- Galgani, F., Nagayama, F. (1987) Digestive proteinases in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **87B**, 889-893.
- Gevaert, K., Vandekerckhove, J. (2000) Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* **21**, 1145-1154.
- Guerrero-Olazarán, M.G., Escamilla-Treviño, Y., Van-Wormhoudt, A., Sepúlveda-Saavedra, J., Viader-Salvadó, J.M. (2001) Efecto de la expresión en *Pichia pastoris* de una serinoproteasa sobre enzimas peroxisomales. *Ciencia UANL* **4**(4): 448-453.
- Guizani, N., Marshall, M.R., Wei, C.I. (1992) Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the hepatopancreas of crayfish (*Procambarus clarkii*). *Comp. Biochem. Physiol.* **103B** (4), 809-815.
- Hedstrom, L. (1996) Trypsin: A case study in the structural determinants of enzyme specificity. *Biol. Chem.* **377**, 465-470.
- Hehemann, J.H., Redecke, L., Murugaiyan, J., von Bergen, M., Betzel, C., Saborowski, R. (2008) Autoproteolytic stability of a trypsin

- from the marine crab *Cancer pagurus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**, 566-571.
- Hehemann, J.H., Redecke, L., Perbandt, M., Saborowski, R., Betzel, C. (2007) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of trypsin-like proteinases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus*. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **1**, 242-245
- Huber, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer, J., Steigemann, W. (1974) Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **89**, 73-101.
- Jungbauer, A., Kaar, W. (2007) Current status of technical protein refolding. *J. Biotech.* **128**, 587-596.
- Kim, H.R., Meyers, S.P., Godber, J.S. (1992) Purification and characterization of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish. *Procamburus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B** (2): 391-398.
- King, L.A., Possee, R.D. (1992) *The baculovirus expression system: a laboratory guide*. (Chapman y Hall eds.), Springer, 229 pp.
- Kirpichnikov, V.S., Muske, G.A. (1980) The adaptive value of biochemical polymorphism in animal and plant populations. *Genética* **52/53**, 183-193.
- Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D., Van Wormhoudt, A. (1996) Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 551-563.
- Klein, B., Sellos, D., Van-Wormhoudt, A. (1998) Genomic organization and polymorphism of a Crustacean trypsin multi-gene family. *Gene*, **216**, 123-129.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B.K. (2007) Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Comp. Biochem. Physiol.* **148B**, 382-389.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B.K., Saeki, H. (2006) Trypsin from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* **144B**, 47-56.
- Klomklao, S., Kishimura, H., Nonami, Y., Benjakul, S. (2009) Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry* **115**, 155-162.
- Kossiakoff, A.A., Chambers, J.L., Kay, L.M., Stroud, R.M. (1977) Structure of bovine trypsinogen at 1.9 Å resolutions. *Biochemistry* **16**, 654-664.
- Lam, W., Coast, G.M., Rayne, R.C. (2000) Characterisation of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 85-94.
- LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Weihofen, A., Schlossmacher, M.G., Selkoe, D.J. (2005) Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat. Med.* **11**(11): 1214-21.
- Lu, B., Zhou, L., Cai, Q., Hara, K., Maeda, A., Su, W., Cao, M. (2008) Purification and characterization of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food chemistry* **110**, 352-360.
- Martínez, A., Olsen, R.L., Serra, J.L. (1988) Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicolus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **91B** (4): 677-684.
- Muhlia-Almazán, A., Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F.L. (2008) Invertebrate trypsins: a review. *J. Comp. Physiol.* **178B**, 655-672.
- Northrup, J.H., Kunitz, M. (1931) Isolation of protein crystals possessing tryptic activity. *Science* **73**, 262-263.
- Northrup, J.H., Kunitz, M., Herriott, R.M. (1948) *Crystalline enzymes*. Columbia University Press, New York.
- Ohlsson, K., Tegner, H. (1973) Anionic and cationic dog trypsin: Isolation and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **317**(2): 328-337.
- Patthy, L. (1999) Genome evolution and the evolution of exon shuffling: a review. *Gene* **238**, 103-114.
- Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Perera, E., Pardo-Ruiz, Z., Alonso-Jiménez, E. (2007) Phenoloxidase activity in the hemolymph of the spiny lobster *Panulirus argus*. *Fish Shell Immunol.* **23**, 1187-1195.
- Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Perera, E., Pardo-Ruiz, Z., Alonso-Jiménez, E. (2008) Hemocyanin-derived phenoloxidase activity in the hemolymph of the spiny lobster *Panulirus argus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 652-658.
- Perera, E., Moyano, F.J., Díaz, M., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Alonso-Jiménez, E., Carrillo, O., Galich, G. (2008) Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **150B**, 247-254.
- Perera, E., Moyano, F.J., Rodríguez-Viera, L., Cervantes, A., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M. (2010) *In vitro* digestion of protein sources by crude enzyme extracts of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) hepatopancreas with different trypsin isoenzyme patterns. *Aquaculture* **310**, 178-185.
- Perera, E., Pons, T., Hernández, D., Moyano, F.J., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M. (2010) New members of the brachyurins

- family in lobster include a trypsin-like enzyme with amino acid substitutions in the substrate-binding pocket. *FEBS J.* **277**, 3489-3501.
- Perona, J.J., Craik, C.S. (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* **4**, 337-360.
- Perona, J.J., Tsu, C.A., Craik, C.S., Fletterick, R.J. (1997) Crystal structure of an ecotin-collagenase complex suggests a model for recognition and cleavage of the collagen triple helix. *Biochemistry* **36**, 5381-5392.
- Polanowski, A., Wilimowska-Pelc, A., Kowalska, J., Grybel, J., Zelazko, M., Wilusz, T. (2003) Non-conventional affinity chromatography of serine proteinases and their inhibitors. *Acta Biochem. Pol.* **50**(3): 765-773
- Puigserver, A., Desnuelle, P. (1971) Identification of an anionic trypsinogen in bovine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* **236**(2): 499-502.
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A., Sanjust, E. (2002) Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **17**(4), 207-18.
- Roy, P., Colas, B., Durand, P. (1996) Purification, kinetical and molecular characterization of a collagenolytic protease from greenshore crab (*Carcinus maenas*) digestive gland. *Comp. Biochem. Physiol.* **115B** (1): 97-95.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Male, R. (2000) Trypsin isozymes: Development, digestion and structure. En: *Seafood Enzymes, utilization and influence on post-harvest seafood quality*. (NF Haard, BK Simpson eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, 215-269 pp.
- Sainz, J.C., Córdova-Murueta, J.H. (2009) Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* **290**, 190-195.
- Sainz, J.C., García-Carreño, F.L., Córdova-Murueta, J.H., Cruz-Hernández, P. (2005) *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isotrypsins, genotype and modulation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **326**, 105-113.
- Sainz, J.C., García-Carreño, F.L., Hernández-Cortés, P. (2004) *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* **138B**, 155-162.
- Schwarzenberger, A., Zitt, A., Kroth, P., Mueller, S., Von Elert, E. (2010) Gene expression and activity of digestive proteases in *Daphnia*: effects of cyanobacterial protease inhibitors. *BMC Physiology* **10**, 6.
- Scopes, R.K. (1994) Protein purification, principles and practice. 3rd ed., Springer Advanced Text in Chemistry, New York, USA, 439 pp.
- Sjödahl, J., Emmer, A., Vincent, J, Roeraadea, J. (2002) Characterization of proteinases from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Protein Expres. Purif.* **26**, 153-161.
- Sorensen, P.H., Mortensen, K.K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnology* **115**, 113-128.
- Sweet, R.M., Wright, H.T., Janin, J., Chothia, C.H., Blow, D.M. (1974) Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* **13**, 4212-4228.
- Tsai, I., Liu, K.C., Chuang, J. (1991) The midgut chymotrypsins of shrimps (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*). *Biochim. Biophys. Acta* **1080**, 59-67.
- Tsu, C.A., Craik, C.S. (1998) Brachyurins. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. (AJ Barrett, ND Rawlings, JF Woessner, eds.) Academic Press, San Diego, CA, USA, 25-30 pp.
- Tsu, C.A., Perona, J.J., Fletterick, R.J., Craik, C.S. (1997) Structural basis for the broad substrate specificity of fiddler crab collagenolytic serine protease. *Biochemistry* **36**, 5393-5401.
- Voytek, P., Gjessing, E.C. (1971) Studies of an anionic trypsinogen and its active enzyme from porcine pancreas. *J Biol. Chem.* **246**(2): 508-516.
- Walsh, K.A., Kauffman, D.L., Sampath-Kumar, K.S.V., Neurath, H. (1964) On the structure and function of bovine trypsinogen and trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 301-308.
- Walsh, K.A., Wilcox, P.E. (1970) Serine proteinases. *Meth. Enzymol.* **19**, 31-41.
- Whitehead, R.E., Ferrer, J.V., Javitch, J.A, Justice, J.B. (2001) Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter. *J. Neurochem.* **76**, 1242-1251.
- Wu, Z., Jiang, G., Xiang, P., Xu, H. (2008) Anionic trypsin from North Pacific krill (*Euphausia pacifica*): purification and characterization. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **14**, 113-120.
- Yoshida, K., Shinmyo, A. (2000) Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **90**, 353-362.
- Zwiling, R.G., Pfeleiderer, H., Sonneborn, H., Kraft, V., Stucky, I. (1969) The evolution of endopeptidases: Common and different traits of bovine and crayfish trypsin. *Comp. Biochem. Physiol.* **28**, 1275-1287.