



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
PROTEASAS DEL PEPINO DE MAR.**

TESIS PRESENTADA POR:

I.B.I. ARISAÍ DEL CARMEN HERNÁNDEZ SÁMANO.

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA .

DIRECTORA DE TESIS.

DRA. ISABEL GUERRERO LEGARRETA.

ASESORAS.

DRA. XOCHITL GUZMÁN GARCÍA.

DRA. RAQUEL GARCÍA BARRIENTOS.

MÉXICO D.F.

ENERO 2010.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón de Posgrados de Excelencia (PNP) del CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el convenio “471-0/ Maestría en Biotecnología”.

La presente tesis se llevó a cabo con el apoyo de una beca de grado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.

Dedico este trabajo a todos aquellos que me han apoyado en algún instante de mi vida y al mundo científico, esperando que este estudio sea de ayuda en investigaciones futuras.

Agradezco especialmente a mi esposo Andrés que amo con todo mí ser por su amor incondicional, a mis padres Honoria y Nicolás, y a mi hermano Nico, que me han dado su cariño y apoyo en todo momento.

También agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana y a las Dras. Isabel Guerrero, Raquel García y Xochitl Guzmán por asesorar mi tesis y por su apoyo, así como al Dr. Carlos Regalado y a la Dra. Araceli Tomasini por la revisión de mi tesis y sus comentarios. Y a la Dra. Belinda Vallejo del CIAD por proporcionarme los organismos para este estudio.

Finalmente, y no por ende menos importante, a mi amigo Hugo León por su hermosa amistad, a mis compañeros del laboratorio de macromoléculas, en especial a Yeny, Violeta e Isadora que han aguantado todas mis dudas, a Pamela del laboratorio de ecotoxicología y especialmente a Saúl por su apoyo en la edición de fotografías.

Arisaí Hernández Sámano.

RESUMEN

Los holoturoideos, conocidos como pepinos de mar, pertenecen al *Phylum* de los equinodermos. Estos organismos marinos poseen un gran número de principios activos tales como carbohidratos, lípidos, neurotoxinas y enzimas.

El conocimiento de las enzimas digestivas del pepino de mar podría aclarar su bioquímica nutricional y su fisiología. En la producción de estos organismos, determinar sus capacidades digestivas permitiría la selección eficiente de ingredientes para la formulación de dietas, establecer los plazos máximos de almacenamiento. Además, la actividad de las proteasas extraídas de organismos marinos es considerablemente alta, además que estos compuestos poseen características particulares que pueden ser aprovechadas eficientemente en varias industrias. Por otra parte, este organismo es explotado ilegalmente en México y los beneficios económicos no permanecen en el país, por lo cual es importante contribuir con las investigaciones básicas de este recurso.

El objetivo de esta tesis fue identificar y caracterizar las proteasas presentes en algunos órganos de los pepinos de mar *Isostichopus fuscus* y *Holothuria impatiens* y correlacionarlos con su histología.

Se utilizaron ejemplares de pepino de mar procedentes del mar de Cortés, en las costas de Sonora, recolectados por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Éstos fueron medidos y posteriormente cortados a lo largo del eje antero-posterior, considerando para el análisis los podios que recubren la región oral o tentáculos, el tracto digestivo, árbol respiratorio y diferentes regiones de piel.

En la caracterización histológica, las muestras de las partes anatómicas u órganos seleccionados fueron fijadas en alcohol al 70%, posteriormente se deshidrataron e incluyeron en parafina; se realizaron cortes de 7 a 12 μm de grosor, mismos que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y finalmente se observaron en un microscopio óptico.

En cuanto a la caracterización enzimática, se determinó la actividad proteolítica endógena. Se clasificaron las proteasas de acuerdo al pH de actividad en ácidas y básicas por los métodos de Anson y Kunitz, respectivamente. Se obtuvieron los extractos enzimáticos de cada parte anatómica u órgano con una relación de 1:2 (tejido: amortiguador de fosfatos) 20 mM pH 7, bajo condiciones no desnaturizantes. Los sustratos, hemoglobina (pH 2-5) y caseína (pH 6-10), se manipularon por separado al 1 % y a 4 °C. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 10 minutos a 37 °C deteniéndola con ácido tricloroacético al 50 %; finalmente, se obtuvieron lecturas espectrofotométricas a 280 nm. Posteriormente se determinó la concentración de proteína por el método de biuret.

Se estimaron los pesos moleculares de las proteasas de los extractos enzimáticos obtenidos por medio de electroforesis desnaturizante y no desnaturizante de acuerdo al método de Laemmli (1970). Se utilizó un gel de separación de acrilamida al 12 % y un gel de concentración de acrilamida al 4%.

Los resultados mostraron que los órganos y partes anatómicas de *I. fuscus* y *H. impatiens* tienen gran cantidad de tejido conjuntivo y agregados de células con actividad digestiva, además de un tipo de inclusiones que sugieren la acción de defensa de hemocitos contra agentes externos al organismo. También, demostraron que pueden existir dentro de estos organismos parásitos y residuos de algas usadas como alimento. En particular, los tejidos que presentaron una evidente cantidad de células con actividad digestiva, en el estudio histológico, fueron los podios o tentáculos, túbulos internos, tubo respiratorio y la piel dorsal.

El estudio enzimológico complementó los resultados histológicos, mostrando que en general, los órganos de los pepinos de mar tuvieron menor actividad enzimática a pH ácido comparada con la actividad a pH básico.

Al analizar los resultados de actividad de los diferentes órganos dentro de cada especie, se encontró que la actividad proteolítica en los podios fue mayor, siendo estadísticamente significativa a pH de 6 a 10 (hasta 81 ± 3 UAP/mg para *H. impatiens*), sugiriendo la presencia de serín proteasas y a pH 2 (hasta 27 ± 14 UAP/mg para *H. impatiens*) la presencia de proteasas aspárticas. Así mismo, se observó que los extractos de piel externa (pH 2-4 y 10)

(hasta 68 ± 36 UAP/mg) y ventral (pH 10) (61 ± 35 UAP/mg) de *I. fuscus*, así como los extractos de piel ventral de *H. impatiens* (pH 4 y 7), tienen actividades significativamente mayores que otros órganos, posiblemente por el contacto que la piel tiene con el medio ambiente. Además, sugiere que las diferencias metabólicas entre el tipo de familia (*Stichopodidae* o *Holothuriidae*) de los pepinos de mar influye en la actividad proteolítica.

Se encontraron proteínas de alto peso molecular, entre 30 a 120 kDa, en la mayoría de los órganos estudiados de las dos especies. En general, en la mayoría de los órganos del pepino de mar *I. fuscus* tuvieron proteínas de peso molecular estimado de 39 kDa, mientras que en *H. impatiens* las proteínas fueron de 45 a 66 kDa. En los tentáculos se identificaron proteínas de aproximadamente 39, 45, 66 y 103 kDa, determinándose para *I. fuscus* una alta concentración de proteína mayor a 5.5 mg/mL. En el extracto enzimático de los podios de *H. impatiens* se encontraron proteínas de peso molecular mayor a las de *I. fuscus*, su peso estimado fue de 84.64 y 56.87 kDa.

Por lo tanto, relacionando los resultados del estudio histológico y enzimológico con respecto a la presencia de ciertas inclusiones con actividad digestiva, se sugiere que estos posibles hemocitos al llevar a cabo los métodos de defensa que los caracterizan tienen acción de proteólisis ácida ó básica contra agentes extraños, de ahí la presencia de actividad digestiva en todas las partes anatómicas u órganos del pepino de mar. Además de que se sugiere un mecanismo de digestión alterna para estos organismos.

De tal forma, el conocimiento de las enzimas digestivas podría aclarar la bioquímica nutricional y la fisiología de los pepinos de mar, ayudando a determinar sus capacidades digestivas. Por lo que demostrar las características *sui generis* de las proteasas presentes en estas especies y su relación con determinados tejidos contribuirá al conocimiento básico de la actividad y función de estas enzimas, esperando sentar las bases para posteriores estudios estructurales y posibles aplicaciones bioquímicas.

ABSTRACT

Holothurians, commonly known as sea cucumbers, belong to the *Phylum* echinoderms. These marine organisms contain a wide variety of active ingredients, such as carbohydrates, lipids, neurotoxins and enzymes.

The knowledge of digestive enzymes in the sea cucumber could clarify its nutritional biochemistry and physiology. Determining the digestive capabilities of these animals would allow efficient selection of ingredients for diet formulation aimed for production. Moreover, the activity of extracted proteases from marine organisms is very high and have particular characteristics that can be efficiently exploited. In addition, sea cucumbers are illegally exploited in Mexico, the profit is generally for other countries. Therefore it is important to contribute to basic research of this resource.

The objective of this study was to identify and characterize the proteases present in several organs of the sea cucumbers *Holothuria impatiens* and *Isostichopus fuscus* and to relate these active compounds to their histology.

Specimens of sea cucumber (*H. impatiens* and *I. fuscus*) from the Sea of Cortés, off the coast of Sonora, collected by the Research Center for Food and Development (CIAD) were studied. They were measured, weighted and cut along the anteroposterior axis. The following regions were considered for analysis: podia or tentacles (covering the oral region), digestive tract, respiratory tract and different skin regions.

For histology studies, samples of selected anatomical parts or organs were fixed with 70 % alcohol, dehydrated and embedded in paraffin; 7 to 12 μm thick sections were stained with hematoxylin-eosin, and observed under a light microscope.

For enzyme characterization, we determined the endogenous proteolytic activity. Proteases were classified according to the pH of acidic and basic activity by the methods of Anson and Kunitz, respectively. Enzymatic extracts were obtained from each anatomical part

or organ with a ratio of 1:2 (tissue: phosphate buffer) 20 mM pH 7, under non-denaturing conditions. The substrates, hemoglobin (pH 2-5) and casein (pH 6-10), were handled separately to 1 % and 4 °C. The enzymatic reaction was carried out for 10 minutes at 37 °C by stopping with 50 % trichloroacetic acid, and finally, spectrophotometric readings were obtained at 280 nm. It was later determined the protein concentration by the biuret method.

We estimated the molecular weights of the protease enzymatic extracts obtained by denaturing and nondenaturing electrophoresis according to the method of Laemmli (1970). We used a separation gel 12 % acrylamide gel and acrylamide concentration of 4 %.

The results showed that the organs and anatomical parts of *I. fuscus* and *H. impatiens* have large amounts of tissue and cell aggregates with digestive activity, and a type of inclusions that suggest defense action of hemocytes against outside the body. Also, that may exist within these parasitic organisms and residual algae used as food. In particular, tissues that have an obvious number of cells with digestive activity in the histological study, it was the podiums or tentacles, internal tubules, breathing tube and the dorsal skin.

The results obtained in enzymology studies complemented the histological study. They showed that, in general, the bodies of sea cucumbers with lower activity at acidic pH compared with the activity at basic pH.

In analyzing the results of activity of different organs within species, we found that proteolytic activity was higher in the podiums were statistically significant at pH 6 to 10 (up to 81 ± 3 UAP/mg for *H. impatiens*), suggesting the presence of serine proteases and pH 2 (up to 27 ± 14 UAP/mg for *H. impatiens*) the presence of aspartic proteases. Also, it was observed that outer skin extracts (pH 2-4 and 10) (up to 68 ± 36 UAP/mg) and the ventral skin (pH 10) (61 ± 35 UAP/mg) of *I. fuscus*, and ventral skin extracts of *H. impatiens* (pH 4 and 7) have significantly higher activity than other organs, possibly by contact with the skin is the environment. It also suggests that the metabolic differences between type of family (*Holothuriidae* or *Stichopodidae*) of sea cucumbers influences the proteolytic activity.

We found high molecular weight proteins, between 30 and 120 kDa, in most organs of the two species studied. In general, most of the organs of sea cucumber *I. fuscus* had estimated molecular weight proteins of 39 kDa, whereas in *H. Impatiens* proteins were between 45 and 66 kDa. The tentacles were identified in proteins of approximately 39, 45, 66 and 103 kDa, determined for *I. fuscus* a high concentration of protein higher than 5.5 mg/mL. In *H. impatiens* were identified in proteins of approximately 84.64 y 56.87 kDa.

Therefore, relating the results of histology and Enzymology about the presence of certain inclusions with digestive activity, it is suggested that these hemocytes in conducting defense methods have proteolysis action acidic or basic, hence the presence of digestive activity in all anatomical parts or organs of sea cucumber. In addition to suggesting a alternate mechanism of digestion for these organisms.

Thus, knowledge of digestive enzymes could clarify the nutritional biochemistry and physiology of sea cucumbers, helping to determine their digestive capacity. As evidence of the sui generis characteristics of proteases present in these species and their relation to certain tissues contribute to basic knowledge of the activity and function of these enzymes, hoping to lay the groundwork for future structural studies and potential biochemical applications.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	19
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	23
2.1 Características generales del pepino de mar.	23
2.1.1 Taxonomía.	23
2.1.2 Anatomía.	23
2.1.3 Alimentación.	25
2.1.4 Reproducción.	25
2.1.5 Hábitat.	26
2.1.6 Depredadores.	27
2.1.7 Mecanismos de defensa.	28
2.1.8 Propiedades y Composición.	29
2.1.9 Principios activos.	30
2.1.10 Importancia para el ambiente.	31
2.1.11 Importancia económica.	32
2.1.12 Medidas de protección del pepino de mar en México.	35
2.2 Enzimas.	37
2.2.1 Definición de enzima.	37
2.2.2 Acción de las enzimas.	37
2.2.3 Clasificación de las enzimas.	38
2.2.4 Enzimas de organismos marinos.	38
2.2.5 Enzimas del pepino de mar.	39
2.3 Proteasas.	41
2.3.1 Definición.	41
2.3.2 Clasificación de las proteasas.	41
2.3.3 Proteasas de organismos marinos.	42
2.3.3.1 Características generales de proteasas de organismos marinos.	43
2.3.3.2 Uso industrial de las proteasas marinas.	44

2.3.3.2.1 Aplicaciones en la industria de alimentos.	44
2.3.3.2.2 Aplicaciones biomédicas.	45
2.4 Histología.	46
2.4.1 Definición.	46
2.4.2 Métodos histológicos.	46
2.4.3 Preparación de tejidos para microscopia óptica.	47
2.4.3.1 Fijación.	47
2.4.3.2 Inclusión y corte.	48
2.4.3.3 Coloración.	49
2.5 Electroforesis.	49
2.5.1 Electroforesis Desnaturalizante SDS-PAGE 1D.	51
2.5.2 Tinción en electroforesis.	51
2.5.3 Conservación de geles de electroforesis.	52
2.5.4 Estimación de peso molecular.	53
2.6 Determinación de concentración de proteína.	53
2.7 Zimografía.	54
3. ANTECEDENTES.	55
3.1 Estudios histológicos del pepino de mar.	55
3.2 Caracterización de proteasas del pepino de mar.	62
4. JUSTIFICACIÓN.	64
5. HIPÓTESIS.	65
6. OBJETIVOS.	65
6.1 Objetivo General.	65
6.2 Objetivos Específicos.	65
7. MATERIALES Y MÉTODOS.	66
7.1 Obtención de materia prima.	66
7.2 Obtención de tejidos del pepino de mar.	67
7.3 Histología.	69
7.3.1 Fijación de tejidos.	69
7.3.2 Preparación y etiquetado de muestras.	69
7.3.3 Inclusión: secuencia de deshidratación, aclaración, infiltración y colado de bloques.	69

7.3.4 Cortes histológicos en micrótopo.	71
7.3.5 Desparafinación de cortes y tinción Hematoxilina-Eosina.	73
7.3.6 Observación en microscopio óptico y selección de fotografías.	74
7.4 Enzimología.	74
7.4.1 Obtención del extracto enzimático.	74
7.4.2 Preparación de sustratos.	74
7.4.2.1 Preparación de hemoglobina al 1 %.	74
7.4.2.2 Preparación de caseína al 1 %.	75
7.4.3 Determinación de concentración de proteína.	75
7.4.4 Determinación de actividad proteolítica y actividad específica.	75
7.4.5 Análisis del peso molecular de las enzimas extraídas del pepino de mar.	77
7.4.5.1 Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 1D.	77
7.4.5.2 Electroforesis no desnaturalizante PAGE 1D.	79
7.4.6 Detección de actividad proteolítica.	79
7.4.7 Detección de proteasas traza.	79
7.4.8 Diseño experimental y análisis estadístico.	81
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	82
8.1 Histología.	82
8.1.1 Piel de pepino de mar.	82
8.1.2 Tentáculos ó podios de la cavidad oral.	82
8.1.3 Tracto digestivo del pepino de mar.	88
8.1.4 Estructuras internas del pepino de mar.	91
8.1.5 Árbol respiratorio del pepino de mar.	91
8.2 Enzimología.	96
8.2.1 Determinación de la concentración de proteína.	96
8.2.2 Determinación de actividad proteolítica y actividad específica.	98
8.2.3 Análisis del peso molecular de las enzimas extraídas del pepino de mar.	104
8.2.4 Detección de actividad proteolítica.	108
8.2.5 Detección de enzimas traza.	108
9. CONCLUSIONES.	109
10. CONCLUSIÓN GLOBAL.	111
11. RECOMENDACIONES PARA LA CONTINUACIÓN DEL PRESENTE	113

ESTUDIO.	
11.1 Histología.	113
11.2 Enzimología.	114
12. BIBLIOGRAFÍA.	115
13. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.	126

ÍNDICE DE FIGURAS.

<i>Figura 1.</i> Pepino de mar <i>Isostichopus fuscus</i> .	21
<i>Figura 2.</i> (Calva, 2002) Morfología externa de <i>Holothuria riojai</i> en la que se aprecian los múltiples podios.	24
<i>Figura 3.</i> (Emson, 1987) Vista dorsal de los órganos internos de <i>Holothuria parvula</i> .	24
<i>Figura 4.</i> Larva auricularia del pepino de mar.	26
<i>Figura 5.</i> Pepino de mar joven <i>I. fuscus</i> .	26
<i>Figura 6.</i> Localización de parásitos en el cuerpo del pepino de mar.	28
<i>Figura 7.</i> Número de especies (por taxón) que infestan al pepino de mar.	28
<i>Figura 8.</i> Reactivo de biuret.	53
<i>Figura 9.</i> Complejo de coordinación.	53
<i>Figura 10.</i> Organización de los tejidos del cuerpo de <i>Holothuria glaberrima</i> .	56
<i>Figura 11.</i> Etapas microscópicas del desarrollo de las gónadas femenina y masculina, respectivamente, de <i>Actinopyga mauritiana</i> .	57
<i>Figura 12.</i> Tinción H-E en larva de un pepino de mar con el síndrome “rotting edges” (<i>podrimiento de bordes</i>).	58
<i>Figura 13.</i> Esporas de hongos en el tejido muscular (flecha) de un pepino de mar.	59
<i>Figura 14.</i> Secciones histológicas del árbol respiratorio de un pepino de mar con protozoos.	59
<i>Figura 15.</i> Secciones histológicas de piel de un pepino de mar infestada con platelmintos.	60
<i>Figura 16.</i> Histología de túbulos de Cuvier de <i>Holothuria forskali</i> .	61
<i>Figura 17.</i> Pepino café, <i>Isostichopus fuscus</i> y Pepino cuello de botella, <i>Holothuria impatiens</i> .	64
<i>Figura 18.</i> Mapa de las islas Tiburón y Dátil, frente a las costas de Sonora.	66
<i>Figura 19.</i> Corte en el eje anteroposterior y extracción de órganos.	67
<i>Figura 20.</i> Podios de la cavidad oral o tentáculos de <i>I. fuscus</i> .	67
<i>Figura 21.</i> Árbol respiratorio (AR), tracto digestivo (TD), estructuras internas (EI)	68
<i>Figura 22.</i> Diferentes regiones de la piel de <i>I. fuscus</i> .	68
<i>Figura 23.</i> Mandíbulas de <i>I. fuscus</i> y <i>H. impatiens</i> .	68
<i>Figura 24.</i> Cassettes para histología.	69
<i>Figura 25.</i> Procesador automático de tejidos LEICA.	70
<i>Figura 26.</i> Incluidor LEICA.	71
<i>Figura 27.</i> Solidificador LEICA.	71
<i>Figura 28.</i> Micrótopo rotatorio MICROM.	72
<i>Figura 29.</i> Secciones histológicas de la piel de <i>Isostichopus fuscus</i> .	83

<i>Figura 30.</i> Secciones histológicas de la piel anterior dorsal de <i>Holothuria impatiens</i> .	84
<i>Figura 31.</i> Secciones histológicas de la piel interna y externa de <i>Holothuria impatiens</i> .	85
<i>Figura 32.</i> Secciones histológicas de la piel ventral de <i>Holothuria impatiens</i> .	86
<i>Figura 33.</i> Secciones histológicas de los tentáculos de <i>Isostichopus fuscus</i> y <i>Holothuria impatiens</i> .	87
<i>Figura 34.</i> Secciones histológicas del tracto digestivo de <i>Isostichopus fuscus</i> .	89
<i>Figura 35.</i> Secciones histológicas del tracto digestivo de <i>Holothuria impatiens</i> .	90
<i>Figura 36.</i> Secciones histológicas de estructuras internas de <i>Isostichopus fuscus</i> .	92
<i>Figura 37.</i> Secciones histológicas del árbol respiratorio de <i>Isostichopus fuscus</i> .	93
<i>Figura 38.</i> Concentración de proteína (mg/mL) de las partes anatómicas u órganos estudiados.	97
<i>Figura 39.</i> Efecto del pH sobre la actividad específica de extractos enzimáticos de las partes anatómicas u órganos estudiados de <i>I. fuscus</i> .	102
<i>Figura 40.</i> Efecto del pH sobre la actividad específica de extractos enzimáticos de las partes anatómicas u órganos estudiados de <i>H. impatiens</i>	103
<i>Figura 41.</i> Perfil electroforético del Marcador Sigma VII-L (14-66 kDa).	105
<i>Figura 42.</i> Electroforesis desnaturizante y no desnaturizante de muestras extraídas de los podios de <i>I. fuscus</i> .	105
<i>Figura 43.</i> Electroforesis desnaturizante y no desnaturizante de muestras extraídas del tracto digestivo de <i>I. fuscus</i> .	106
<i>Figura 44.</i> Electroforesis no desnaturizante de muestras extraídas de la piel externa e interna de <i>I. fuscus</i> .	106
<i>Figura 45.</i> Electroforesis desnaturizante de muestras extraídas de las diferentes regiones de la piel de <i>I. fuscus</i> .	106
<i>Figura 46.</i> Electroforesis no desnaturizante de muestras extraídas de diferentes partes anatómicas u órganos de <i>I. fuscus</i> y <i>H. impatiens</i> .	107

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Especies de pepino de mar bajo explotación comercial en México, Centro y Sur América.	34
Tabla 2. Medidas de gestión para la pesquería de pepino de mar en América Latina y el Caribe.	36
Tabla 3. Clasificación internacional de las enzimas.	38
Tabla 4. Comparación algunas propiedades cinéticas, termodinámicas y físicas de proteasas digestivas de animales terrestres y marinos.	43
Tabla 5. Inclusión en parafina: Secuencia de Deshidratación, Aclaración e Infiltración.	70
Tabla 6. Secuencia y tiempos para la desparafinación y tinción con Hematoxilina-Eosina.	73
Tabla 7. Composición de los geles de separación y concentración para electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).	78
Tabla 8. Concentración de proteína (mg/mL) de partes anatómicas u órganos de <i>I. fuscus</i> y <i>H. impatiens</i> .	98
Tabla 9. Actividad específica (UAP/mg) a pH 2-10 de las proteasas de <i>I. fuscus</i> .	102
Tabla 10. Actividad específica (UAP/mg) a pH 2-10 de las proteasas de <i>H. impatiens</i> .	103
Tabla 11. Proteínas del marcador Sigma VII-L (14-66 kDa) y detalles del perfil electroforético.	105
Tabla 12. Muestras de extractos enzimáticos de <i>I. fuscus</i> y <i>H. impatiens</i> inyectadas en los geles de electroforesis y los valores estimados de pesos moleculares.	107

ÍNDICE DE ANEXOS.

ANEXO 1. Composición de dietas para pepino de mar y contenido de proteína.	127
ANEXO 2. Comparación de los elementos principales en pepinos de mar.	127
ANEXO 3. Comparación de los niveles de aminoácidos en pepinos de mar.	127
ANEXO 4. Cantidad de elementos inorgánicos en pepinos de mar (ppm).	128
ANEXO 5. Peces de la familia Carapidae asociados a holoturoideos.	128
ANEXO 6. Exportaciones de pepino de mar de los principales exportadores en US\$'000 (1991-2001).	129
ANEXO 7. Importaciones de pepino de mar de los principales importadores en US\$'000 (1991-2001).	130
ANEXO 8. Importaciones de pepino de mar, fresco/congelado/deshidratado/salmuera (1995-2001).	130
ANEXO 9. Precios medios de importación (US\$/kg) de pepino de mar en Hong Kong (2001-2003).	131
ANEXO 10. Tendencia de precios de pepino de mar deshidratado (2000-2005).	131
ANEXO 11. Producción de pepino de mar por especie y ciudad en toneladas (1991-2001) y en porcentaje (2001).	132
ANEXO 12. Especies de pepino de mar de importancia comercial en China, Taiwán, Hong Kong SAR, Japón, Malasia, Tailandia, Indonesia, Filipinas, Vietnam, Singapur e Islas Spratly.	133
ANEXO 13. Volumen total de pepino de mar importado por China (Hong Kong SAR) de América Latina y países del Caribe (1996-2005).	134
ANEXO 14. Volumen total de pepino de mar importado por China (Hong Kong SAR).	134
ANEXO 15. Predios de Propiedad Federal en Baja California registrados para el aprovechamiento extractivo del pepino de mar <i>Isostichopus fuscus</i> .	135
ANEXO 16. Soluciones para tinción con plata en geles de electroforesis.	136
ANEXO 17. Análisis estadístico de la concentración de proteína y actividad de las enzimas extraídas de <i>Isostichopus fuscus</i> y <i>Holothuria impatiens</i> .	137
ANEXO 18. Actividad proteolítica (UAP/mL) a pH 2-10 de las proteasas de <i>I. fuscus</i> y <i>H. impatiens</i> .	141
ANEXO 19. Geles de electroforesis de las proteasas extraídas de <i>I. fuscus</i> y <i>H. impatiens</i> .	142

1. INTRODUCCIÓN.

Los productos marinos han atraído la atención de biólogos y químicos de todo el mundo. Hasta ahora, al rededor de 16,000 productos naturales han sido aislados de organismos marinos y reportados en aproximadamente 6,800 publicaciones. Además, existen cerca de 9,000 publicaciones relacionadas como estudios de actividad biológica, estudios ecológicos, entre otros. Actualmente el océano es considerado como una fuente potencial de principios activos (Bhakuni y Rawat, 2005).

Por otro lado, hace más de 100 años, Eduard Buchner (Haard y Simpson, 2000) demostró que las moléculas con actividad catalítica pueden ser aisladas de levaduras. Después de décadas de intensa investigación sobre estas moléculas (las enzimas), ahora sabemos que están en todas partes de los sistemas vivos y que son los agentes que hacen posible las reacciones químicas en las diversas formas de vida, aunque a veces en diferentes condiciones del medio ambiente.

La mayoría de las enzimas conocidas han sido ampliamente estudiadas en los mamíferos terrestres como ratas y en microorganismos. Entonces, *¿por qué estudiar las enzimas de los animales acuáticos?* Aunque la mayoría de las enzimas de seres acuáticos se encuentran también en las formas de vida terrestre, es decir, que son enzimas homólogas a partir de fuentes distintas que tienen el mismo nombre y número de la Comisión de Enzimas (EC), éstas pueden presentar propiedades muy diferentes con respecto a la estabilidad, temperatura óptima, especificidad a sustratos secundarios, entre otras.

Estas diferencias se basan en que los animales marinos se han adaptado a diferentes condiciones ambientales, y estas adaptaciones, con otros factores, y las variaciones genéticas dentro de una especie, se han traducido en proteasas digestivas con ciertas propiedades únicas en comparación con sus homologas de los animales terrestres, plantas o microorganismos.

Los organismos acuáticos ocupan a menudo ambientes extremos, tales como la profundidad del océano, donde la presión es alta y la luz esta ausente, temperaturas muy altas o bajas, rangos de salinidad de muy bajo a saturado, fluctuaciones en la disponibilidad de oxígeno, entre otros (Haard y Simpson, 2000).

Las ciencias del mar no han quedado al margen de la aplicación de la Biotecnología. Así en 1992 la Organización para la Cooperación Económica y de Desarrollo definió a la Biotecnología Marina como “La aplicación de principios científicos y de ingeniería en el uso directo o indirecto de organismos acuáticos, partes o productos derivados de éstos en su forma natural o modificada al procesamiento de materiales para proveer de bienes y servicios” (Guerrero y col., 2004).

Así mismo, el análisis de enzimas de origen marino permite conocer diferentes aspectos básicos de los organismos acuáticos como: capacidad digestiva, tipo de alimentación, requerimientos nutritivos, mecanismos de degradación, incluso su capacidad de sobrevivencia y los cambios que ha sufrido su hábitat. Se sabe que las características de las enzimas presentes en el aparato digestivo son un reflejo del hábito alimentario de cada especie (Jonas y col., 1983).

El conocimiento de la alimentación de organismos acuáticos es necesario para una acuicultura rentable. Una alimentación eficiente depende del conocimiento de cómo los organismos utilizan los diversos componentes de la dieta. La acuicultura es una industria global multimillonaria en la cual se propagan o cultivan organismos acuáticos en condiciones controladas y cuya actividad complementa la demanda de los productos obtenidos a través de la industria pesquera tradicional (Guerrero y col., 2004).

El conocimiento de la digestibilidad de proteína es importante en la formulación de dietas, porque los animales deben consumir proteína dietaria para abastecerse de aminoácidos. El uso de proteína es afectado por la naturaleza de la fuente proteica, su nivel de consumo y la capacidad de un organismo para usar otros componentes de la dieta. La calidad de la proteína es afectada por la frescura de la materia prima, la cantidad de lípidos, el proceso de secado y la fuente de proteína (Anderson y col., 1993).

Se han llevado a cabo diferentes investigaciones sobre la actividad de las proteasas de varias especies marinas para desarrollar una dieta eficaz para la cría intensiva de estas especies a través de la comprensión de sus capacidades digestivas (Clark y col., 1985 y Alarcón y col., 1998). La tasa de digestión y absorción de los aminoácidos esenciales durante la proteólisis se puede determinar con conocimiento adecuado de la actividad de las proteasas (Eshel y col., 1993). Actualmente la investigación en el área de alimentos para acuicultura se está enfocando en diversas fuentes más económicas de proteína. Un método amigable para la recuperación de proteína soluble e insoluble de los productos de la pesquería es el llamado hidrolizado de proteína. Estos hidrolizados ya están actualmente en el mercado. Algunos ensayos han demostrado las ventajas de sustituir harinas de pescado (comúnmente utilizada) por hidrolizados de proteína (Anggawati y col., 1990).

Uno de los organismos marinos con fuerte capacidad digestiva y autolítica es el holoturoideo conocido como pepino de mar (Figura 1), carajo ó cohombro de mar. Estos invertebrados son estudiados ya que tienen alto valor comercial, gran demanda en países asiáticos, importantes compuestos bioactivos y contribuyen benéficamente a los ecosistemas marinos. Sin embargo, poco se sabe sobre sus enzimas digestivas. La evolución del conocimiento de las enzimas digestivas de los holotúridos podría aclarar su bioquímica nutricional y fisiología.



Figura 1. Pepino de mar *Isostichopus fuscus*.

China y Japón son los principales productores y consumidores a nivel mundial de pepino de mar ya que es parte de su dieta y son considerados como remedio tradicional. En algunos países las gónadas de holotúridos se consideran un manjar muy apreciado. En México, la pesquería de pepino de mar se inició en Baja California con *Isostichopus fuscus* en la costa oriental (1988) y *Parastichopus parvimensis* (1989) en la costa occidental (Castro, 1997) como una actividad de pequeña escala que respondió a la demanda de los países orientales (Aguilar y Ramírez, 2002). Posteriormente, en 1994, comenzó la pesquería de *Holothuria impatiens*. Actualmente, se explotan estas especies de forma legal para exportación pero en régimen de concesión para su protección.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Características generales del pepino de mar.

2.1.1 Taxonomía.

El *Phylum* Echinodermata figura entre los invertebrados marinos más conocidos, incluye las clases Asteroidea (estrellas de mar), Ofiuroidea (estrellas serpientes), Equinoidea (erizos de mar), Holothuroidea (pepinos de mar) y Crinoidea (lirios de mar) (Calva, 2002).

Los pepinos de mar pertenecen al reino animal, *Phylum* equinodermata y a la Clase Holothuroidea y la descripción de caracteres morfológicos externos e internos sustenta la clasificación taxonómica de los pepinos de mar a nivel de orden, familia, género y especie (Zetina y col., 2002).

La taxonomía de la clase Holothuroidea es muy compleja; en México existen pocos expertos y a nivel mundial la situación no es mejor (Pawson, 1995).

2.1.2 Anatomía.

El pepino de mar tiene una forma cilíndrica alargada, con una abertura bucal en un extremo rodeada por tentáculos y en el otro extremo una abertura anal. Llegan a medir alrededor de 30 cm de longitud, siendo su talla comercial de 24 cm (Salgado, 1994).

Son animales adaptados a la reptación, por lo cual poseen pies ambulacrales, de los cuales los más desarrollados son los inferiores, otros se sitúan en los dos radios dorsales y tienen funciones sensibles (Figura 2).

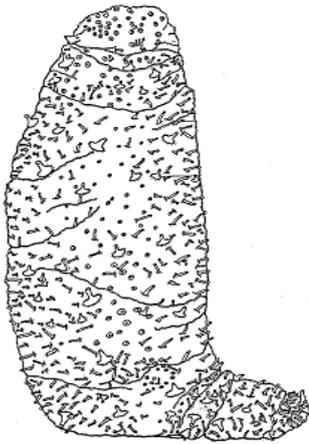


Figura 2. (Calva, 2002) Morfología externa de *Holothuria riojai* en la que se aprecian los múltiples podios.

El sistema digestivo clásico del orden Aspidochirotida (*Phylum* equinodermata), comienza en los tentáculos, se continúa con la boca, prosigue el esófago, la región estomacal, enseguida hay un angostamiento y el intestino. De todo el sistema, el órgano más conspicuo es el intestino el cual se encuentra enrollado dentro del celoma. Dicho enrollamiento muestra una posición definida, puesto que primero desciende a la parte posterior (intestino delgado), recorriendo la región media dorsal, luego se curva y asciende a la parte anterior; desciende a lo largo de la región ventral media y la parte final del intestino prosigue en un recto de tamaño considerable que desemboca en una cloaca amplia y por último, está el ano (Figura 3). Frecuentemente el intestino y el recto contienen granos de arena.

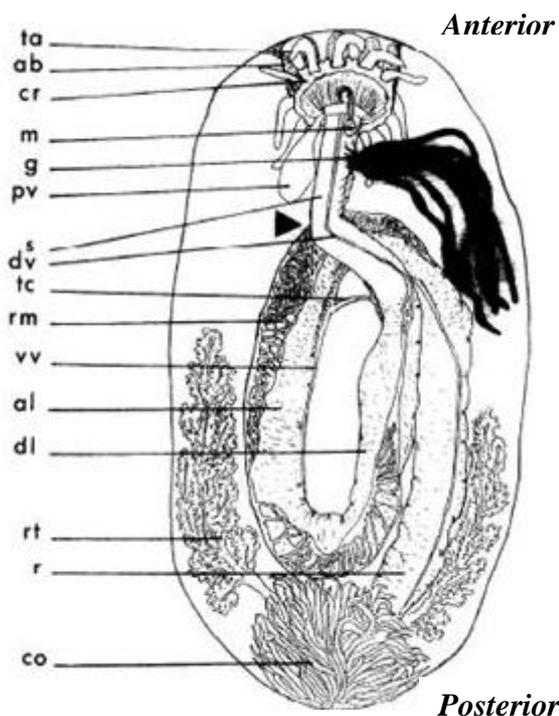


Figura 3. (Emson, 1987) Vista dorsal de los órganos internos de *Holothuria parvula*.

ab: bulbo acufaríngeo, al: intestino delgado ascendente; co: órgano cuvieriano; cr: anillo calcáreo; dl: intestino delgado descendente; dv: vaso hemal dorsal; g: gónada; m: madreporito; pv: vesícula de Poli; r: recto; rm: rete mirabile (complejo de arterias y venas); rt, árbol respiratorio; s: estómago; ta: ámpula tentacular; tc: conexión transversal del sistema hemal; vv: vaso hemal ventral.

2.1.3 Alimentación.

La mayoría de los mecanismos alimenticios de los pepinos de mar no han sido demostrados todavía. Sin embargo, se sabe que en su alimentación siempre intervienen los tentáculos y que se alimentan de recursos como: plancton, detritus, contenido orgánico presente en fango y/o limo, y algas o microalgas como *Rhodomonas* y *Dunaliella* (Calva, 2002).

En cuanto a la acuicultura del pepino de mar, es relativamente reciente. Hay un número limitado de informes sobre su alimentación y crecimiento. Sun Huiling y col. (2004), reportaron las necesidades nutricionales de *Apostichopus japonicus*. La alimentación artificial utilizada estuvo compuesta principalmente de harina de pescado, *Sargassum thumbergii* y “lees” (subproductos de la producción de vino y cerveza). Los autores determinaron que la tasa de ganancia de peso y digestibilidad de los alimentos incrementaron con el contenido de proteína en la dieta, siendo el 21.5 % el contenido óptimo. La tasa de ganancia de peso fue máxima cuando la dieta era rica en los siguientes aminoácidos: treonina, valina, leucina, fenilalanina, lisina, histidina y arginina; y disminuyó cuando la dieta era rica en fibra. Por otra parte, las tasas de crecimiento más altas se obtuvieron con una relación de 6.8-8.8 : 1, de calcio/fósforo, en el contenido de la dieta experimental (Anexo 1).

2.1.4 Reproducción.

Los sexos son separados (dioicos), sin embargo, ocasionalmente se han registrado individuos hermafroditas (Herrero-Pérezrul, 1994). Ya que no se ha observado dimorfismo sexual externo, el sexo se identifica mediante histología de las gónadas (Howaida y col., 2004). La proporción sexual es 1:1. Tienen una única gónada que presenta cinco estadios de desarrollo: indiferenciado, gametogénesis, madurez, desove y postdesove. El ciclo reproductor es anual, con un desove en verano (Salgado-Castro, 1994; Herrero-Pérezrul, 1994; Fajardo-León y col., 1995).

Al igual que otros muchos equinodermos, algunas especies incuban sus huevos, sobre todo en zonas frías; la incubación se produce en la zona ventral o dorsal del animal. El desarrollo, si no existe incubación, ocurre en el agua de mar y la larva formada es llamada auricularia (Figura 4). El pepino de mar joven llega a medir aproximadamente 1.5 cm de largo (Figura 5) y el peso de la primera madurez se ha estudiado que es a partir de los 167 g (peso del músculo) (Herrero-Pérezrul, 1994). La vida de los holotúridos se estima entre los 5 y 10 años.

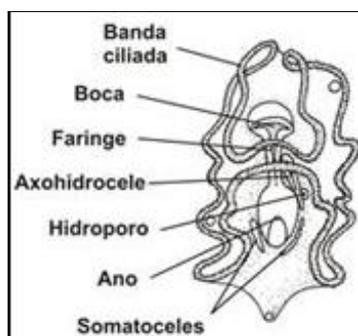


Figura 4. Larva auricularia del pepino de mar.

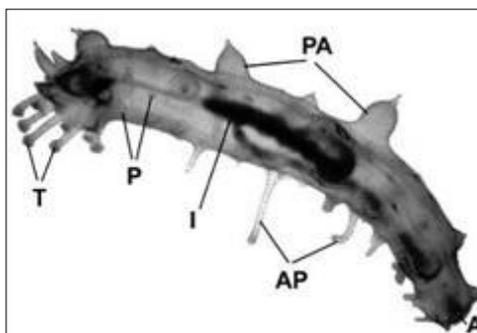


Figura 5. Pepino de mar joven *I. fuscus*. Se pueden observar los tentáculos (T), Pigmentos de la pared del cuerpo (P), intestino (I), podios ambulacrales (AP), ano (A) y papilas (PA).

2.1.5 Hábitat.

Se les considera exclusivamente marinos, sin embargo, existen estudios en los que se han colectado equinodermos en estuarios y en lagunas costeras.

El sustrato en el que vive es principalmente de tipo rocoso y pedregoso, aunque se le encuentra también en fondos de conchas y arcillas, así como entre algas, si existen en la zona.

La profundidad de distribución va de los 0.50 m hasta los 61 m (Kerstitch, 1989), aunque normalmente la máxima profundidad es de 33 m.

Los individuos pequeños (60 a 160 mm) se localizan principalmente dentro de oquedades y grietas entre las piedras, así como debajo de las mismas, mientras que organismos de tallas grandes (mayor a 16 cm) se encuentran principalmente sobre piedras y rocas; además son individuos de hábitos nocturnos (Kerstitch, 1989).

La separación de las especies dentro de sus diferentes microhábitats es debida, posiblemente, al alto grado de adaptación en los mecanismos alimenticios y a la posible especialización alimenticia. No obstante, hay otros factores que pueden influir en la distribución de los holotúridos tales como, movilidad, dispersión y colonización de larvas, potencial para su variabilidad genética y capacidad reproductora (Calva, 2002).

La mayoría de los equinodermos abisales corresponde a los pepinos de mar, quienes al tener un esqueleto conformado por espículas son los que toleran las mayores profundidades y por ende las mayores presiones hidrostáticas (Calva, 2002).

2.1.6 Depredadores.

Los pepinos de mar tienen pocos enemigos naturales, se mencionan sólo algunos casos de depredadores tales como cangrejos, algunos peces y estrellas de mar como *Solaster* la cual sólo come a otros equinodermos como pepino de mar, sin embargo, son comunes las asociaciones entre holoturoideos y otros organismos comensales como cangrejos y peces, estos últimos, generalmente se alojan en la cloaca y entran o salen del animal cuando se abre el esfínter del ano (Calva, 2002).

Entre los equinodermos, los holoturoideos representan la clase más infestada por parásitos. Los parásitos, son siempre perjudiciales y aunque a veces no son letales pueden causar la muerte del huésped, en algunos casos.

Según una revisión sobre las enfermedades de los equinodermos (Jangoux, 1990), más de un tercio de los parásitos de equinodermos viven sobre ó dentro de holotúridos. Las partes principales del cuerpo que sufren las infestaciones son el sistema digestivo y el celoma (Figura 6). Las enfermedades inducidas por parásitos, son en su mayoría estructurales: crean llagas en la superficie de la epidermis, perforaciones en el árbol respiratorio o hasta el celoma.

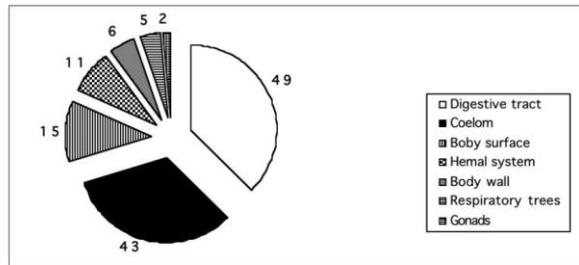


Figura 6. Localización de parásitos en el cuerpo del pepino de mar.

Los organismos que se han registrado como parásitos son algunas bacterias causantes de la ulceración de la piel (Becker, 2002), hongos, protozoos los cuales viven en el tracto digestivo y árbol respiratorio (Barel y Kramer, 1977), y metazoos como platelmintos del *Phylum Platyhelminthes* (Figura 7).

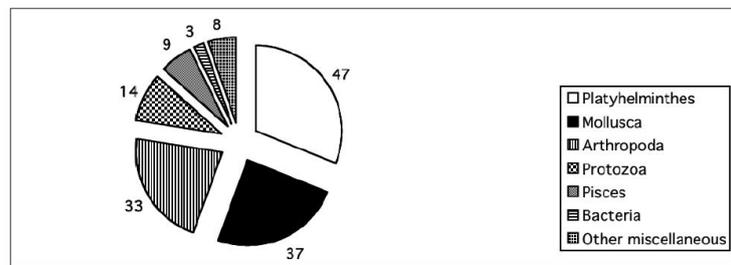


Figura 7. Número de especies (por taxón) que infestan al pepino de mar.

2.1.7 Mecanismos de defensa.

El pepino de mar tiene una estrategia singular de defensa contra sus depredadores, cuando un animal extraño lo ataca, el holotúrido se voltea y expulsa por el ano sus órganos, o en algunas especies, los llamados túbulos de Cuvier. Posteriormente estos órganos ó los túbulos de Cuvier, son regenerados por el organismo bajo diferentes mecanismos de

regeneración biológica. Estos procesos están mediados por diferentes biomoléculas que son sintetizadas por el organismo.

Los túbulos de Cuvier poseen una gran adhesividad por lo que son muy útiles como estrategia de defensa contra sus depredadores, ya que al ser expelidos por el pepino de mar, se vuelven pegajosos una vez que están en contacto con el depredador, inmovilizándolo e inhabilitándolo (Vanden y Jangoux, 1987).

No es éste el único mecanismo de defensa de los holoturoideos. Ciertas especies de los géneros *Holothuria*, *Stichopus*, *Cucumaria*, *Paraaudina*, *Thelenota*, *Pentacta* y *Actinopyga* también descargan, al manipularlas, un fluido gomoso procedente de glándulas especiales situadas en la pared de su cuerpo. Este fluido contiene una sustancia designada como holoturina, la cual está constituida por saponinas y glucósidos. La holoturina es toxica si se ingiere y es irritante para la piel. El mal sabor de ésta toxina quizás explique que los holotúridos tengan muy pocos predadores y que sean abundantes en los fondos arenosos, en arrecifes de coral profundos y hasta en zonas abisales. Por otra parte, el fluido viscoso hace que se adhieran partículas de arena sobre la superficie externa del animal, lo que probablemente incremente su mimetismo (Valledor, 1994).

2.1.8 Propiedades y Composición.

El pepino de mar se ha utilizado como remedio tradicional en países asiáticos para curar diversas heridas internas y externas ya que se cree que tiene propiedades afrodisíacas y curativas (Battaglione y col., 1999).

En las últimas décadas, diversas disciplinas científicas han enfocado sus investigaciones al estudio de esta especie marina, en aspectos tales como su acuicultura, fisiología y bioquímica; entre las características más importantes de esta especie destaca su habilidad sorprendente para regenerar tejidos y órganos, razón por la cual se han estudiado los mecanismos relacionados con el proceso de cicatrización y regeneración biológica de éste organismo. También se ha visto que posee propiedades anticoagulantes y citotóxicas, entre otras.

En cuanto a su composición, el pepino de mar es alto en proteína (alrededor del 50 % en peso seco según la especie) y bajo en grasa, comparado con la mayoría de los alimentos (Anexo 2). La pared del cuerpo del pepino de mar consiste de colágeno insoluble además de altos niveles de lisina, arginina y triptófano, por esta razón la gelatina del pepino de mar es más apreciada que las de otro origen (DeMoor y col., 2003; Taylor y White, 1997). El perfil de aminoácidos (especialmente los aminoácidos esenciales) y la presencia de elementos inorgánicos necesarios hacen que el pepino de mar sea un alimento saludable (Anexo 3 y 4).

2.1.9 Principios activos.

En el caso del pepino de mar los compuestos bioactivos que más se han estudiado son los carbohidratos, proteínas y enzimas, lípidos y otros compuestos como las neurotoxinas. Estos se han utilizado para tratamientos de enfermedades como el cáncer, artritis, entre otros padecimientos.

Se ha detectado la presencia de sulfato de condroitina (polisacárido sulfatado) que se ha utilizado en el tratamiento de la artritis y de otras patologías de las articulaciones, además de ser utilizado en la medicina por su potente acción anticoagulante y antitrombótica (Mourão, 1996; Volpi, 2006). Otro de los carbohidratos más estudiados en los holotúridos son los triterpenoides, estos son importantes debido a que presentan actividad hemolítica y citotóxica (Popov, 2002).

La saponina Holoturina A, de los pepinos de mar, es una mezcla de varios glucósidos y ha mostrado actividad hemolítica *in vivo* e *in vitro*, actividades neuromusculares y citotóxicas (Ramamurthy, 1967; McLachan, 1964). La fracción de saponina de *Stichopus japonicus* mostró actividad antifúngica contra *Trichophyton asteroid*, *Candida albicans* y otras especies de hongos *in vitro* en concentraciones de 2,78-16,7 mg/mL (Shimada, 1969). Se considera que las holoturinas de los pepinos de mar tienen gran potencial como agentes farmacológicos neuromusculares y para el cáncer (Bhakuni y Rawat, 2005).

También, se ha visto que las bases esfingoides de cerebrosidos (glucoesfingolípidos) del pepino de mar *Stichopus variegates* presentan actividad de citotoxicidad por medio de apoptosis de células humanas de cáncer de colon (Sugawara y col., 2006).

Por otra parte, en el intestino de *Apostichopus japonicus* se ha detectado hasta 12 ppm de vanadio, que se ha utilizado para tratar úlceras gastrointestinales (Zhonghua, 1993).

2.1.10 Importancia para el ambiente.

El pepino de mar tiene gran valor dentro del ecosistema marino. Su función es importante porque filtran los sedimentos oceánicos y devuelven nutrientes a la red alimenticia, revolviendo las capas superiores de sedimento y facilitando la penetración del oxígeno. Este proceso evita la acumulación de materia orgánica en descomposición y puede ayudar a controlar poblaciones de plagas y organismos patógenos (incluidas ciertas bacterias), además sus huevos y larvas, que forman parte del plancton, son alimento vital de otras especies marinas.

Los pepinos de mar remueven anualmente una gran cantidad de sedimento y tienen una acción transformadora del sustrato de las zonas en las que habita, haciéndolo aprovechable a otros niveles tróficos. Son los responsables de cambios significativos en la composición del sedimento marino y reciclaje de nutrientes. Además, son frecuentes hospederos de diferentes especies de cangrejos, camarones y peces (Calva, 2002).

La mayoría de las especies de peces marinos de los géneros *Carapus* y *Encheliophis*, pertenecientes a la familia Carapidae (Pearlfish), son usualmente encontradas en el árbol respiratorio o en la cavidad celómica de los holoturoideos.

Aunque los peces son capaces de vivir en diferentes especies hospederas, a menudo muestran una preferencia específica (Trott y Trott, 1972; Gustato y col., 1979). *C. Boraborensis*, *C. Homei*, *C. murlani* y *E. gracilis* pueden vivir en la misma especie hospedadora y se encuentran en las mismas aguas, pero por lo general no viven al mismo tiempo en el mismo individuo (Smith, 1964; Trott, 1981; Shen y Yeh, 1987; Vanden y

Jangoux, 1989, Markle y Olney, 1990). Si existe, un sistema de reconocimiento del pepino de mar todavía no está claro.

Los pepinos de mar también actúan como estimuladores del desarrollo para algunas larvas de *Carapus spp.* Algunos de los “pearlfishes” ó peces de la familia *Carapidae*, asociados con los pepinos de mar se muestran en el Anexo 5 (FAO, 2004).

2.1.11 Importancia económica.

Los holotúridos son consumidos principalmente en países Asiáticos en diferentes formas, ya sea fresco, deshidratado, en salmuera, entre otras preparaciones. Además, muchas de las biomoléculas presentes en diferentes especies de pepino de mar se han extraído y utilizado en la industria farmacéutica y de los alimentos, en este último caso como suplemento alimenticio para deportistas y personas con ciertas deficiencias nutricionales. En los últimos años se ha incrementado el número de productos comerciales que contienen extractos de pepino de mar y que están siendo utilizados para el tratamiento de la artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis reumática, como el ArthriSea® ó SeaCuMax® de NutriSea®.

En el 2001, el 66% de la producción mundial de pepinos de mar silvestre se originó en Asia, seguida de Oceanía (16%), Norte y Centroamérica (12%, mostrando el mayor aumento en la producción) y África (5%). La mayoría de la producción de pepino de mar se realizó en el Océano Pacífico, en particular en el noroeste (43%) y en la región Centro-Occidental (32%) (FAO, 2004).

A nivel mundial, en el 2001, las exportaciones de pepinos de mar fueron más de 5,300 toneladas, con un valor de 30.9 millones de dólares estadounidenses. El 84 % del volumen y el 90 % del valor de estas exportaciones fueron de pepino de mar curado. En términos de volumen, Hong Kong SAR (Región Administrativa Especial (SAR) de China), fue el principal exportador con 3,900 toneladas, seguido por China y las Islas Salomón. Hong Kong SAR también fue el principal exportador en términos de valor con 22.7 millones de dólares estadounidenses, seguido por Sri Lanka y la Provincia China de Taiwán (FAO, 2004) (Anexo 6).

Para el mismo año, las importaciones de pepinos de mar ascendieron a 7,300 toneladas, representando 56.7 millones de dólares. Hong Kong SAR fue el primer importador en volumen con 4,400 toneladas, seguido por China y la provincia de Taiwán de China. En términos de valor, Hong Kong con 50.4 millones de dólares fue seguido por la Provincia China de Taiwán y China. La mayor parte (68 %) de pepino mar importado se compuso de productos secos, salados o en forma de salmuera, seguida por congelados (31 %) y una mínima cantidad de pepinos de mar frescos o refrigerados (FAO, 2004) (Anexo 7 y 8).

En el mercado de China (Hong Kong SAR), los precios medios de importación de origen australiano de pepino de mar han sido los más altos en los últimos años (2001-2003) debido a las especies y el factor de calidad (Anexo 9). Una tendencia similar se observa también para el pepino de mar procedente de países del Pacífico.

El mercado de China también controla los precios del mercado internacional de pepino de mar. Sin embargo, la calidad es el factor principal que determina los precios. Por ejemplo, en el mercado de Malasia (2003), el precio de venta del pepino de mar deshidratado fue alrededor de 110 dólares estadounidenses por kilo (US\$/kg) y el precio de venta del pepino congelado fue de 23-24 US\$/kg; en las Islas Galápagos el precio del pepino de mar en salmuera fue de 22.88 US\$/kg para el 2003 (Murillo y col., 2003). En general, en el sureste de Asia, el pepino de mar *Holothuria scabra* deshidratado alcanzó los 66 dólares estadounidenses por kg en el 2005 (FAO, 2008) (Anexo 10). Una tendencia similar se observa también en otros mercados de Asia.

En la región centro-occidental del Pacífico (México, América Central y América del Sur) existen alrededor de 300 especies de holoturoideos en aguas poco profundas (Preston, 1993). Hay 35 especies de pepinos de mar conocidas y utilizadas para su producción y comercialización. Se trata de especies que en general tienen paredes gruesas y pertenecen al orden Aspidochirotida. De este orden, sólo las familias Holothuriidae (géneros *Actinopyga*, *Bohadschia*, *Pearsonothuria* y *Holothuria*) y Stichopodidae (géneros *Stichopus* y *Thelenota*) se recolectan y exportan. Sin embargo, también se han registrado especímenes del orden Dendrochirotida de la familia Cucumaridae (Tabla 1) (FAO, 2008).

Tabla 1. Especies de pepino de mar bajo explotación comercial en México, Centro y Sur América.

Order	Family	Species	Commercial exploitation
Aspidochirotida	Holothuriidae	<i>Actinopyga agassizi</i>	Panama, Venezuela
		<i>Holothuria mexicana</i>	Nicaragua, Panama, Venezuela
		<i>H. impatiens</i>	Mexico
		<i>H. theelii</i>	Peru
		<i>H. atra</i>	Ecuador
		<i>H. kefersteini</i>	Ecuador
		<i>H. inornata</i>	Costa Rica
		<i>H. arenicola</i>	Nicaragua
		Stichopodidae	
<i>I. fuscus</i>	Ecuador, Mexico, Panama, Peru		
<i>Stichopus horrens</i>	Ecuador		
<i>Astchopus multifidus</i>	Panama, Caribbean region		
Dendrochirotidae	Cucumaridae	<i>Athyonidium chilensis</i>	Chile, Peru
		<i>Pattalus mollis</i>	Chile, Peru

La demanda por el pepino de mar *Isostichopus fuscus* fomentó el inicio de su captura comercial en México entre 1987 y 1988. El interés por explotar comercialmente este recurso, también se manifestó en los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Sin embargo, dado a que en México no se consume el pepino de mar, una vez procesado y empacado se exporta. Actualmente, en México existen dos presentaciones para la exportación del producto: el pepino precongelado (chilled) y el deshidratado (Ramírez-Soberón, 2000), siendo la primera la más rentable. *I. fuscus* es uno de los equinodermos holotúridos más grandes (Caso, 1961) y de los más cotizados en los mercados asiáticos por la textura suave de su piel.

En México, en el 2001, se reportó una producción de pepino de mar de 481 toneladas lo que representó el 2.6 % de la producción mundial (Anexo 11).

Actualmente, la mayoría del pepino de mar *I. fuscus* de México es exportado a Taiwán y Hong Kong, ya sea refrigerado o deshidratado. En el Anexo 12 se presenta una tabla de las especies de importancia comercial de pepino de mar en China, Taiwan, Hong Kong SAR, Japón, Malasia, Tailandia, Indonesia, Filipinas, Vietnam, Singapur e Islas Spratly.

Hong Kong SAR, reportó más de 14 toneladas de pepino de mar que importó de México desde 1995 hasta 2005 (Anexo 13), mientras que los datos disponibles en la FAO indica un total de 2,564 toneladas capturadas desde 1998 hasta 2005, con un promedio de captura anual de 320.5 ± 86.3 toneladas (Anexo 14) (FAO, 2008). No hay información sobre las capturas y de exportación a nivel de especie.

La pesquería de pepinos de mar ayuda a las comunidades locales de Baja California durante la temporada de veda de los recursos más rentables, erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*), abulón (*Haliotis fulgens*) y ojo de cerradura (*Megathura crenulata*) (Castro, 1997).

2.1.12 Medidas de protección del pepino de mar en México.

La explotación ilegal del pepino de mar en la península de Baja California se ha realizado desde antes de otorgarse los primeros permisos de pesca comercial en 1987. La medida de protección, determinada por la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), es la **NOM-059-SEMARNAT-2000** “Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo”. Esta norma determina a la especie en la categoría de amenazada (Diario Oficial, 2000).

En marzo de 2002, el pepino de mar *Isostichopus fuscus* fue sujeto a protección especial, que permite el uso de esta especie bajo condiciones restringidas. En 2005, un plan de manejo adaptativo se desarrolló bajo un esquema participativo de los gobiernos locales y nacionales, científicos y asociaciones de pescadores, para evaluar continuamente el impacto de la pesca. Este plan incluye la asignación de cuotas para la acuicultura y los informes de capturas y población. Este plan de gestión está sujeto a revisión anual y es adaptado a los nuevos resultados obtenidos (Toral-Granda, 2007).

La pesquería de *I. fuscus* se gestiona en régimen de concesión por la "Unidad de Manejo para la Vida Silvestre" (UMAS) a los pescadores organizados que a cambio debe presentar informes sobre la actividad. Esta información ayuda a decidir las medidas de gestión adicionales para garantizar la sostenibilidad del recurso (Herrero-Perézrul, 1999). Las medidas de gestión para la pesquería de pepino de mar en América Latina y el Caribe se muestran en la Tabla 2 (FAO, 2008).

Tabla 2. Medidas de gestión para la pesquería de pepino de mar en América Latina y el Caribe.

Country	Management measures
Argentina	No known fishery
Belize	No information available
Brazil	No information available
Chile	No management measures in place
Colombia	No management measures in place
Costa Rica	Total ban on sea cucumber fishing
Cuba	Minimum landing sizes, temporal closure over the reproductive season, total allowable catches per region
Ecuador (Galapagos Islands)	Fishing season, minimum harvesting size, no take zones, total allowable catch
Ecuador (Mainland)	Total ban on sea cucumber fishing
El Salvador	No known fishery
Haiti	No information available
Honduras	No known fishery
Jamaica	No known fishery
Mexico	Fishery manager inside "Unidad de Manejo para la Vida Silvestre" for <i>I. fuscus</i>
Panama	Total ban on sea cucumber fishing
Peru	No management measures in place
Uruguay	No information available
Venezuela	Total ban on sea cucumber fishing

En Baja California Sur existen 11 Predios de Propiedad Federal registrados para el aprovechamiento extractivo del pepino de mar *I. fuscus* de los cuales 9 se encuentran ubicados en polígonos situados en el Golfo de California (Anexo 15) (Edo. BCS, 2009).

2.2 Enzimas.

2.2.1 Definición de enzima.

Las enzimas son catalizadores complejos constituidos por proteínas globulares. Un catalizador es una sustancia que aumenta la rapidez o velocidad de una reacción química, sin verse alterada ella misma en el proceso global. La mayor parte de los catalizadores biológicos, aunque no todos ellos, son proteínas denominadas enzimas (Mathews y col., 2002).

Las enzimas aceleran la velocidad de las reacciones químicas en un factor de 10^{12} a 10^{20} respecto a las reacciones no catalizadas enzimáticamente. La actividad molar de las enzimas es muy alta: una molécula de enzima puede transformar hasta 600,000 moléculas de sustrato por segundo (Fennema y Danson, 1993).

Las enzimas se diferencian de los catalizadores químicos ordinarios en varios aspectos importantes (Voet y Voet., 2000):

- 1.- Se obtienen velocidades de reacción más elevadas.
- 2.- Actúan en condiciones de reacción más suaves.
- 3.- Tienen mayor especificidad de reacción.
- 4.- Capacidad para la regulación de la reacción.

2.2.2 Acción de las enzimas.

El mecanismo de acción de una enzima es: 1) une el sustrato o sustratos en el sitio activo, 2) reduce la energía del estado de transición, e 3) impulsa directamente el acontecimiento catalítico. Cuando el proceso catalítico se ha completado, la enzima debe ser capaz de liberar el producto(s) y volver a su estado original, para estar preparada para un nuevo ciclo de catálisis (Mathews y col., 2002).

Las enzimas se unen de modo específico a sus sustratos a través de interacciones geométrica y físicamente complementarias. Ello permite a las enzimas ser absolutamente estereoespecíficas, tanto al unirse a los sustratos como en la catálisis de reacciones (Voet y Voet., 2000).

La actividad catalítica de las enzimas depende de la integridad de su conformación proteica nativa. Si se desnaturaliza o disocia una enzima en sus subunidades, se pierde normalmente la actividad enzimática. Así, la integridad de la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas enzimáticas es esencial para su actividad catalítica (Lehninger, 1991).

2.2.3 Clasificación de las enzimas.

Las enzimas se clasifican y designan de acuerdo con la naturaleza de las reacciones químicas que catalizan. Existen seis clases principales de reacciones que catalizan las enzimas (Tabla 3), así como subclases y sub-subclases dentro de las clases (Bohinski, 1991).

Tabla 3. Clasificación internacional de las enzimas.

Clasificación	Tipo de reacción catalizada
1. Oxidorreductasas	Reacciones de oxidación-reducción
2. Transferasas	Transferencia de grupos funcionales
3. Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
4. Liasas	Eliminación de grupo para formar enlaces dobles
5. Isomerasas	Isomerización
6. Ligasas	Formación de enlace acoplada con la hidrólisis de ATP

2.2.4 Enzimas de organismos marinos.

La mayoría de las enzimas de organismos marinos se encuentran también en las formas de vida terrestre, y tienen el mismo nombre y número (CE) de la Comisión de Enzimas, sin embargo, éstas pueden presentar propiedades muy diferentes con respecto a la estabilidad, la temperatura óptima, especificidad a sustrato secundario, entre otras. Estas diferencias se basan por ejemplo en la adaptación y en las condiciones del hábitat.

Los organismos acuáticos ocupan a menudo ambientes extremos, tales como la profundidad oceano, donde la presión es alta y la luz está ausente, rangos de temperatura entre -2 °C en los gradientes salinos polares hasta 103 °C en las aguas termales; rangos de salinidad de muy baja a saturada; y fluctuaciones diarias en la disponibilidad de oxígeno. Por esta razón, el tema de las enzimas de origen marino es de interés para el bioquímico comparativo (Haard y Simpson, 2000).

Las enzimas obtenidas de organismos acuáticos están directamente relacionadas con el crecimiento de estos y fundamentalmente con la composición del tejido, el valor nutritivo y las características comestibles de los alimentos marinos. Factores intraespecíficos como la edad biológica, dieta, calidad de agua y temperatura del hábitat, influyen la composición, durabilidad postmortem y las características comestibles.

2.2.5 Enzimas del pepino de mar.

Las principales enzimas antioxidantes encontradas en estos organismos incluyen superperoxido dismutasa (SOD), catalasa, glutathionperoxidasa, y glutathion reductasa (GR), además de la glutathion transferasa que tiene un papel muy importante en la desintoxicación (Dolmatova y col., 2004).

En el caso del músculo del pepino de mar se encuentra una proteína que ha causado controversias entre los científicos debido a su posición especial en el estudio de la evolución: la enzima arginina quinasa (AK). Esta proteína juega un papel esencial en el metabolismo celular controlando los niveles de ATP en la célula para el requerimiento fluctuante de energía, como es el caso de las células de los músculos y nervios.

La AK se aísla del músculo longitudinal del pepino de mar, en particular se ha estudiado de la especie *Stichopus japonicus* y se vio que se trata de una arginina quinasa dimérica que tiene una estructura muy similar a las isoenzimas de los vertebrados: la creatina quinasa (CK), pero es absolutamente específica para la arginina como los AK's de los moluscos y artrópodos. Estas enzimas de origen independiente constituyen una aparición inusual en la evolución de las proteínas (Guo y col., 2004; Goo y col., 2003; Suzuki y col., 1999).

En los tejidos y fluidos de muchos seres vivos se encuentran muchas clases de proteínas, entre ellas destacan varios tipos de proteínas pertenecientes a la familia de las lectinas. Las lectinas son un grupo de proteínas que reconocen estructuras de carbohidratos específicos y aglutinan varias células por medio de un enlace glicoconjugado a la superficie celular. Los animales producen una gran variedad de lectinas, muchos de las cuales están relacionadas con fenómenos de reconocimiento celular.

Se han aislado y caracterizado varias lectinas tipo C de muchos invertebrados marinos, entre ellos el pepino de mar. Hay muchos reportes pero en pocas especies, entre ellas destaca la *Cucumaria echinata*, de esta especie se han extraído cuatro lectinas que son dependientes del Ca^{+2} y se han nombrado de la siguiente manera: CEL I, CEL II, CEL III, CEL IV. Dentro de este grupo de lectinas la CEL III (47.5 kDa) es la única que muestra actividad hemolítica así como citotóxica (Himeshima y col., 1994; Hatakeyama y col., 1994, 2002; Matsubara y col., 2007; Oda y col., 1997).

La caracterización de proteínas extraídas del túbulo de Cuvier de la especie *Holothuria forskali* ha mostrado que este órgano está compuesto básicamente de diez proteínas que tienen básicamente la misma composición de aminoácidos (DeMoor y col., 2003; Endean, 1957). Los estudios de la caracterización bioquímica del material adhesivo de los túbulos de Cuvier son importantes debido a que dentro de las aplicaciones se podría utilizar esta característica adhesiva en medicina y para construcciones bajo el agua (Strausberg y Link, 1990; Taylor y White, 1997). Casi no se sabe nada acerca de cómo se produce la adhesividad de los túbulos de Cuvier, pero al menos se sabe que se debe parcialmente a la presencia de las proteínas (DeMoor y col., 2003; Endean, 1957).

Las proteínas encontradas en los fluidos también han sido estudiadas en pocas especies de pepino de mar aunque en las últimas décadas se han estudiado profundamente las células de la hemolinfa y del líquido celómico de muchos invertebrados marinos, estas células son funcionalmente análogas a los inmunocitos de los vertebrados. El estudio de estos fluidos es muy importante ya que permite entender la evolución del sistema inmune, además la utilización de estas células sirve para la preparación de drogas nuevas así como para el biomonitoreo ecológico (Dolmatova y col., 2004).

2.3 Proteasas.

2.3.1 Definición.

Las proteasas son enzimas que escinden los enlaces peptídicos de las proteínas. En otras palabras, las enzimas protelíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de las hidrolasas, ya que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo carboxilo de una aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua (Rao y col., 1998).

Existe una amplia diversidad de fuentes de proteasas, éstas pueden obtenerse a partir de animales, plantas y microorganismos (principalmente bacterias y hongos). Las proteasas de origen animal incluyen la tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina y renina, y son extraídas generalmente del ganado por lo que su producción depende de la disponibilidad del ganado para su sacrificio (Rao y col., 1998).

2.3.2 Clasificación de las proteasas.

Las proteasas se pueden clasificar en base a diferentes criterios: por el tipo de reacción que catalizan, la naturaleza química del sitio catalítico, y el pH óptimo al cual se lleva a cabo la reacción con el sustrato.

Dependiendo de la naturaleza del sitio sobre el cual actúan las proteasas, éstas se clasifican en endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas (tripsina y quimotripsina) son aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína dando como resultado cadenas de péptidos y las exopeptidasas actúan sobre enlaces terminales de una proteína, basándose su sitio de acción sobre el nitrógeno libre terminal de la cadena polipeptídica (aminopeptidasas) ó sobre el carbonilo terminal (carboxipeptidasas), dando como resultado aminoácidos libres (Rao y col., 1998).

Basado en el grupo funcional presente en el sitio activo, las proteasas se pueden clasificar en cuatro grupos: serín proteasas, aspartil proteasas, cisteín proteasas y metaloproteasas (Whitaker, 1994; Rao y col., 1998).

Finalmente, de acuerdo al pH en el que las enzimas presentan la mayor actividad, las proteasas se pueden clasificar en: proteasas alcalinas (pH 8 a 13), neutras y ácidas (pH 2 a 6). Las serín proteasas se encuentran en la clasificación de proteasas alcalinas; entre las proteasas neutras se encuentran las cisteín proteasas, metaloproteasas y algunas serín proteasas; y dentro de las proteasas ácidas se encuentran las aspartil proteasas y algunas cisteín proteasas y metaloproteasas (Sandhya y col., 2005).

2.3.3 Proteasas de organismos marinos.

Las proteasas digestivas de origen marino se han convertido en uno de los principales objetos de estudio debido a su importancia en las aplicaciones industriales así como por sus propiedades bioquímicas. Actualmente, las investigaciones sobre la actividad de proteasas de diferentes especies marinas han sido realizadas para el desarrollo de dietas efectivas para la crianza intensiva de estas especies y para el entendimiento de sus capacidades digestivas.

Al igual que las proteasas de plantas, animales y microorganismos, las proteasas digestivas de los animales marinos tienen acción hidrolítica, y catalizan la escisión de enlaces peptídicos con la participación de moléculas de agua como reactivos. En términos de la industria alimentaria actual (y en otras aplicaciones industriales), las proteasas son el más importante y más utilizado grupo de enzimas.

Las proteasas industriales son en su mayoría de microorganismos, y en menor medida de plantas y origen animal. Hasta ahora, hay un uso muy limitado de proteasas marinas por la industria. Las razones, incluyen la relativa escasez de información básica sobre estas enzimas. Sin embargo, los animales marinos comprenden varios miles de diversas especies que subsisten en condiciones de hábitats diferentes (Hultin, 1980).

En los últimos años una serie de estudios se han realizado para caracterizar las enzimas digestivas de los organismos acuáticos, que son útiles tanto para determinar los plazos máximos de almacenamiento, evitando la autólisis, y desarrollar aplicaciones prácticas para proteasas digestivas en la fisiología, bioquímica y ciencias de la alimentación (García, 1992, Haard, 1992 y Jiang y col., 1991). En la acuicultura, esto puede ayudar a la selección de ingredientes que deben incluirse en una dieta (Lan y Pan, 1993).

2.3.3.1 Características generales de proteasas de organismos marinos.

La literatura demuestra ampliamente que algunas proteasas digestivas de animales marinos son catalizadores más eficientes a baja temperatura de reacción, más termolábiles, o con capacidad superior a desnaturalizar sustratos proteicos nativos. En la Tabla 4 se muestra la comparación de las propiedades cinéticas, termodinámicas y físicas de algunas proteasas digestivas de animales marinos contra mamíferos terrestres.

Tabla 4. Comparación algunas propiedades cinéticas, termodinámicas y físicas de proteasas digestivas de animales terrestres y marinos (Haard, 1998; Haard y Simpson, 2000).

Enzyme	Source	Biological temperature (°C)	Mol. wt. (kDa)	pH optimum	Temperature optimum (°C)	K_m' (mM)	V_{max}
<i>Acid proteinases</i>							
Pepsin	Atlantic cod	0-5	35.5	3.5	40	0.05	
	Capelin	(-1)-4	23.0; 27.0	3.7; 2.5	38; 43		
	Greenland cod	(-2)-2	36.4	3.5	30	0.86	
	Polar cod	(-1.5)-2	40.0; 42.0	2.0	37	0.06; 1.33	31; 556
	Sardine	10	33.0; 37.0	2.0; 4.0	40; 55		
	Porcine	37	32.0-35.0	2.0	47	0.04	
Chymosin			33.8; 44.0	2.2-3.5			
Gastricin(ogens)	Hake		32.3; 33.9	3.0			
<i>Serine proteinases</i>							
Trypsin	Atlantic cod	0-5	24.2; 24.8	7.5-8.0	40	1.42	0.25
	Capelin	(-1)-4	28.0	7.5-8.0	45	0.73; 1.38	
	Cunner	>5.0	24.0	8.5	45	0.73	0.18
	Greenland cod	(-2)-2	23.5	7.5	35	1.67	0.21
	Mullet	15	24.0	8.0	55	0.49	400
	Sardine	10	22.9-28.9	10.0	45		
	Bovine	37	23.0	8.2	45	1.02	0.03
	Chymotrypsin	Atlantic cod	0-5	26.0	7.8	52	0.14; 0.20
Chymotrypsin	Dogfish			7.0; 8.0		3.5; 0.27	
	Rainbow trout	15	28.2-28.8	9.0	55	0.04; 0.02	2.24; 2.52
	Bovine	37		7.2	57	0.053	0.85
Elastase	Atlantic cod	0-5	28.0	7.5-9.0	43	1.96	38.5
	Porcine	37		7.5-9.0	58	2.42	11.0
<i>Thiol proteinase</i>							
Cathepsin B	Mussel		21.0	3.0-4.5			

En general, algunas de las características de las proteasas de organismos marinos son (Haard, 2000):

- Mayor eficiencia catalítica a bajas temperaturas de reacción. Puede ser utilizado para procesar los alimentos a baja temperatura reduciendo costos de energía y la destrucción de componentes termolábiles esenciales de los alimentos.
- Baja termoestabilidad. Permitiría su inactivación en tratamientos térmicos leves.
- Estructuras flexibles.
- Estabilidad al frío.
- Actividad/Estabilidad catalítica de pH neutro a alcalino.
- Respuesta diferente a inhibidores específicos.
- Sensibilidad a la presión.
- Capacidad de hidrólisis de sustratos proteicos nativos. Puede ser ventajoso en la fabricación de zumo de fruta, para la inactivación de las enzimas endógenas indeseables tales como polifenoles oxidasas (PPO) o pectina metil-esterasa (PME).
- Sensibilidad a pH ácido o alcalino, sales, urea, detergentes, etc.

2.3.3.2 Uso industrial de las proteasas marinas.

2.3.3.2.1 Aplicaciones en la industria de alimentos.

(Haard, 2000)

- Mejoramiento de las características de textura de los cereales y productos horneados.
- Mejoramiento del proceso de secado.
- Mejoramiento de la calidad de los productos de huevo, carne fresca, la recuperación de proteínas y péptidos a partir de huesos, hidrolizados de las proteínas de la sangre.
- Reducción de viscosidad.
- Se utilizan para hacer cuajo en queseras / maduración de queso.

2.3.3.2.2 Aplicaciones biomédicas.

(Haard, 2000)

- Para reducir la inflamación de los tejidos.
- Disolver coágulos de sangre.
- Promover la cicatrización de heridas.
- Activar las hormonas.
- Diagnosticar candidiasis.
- Ayuda o facilita la digestión.

2.4 Histología.

2.4.1 Definición.

De acuerdo con la traducción literal, la palabra histología significa “el estudio del tejido” y se refiere al análisis de la composición microscópica y la respectiva función del material biológico. Las primeras investigaciones histológicas fueron posibles a partir del año 1600, cuando se incorporó el recientemente inventado microscopio a los estudios anatómicos. Marcello Malpighi es el fundador de la histología y su nombre aún está ligado a varias estructuras histológicas.

La histología explica las interrelaciones entre las células, los tejidos y la estructura y la composición molecular de los órganos. Existen 4 tejidos fundamentales: tejido epitelial, tejido conjuntivo, tejido muscular y tejido nervioso (Geneser, 2002).

2.4.2 Métodos histológicos.

En general, los métodos histológicos se clasifican en dos grupos: los que se basan en la observación directa de células y tejidos vivos, y los que analizan material muerto o inanimado.

En todos los casos se comienza con el análisis microscópico, de importancia fundamental para todos los métodos histológicos. El microscopio es el instrumento más importante en la histología. Sobre la base del microscopio óptico común se han desarrollado varios microscopios especiales, cada uno de los cuales presenta ventajas y limitaciones específicas. Algunos microscopios utilizados son el de campo oscuro, de contraste de fase, de fluorescencia, de barrido confocal, de luz ultravioleta, microscopio electrónico de transmisión y de barrido, difracción de rayos x, entre otros.

En el estudio de células y tejidos se utiliza con mayor frecuencia el tejido muerto, que se mantiene mediante acciones químicas inmediatamente después de extraído y entonces se corta en secciones muy delgadas, denominadas *cortes histológicos*. Después de la tinción con distintos colorantes se observan los cortes con el microscopio óptico, dado que el mayor contraste entre los componentes tisulares permite diferenciarlos (Geneser, 2002).

2.4.3 Preparación de tejidos para microscopia óptica.

2.4.3.1 Fijación.

La fijación tiene la finalidad de evitar que se deforme y degenera la estructura de las células y tejidos y se endurezcan los tejidos blandos. Gran parte de esto se atribuye al hecho de que coagulan proteínas que abundan en las células (Guzmán, 1999).

Las células se matan con la fijación, para detener los procesos celulares dinámicos con la mayor rapidez posible y mantener la estructura con las mínimas modificaciones posibles. Esto se logra con la insolubilización de los componentes estructurales de la célula y la formación de enlaces cruzados, por la acción de distintos agentes químicos, los fijadores. En el proceso de fijación se estabilizan las proteínas, por que los fijadores favorecen la formación de enlaces cruzados entre las moléculas proteicas. De esta manera se mantienen todas las relaciones entre las estructuras como en la célula viva. Las proteínas solubles se unen a las estructurales y se transforman así en insolubles.

La fijación también produce la inactivación de algunas de las enzimas celulares, las cuales de otro modo iniciarían la auto-digestión o autólisis y conducirían a la degeneración post mortem. Además se eliminan algunas bacterias y otros microorganismos que podrían destruir el tejido (Geneser, 2002).

2.4.3.2 Inclusión y corte.

El tejido fijado se corta en secciones delgadas, que permiten el paso de la luz. La mayoría de los preparados para microscopía óptica tienen un espesor de alrededor de 5-10 μm , para lo que se requiere un micrótomo, instrumento para cortar. Para obtener la consistencia necesaria para poder cortar secciones tan delgadas es necesario incluir antes el tejido en un material que le confiera suficiente dureza. Las sustancias adecuadas para este fin, los *medios de inclusión*, son tipos de cera insolubles en agua, por lo general se utiliza parafina (Geneser, 2002).

La inclusión es la operación mediante la cual se hace penetrar en el tejido deshidratado un material solidificable semejante a la consistencia del tejido facilitando la ejecución de cortes finos ya que se conserva la posición original de cada uno de los elementos que integran los tejidos. Este procedimiento implica la *deshidratación*, *aclaración*, *infiltración* y *colado de bloques* (Estrada y col., 1982).

La *deshidratación* se hace de forma gradual, se pasa el tejido fijado por una serie de soluciones acuosas de etanol en concentraciones crecientes, hasta llegar a alcohol absoluto. El tejido se sumerge entonces en un líquido miscible en etanol y parafina, generalmente xileno, debido a que el alcohol no es un solvente de la parafina, a esta fase se le llama *aclaramiento*. En el aclaramiento se utiliza el xilol en cambios sucesivos, hasta substituir el alcohol por xilol. Se continúa con la *infiltración* donde se coloca el tejido en parafina líquida para que penetre en él disolviendo el xileno. Por último está el *colado de bloques*, donde al enfriar la parafina, se solidifica y forma junto con el tejido incluido un bloque sólido del que se obtendrán los cortes histológicos (Estrada y col., 1982).

2.4.3.3 Coloración.

La mayoría de los colorantes histológicos se utilizan en solución acuosa, por lo que los cortes incluidos en parafina deben ser desparafinados, mediante un tratamiento con xileno, y rehidratados. Por lo cual se pasan por concentraciones descendentes de alcohol hasta agua (Estrada y col., 1982).

La mayor parte de los métodos de tinción histológicos se desarrollaron en función de su capacidad para teñir selectivamente los distintos componentes tisulares. La tinción tiene como objetivo que las estructuras celulares y tisulares queden contrastadas y de esta forma se facilite la identificación. El método de tinción más utilizado es la combinación de hematoxilina y eosina (H-E), que tiñe los componentes nucleares de azul violáceo, mientras que casi todas las estructuras citoplasmáticas adquieren una tonalidad rosada. Con la técnica de Hematoxilina-Eosina nos situamos en el aspecto del tejido, y se pueden observar estructuras como: núcleo, citoplasma, forma y extensión de las células, límites celulares, sustancias producidas por las células y los límites que tienen los tejidos.

Después de la tinción, por lo general se deshidrata y se aclara nuevamente la muestra del tejido y entonces se monta, es decir, se cubre con una gota de medio de montaje transparente y se coloca un cubre objeto para proteger el preparado (Geneser, 2002).

2.5 Electroforesis.

La electroforesis es un método analítico semipreparativo en el que es posible separar biomoléculas en dependencia de su carga, peso molecular y estructura tridimensional bajo la acción de un campo eléctrico. Fue empleado por primera vez por *Tiselius* en el año 1937 (García-Pérez, 2000).

Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas. Se pueden conocer también las características ácido-básicas de las

proteínas presentes en un extracto crudo, y es útil para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas.

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en la electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible, forma geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado.

Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética como son: pH, fuerza iónica, temperatura, gradiente de potencial, tiempo de corrida (corridas muy cortas impiden que las muestras avancen el espacio necesario para su correcta separación, pero también se ha probado que tiempos de corrida cortos minimizan la dispersión de la muestra y el ensanchamiento de la banda), concentraciones de acrilamida y de bisacrilamida. La uniformidad de la temperatura a través del gel mientras ocurre la corrida electroforética generalmente elimina el efecto de la deformación de las bandas en forma de “sonrisa” (García-Pérez, 2000).

El sistema de electroforesis a emplear depende de los objetivos a alcanzar, los más empleados son gel uniforme y tampón homogéneo, y gel y tampón heterogéneo. La principal desventaja del primero, es que la resolución es menor porque no hay efecto concentrador en la primera parte de la corrida. En el sistema discontinuo o heterogéneo se varían el poro del gel y los iones del tampón, por lo que se puede concentrar la muestra (Sheer y col., 1990). En la actualidad es común que la electroforesis discontinua se realice con 2 tipos de geles, un gel concentrador (de poros grandes) y un gel separador (de poros pequeños). Esto se fundamenta en que los constituyentes iónicos de las soluciones tampones utilizadas en ambos geles son iguales, pero el pH de éstas y del tampón de corrida empleado en los electrodos es diferente.

La separación ocurre en el gel separador, donde la migración está determinada por la carga y el tamaño molecular de las partículas. Encima de este gel se sitúa el gel concentrador, generalmente de una menor altura (1/3 del gel separador), en el que la muestra se concentra en

una zona muy estrecha; lo que determina la separación en bandas finas en el gel separador y produce un alto poder de resolución (García-Pérez, 2000).

2.5.1 Electroforesis Desnaturalizante SDS-PAGE 1D.

La electroforesis con dodecilsulfato de sodio (SDS) es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para la determinación del peso molecular de las subunidades de proteínas. En general, el SDS-PAGE se emplea para estimar el peso molecular de las proteínas comparándose con un patrón.

El SDS desnaturaliza por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos).

El complejo SDS-proteína tiene forma de varilla con un diámetro aproximado de 18 Å y una longitud proporcional al peso molecular de la cadena polipeptídica. El tratamiento concomitante con un agente reductor de puentes bisulfuro, como el beta mercaptoetanol (β -ME) o el DTT desnaturaliza las proteínas y las rompe en las subunidades que la componen. Por lo que el complejo SDS-proteína tiene generalmente mayor densidad de carga y menor tamaño que las proteínas nativas.

2.5.2 Tinción en electroforesis.

Las proteínas coloreadas naturales como la mioglobina, hemoglobina, ferritina y citocromo C, pueden ser observadas directamente en los geles, sin embargo la visualización de la mayoría de las proteínas requiere el uso de colorantes. Los colorantes orgánicos fueron los que se emplearon primero para teñir proteínas en los geles de electroforesis. Un ejemplo de estos colorantes son el bromofenol azul y el azul de Coomassie.

Existen diferentes tipos de tinción, entre ellos la tinción con plata. Switzer y colaboradores presentaron la tinción con plata en 1979, una técnica que hoy en día constituye una herramienta muy sensible para la visualización de proteínas con un nivel de detección hasta de 0.3 a 10 ng (Switzer y col., 1979). Tiene la característica de producir generalmente coloraciones carmelita o negro, sin embargo algunas proteínas tienen colores característicos como las lipoproteínas que tienden a colorearse de azul y algunas glicoproteínas que aparecen amarillas, carmelitas o rojas. Este efecto cromático se ha demostrado que está dado por la difracción de la luz en la plata, ya que la detección de la proteína depende de la unión de los iones de plata con las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas, principalmente los grupos sulfhidrilo y carboxilo (Switzer y col., 1979; Oakley y col., 1980; Merrill y col., 1981, 1986), seguido de la reducción a plata metálica (Rabilloud, 1990, 1999).

La tinción con Coomassie puede emplearse para la determinación de proteínas cuando estas son abundantes, pero no para la determinación de pureza de proteínas trazas. Esta tinción requiere un medio ácido para la generación de la atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. La atracción iónica es a través de las fuerzas de Van Der Waals, que une a las proteínas y al colorante formando un complejo. Esta unión es totalmente reversible en condiciones apropiadas (García-Pérez, 2000).

2.5.3 Conservación de geles de electroforesis.

Notsu K. y Shiratori M. (1997), reportaron sumergir el gel después de la electroforesis en una solución de sacáridos, azúcares, alcoholes de más de 4 carbonos y polímeros solubles en agua; después se introduce éste entre 2 filmes de celofán transparentes y semipermeables colocado en forma de sándwich a ambos lados del gel o en uno y en el otro una lámina plástica. De esta forma los componentes acuosos del gel son reemplazados por los de la solución. Esto permite que el gel se seque, sin causar su ruptura, deformación, pérdida de la transparencia y sin necesidad de emplear calor o presión reducida ni ningún aparato especial. Se recomienda el empleo de un poliol como el glicerol como agente «húmedo» cuya función es además de actuar como un agente de restricción de la difusión, impide que el gel se seque por la evaporación durante la conservación, lo que evita su ruptura (García-Pérez, 2000).

2.5.4 Estimación de peso molecular.

El peso molecular (PM) de las proteínas puede determinarse en electroforesis al comparar las movilidades electroforéticas de varios marcadores de peso molecular conocido. Existen patrones (mezclas de proteínas de peso molecular conocido que se tiñen uniformemente) de varios rangos de peso molecular por lo que se debe aplicar el que abarque el peso molecular esperado para la proteína que se quiere determinar. Estos patrones deben ser tratados de manera similar a las muestras.

Para completar el estudio de peso molecular de proteínas, se ha reportado el análisis por espectrometría de masa por ionización en electroatomización (ESI-MS) para proveer de una determinación exacta del peso molecular de proteínas aisladas y no resueltas por SDS-PAGE (García-Pérez, 2000).

2.6 Determinación de concentración de proteína.

El reactivo de biuret detecta la presencia de proteínas, péptidos cortos y otros compuestos con dos o más enlaces peptídicos en muestras de composición desconocida. Es un método colorimétrico que permite determinar la concentración de proteínas de una muestra mediante espectroscopia ultravioleta-visible a una longitud de onda de 540 nm (para detectar el ión Cu^{2+}).

La reacción debe su nombre al biuret, una molécula formada a partir de dos de urea (Figura 8).

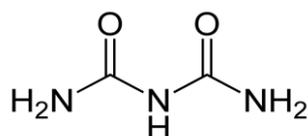


Figura 8. Reactivo de biuret.

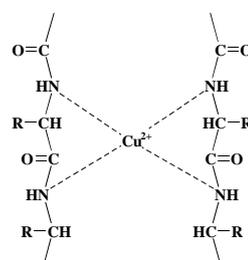


Figura 9. Complejo de coordinación.

El reactivo de Biuret contiene sulfato cúprico (CuSO_4) en solución acuosa alcalina (gracias a la presencia de NaOH o KOH). La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos (Figura 9).

2.7 Zimografía.

La zimografía o zimograma es una técnica electroforética que permite observar la actividad de las enzimas. Se realiza con geles de poliacrilamida y a diferencia de las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se trata de utilizar condiciones suaves, no desnaturizantes (sin agentes reductores), para evitar la pérdida de actividad de las enzimas estudiadas.

3. ANTECEDENTES.

3.1 Estudios histológicos del pepino de mar.

Existen pocos estudios de los tejidos de los pepinos de mar, sólo algunas especies han sido analizadas como *Holothuria leucospilota*, *H. forskali*, y *H. glaberrima*, *H. spinifera*, entre otras, y la mayoría de esos estudios histológicos se han enfocado principalmente a aspectos como regeneración celular, reproducción, enfermedades ó síndromes, y tubulos de Cuvier.

En el 2007, San Miguel y García, utilizaron la tinción con azul de toluidina para el análisis de la dermis, los músculos circulares y longitudinales, y el epitelio celómico de *H. glaberrima*. Como alternativa, emplearon marcadores fluorescentes para destacar los tejidos de interés (Figura 10) que fueron claramente identificados. Además, fueron capaces de analizar los cambios que se produjeron en las células y tejidos durante el proceso de cicatrización (4 semanas) utilizando la tinción con azul de toluidina, inmuohistoquímica y faloidina. Concluyeron que *H. glaberrima* emplea mecanismos celulares análogos durante la cicatrización de heridas y la regeneración de órganos.

Otro estudio en el cual se utilizaron técnicas histológicas, específicamente la tinción con hematoxilina y eosina (HE), fue el realizado por Howaida y col. (2004), donde se analizó el índice gonadal, morfología de túbulos e histología de las gónadas, para evaluar los estados de madurez del pepino de mar *Actinopyga mauritiana*. Se basaron en estudios previos de Sewell, 1992; Tuwo y Conand, 1992; Hamel y col., 1993; y Ramofafia y col., 2001; y se determinaron cuatro etapas de madurez: la etapa I - prematura o de recuperación; la etapa II -maduración, etapa III - madura y la etapa IV - postdesove (Figura 11).

Los resultados de estos investigadores indicaron, entre otras conclusiones, que *A. mauritiana* tiene un ciclo reproductivo anual en el Mar Rojo, que la gametogénesis ocurre en sincronía en ambos sexos, el período de actividad reproductiva óptima es entre primavera y verano, y que el sexo sólo puede ser identificado por medio de histología.

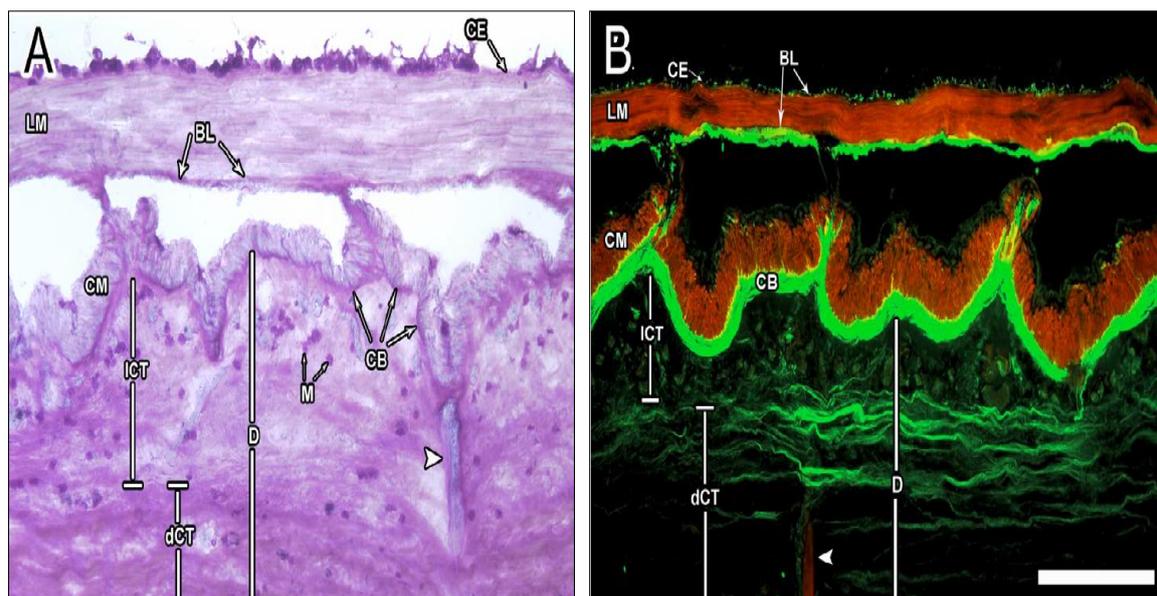


Figura 10. Organización de los tejidos del cuerpo de *Holothuria glaberrima*. Secciones longitudinales de la pared del cuerpo. (A) Tinción con azul de toluidina e (B) inmunofluorescencia indirecta con rodamina y faloidina (rojo) y anticuerpo monoclonal para el colágeno del holothurido (HgCol, verde). BL-lámina basal del epitelio celómico, CB-banda de colágeno, CE-epitelio celómico, CM-músculo circular, D-dermis, incluyendo el tejido conectivo laxo (ICT) y denso (dCT), LM-musculo longitudinal, M-mórulas. Barra de escala = 300 μ m.

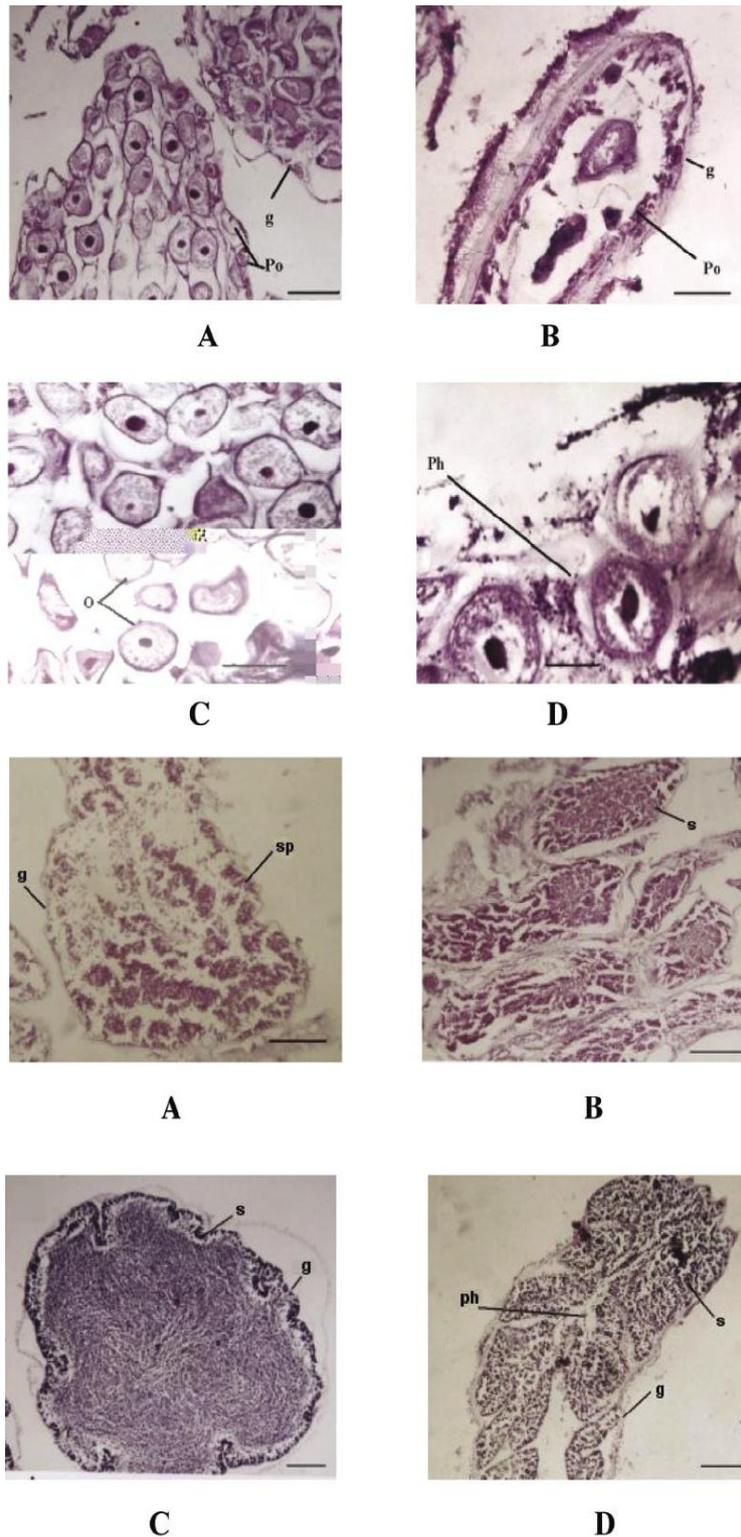


Figura 11. Etapas microscópicas del desarrollo de las gónadas femenina y masculina, respectivamente, de *Actinopyga mauritiana*: (A) Etapa I; (B) Etapa II; (C) Etapa III; (D) Etapa IV. g: pared gonadal; o: ovocitos maduros; ph: fagocitos; po: ovocitos previtelogenico; sp: espermatogénesis; s: espermatozoides maduros. Barra de escala = 100µm.

Por otro lado, la rápida expansión e intensificación de la acuicultura de pepino de mar ha dado lugar a la aparición de diversas enfermedades que causan graves pérdidas económicas, lo que puede convertirse en uno de los factores limitantes en el desarrollo sostenible de esta industria.

Por lo anterior se han realizado estudios epidemiológicos que han mostrado que los síndromes de la descomposición, úlceras en el estómago en la etapa de auricularia y autólisis de los pepinos jóvenes, son causadas por agentes bacterianos, mientras que la ulceración de la piel, la erosión de la epidermis y edema del cuerpo, son provocados por diversos patógenos como bacterias, hongos y parásitos durante el cultivo al aire libre. En muchos de estos estudios epidemiológicos se ha utilizado el análisis histopatológico. Por ejemplo, Wang y col., en el 2004, aislaron diferentes microorganismos causantes de enfermedades ó síndromes del pepino de mar *Apostichopus japonicus* e hicieron un análisis histopatológico utilizando la tinción Hematoxilina-Eosina. Reportaron la presencia de 2 bacterias denominadas LB-1 y LB-2 que causan el síndrome “*Rotting edges*” (*podrimiento de bordes*) en la etapa larvaria (Figura 12).

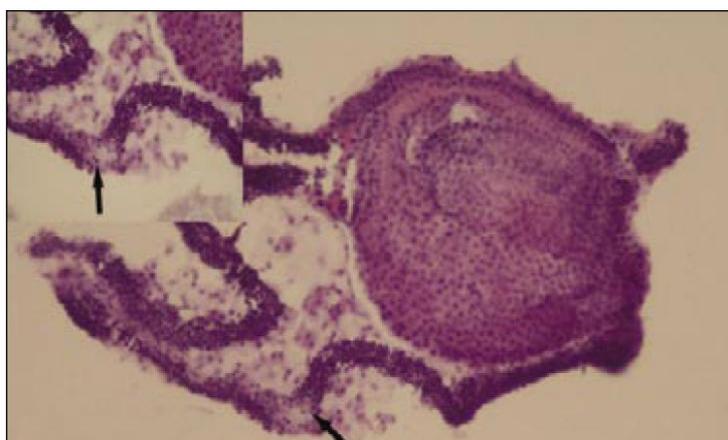


Figura 12. Tinción H-E en larva de un pepino de mar con el síndrome “rotting edges” (*podrimiento de bordes*). Los bordes se observan en púrpura oscuro. Las células afectadas muestran necrosis y se arrojan fuera de los tejidos.

También, detectaron en el tejido muscular (Figura 13) hifas de hongos y esporas, lo que llevo a la conclusión de que el hongo puede invadir la pared del cuerpo y crecer profundamente en los tejidos.



Figura 13. Esporas de hongos en el tejido muscular (flecha) de un pepino de mar.

Así mismo, en secciones histológicas del árbol respiratorio mostraron la presencia de un gran número de protozoos que dañaron el tejido epitelial (Figura 14).

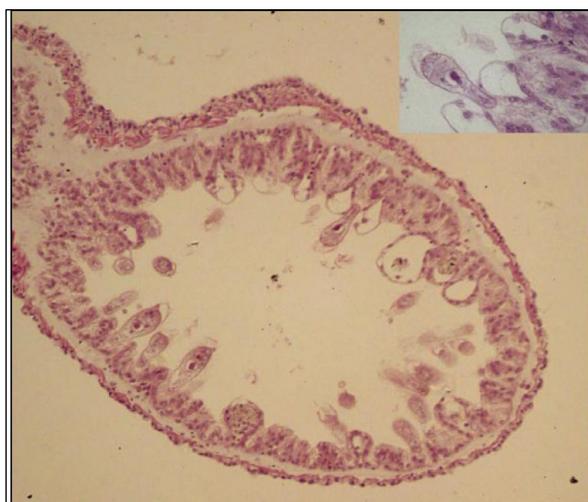


Figura 14. Secciones histológicas del árbol respiratorio de un pepino de mar con protozoos. Muestra un gran número de protozoos.

Las observaciones histológicas también demostraron que pueden existir gran cantidad de gusanos en zonas lesionadas de los tejidos de pepino de mar. Los gusanos ocuparon un gran espacio dentro de los tejidos y causaron la necrosis y la dispersión del músculo (Figura 15).

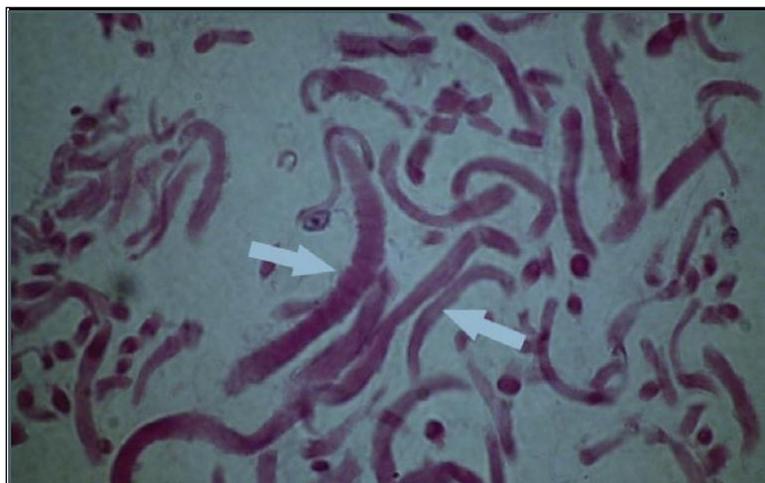


Figura 15. Secciones histológicas de piel de un pepino de mar infestada con platelmintos. Muestra la infestación de gusanos del *Phylum Platyhelminthes* (flechas) en el tejido muscular. (Tinción H-E, 1000 ×).

En resumen, pudieron observar que entre los agentes patógenos, las bacterias son el agente etiológico más importante, mientras que los parásitos y los hongos son considerados como agentes secundarios.

Por otra parte, los túbulos de Cuvier expulsados por los pepinos de mar, poseen gran adhesividad y fuerza de alta resistencia que permite enredar e inmovilizar a los depredadores potenciales. Esto ha sido estudiado por varios científicos con el objetivo de dilucidar los mecanismos biológicos de los pepinos de mar y darle una aplicación práctica a este material adhesivo.

Pruebas histoquímicas realizadas a los túbulos de Cuvier de las especies *Holothuria leucospilota* (Endean, 1957) y *Holothuria forskali* (Vanden y Jangoux, 1987) indican que el material encerrado en los gránulos secretorios de las células adhesivas del epitelio exterior (mesotelio) tiende a ser proteínico.

DeMoor y col., en el 2003, basados en lo reportado por Vanden y Endean, realizaron estudios de histología (Figura 16) y localización inmunocitoquímica de los componentes de los túbulos de Cuvier de *H. forskali*.

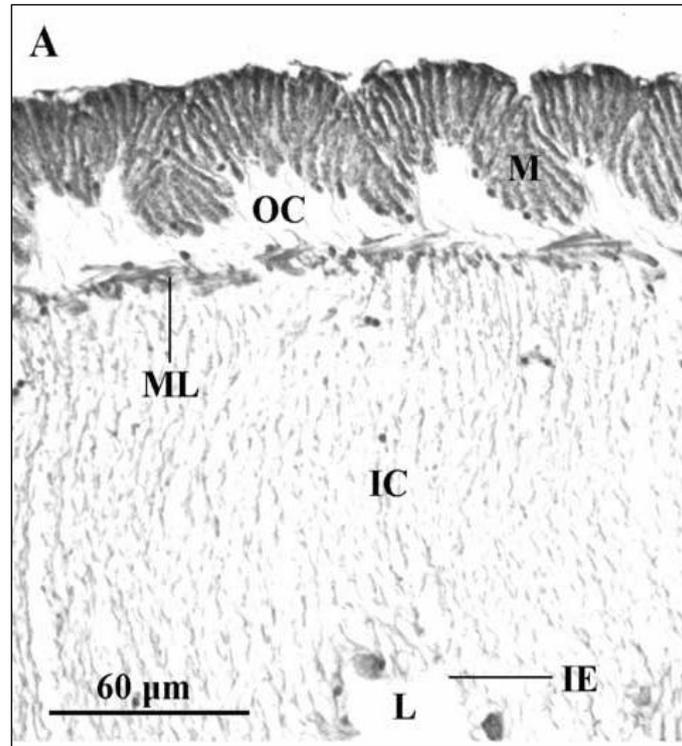


Figura 16. Histología de túbulos de Cuvier de *Holothuria forskali*. A: Sección longitudinal de la pared de un túbulo fijado en líquido de Bouin y teñido con azul de Alcian-hemalumbre de Mayer-floxina. IC-interior de la capa de tejido conectivo (epitelio interno); L-luz; M-mesotelio; ML-capa muscular; OC-capa externa de tejido conjuntivo.

3.2 Caracterización de proteasas del pepino de mar.

Existen pocos estudios reportados sobre la caracterización de las proteasas presentes en los diferentes órganos de los pepinos de mar.

Entre las pocas especies estudiadas esta el *Stichopus japonicus*, las enzimas crudas extraídas de su tracto digestivo muestran una gran actividad caseinolítica y ácida. A un pH ácido de 2.0 y 5.0 se encuentran proteasas con actividad similar a las pepsinas y también tienen actividad proteolítica alcalina a pH de 8.0 y 13.5.

Tanto para la proteasa ácida de pH 2.0 como la alcalina de pH 13.5 se mostró gran resistencia a la desnaturalización por temperatura. Mientras que las proteasas de pH de 5.0 y 8.0 mostraron ser más sensibles a la temperatura. Por otro lado se caracterizaron estas enzimas con inhibidores, estos estudios sugieren que también se encuentra una serín proteasa probablemente una colagenasa que se encuentra en el tracto digestivo. Esta enzima mostró una actividad similar a las actividades de las tripsinas y crimotripsinas, en un rango de pH de 7.0 a 10.0 con poca estabilidad térmica (Yoshinaka y col., 1986; Roy y col., 1996). Otra enzima identificada en el tracto digestivo, es una metaloproteasa con pH óptimo de 13.5, peso molecular de 20.6 kDa y con gran estabilidad térmica. En el rango de pH de 8.0 a 13.5 se encontraron tres proteasas de pesos moleculares de 20.6, 39.1, 114.1 kDa (Fu y col., 2005).

DeMoor y col., 2003, estudiaron el origen celular y la composición del material adhesivo de los túbulos de Cuvier de *Holothuria forskali*. Estos investigadores determinaron que se compone de 60 % proteínas y 40 % carbohidratos, una composición única entre las secreciones de material adhesivo de invertebrados marinos. Además, el análisis electroforético reveló que la fracción soluble de este material, contiene cerca de 10 proteínas con pesos moleculares aparentes que van desde 17 hasta 220 kDa y de composiciones similares de aminoácidos, ricos en glicina (16–22%) y residuos ácidos (19–22%).

Lo anterior fue contrastado con las pruebas histoquímicas realizadas por Endean (1957) donde se estudiaron los túbulos de Cuvier de *H. leucospilota*, y se indicó que el material encerrado en los gránulos secretorios de las células granulares estaba compuesto mayormente de tirosina y residuos básicos (lisina, histidina, y arginina). Por lo que se concluyó que se sugiere la presencia de otras proteínas en la fracción insoluble del material adhesivo de los túbulos de Cuvier de los pepinos de mar.

Así mismo, se ha estudiado la influencia que tienen diferentes reactivos en la tenacidad de los túbulos de Cuvier de *H. forskali* dando como resultado sistemático que la adhesividad se ve reducida por varias enzimas proteolíticas (Zahn y col., 1973; Müller y col., 1972). Entre ellas, las más potentes son, en orden decreciente, carboxipeptidasa A, quimotripsina, y tripsina, demostrando la presencia de residuos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y residuos básicos (lisina y la arginina).

4. JUSTIFICACIÓN.

El pepino de mar es una especie rica en principios activos que podrían ser utilizados eficientemente en el tratamiento de enfermedades y en el desarrollo de nuevos productos alimentarios y farmacéuticos. Además, la actividad de las proteasas extraídas de organismos marinos es considerablemente alta y poseen características particulares que pueden ser aprovechadas eficientemente en la industria.

Debido a que el pepino de mar es un recurso potencial poco explotado para beneficio nacional, aunque seriamente amenazado que se exporta de forma ilegal, es necesario aportar información relevante sobre las posibilidades de utilización de algunos principios activos de estos organismos, específicamente, *Isostichopus fuscus* y *Holothuria impatiens* (Figura 17), para incentivar su protección y producción.

Demostrando las características *sui generis* de las proteasas presentes en estas especies y su relación con determinados tejidos, se contribuirá al conocimiento básico de la actividad y función de estas enzimas, esperando sentar las bases para posteriores estudios estructurales.

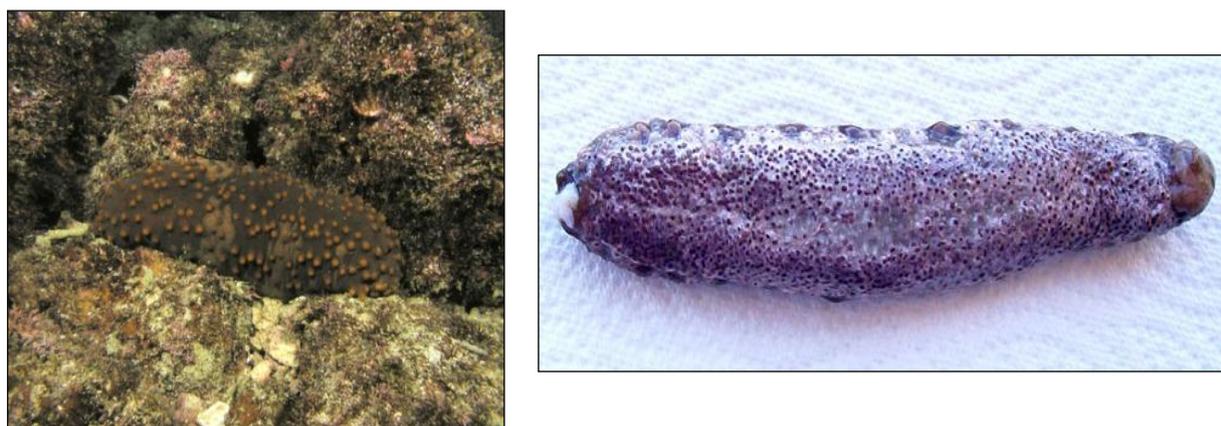


Figura 17. Pepino café, *Isostichopus fuscus* y Pepino cuello de botella, *Holothuria impatiens*.

5. HIPÓTESIS.

Se cree que en algunas zonas anatómicas de los pepino de mar *Isostichopus fuscus* y *Holothuria impatiens*, principalmente donde se encuentra el tracto digestivo, existe una gran cantidad de enzimas con alta actividad proteolítica.

6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo General.

Identificar y caracterizar las proteasas presentes en diferentes partes anatómicas u órganos de los pepinos de mar *Isostichopus fuscus* y *Holothuria impatiens* por medios histológicos y enzimológicos.

6.2 Objetivos Específicos.

- Caracterizar varias regiones anatómicas u órganos del pepino de mar por métodos histológicos.
- Obtener un extracto enzimático primario de diferentes partes anatómicas u órganos del pepino de mar.
- Determinar la actividad enzimática de las proteasas a diferentes pH.
- Estimar los pesos moleculares de las proteasas por medio de electroforesis.
- Detectar la actividad proteolítica y la posible presencia de otras enzimas por medio de zimografía.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Obtención de materia prima.

Los pepinos de mar *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) y *Holothuria impatiens* (Forskaal, 1775) se obtuvieron del Mar de Cortés, en las costas de Sonora, en el sitio conocido como Guano ($28^{\circ} 42' 48.60''$ N, $112^{\circ} 17' 22.81''$ W), al este de la isla Dátil y al sur de la isla Tiburón (Figura 18). Se colectaron especímenes adultos de entre 5 y 7 años de edad aproximadamente de 27 a 30 cm de largo (Reyes, 1997) a profundidades que oscilaron entre los 3 y 15 m (entre las 12 y 16 horas). La recolección y gestión de permisos de la misma corrió a cargo de investigadores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) A.C., Hermosillo, Sonora, particularmente del laboratorio de la Dra. Belinda Vallejo, con quienes se tuvo una amplia colaboración. Se utilizaron 6 pepinos de mar, 5 ejemplares de *I. fuscus* y 1 de *H. impatiens*.



Figura 18. Mapa de las islas Tiburón y Dátil, frente a las costas de Sonora.

Los pepinos de mar se encontraron mayormente posados sobre un arrecife que inicia a los 2 - 3 m de profundidad, dentro de cuevas y algunos menos en parches de arena. La especie *I. fuscus* fue la más abundante. En la parte más somera del arrecife se encontraron abundantes parches de sargazo (*Sargassum sp.*) y por toda la pared rocosa había parches de coral y arena. Los gorgonidos (Gorgonacea) o corales córneos, son abundantes y a partir de los 10 m se encontró coral negro (*Antipathes galapagensis*).

7.2 Obtención de tejidos del pepino de mar.

Los pepinos de mar (*I. fuscus* y *H. impatiens*) fueron cortados por el eje anteroposterior para extraer cuidadosamente sus órganos (Figura 19). En algunos casos no presentaron completos sus órganos debido a una evisceración previa causada por estrés, lo que es común en estos organismos (Ginger y col., 2001).

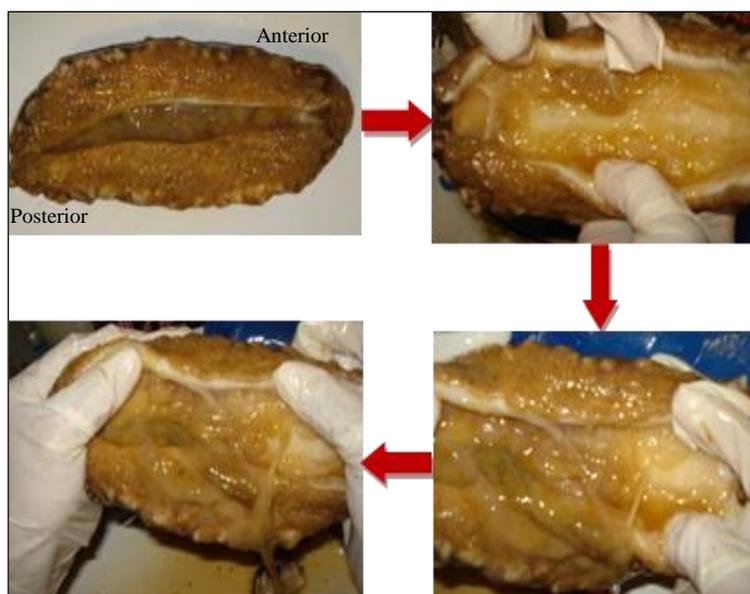


Figura 19. Corte en el eje anteroposterior y extracción de órganos del pepino de mar. *I. fuscus*.

Se tomaron las siguientes partes anatómicas y órganos del pepino de mar para su análisis: podios de la cavidad oral o tentáculos (Figura 20), estructuras internas, árbol respiratorio, tracto digestivo (Figura 21) y diferentes regiones de la piel (Figura 22) (anterior ventral y dorsal; media ventral y dorsal; posterior ventral y dorsal; y piel externa e interna).



Figura 20. Podios de la cavidad oral o tentáculos de *I. fuscus*.

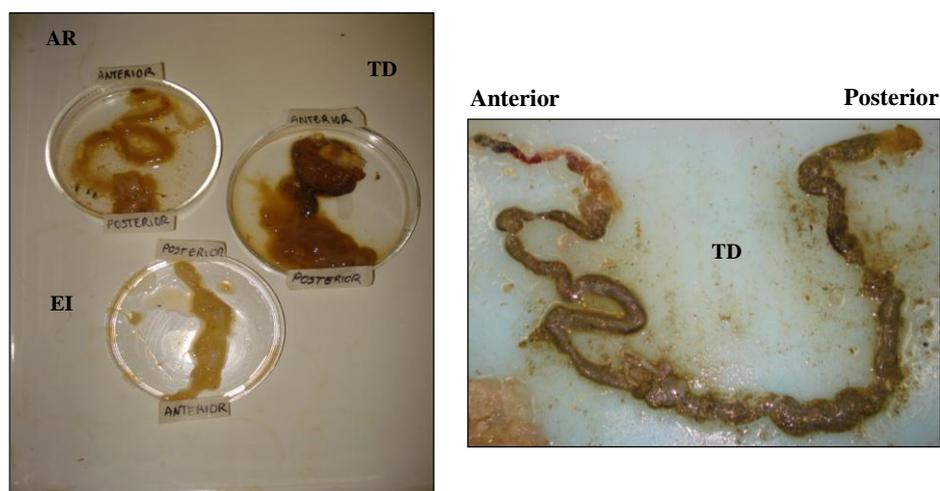


Figura 21. Árbol respiratorio (AR), tracto digestivo (TD), estructuras internas (EI) de *I. fuscus*.

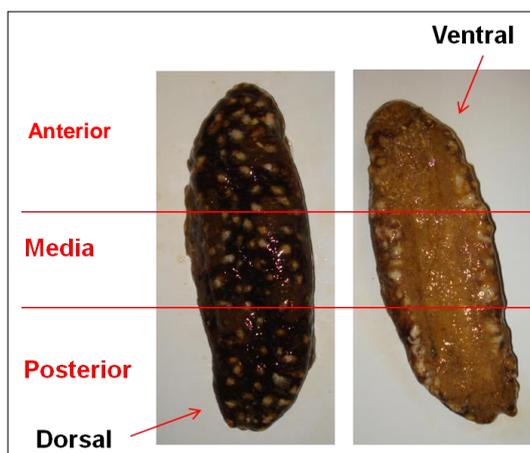


Figura 22. Diferentes regiones de la piel de *I. fuscus*.

Además, se extrajeron las mandíbulas (Figura 23) y se tomaron muestras de las espículas (Caso, 1961) de los pepinos para tener el antecedente de la familia y especie a la que pertenecen.



Figura 23. Mandíbulas de *I. fuscus* y *H. impatiens*.

7.3 Histología.

Una vez obtenidas las muestras de los diferentes tejidos de los pepinos de mar, se llevó a cabo el siguiente protocolo para obtener una preparación histológica y hacer el análisis en el microscopio óptico.

7.3.1 Fijación de tejidos.

Se colocaron las muestras de los tejidos en recipientes de vidrio (bien cerrados) con una solución fijadora de alcohol al 70% durante 24 horas para su correcta fijación.

7.3.2 Preparación y etiquetado de muestras.

Las muestras fijadas de los tejidos de interés se colocaron en cassettes para histología Histosette (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania) (Figura 24), previamente etiquetados. Para conservar los cassettes, se sumergieron en una solución de alcohol al 70% ya que es importante que el tejido no se seque ya que se deteriora.



Figura 24. Cassettes para histología.

7.3.3 Inclusión: secuencia de deshidratación, aclaración, infiltración y colado de bloques.

Los cassettes se colocaron en un procesador automático de tejidos Leica, modelo TP 1020 (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania) (Figura 25), el cual sirve para la fijación, deshidratación, aclaración y finalmente la infiltración con parafina líquida en las muestras histológicas.



Figura 25. Procesador automático de tejidos LEICA.

La secuencia para la inclusión y los tiempos estandarizados fueron los siguientes:

Tabla 5. Inclusión en parafina: Secuencia de Deshidratación, Aclaración e Infiltración.

REACTIVO	DURACIÓN	ESTACIÓN
<i>Deshidratación</i>		
Alcohol 50%	1 h	1
Alcohol 60%	1 h	2
Alcohol 70%	1 h	3
Alcohol 80%	1 h	4
Alcohol 96%	1 h	5
Alcohol absoluto	1 h	6
<i>Aclaración</i>		
Alcohol absoluto-Xileno	30 min	8
Xileno	40 min	9
<i>Infiltración</i>		
Parafina-Xileno	15 min	10
Parafina I	1 h	11
Parafina II	1 h	12

* Datos técnicos importantes del Procesador automático de tejidos Leica.
 - Volumen mínimo y máximo de cada contenedor: 1.2 - 1.5 L.
 - Cesta porta muestras con capacidad máxima de 80 cassettes.

Concluida la inclusión en parafina, se continuó con el colado de bloques en un incluidor Leica modelo EG1140C (Figura 26), donde cada tejido incluido se colocó en un molde, con ayuda de pinzas de punta plana, de modo que el tejido quedó en dirección del corte requerido, ya sea de forma longitudinal o transversal, se llenó con parafina líquida, previamente calentada a 65-70 °C y se colocó encima la tapa del cassette histosette.

Finalmente, se enfrió a 4 °C en un solidificador Leica modelo EG1140H (Figura 27). Cuando se endureció la parafina se desprendió el bloque del molde y se conservó en un lugar fresco hasta ser cortado en el micrótopo.



Figura 26. Incluidor LEICA.



Figura 27. Solidificador LEICA.

7.3.4 Cortes histológicos en micrótopo.

Se utilizó un micrótopo rotatorio Microm, modelo HM 315 (Thermo Fisher Scientific Inc., Walldorf, Alemania) (Figura 28), el cual es un instrumento de alta eficiencia para técnicas en parafina en estudios de laboratorio. Los cortes realizados fueron de entre 7 a 12 μm de grosor colocándose en portaobjetos. La finalidad es obtener cortes lo suficientemente delgados para que puedan ser atravesados por la luz para ser observados y analizados en el microscopio óptico una vez teñidos.

El procedimiento detallado fue el siguiente:

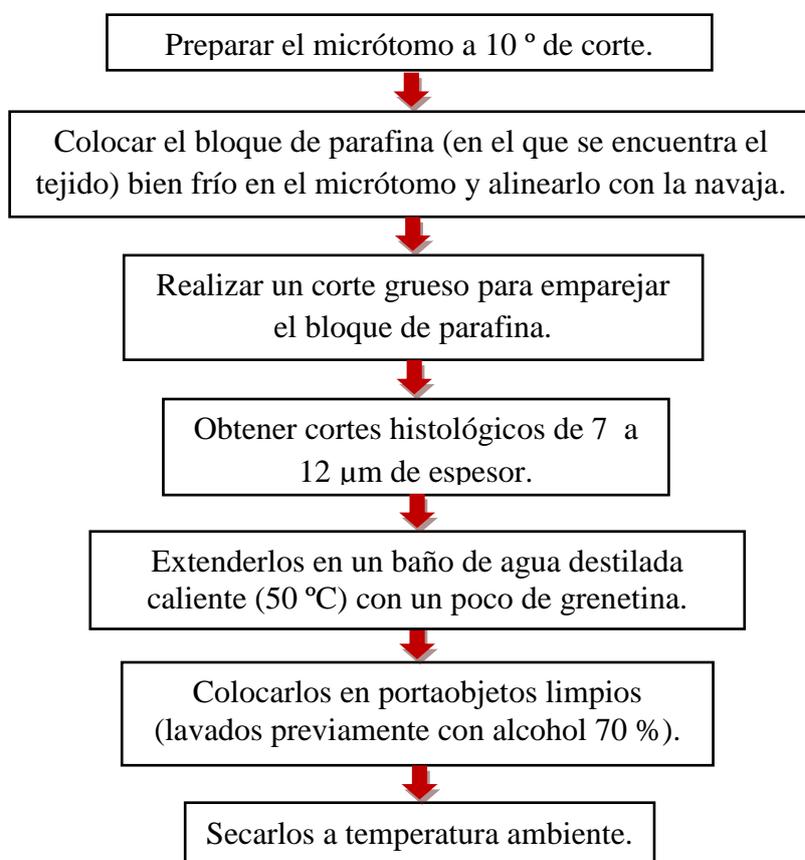


Figura 28. Micrótopo rotatorio MICROM.

* Datos técnicos importantes del Microtopo Microm HM 315:

- Corta secciones en un rango de 0.5 µm a 60 µm.
- Rango de temperatura: -20 °C a 50 °C.

7.3.5 Desparafinación de cortes y tinción Hematoxilina-Eosina.

Los cortes se secaron en la estufa a 58 °C durante 1 hora para adherir el tejido al portaobjetos y se sumergieron en los siguientes reactivos respetando rigurosamente los tiempos estandarizados marcados en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencia y tiempos para la desparafinación y tinción con Hematoxilina-Eosina.

REACTIVO	DURACIÓN
<i>Desparafinación</i>	
Xileno I	2.5 min
Xileno II	2.5 min
Alcohol absoluto I	2.5 min
Alcohol absoluto II	2.5 min
Alcohol 96% I	2.5 min
Alcohol 96% II	2.5 min
Alcohol 70%	5 min
Agua destilada	5 min
<i>Tinción Hematoxilina-Eosina</i>	
Hematoxilina	*10 min
Alcohol ácido (alcohol 96%, HCl 1%)	5 a 10 sumergidas.
Agua corriente	2 min
Agua amoniacal	2-3 s
Agua destilada	10 min
Alcohol 80%	2 min
Eosina	*5 min
Alcohol 96% I	2.5 min
Alcohol 96% II	2.5 min
Alcohol absoluto I	2.5 min
Alcohol absoluto II	2.5 min
Alcohol-Xileno	2.5 min
Xileno I	2.5 min
Xileno II	2.5 min

* Los tiempos fueron adecuados a los tejidos del pepino de mar.

Una vez teñidos los cortes, se montaron en resina sintética disuelta en xileno, se cubrieron con cubreobjetos cuidando que no quedaran burbujas sobre el corte histológico y se dejaron secar a temperatura ambiente durante un mínimo de 5 horas.

7.3.6 Observación en microscopio óptico y selección de fotografías.

Finalmente, los cortes histológicos teñidos se observaron en un microscopio óptico con cámara digital acoplada marca Leica, utilizando objetivos de 10x, 40x, y 63x, así como un acercamiento de 1.4. Posteriormente, fueron seleccionadas las fotografías más representativas de cada parte anatómica u órgano estudiado de los pepinos de mar. Se utilizó el programa Adobe Photoshop CS4 para tener mayor calidad de imagen en las fotografías seleccionadas.

7.4 Enzimología.

7.4.1 Obtención del extracto enzimático.

Se colocaron 10 g de muestra de cada una de las partes anatómicas u órganos mencionados (pag. 62) en 20 mL de amortiguador de fosfatos de sodio 20 mM, pH 7, a 4 °C, posteriormente se homogenizaron y se centrifugaron a 4,000 rpm. durante 30 minutos en una centrifuga Eppendorf modelo 5810 R con un rotor F-34-6-38 (Eppendorf International, Hamburgo, Alemania). Por último, se decantó el sobrenadante y fue utilizado en las determinaciones de actividad proteolítica y concentración de proteína (García-Barrientos, 2001).

7.4.2 Preparación de sustratos.

7.4.2.1 Preparación de hemoglobina al 1%.

El método de hemoglobina para la estimación de proteasas se basa en que la hemoglobina desnaturalizada es digerida bajo condiciones estándar por las enzimas proteolíticas, mientras que la hemoglobina no digerida es precipitada con ácido tricloroacético, la cantidad de proteína no precipitada son los productos los cuales son una medida de la cantidad de proteasas presentes (Anson, 1938). La hemoglobina, a diferencia de la caseína y la gelatina, es un sustrato reproducible. Aún cuando los péptidos están presentes al adicionar proteasas, la formación de productos no precipitables por ácido tricloroacético es

mejor que con las proteasas solas. Los métodos de hemoglobina se han descrito para pepsina, tripsina, papaína, y catepsina (Anson, 1938).

En este estudio, el sustrato de hemoglobina se preparó de acuerdo a la técnica de Anson (1938) descrita por Ouali y Valin (1980). La hemoglobina, se preparó en una solución de ácido bórico 0.025 M, ácido fosfórico 0.025 M y ácido acético 0.25 M, ajustado a un pH de 4, la mezcla se calentó y agitó en un baño maría por 20 minutos a 60 °C. Posteriormente, se dejó enfriar y se almacenó a 4 °C.

7.4.2.2 Preparación de caseína al 1%.

La actividad proteasa alcalina se determinó siguiendo el método de Kunitz (1947). Se preparó caseína al 1% de acuerdo a la técnica de Kunitz reportada por Yamaguchi y col., (1983) en un amortiguador de fosfatos 20 mM (fosfato de sodio dibásico y fosfato de sodio monobásico), pH 7, calentándose a 60 °C con agitación por 20 minutos. A continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C.

7.4.3 Determinación de concentración de proteína.

Para determinar la concentración de proteína de cada uno de los órganos estudiados se agregó 1 mL de extracto enzimático a 3 mL de reactivo de biuret, se dejó reaccionar 20 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650. Se utilizó una curva patrón de albumina de bovino para la determinación de concentración de proteína donde la ecuación de la recta fue $y = 0.059 x$; $R^2 = 0.989$.

7.4.4 Determinación de actividad proteolítica y actividad específica.

Se determinó la actividad proteolítica endógena de las proteasas de las siguientes partes anatómicas u órganos: podios de la cavidad oral o tentáculos (Figura 20), estructuras internas, árbol respiratorio, tracto digestivo (Figura 21) y diferentes regiones de la piel (Figura 22)

(anterior ventral y dorsal; media ventral y dorsal; posterior ventral y dorsal; y piel externa e interna).

Se clasificaron las proteasas de acuerdo al pH de actividad en ácidas y básicas, determinándose por los métodos de Anson y Kunitz, respectivamente.

La caseína precipita a un pH de 4.44 a 5.77, siendo su pH de 6.50-6.85 (Park y col., 2007), por lo que se decidió realizar las pruebas de actividad enzimática con hemoglobina para pH de 2-5 y caseína para pH de 6-10.

Se obtuvieron los extractos enzimáticos bajo condiciones no desnaturizantes, considerando una relación de 1:2, tejido:búfer de fosfatos 20 mM, pH 7. Se colocaron 250 µL de extracto y 1 mL del sustrato correspondiente, se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo con 200 µL de ácido tricloroacético al 50 %, el cual precipita tanto al sustrato sin degradar como a la enzima, mientras que los péptidos resultantes de la proteólisis se mantienen estables en la solución (Anson, 1938). Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 2,000 rpm. en una microcentrifuga Bio-Rad modelo 14K (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) y se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Fullerton, California).

La actividad proteolítica se definió como Unidad de Actividad Proteolítica (UAP) por mL de extracto enzimático, mediante la ecuación: **Actividad proteolítica = UAP/mL** (Yamaguchi y col, 1983). Donde UAP se define como la cantidad de enzima que produce un cambio de 0.001 en la absorbancia ó densidad óptica a 280 nm por minuto bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Por lo tanto:

$$\text{UAP} = [\text{Abs}_{280\text{nm}} * \text{dilución}] / [(0.001)(\text{tiempo de reacción en min.})]$$

Los resultados fueron reportados en actividad específica definida como Unidad de Actividad Proteolítica por mg de proteína soluble (UAP/mg).

7.4.5 Análisis de los pesos moleculares de las enzimas de los extractos.

Para determinar el peso molecular aparente de las enzimas se realizaron electroforesis bajo condiciones desnaturizantes, y para seguir el proceso de separación relacionado con la actividad enzimática se realizaron electroforesis bajo condiciones no desnaturizantes acoplada a una técnica de zimografía (García-Barrientos, 2001).

Las muestras de extractos fueron evaluadas electroforéticamente de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Se realizaron electroforesis (desnaturizantes y no desnaturizantes) discontinuas con geles de poliacrilamida, 12 % para el gel de separación y 4 % para el gel de concentración. El equipo utilizado fue un Mini-Protean III de Bio-Rad (Reichmond, California), empleando un marcador Sigma VII-L (14-70 kDa) de mediano peso molecular.

7.4.5.1 Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE 1D.

Para este fin se emplearon geles unidimensionales de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturizantes. Por ende, se prepararon las siguientes soluciones:

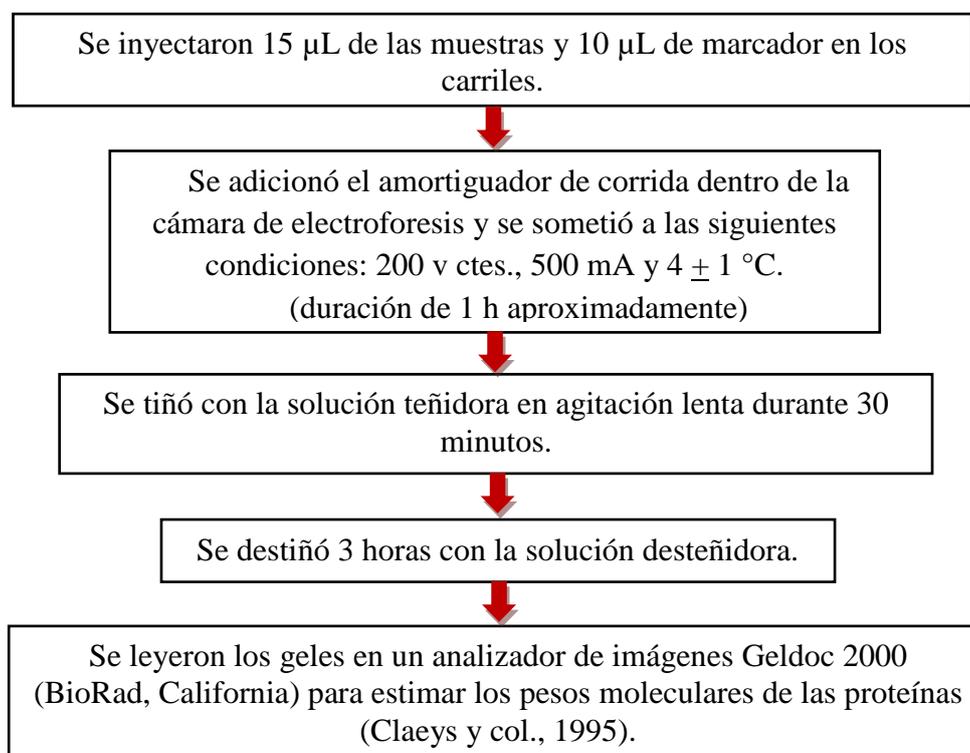
- A) Acrilamida/bis (30 % T, 2.67 % C).
- B) Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8.
- C) Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.
- D) Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %.
- E) Amortiguador muestra: SDS al 10 %, mercaptoetanol al 5 %, azul de bromofenol al 0.05 %, glicerol al 10 % y Tris-HCl 0.5M, pH 6.8.
- F) Amortiguador de corrida pH 8.3: Tris base al 1.5 %, glicina al 0.7 % y SDS al 0.5 %.
- G) Solución teñidora: Azul de Coomassie R-250 al 0.1 %, metanol al 40 % y ácido acético al 10 %.
- H) Solución desteñidora: metanol al 40 % y ácido acético al 10 %.

Una vez preparadas las soluciones correspondientes, se trataron las muestras de cada una de las partes anatómicas u órganos estudiados. En cada caso, se agregó 250 μL de extracto enzimático a 750 μL de amortiguador muestra y se colocó en baño maría con ebullición durante 1 minuto. Posteriormente se preparó el gel de separación Tris 0.375 M, pH 8.8 y el gel de concentración Tris 0.125 M, pH 6.8 como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición de los geles de separación y concentración para electroforesis desnaturante (SDS-PAGE).

	GEL DE SEPARACIÓN	GEL DE CONCENTRACIÓN
Agua destilada	3.35 mL	6.1 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 mL	-----
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-----	2.5 mL
SDS 10%	100 μL	100 μL
Acrilamida/bis	4.0 mL	1.3 mL
Persulfato de amonio 10%	100 μL	100 μL
TEMED	50 μL	50 μL

Una vez listos los geles se siguió la siguiente metodología:



7.4.5.2 Electroforesis no desnaturalizante PAGE 1D.

En la electroforesis no desnaturalizante se separan las proteínas en su estado nativo (García, 2000). La metodología para llevar a cabo esta electroforesis fue muy similar a la mencionada anteriormente con ligeras modificaciones. Se prepararon las soluciones anteriores, excepto el dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %, además, el amortiguador muestra se preparó sin β -mercaptoetanol y SDS. Una vez listas las soluciones, se prepararon las muestras colocando 250 μ L de extracto enzimático y 750 μ L de amortiguador muestra y sin tratamiento térmico. El gel de separación Tris 0.375 M, pH 8.8 y el gel de concentración Tris 0.125 M, pH 6.8, se prepararon sin SDS y se continuó con el mismo procedimiento pero con las siguientes condiciones de corrida: corriente constante de 30 mA, voltaje 200 v y temperatura de 4 ± 1 °C. La duración de la corrida fue de aproximadamente 3 horas.

7.4.6 Detección de actividad proteolítica.

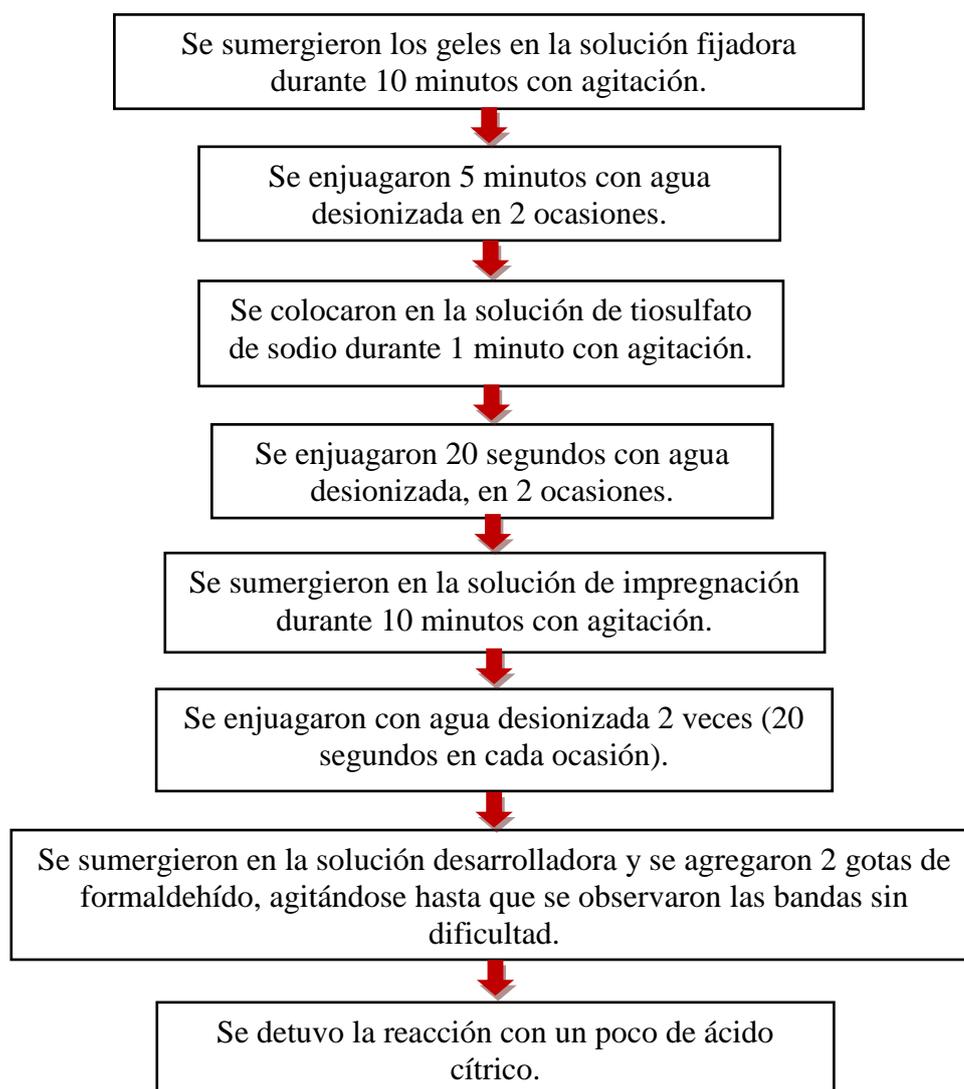
Para realizar los zimogramas, se realizaron electroforesis no desnaturalizantes (García-Barrientos, 2001); al término de ésta, se sumergieron los geles de poliacrilamida en una solución de caseína al 2 % en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, durante 1 hora a 4 °C. Después, se incubaron por 2 horas a 37 °C, se enjuagaron con agua destilada y se colocaron 2 horas más en la solución teñidora azul de Coomassie R-250 al 0.1 % con agitación lenta. Finalmente, se destañaron con la solución desteñidora (40 % metanol / 10 % Ácido acético) hasta que se observaron claramente las bandas de proteínas.

7.4.7 Detección de proteasas traza.

Para la detección de proteasas en concentraciones de ng se llevó a cabo la tinción con plata siguiendo la técnica reportada por Neuhoff y col. (1988). Se prepararon las siguientes soluciones (Anexo 16):

- 1) Solución fijadora.
- 2) Solución de tiosulfato.
- 3) Solución de impregnación.
- 4) Solución desarrolladora.
- 5) Ácido cítrico 2.3 M.

Posteriormente, se realizó el siguiente procedimiento:



7.4.8 Diseño experimental y análisis estadístico.

Se analizaron por separado las actividades enzimáticas de *Isostichopus fuscus* y *Holothuria impatiens* para cada pH (2-10). Las muestras se asignaron en un diseño totalmente al azar. Para cada especie y pH, la fuente de variación fue la región anatómica u órgano estudiado, y la variable de respuesta la actividad específica expresada como Unidades de Actividad Proteolítica (UAP) por mg de proteína.

Los resultados se sujetaron a análisis de Varianza y a comparación múltiple de Duncan (Anexo 17) empleando el paquete estadístico NCSS (Number Cruncher Statistical System) (Fu y col., 2005).

Todos los análisis cuantitativos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar (DE) de las determinaciones.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

8.1 Histología.

El análisis histológico de las dos especies estudiadas permitió caracterizar la piel de la región anterior, media y posterior, así como los tentáculos ó podios de la porción oral y estructuras internas como el tracto digestivo y árbol respiratorio.

8.1.1 Piel de pepino de mar.

La piel de los holoturidos mostró diferentes capas a través del cuerpo: epitelios dérmicos y una densa capa de tejido conectivo entre otras, este último, también llamado tejido conjuntivo el cual se encarga de la unión y soporte (Herrera, 1994; Cowden, 1968).

En los cortes histológicos de *Isostichopus fuscus*, se observaron agregados celulares llamados cuerpos cafés con funciones digestivas (CD) alrededor de células dañadas, de material extraño o posibles agentes patógenos nombrados “inclusiones” en este trabajo (Figura 29). El análisis histológico de la piel en *Holothuria impatiens*, fue análogo (Figuras 30, 31 y 32).

8.1.2 Tentáculos ó podios de la cavidad oral del pepino de mar.

Los organismos estudiados se alimentan generalmente del fondo o alimento suspendido, las bacterias y diatomeas constituyen su principal alimento. Las papilas de los tentáculos presentan diferentes tipos de células, algunas de ellas en el tejido conectivo, otras en formas vesiculares ó en agregados de varias inclusiones (Figura 33). Las inclusiones observadas en los tentáculos orales también presentan formas ovoides y esféricas, que eventualmente podrían tratarse de formas parásitas enquistadas. En las dos especies se observaron éstas inclusiones, además de células con aparente actividad digestiva y gránulos secretorios (Figura 33). En *I. fuscus* se encontraron restos alimenticios como algas. Se sabe que se alimentan de algas o microalgas como *Rhodomonas* y *Dunaliella* (Calva, 2002).

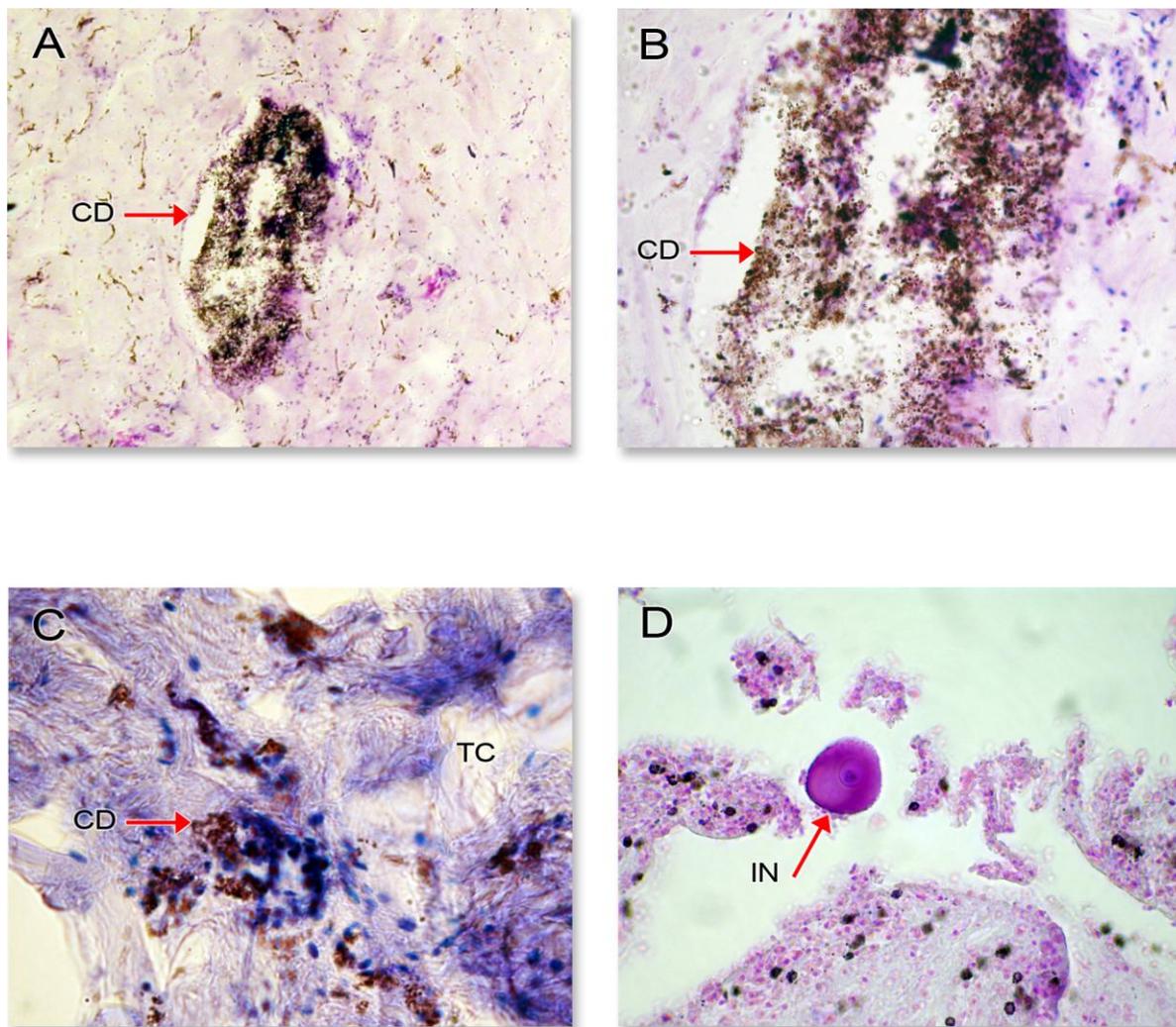


Figura 29. Secciones histológicas de la piel de *Isostichopus fuscus*. En A, agregado de células con actividad digestiva (CD) visualizadas en coloración café oscuro, 100X, y en B, un acercamiento del agregado mostrando los gránulos secretorios (CD), 400X. En C, imagen de la piel con abundante tejido conjuntivo (TC) y células con actividad digestiva, 630X. En D, presencia de una inclusión (IN) con tinción basófila, 400X, donde se aprecia un tono azul violáceo en el centro que indica los componentes nucleares. Tinción H-E.

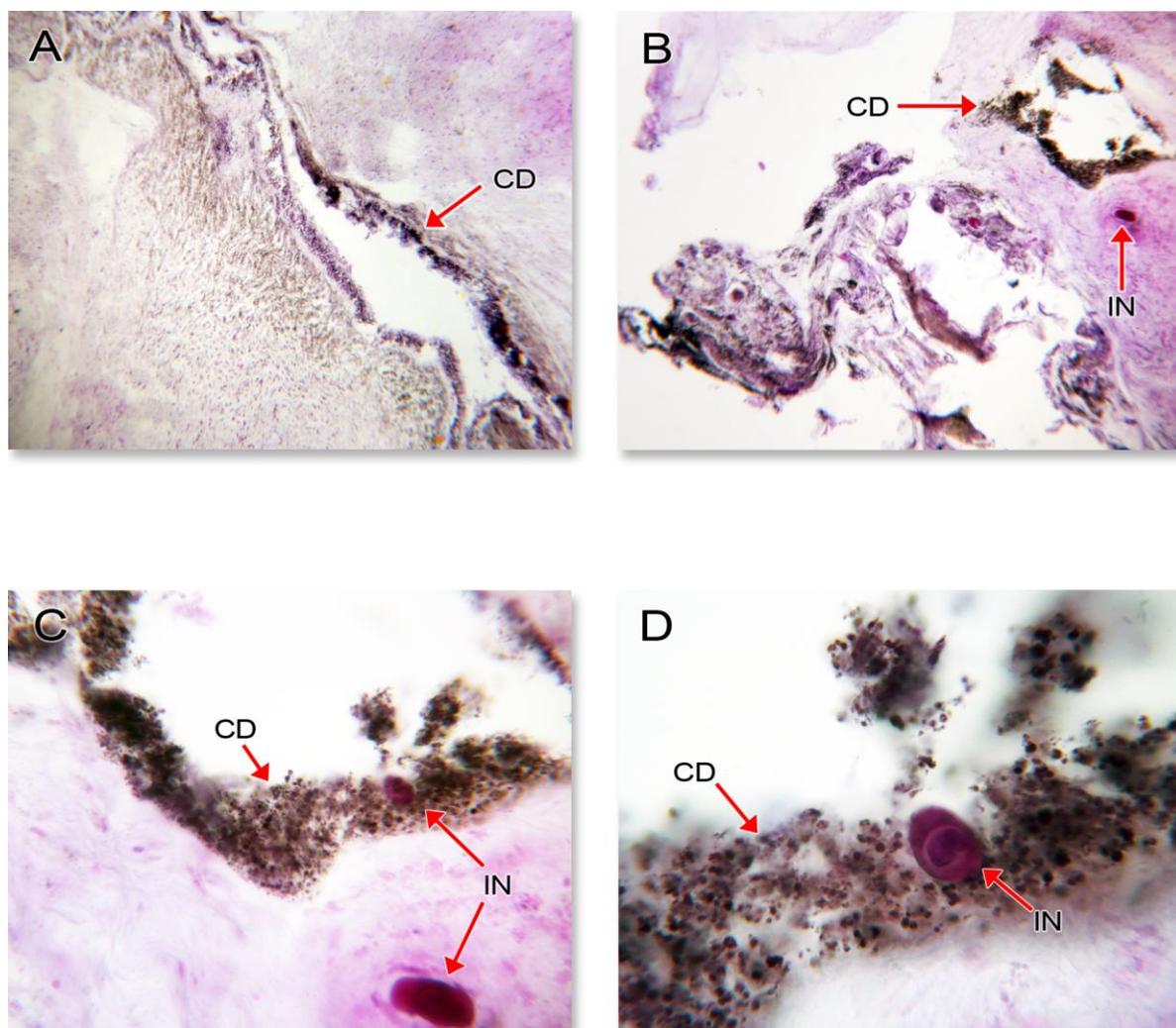


Figura 30. Secciones histológicas de la piel anterior dorsal de *Holothuria impatiens*. En A, imagen de la piel media dorsal con células digestivas (CD) en las orillas de lo que puede ser un canal hemal, 100X. En B, imagen de la piel con abundante tejido conjuntivo (TC), agregados de células digestivas en coloración café e inclusión (IN) con tinción basófila, 100X, en C, un acercamiento de un agregado de células digestivas e inclusiones, 400X, y en D, un acercamiento de una inclusión rodeada de gránulos secretorios (CD), 1000X. Tinción H-E.

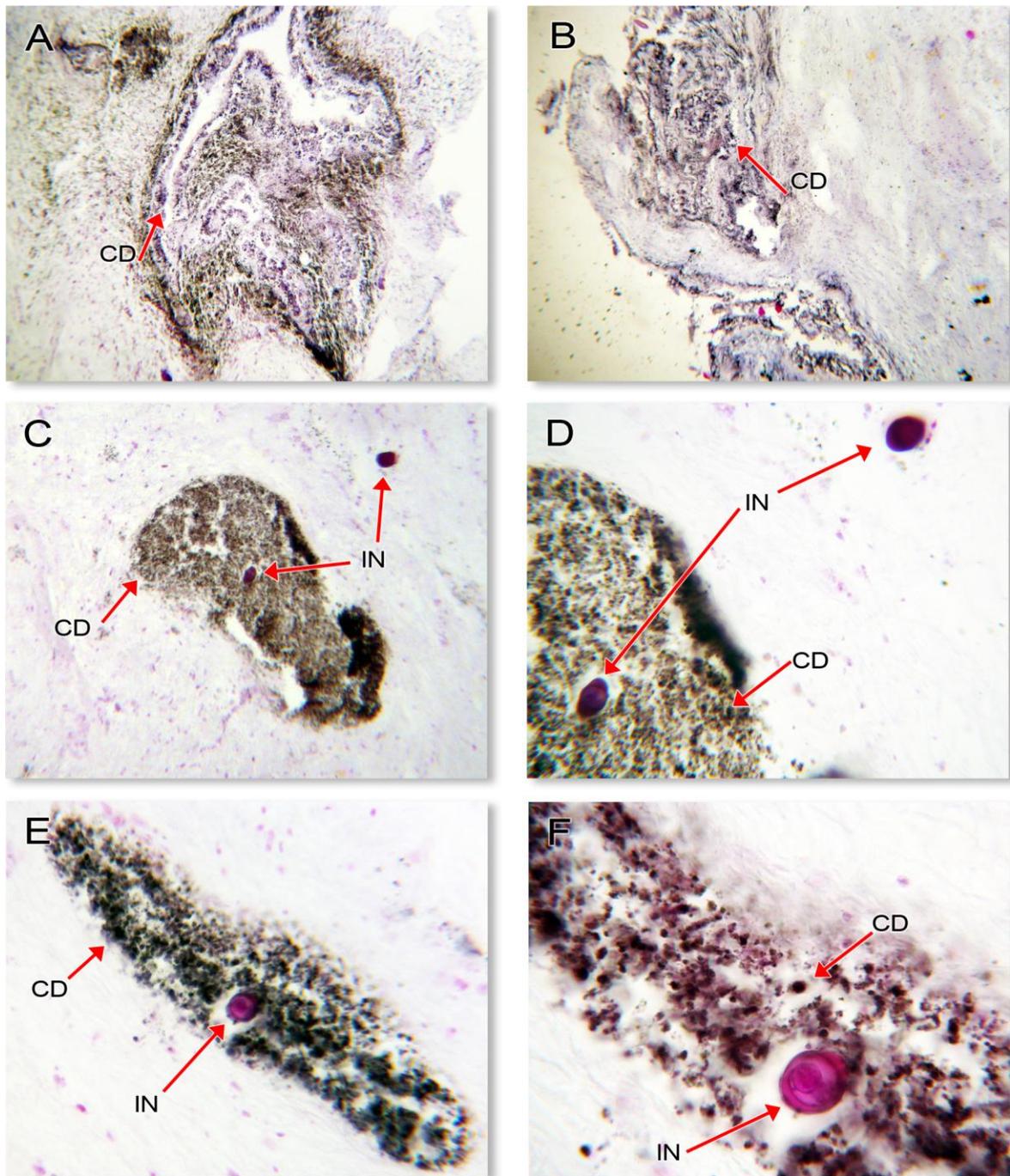


Figura 31. Secciones histológicas de la piel interna y externa de *Holothuria impatiens*. A y B, son imágenes de la piel interna que presentan agregados de células digestivas (CD) en coloración café obscuro, 100X. En C, imagen de la piel externa que muestra una vesícula digestiva (VE) en coloración café inmersa en tejido conjuntivo (TC) e inclusiones (IN) con tinción basófila, 100X, y en D, un acercamiento donde se aprecian células digestivas e inclusiones, 400X. En E, otro aspecto de la piel externa con presencia de una vesícula digestiva e inclusión dentro del tejido conjuntivo, 400X, y en F, un acercamiento de la inclusión rodeada de gránulos secretorios en coloración café, se aprecian los componentes nucleares de la inclusión en tono azul violáceo. 1000X. Tinción H-E.

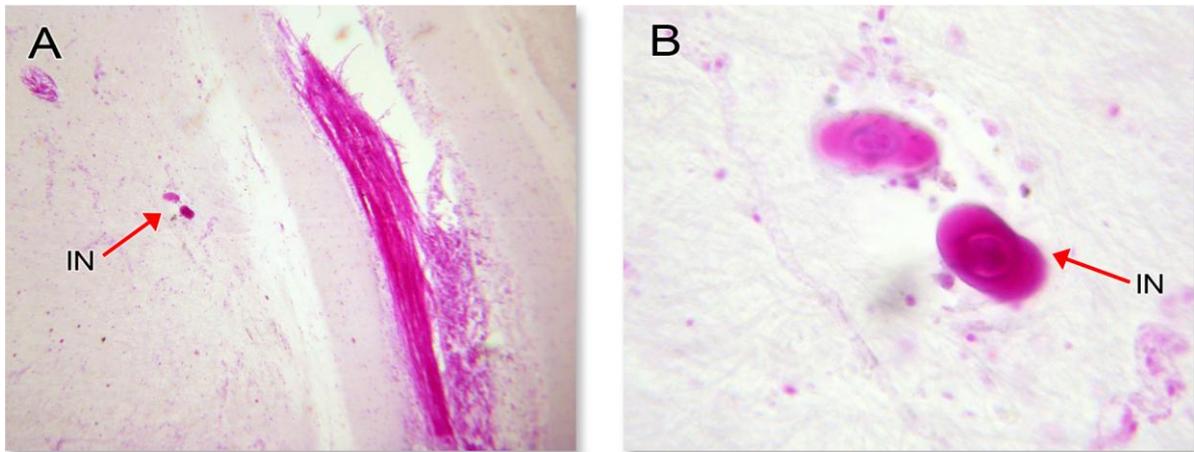


Figura 32. Secciones histológicas de la piel ventral de *Holothuria impatiens*. En A, imagen de la piel ventral con presencia de inclusiones (IN) con tinción basófila y bandas musculares, 100X, y en B, un acercamiento de éstas inclusiones, 400X, donde se puede apreciar con claridad el núcleo en azul violáceo. Tinción H-E.

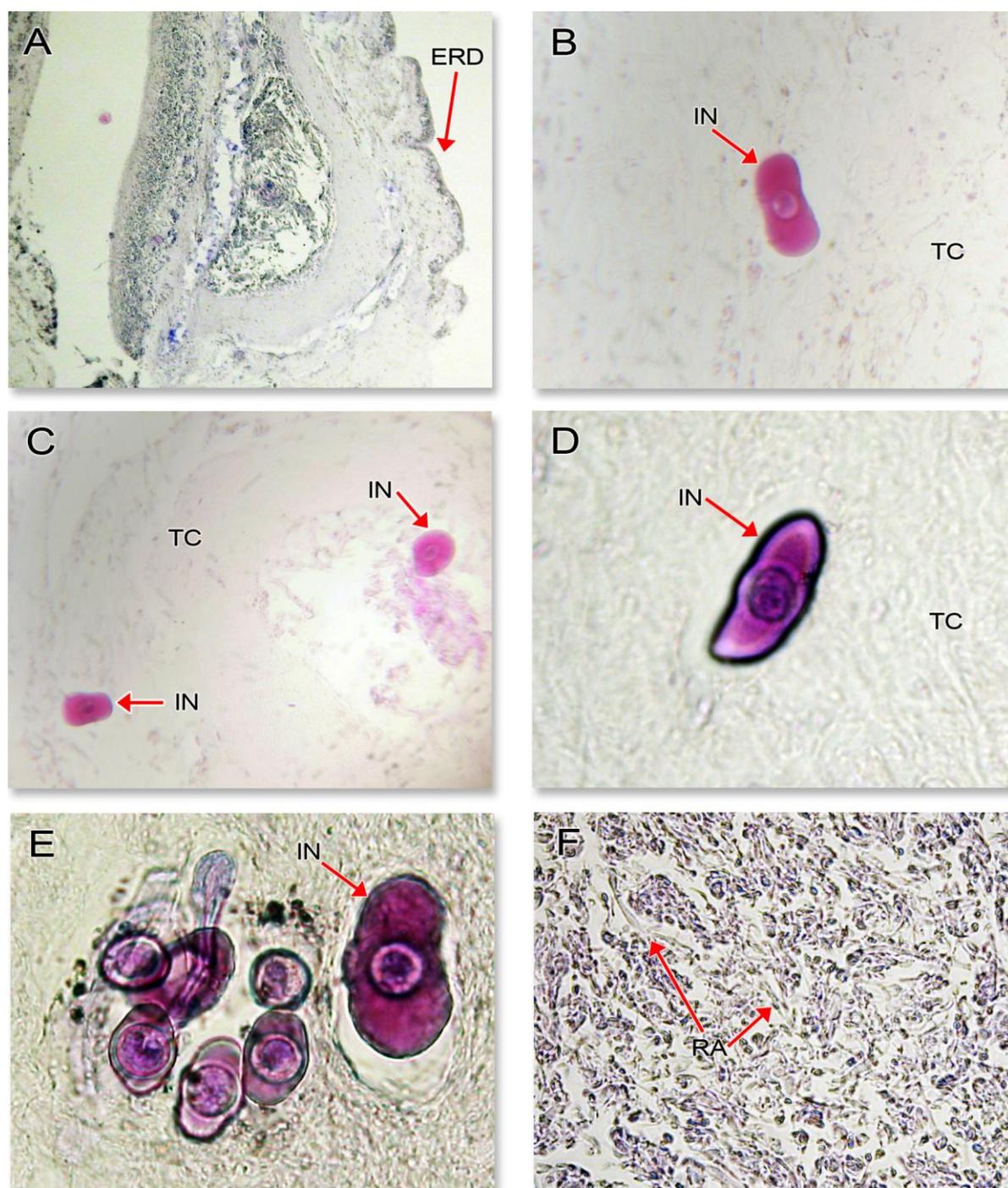


Figura 33. Secciones histológicas de tentáculos del pepino de mar. *Isostichopus fuscus*. En A, visualización de epitelio de una región digestiva (ERD), 100X. *Holothuria impatiens*. En B y C presencia de inclusiones (IN) con tinción basófila en tejido conjuntivo (TC), 400X. *Isostichopus fuscus*. En D, inclusión inmersa en tejido conjuntivo, 630X. En E presencia de un agregado de inclusiones (IN) con tinción basófila en tejido conjuntivo, 630X. En F, posibles restos alimenticios (RA), 630X. Tinción H-E.

8.1.3 Tracto digestivo del pepino de mar.

En el canal alimentario se observaron restos de alimento, diferentes grupos celulares que podrían corresponder a células celómicas. Además se identificaron los túbulos intestinales y lo que aparenta ser un parásito del tipo de platelmintos en *I. fuscus* con aparente actividad digestiva (Figura 34). La presencia de estos organismos es muy común dado a la relación de los pepinos con el substrato y también ha sido reportado por otros autores (Wang y col., 2004).

También, en las dos especies de pepino de mar se observó la presencia de células con actividad digestiva y gránulos secretorios, así como las inclusiones mencionadas anteriormente en tejido conjuntivo (Figuras 34 y 35).

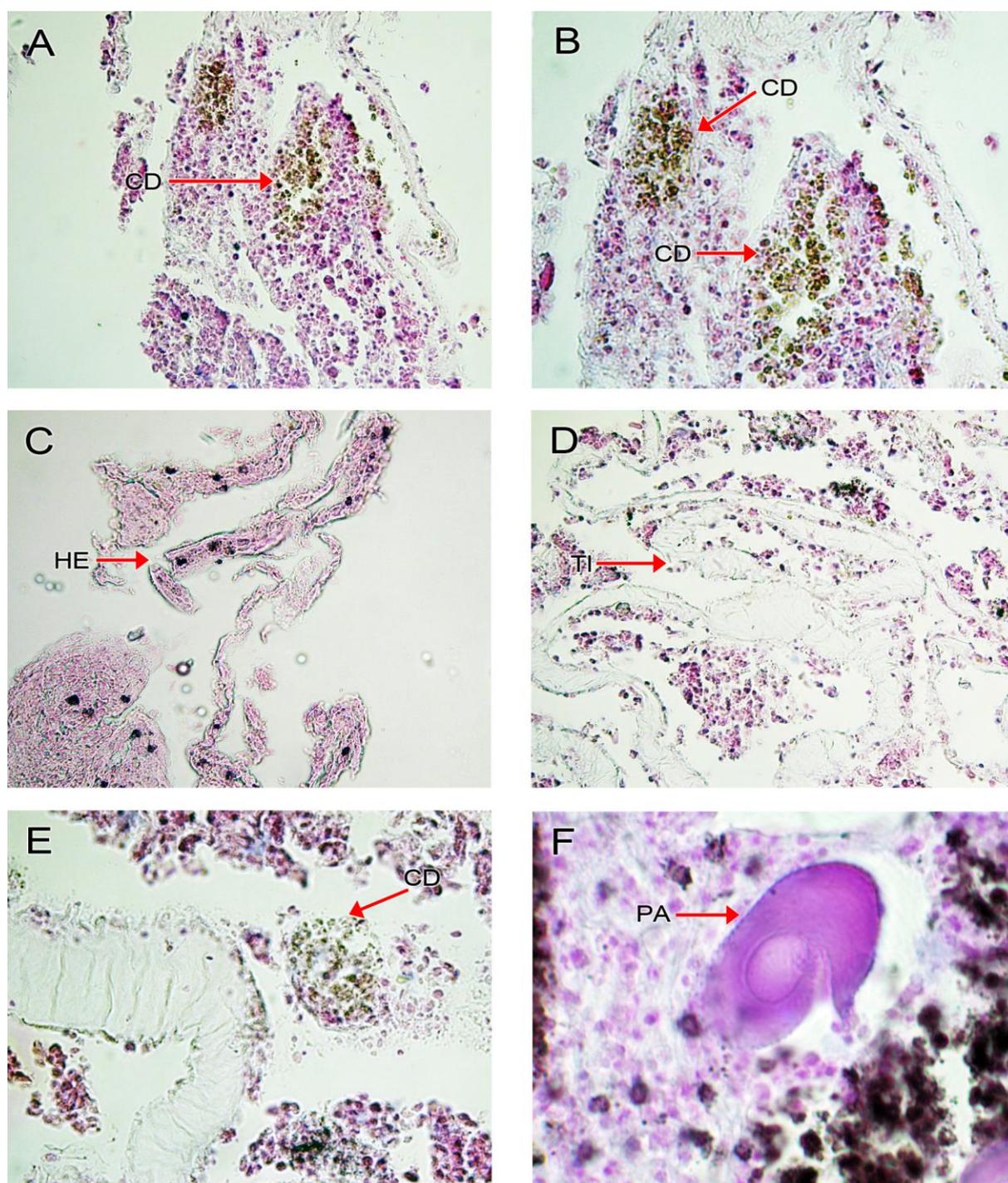


Figura 34. Secciones histológicas del tracto digestivo de *Isostichopus fuscus*. En A y B, porción del intestino con presencia de células digestivas (CD) visualizadas en coloración café en forma de gránulos, 400X. En C, presencia de posibles hemocitos (HE), 400X. En D, túbulos intestinales (TI), 400X, y en E, un acercamiento del tubo intestinal y las células digestivas en coloración café, 630X. En F, la presencia de un parásito (PA) con tinción basófila, 400X. Tinción H-E.

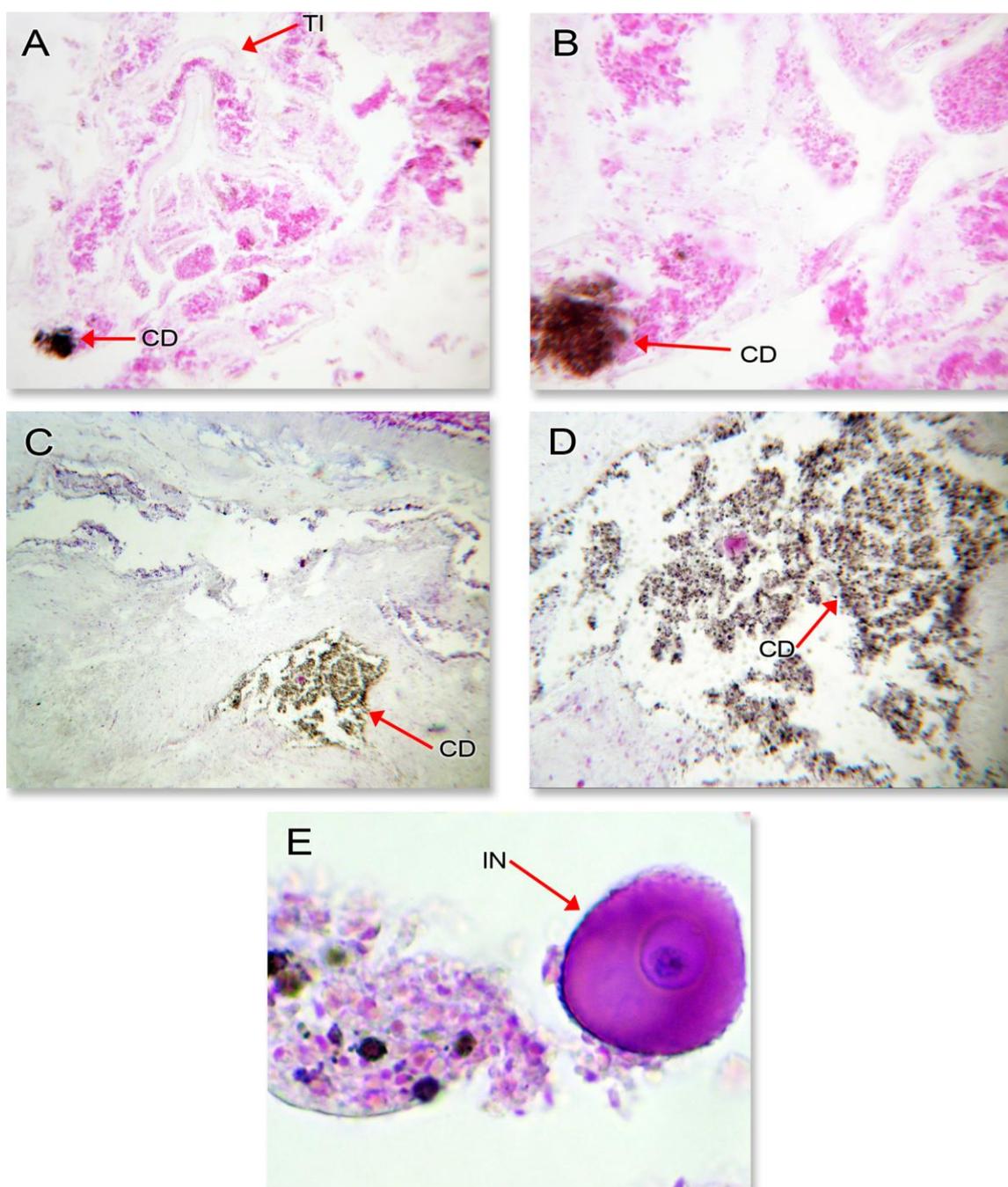


Figura 35. Secciones histológicas del tracto digestivo de *Holothuria impatiens*. En A, porción del intestino con presencia de células digestivas (CD) y túbulos intestinales (TI), 100X, y en B, un acercamiento de las células con actividad digestiva mostrando secreciones en coloración café, 400X. En C, presencia de actividad digestiva visualizada en coloración café (CD), 100X, y en D, un acercamiento de los gránulos secretorios (CD), 400X. En E, visualización de una inclusión con tinción basófila en tejido conjuntivo, 1000X, Tinción H-E.

8.1.4 Estructuras internas del pepino de mar.

En las estructuras internas de *I. fuscus* se observó la presencia de agregados de células con actividad digestiva con aparentes gránulos secretorios e inclusiones (Figura 36), que sugieren la acción de defensa de hemocitos contra agentes externos al organismo (Wang, 2007) con uno de sus mecanismos de defensa llamado *formación de nódulos* el cual se caracteriza por la fagocitosis y la subsecuente encapsulación de material extraño (Antón y Salazar, 2009).

En estudios anteriores las pruebas histoquímicas realizadas en los túbulos de Cuvier de *H. leucospilota* y *H. forskali* reveló que el material encerrado en los gránulos secretorios de las células adhesivas del epitelio exterior (mesotelio) tiende a ser proteínico (Vanden y col., 1987; Endean, 1957).

8.1.5 Árbol respiratorio del pepino de mar.

Los arboles respiratorios en los pepinos de mar, son estructuras internas accesorias al intestino y al sistema hemal. En el árbol respiratorio de *I. fuscus* se observó una zona densa de gránulos secretorios indicando la actividad digestiva de las células. Además se apreció que estas zonas con células digestivas se caracterizaban por una gran cantidad de inclusiones presentes, las cuales muestran claramente el núcleo y citoplasma (Figura 37).

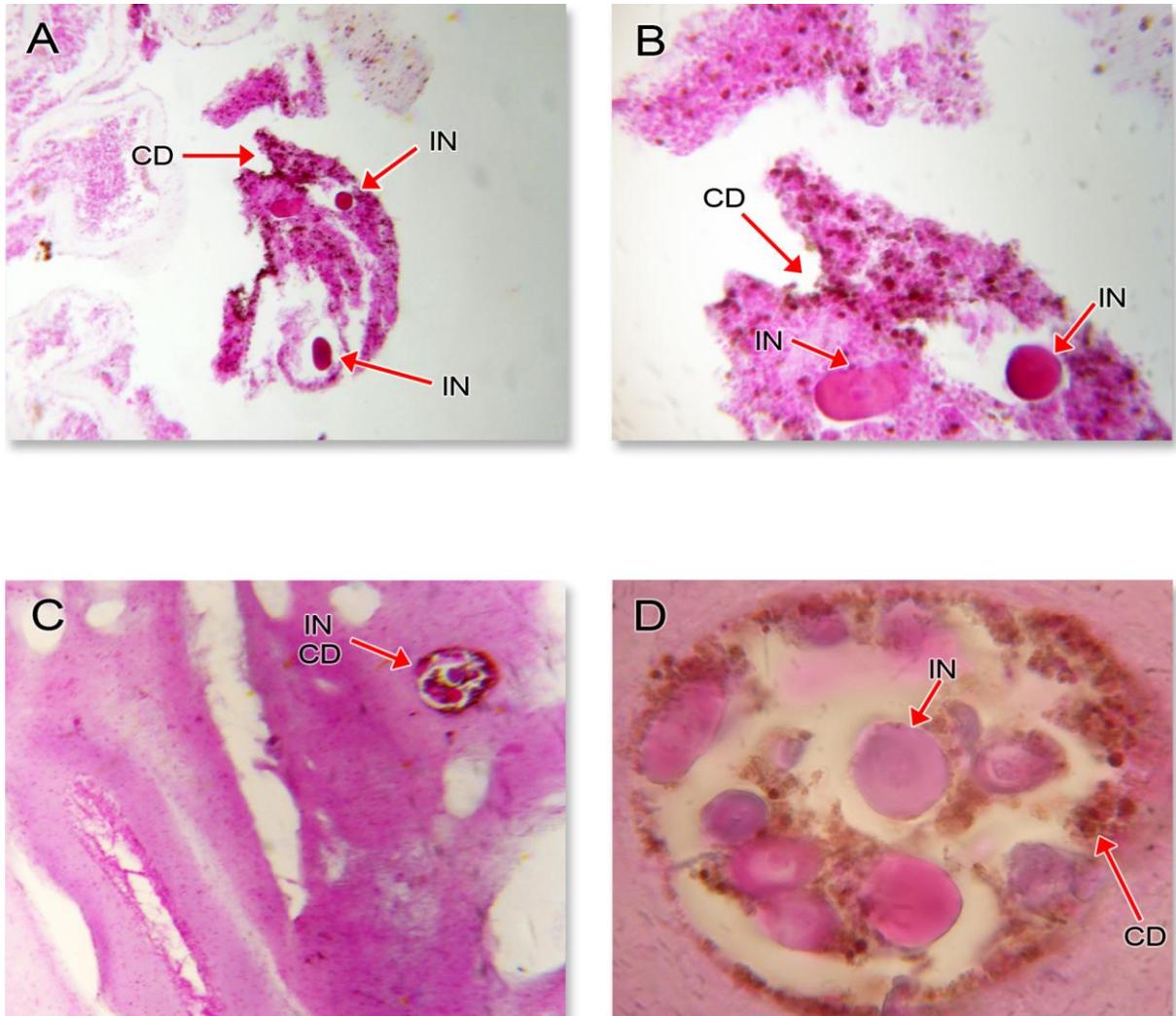


Figura 36. Secciones histológicas de estructuras internas de *Isostichopus fuscus*. En A, B, C y D presencia de agregados de células con actividad digestiva en coloración café (CD) e inclusiones (IN) con tinción basófila. En B y D, acercamientos de los gránulos secretorios (CD) y las inclusiones, de A y C (A y C, 100X, B, 400X, y D, 1000X). Tinción H-E.

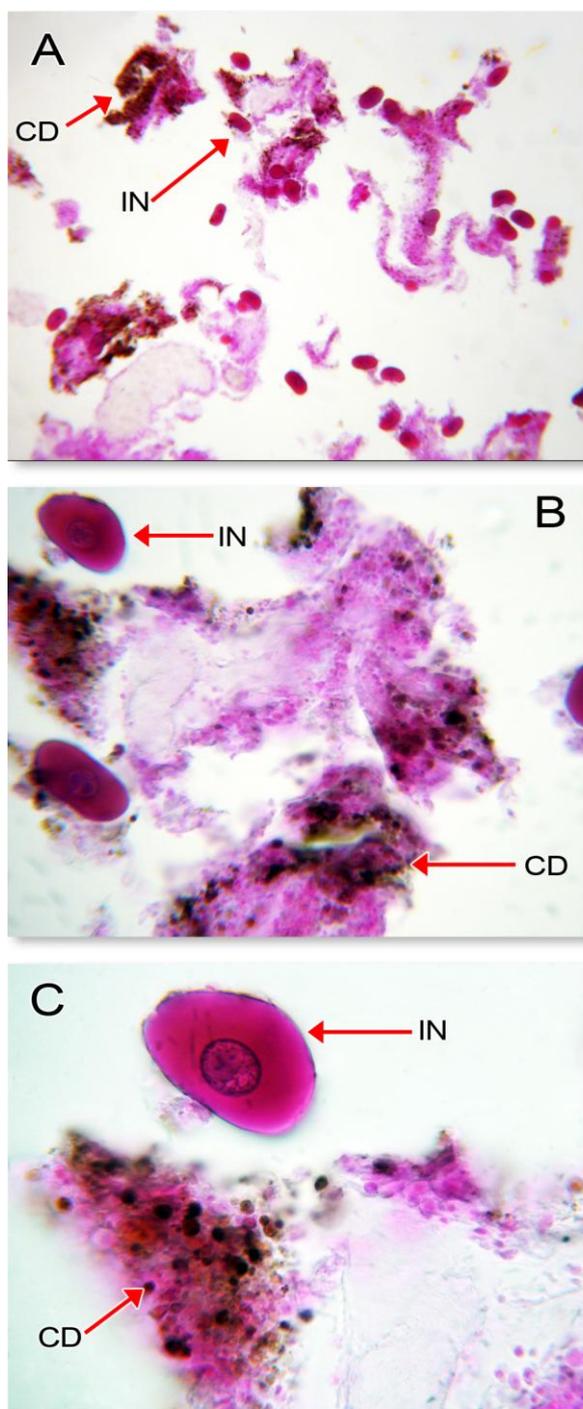


Figura 37. Secciones histológicas del árbol respiratorio de *Isostichopus fuscus*. En A (100X), B y C presencia de agregados de células digestivas (CD) e inclusiones (IN) con tinción basófila. En B, acercamiento de las inclusiones y gránulos secretorios (CD) en coloración café, 400X, y en C, acercamiento de una inclusión donde se aprecia en el centro un tono azul violáceo que indica los componentes nucleares e indicando las estructuras citoplasmáticas, 1000X. Tinción H-E.

La caracterización histológica de los órganos de los pepinos de mar *Isostichopus fuscus* y *Holothuria impatiens*, permitió identificar diferentes estructuras tisulares, lo que contribuye a ampliar el conocimiento básico sobre estas especies.

En este trabajo se pudo identificar en todas las regiones estudiadas gran cantidad de tejido conjuntivo; agregados de células con actividad digestiva las cuales se visualizan en coloración café (Estrada, 1982) y los epitelios de estas regiones digestivas; y un tipo de inclusiones con tinción basófila inmersas en tejido conjuntivo, aisladas o en agregados, que sugieren la acción de defensa de hemocitos contra agentes externos al organismo (Wang, 2007).

También se observaron los túbulos intestinales, residuos de alimento en los tentáculos y la presencia de un parásito en el tracto digestivo de *I. fuscus* como lo reportado por Wang y col. (2004). Dentro de este contexto, Barel y Kramer (1977), reportaron que en el tracto digestivo y árbol respiratorio de los pepinos de mar suelen vivir protozoos. Mientras que Jangoux en 1990, reportó en una revisión que más de un tercio de los parásitos de equinodermos viven sobre ó dentro de los holotúridos y que las partes principales del cuerpo que sufren las infestaciones son el sistema digestivo y el celoma.

Por otro lado, los podios o tentáculos, túbulos internos, tubo respiratorio y la piel dorsal fueron los tejidos observados al microscopio que presentaron una evidente cantidad de agregados cafés con actividad digestiva, gracias a la tinción con Hematoxilina-Eosina.

La presencia de enzimas con actividad proteolítica en diversas partes del cuerpo del pepino de mar sugiere que estos organismos marinos requieren de una capacidad digestiva alterna a su sistema digestivo establecido, ya que como es sabido, los holoturoideos tienden a eviscerar sus órganos como respuesta al estrés o los expulsan autónomamente como método de defensa contra sus depredadores (Calva, 2002). Es decir, que en el tiempo que sus órganos son regenerados, aproximadamente de 3 a 4 semanas (San Miguel y García, 2007), los pepinos de mar posiblemente pueden utilizar los tentáculos de la cavidad oral para llevar a cabo la mayor parte de su digestión.

Sin embargo, es necesario realizar en el futuro pruebas histoquímicas con técnicas específicas para identificar con mayor precisión la presencia de proteasas.

Los resultados obtenidos anteriormente por medio de técnicas histológicas, fueron esencialmente cualitativos. Posteriormente se complementó el estudio de la identificación de proteasas de los pepinos de mar, *I. fuscus* y *H. impatiens*, con la caracterización enzimológica de éstas, integrando a la parte histológica resultados cuantitativos de actividad específica, concentración de proteína y pesos moleculares estimados de las proteasas.

8.2 Enzimología.

8.2.1 Determinación de la concentración de proteína.

La determinación de concentración de proteína nos permite conocer la cantidad necesaria para la preparación de muestras en los estudios de estimación de peso molecular por medio de técnicas electroforéticas ya que si inyectamos muestras con alta concentración de proteína, las bandas en los geles de electroforesis no se apreciaran bien debido a que se obtienen bandas demasiado gruesas (García-Pérez, 2000). La concentración de las muestras a usar depende de su heterogeneidad. Las bandas, especialmente de proteínas pequeñas, son más anchas en el sistema homogéneo que en el heterogéneo, efecto que se compensa con la mayor pendiente de este último (Schägger y col., 1987).

En este estudio se utilizaron mezclas complejas de proteínas. Éste tipo de mezclas se pueden preparar a una concentración de 5-10 mg/mL, por lo tanto, se pueden inyectar de 5-15 μ L de las muestras en los carriles del gel de electroforesis (Lomonte y col., 1996), esto tomando en cuenta que $\frac{1}{4}$ es de extracto enzimático y $\frac{3}{4}$ de amortiguador muestra, por lo tanto correspondería por ejemplo de 6-37 μ g de proteína soluble. Por consiguiente, los resultados de concentración de proteína permitieron determinar el volumen de inyección en los carriles de los geles de electroforesis.

Los resultados (Figura 38) mostraron que las partes anatómicas u órganos de *Isostichopus fuscus* que tuvieron las mayores concentraciones de proteína (mayor a 5.5 mg/mL) estadísticamente significativas (Tabla 8), fueron: los túbulos internos, podios, la piel dorsal e interna. Sin embargo, en el caso de *Holothuria impatiens* (Tabla 8), no hubo diferencia significativa entre las medias de los valores de concentración obtenidos según el análisis de varianza (ANOVA).

Por otro lado, los resultados de concentración obtenidos son muy similares a lo reportado por X. Fu y col., en el 2004, donde se obtuvo una concentración de 6.91 mg/mL para el tracto digestivo de *Stichopus japonicus*. En este estudio, específicamente en el tracto digestivo de *I. fuscus* y *H. impatiens*, se encontraron concentraciones de proteína de 4.74

mg/mL y 3.14 mg/mL, respectivamente, siendo estas más bajas que las reportadas en la bibliografía.

Además, los valores de concentración de proteína nos permiten conocer la actividad proteolítica expresada en miligramos de proteína soluble del extracto enzimático (UAP/mg) y comparar los valores obtenidos con los datos reportados anteriormente por X. Fu y col. en el 2005, donde se determinó la actividad proteolítica del extracto crudo del tracto digestivo de *Stichopus japonicus*.

La actividad enzimática es afectada por la temperatura, el pH, la concentración de la propia enzima y del sustrato y otros factores físico-químicos, por lo que es importante conocer la concentración de proteína existente en cada órgano o parte anatómica del pepino de mar.

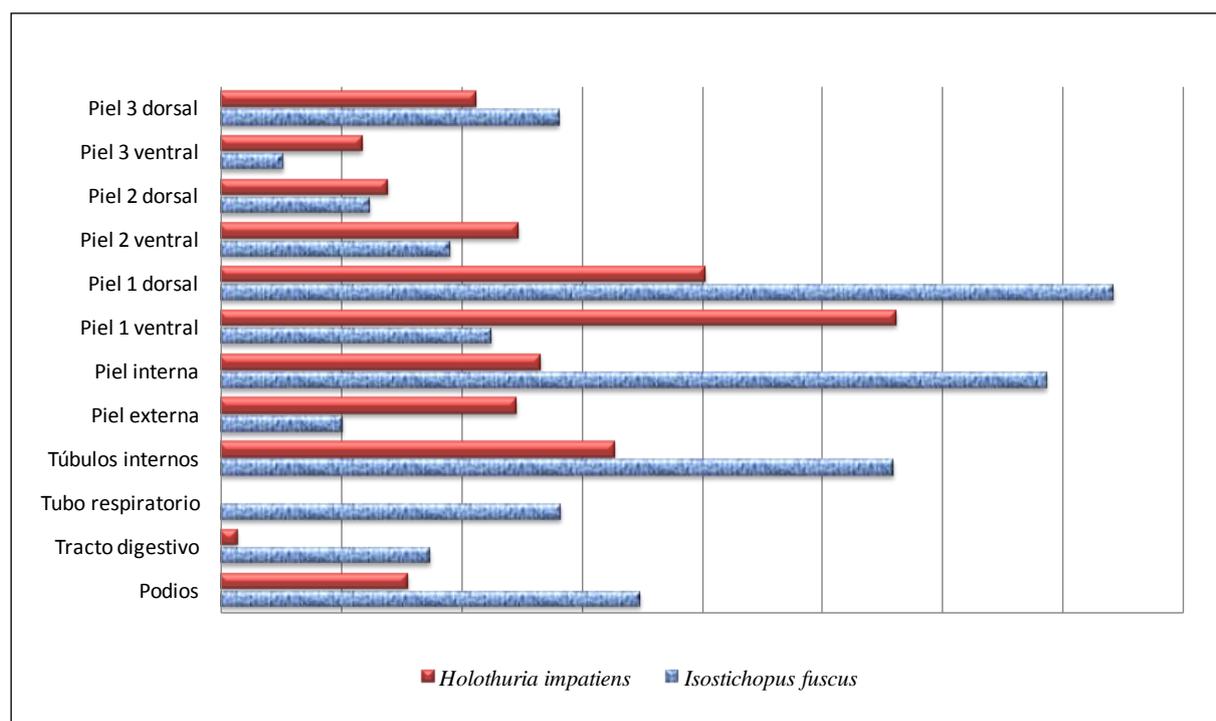


Figura 38. Concentración de proteína (mg/mL) de las partes anatómicas u órganos estudiados de *I. fuscus* y *H. impatiens*.

Tabla 8. Concentración de proteína (mg/mL) de partes anatómicas u órganos de *I. fuscus* y *H. impatiens*.

Concentración de proteína promedio (mg/mL) \pm D.E.		
Parte Anatómica u Órgano	<i>I. fuscus</i>	<i>H. impatiens</i>
Podios	6.48 \pm 0.26	4.55 \pm 0.24
Tracto Digestivo	4.74 \pm 0.48	3.14 \pm 0.11
Tubo Respiratorio	5.82 \pm 0.14	-----
Túbulos Internos	8.59 \pm 0.54	6.27 \pm 0.06
Piel Externa	4.00 \pm 0.06	5.46 \pm 0.66
Piel Interna	9.86 \pm 1.27	5.65 \pm 0.10
Piel 1 Ventral	5.25 \pm 0.48	8.61 \pm 3.25
Piel 1 Dorsal	10.41 \pm 1.66	7.02 \pm 3.04
Piel 2 Ventral	4.91 \pm 0.48	5.47 \pm 0.18
Piel 2 Dorsal	4.23 \pm 0.48	4.38 \pm 0.62
Piel 3 ventral	3.51 \pm 0.06	4.17 \pm 0.01
Piel 3 dorsal	5.81 \pm 0.44	5.12 \pm 0.06

*Los datos presentados son medias de determinaciones por triplicado \pm desviación estándar (D.E.).

*Los valores de máxima concentración de proteína están marcados en azul ($p < 0.001$).

8.2.2 Determinación de actividad proteolítica y actividad específica.

En general, las partes anatómicas u órganos de los pepinos de mar estudiados tienen valores de pH ácido baja actividad proteolítica comparada con los valores de actividad a pH básico (Figuras 39 y 40), estos resultados reflejan lo reportado en muchos estudios donde se ha descrito que las especies fundamentalmente carnívoras poseen mayores niveles de actividad de proteasas ácidas en comparación con las especies omnívoras o herbívoras (Jonas y col., 1983), lo que explicaría la baja actividad de la mayoría de las proteasas ácidas del pepino de mar que es herbívoro.

La estabilidad de la actividad proteolítica a pH alcalino podría ser una adaptación de especies que se alimentan de forma constante y por tanto ingieren grandes cantidades de agua de mar a un pH neutro (Guillaume y Choubert, 1999).

Dentro de este contexto, se ha reportado la presencia de serín proteasas, tanto de tipo tripsina como quimotripsina (ambas, proteasas alcalinas) en holotúridos (Fish, 1967), estas son las enzimas proteolíticas mayoritarias que actúan en el sistema digestivo de los peces marinos (Essed y col., 2002).

Sin embargo, la presencia de proteasas con alta actividad a pH básico en diferentes partes anatómicas u órganos del pepino de mar no demuestra, si se trata de las serín proteasas, tripsina y quimotripsina, implicadas en los sistemas de digestión.

Las partes anatómicas u órganos de *I. fuscus* que presentaron actividad proteolítica (Figura 39) significativamente ($p \leq 0.002$) mayor, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (Anexo 17), fueron (Tabla 9): podios a pH 2 (24.7 ± 13.6 UAP/mg) y pH de 6 a 10 (con un máximo de 46.9 ± 27.6 UAP/mg), la piel externa a pH de 2 a 4 (con un máximo de 68.1 ± 36 UAP/mg) y pH 10 (60.8 ± 35 UAP/mL), y la piel anterior ventral a pH 10 (38.9 ± 25.3 UAP/mg). En el Anexo 19 se reportan los valores de actividad enzimática expresados en UAP/mL.

Los resultados reportados por X. Fu en el 2005, donde el tracto digestivo de *Stichopus japonicus* fue caracterizado por técnicas bioquímicas y electroforéticas, mostraron con el ensayo de digestión de caseína ácida, la presencia de proteasas con actividad óptima a pH 2 y pH 5, y proteasas alcalinas con actividad óptima a un pH de 8 y 13.5. Estos datos concuerdan para el caso de los podios a pH 2 y 8, y piel externa a pH 2. En el caso del tracto digestivo, en este estudio se observó alta actividad a pH ácido de 2, 6, y pH básico de 8; a pesar de que éste órgano no presentó actividad proteolítica significativamente mayor con respecto a los demás órganos y partes anatómicas estudiadas. Por otro lado, recordemos que el presente análisis se realizó en un rango de pH de 2 a 10.

Para *H. impatiens* las partes anatómicas u órganos con actividad proteolítica (Figura 40) significativamente ($p \leq 0.02$) mayor, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (Anexo 17), fueron (Tabla 10): los podios a pH 2 (27.55 ± 13.73 UAP/mg) y de 6 a 10 (con un máximo de 81.29 ± 3.11 UAP/mg); la piel ventral a pH 4 (48.39 ± 0.13 UAP/mg) y pH 7 (42.68 ± 5.32 UAP/mg); y la piel dorsal a pH 10 (42.98 ± 6.65 UAP/mg). En el Anexo 19 se muestran los valores de actividad enzimática en UAP/mL.

Nuevamente, comparando los resultados obtenidos con los resultados reportados por X. Fu, podemos ver que para los podios, concuerda con alta actividad a pH 2, y en el caso

particular del tracto digestivo, se obtuvo alta actividad a pH ácido de 2 y 3 y a pH básico de 8 y 10.

Por lo tanto, el perfil de pH de las proteasas ácidas extraídas del pepino de mar *I. fuscus* muestra alta actividad proteolítica a pH 2 para el caso de los podios, piel externa y tracto digestivo, e incluso a pH 3-4 en la piel externa, y para *H. impatiens* a pH 4 en la piel ventral. Lo que puede indicar la presencia de proteasas aspárticas como la pepsina para pH 2, como se informó en las especies de pez disco (Aleander y col., 2002), tilapia (Yamada y col., 1993), capelán (Gildberg y Raa, 1983) y bacalao polar (Alunchalam y Haard, 1985). Essed y col. (2002) reportaron la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* y encontraron dos óptimos de pH para proteasas de los extractos estomacales a 2.0, sugiriendo la presencia de proteasas aspárticas.

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los extractos enzimáticos del pepino de mar mostraron actividades proteolíticas altas en un rango de pH alcalino de 8 a 10, por lo que se cree la presencia de serín proteasas en base a estudios anteriores de otros organismos marinos. Aleander y col. (2002) detectaron proteasas con actividades óptimas a pH 8 y pH de 12-13 en peces disco, sugiriendo la presencia de al menos dos de los principales grupos de proteasas alcalinas. Alarcón y col. (1998) descubrió actividades proteolíticas óptimas a pH 7 y 10 en chopo y dentón, respectivamente. Otro informe mostró que la mayor actividad proteolítica fue en el rango de pH de 8-10 en el intestino del pez dorado, trucha arco iris y carpa común (Hidalgo y col., 1999). Essed y col. (2002) encontraron dos óptimos de pH para proteasas de los extractos intestinales de atún rojo a pH de 10 y 12, sugiriendo la presencia de serín proteasas.

X. Fu (2005), también sugiere la presencia de una enzima del tipo serín proteasa en el pepino de mar, probablemente una colagenasa (Yoshinaka y col., 1986; Roy y col., 1996; Aoki y col., 2003). Se ha informado que las colagenasas (metaloproteasas) en el tracto digestivo muestran al mismo tiempo actividades similares a la tripsina y quimotripsina con una actividad máxima a pH 6.5-8.0 y débil estabilidad al calor (Yoshinaka y col., 1987; Kristjansson y col., 1995; Zefirova y col., 1996).

X. Fu y col. (2005), determinaron un máximo de actividad específica en el tracto digestivo de *S. japonicus* de 7.9 ± 0.19 UAP/mg a pH 2, mientras que en este estudio se obtuvieron valores de 20.2 ± 10.8 y 52.19 ± 3.33 UAP/mg para *I. fuscus* y *H. impatiens*, respectivamente (Tabla 9). Por lo que podemos apreciar la gran diferencia entre los resultados mencionados para *H. impatiens*, esto se debe en gran parte, a los valores de actividad proteolítica obtenidos, ya que son mayores a los de la bibliografía. Posiblemente esto se deba al tipo de especie manejada.

Así mismo, estos investigadores reportaron alta actividad proteolítica de 13.37 ± 0.08 UAP/mg a pH 8. Esto concuerda con los datos obtenidos en el presente estudio para *I. fuscus*, donde el valor de actividad proteolítica del tracto digestivo a pH 8 fue de 34.9 ± 19.0 UAP/mg. Sin embargo para *H. impatiens* se obtuvo un valor mucho mayor al reportado, siendo este de 68.69 ± 7.93 UAP/mg (Tabla 9).

Puede notarse, con base a los resultados obtenidos, que en el caso de *H. impatiens* no hubo un comportamiento tan homogéneo en las actividades enzimáticas determinadas como en el caso de *I. fuscus*, se piensa que la diferencia en el comportamiento de actividad enzimática entre las dos especies de pepinos de mar puede deberse a que pertenecen a familias distintas, *Holothuriidae* y *Stichopodidae*, respectivamente.

En particular, la alta actividad proteolítica a pH básico, en los podios puede deberse a que posiblemente la mayor degradación del alimento comience en la cavidad oral del pepino, considerando que el pH del agua de mar es básico, variando entre 7,9 y 8,1 (Hernández-Ayón y col., 2007) y a que posiblemente estos organismos necesitan de sistemas de digestión alternos debido a su peculiar acción de eviscerar como respuesta al estrés o como defensa contra sus depredadores.

Por otro lado, se observó que la piel externa y la piel ventral de los pepinos de mar, tuvieron actividades ácidas significativamente mayores con respecto a las actividades de las otras muestras, posiblemente por el contacto que tienen con ciertos microorganismos ó con el medio ya que la intensa contaminación industrial con CO₂ ha producido cambios drásticos en el pH del agua de mar (Hernández-Ayón y col., 2007).

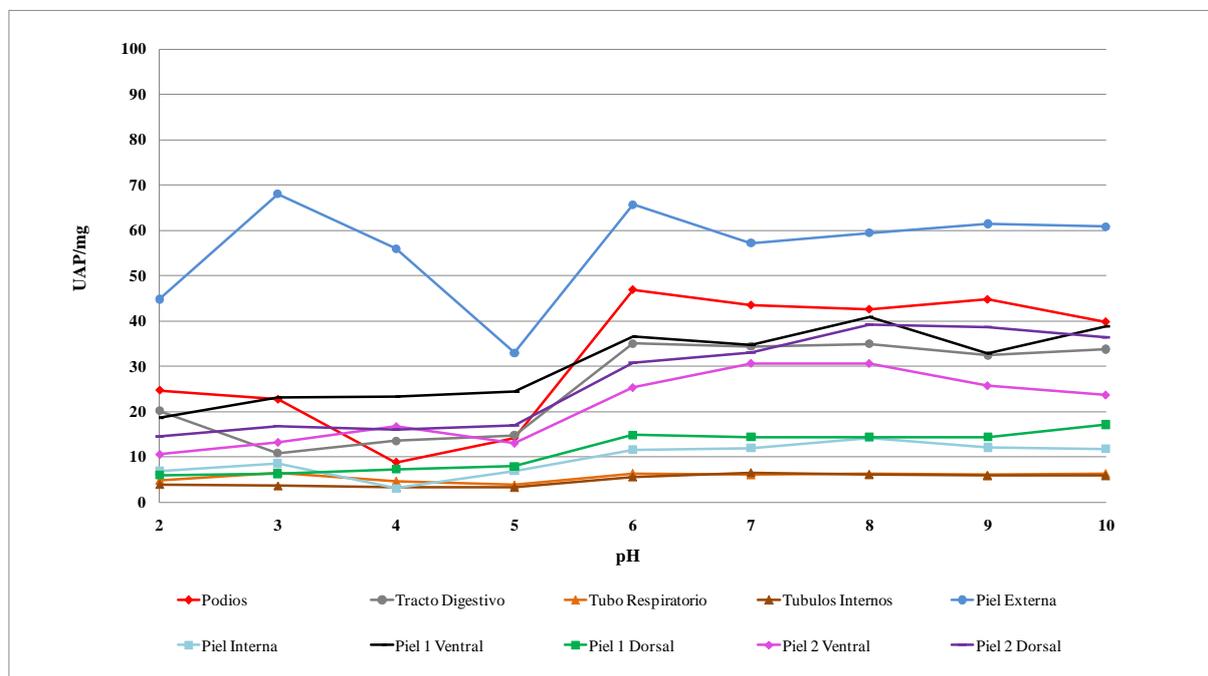


Figura 39. Efecto del pH sobre la actividad específica de extractos enzimáticos de las partes anatómicas u órganos estudiados de *I. fuscus*, sobre hemoglobina (pH 2-5) y caseína (pH 6-10).

Tabla 9. Actividad específica (UAP/mg) a pH de 2 a 10 de las proteasas de *I. fuscus*.

Isostichopus fuscus Parte Anatómica u Órgano	Actividad enzimática promedio (UAP/mg) ± D.E.									
	pH									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Podios	24.7 ± 13.6	22.7 ± 12.7	8.8 ± 5.3	14.2 ± 2.6	46.9 ± 27.6	43.5 ± 22.3	42.6 ± 24.2	44.7 ± 21.3	39.8 ± 20.3	
Tracto Digestivo	20.2 ± 10.8	10.8 ± 8.8	13.5 ± 7.9	14.8 ± 9.0	35.0 ± 17.5	34.4 ± 18.4	34.9 ± 19.0	32.4 ± 17.5	33.8 ± 17.9	
Tubo Respiratorio	19.5 ± 10.6	24.0 ± 10.9	17.5 ± 8.4	13.7 ± 6.1	26.5 ± 14.9	23.9 ± 12.6	24.0 ± 12.1	23.5 ± 12	24.7 ± 12.5	
Túbulos Internos	15.3 ± 7.8	14.7 ± 8	12.8 ± 6.6	13.0 ± 6.9	23.9 ± 14.2	24.9 ± 12.1	24.2 ± 12.8	23.3 ± 12.4	22.8 ± 11.7	
Piel Externa	44.8 ± 20.9	68.1 ± 36	55.9 ± 42	32.9 ± 20	65.7 ± 37.3	57.2 ± 33.7	59.5 ± 31.1	61.5 ± 31.3	60.8 ± 35	
Piel Interna	6.9 ± 4.0	8.5 ± 3.4	3.0 ± 2.4	6.9 ± 4.0	11.6 ± 6.2	11.9 ± 6.2	14.2 ± 7.9	12.0 ± 6.8	11.8 ± 6.6	
Piel 1 Ventral	18.7 ± 8.9	23.1 ± 11	23.3 ± 12	24.4 ± 16.3	36.5 ± 19.3	34.7 ± 18.0	40.8 ± 19.3	32.8 ± 17.4	38.9 ± 25.3	
Piel 1 Dorsal	6.0 ± 0.8	6.3 ± 0.4	7.3 ± 0.5	7.9 ± 0.3	14.8 ± 2.4	14.4 ± 0.2	14.4 ± 0.8	14.4 ± 0.30	17.1 ± 4.6	
Piel 2 Ventral	10.6 ± 6.3	13.2 ± 5.8	16.7 ± 12.8	13.0 ± 7.7	25.3 ± 12	30.6 ± 15.3	30.6 ± 13.7	25.7 ± 13.3	23.6 ± 12	
Piel 2 Dorsal	14.5 ± 0.9	16.8 ± 1.1	16.1 ± 1.3	16.9 ± 0.2	30.7 ± 2.0	33.1 ± 4.0	39.2 ± 7.4	38.7 ± 0.1	36.4 ± 4.7	

*Los datos presentados son medias de determinaciones por triplicado ± desviación estándar (D.E.).

*Los valores de máxima actividad específica están marcados en azul ($p < 0.001$).

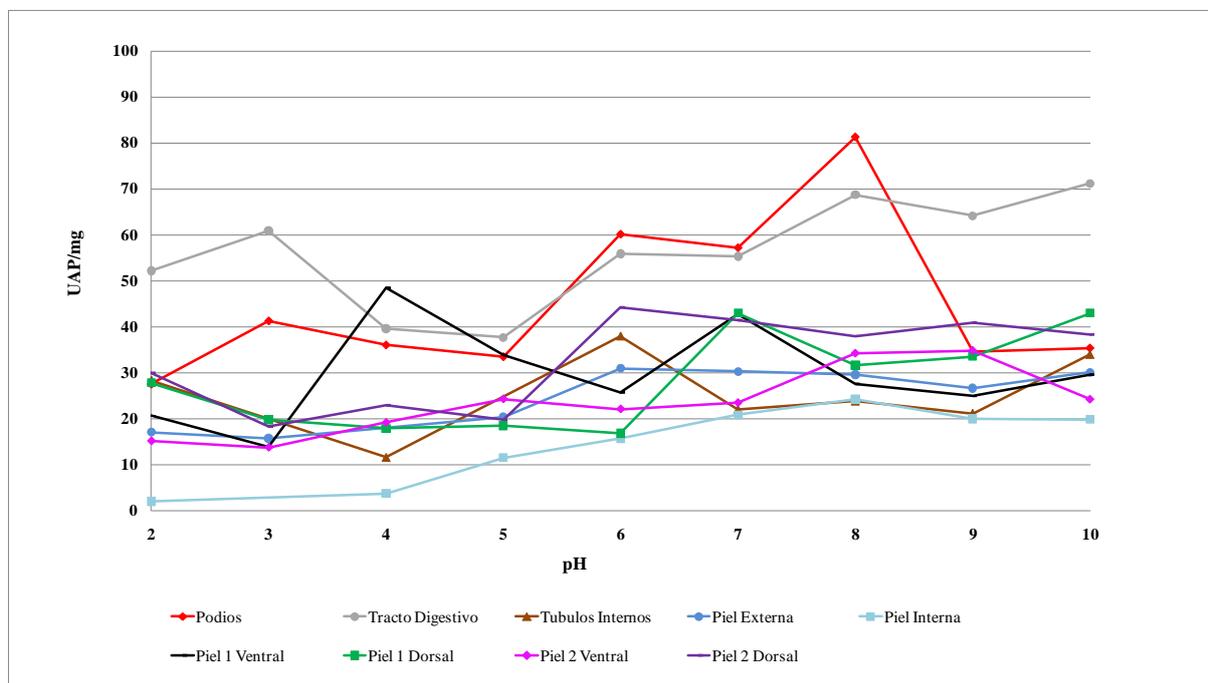


Figura 40. Efecto del pH sobre la actividad específica de extractos enzimáticos de las partes anatómicas u órganos estudiados de *H. impatiens*, sobre hemoglobina (pH 2-5) y caseína (pH 6-10).

Tabla 10. Actividad específica (UAP/mg) a pH de 2 a 10 de las proteasas de *Holothuria impatiens*.

<i>Holothuria impatiens</i> Parte Anatómica u Órgano	Actividad enzimática promedio (UAP/mg) \pm D.E.									
	pH									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Podios	27.5 \pm 13.7	41.3 \pm 5.7	36.1 \pm 0.1	33.5 \pm 0.2	60.1 \pm 0.6	57.2 \pm 0.1	81.3 \pm 3.1	34.6 \pm 0.5	35.4 \pm 1.9	
Tracto Digestivo	52.2 \pm 3.3	60.8 \pm 0.09	39.6 \pm 13.2	37.7 \pm 14.3	55.9 \pm 16.3	55.3 \pm 5.9	68.7 \pm 7.9	64.2 \pm 2.4	71.2 \pm 0.1	
Túbulos Internos	28.3 \pm 0.4	-----	11.6 \pm 0.1	-----	37.9 \pm 0.4	22.0 \pm 0.4	23.8 \pm 0.3	21.1 \pm 0.1	33.9 \pm 0.1	
Piel Externa	17.1 \pm 0.3	15.7 \pm 0.4	-----	20.4 \pm 2.2	30.9 \pm 0.3	30.3 \pm 0.3	29.6 \pm 0.4	26.6 \pm 0.3	30.1 \pm 0.05	
Piel Interna	2.0 \pm 0.05	-----	3.7 \pm 0.2	11.5 \pm 0.2	15.6 \pm 0.1	20.8 \pm 0.4	24.2 \pm 0.2	19.9 \pm 0.2	19.8 \pm 0.05	
Piel 1 Ventral	20.6 \pm 5.0	13.9 \pm 0.9	48.4 \pm 0.1	33.8 \pm 7.6	25.7 \pm 2.7	42.7 \pm 5.3	27.5 \pm 0.6	24.9 \pm 0.7	29.5 \pm 0.2	
Piel 1 Dorsal	27.8 \pm 6.9	19.8 \pm 1.3	17.9 \pm 1.8	18.5 \pm 2.2	16.8 \pm 1.2	43.0 \pm 13.5	31.6 \pm 2.2	33.5 \pm 0.9	42.9 \pm 6.6	
Piel 2 Ventral	15.1 \pm 0.8	13.7 \pm 0.8	19.1 \pm 6.8	24.3 \pm 4.3	22.1 \pm 2.1	23.5 \pm 1.2	34.2 \pm 7.3	34.8 \pm 8.3	24.2 \pm 3.9	
Piel 2 Dorsal	29.9 \pm 17.1	18.3 \pm 0.1	22.9 \pm 1.4	19.8 \pm 2.7	44.2 \pm 1.9	41.5 \pm 0.3	38.0 \pm 0.2	40.9 \pm 1.5	38.2 \pm 0.6	

*Los datos presentados son medias de determinaciones por triplicado \pm desviación estándar (D.E.).

*Los valores de máxima actividad específica están marcados en azul ($p < 0.001$).

8.2.3 Análisis del peso molecular de las enzimas extraídas del pepino de mar.

Se utilizó un marcador (Figura 41) de peso molecular de 14 a 66 kDa (Tabla 11) con el cual se identificaron en la mayoría de los órganos del pepino de mar *Isostichopus fuscus* proteínas de un peso molecular estimado de 39 kDa y para *Holothuria impatiens* proteínas de 45 a 66 kDa (Figura 46).

Se realizó un estudio más detallado de los podios de la cavidad oral ya que fueron los que presentaron alta actividad enzimática, y se encontraron proteínas de peso molecular de aproximadamente 39.1, 44.99, 65.56 y 103.34 kDa para *I. fuscus* (Figura 42). Durante la electroforesis no desnaturalizante se pudo apreciar una nueva banda que indica la presencia de una proteína de un peso estimado de 52.78 kDa (Figura 42), sin embargo, pudo haberse debido a una desnaturalización de las proteínas ya que el densitograma (Figura 42-banda 6) nos permite ver que no se detecta un pico significativo de esta banda que en el gel de electroforesis era muy tenue. Además, se ha reportado que diferentes proteínas de igual talla pueden migrar como una banda única (Bjellqvist, 2000).

En el extracto enzimático de los podios de *Holothuria impatiens* se encontraron proteínas de peso molecular mayor a las de *I. fuscus*, su peso estimado fue de 84.64 y 56.87 kDa (Figura 46-Tabla 12).

En el Anexo 19, se presentan de manera detallada cada uno de los perfiles electroforéticos de los extractos enzimáticos de cada parte anatómica u órgano estudiado de *I. fuscus* y *H. impatiens*, con su respectivo densitograma y tabla de detalles.

Existen pocos estudios reportados sobre caracterización de proteasas del pepino de mar, entre las pocas especies estudiadas esta el *Stichopus japonicus*, donde las enzimas del extracto crudo de su tracto digestivo mostraron una gran actividad caseinolítica y ácida. Fu y col. (2005) reportaron la presencia de proteasas con un peso molecular de 20.6 kDa, 39.1 y 114.1 kDa, estos resultados coinciden con los resultados obtenidos para *I. fuscus* ya que en este estudio se identificaron proteínas de 17.9, 39.15 y 117.27 kDa (Tabla 12 y Anexo 19). En el caso de *H. impatiens*, sólo se identificó una proteína de peso molecular similar al reportado por Fu y col., esta tuvo un peso de 25.62 kDa (Tabla 12). Sin embargo, en los demás órganos

y partes anatómicas de *I. fuscus* estudiados, se identificaron proteasas de igual peso molecular al reportado de 39.1 kDa (Figuras 42, 43, 44) y en la piel anterior ventral una proteína de 18 kDa (Tabla 12 y Anexo 19). Así mismo, en la piel anterior ventral de *H. impatiens* una proteína de 24.21 kDa (Tabla 12 y Anexo 19).

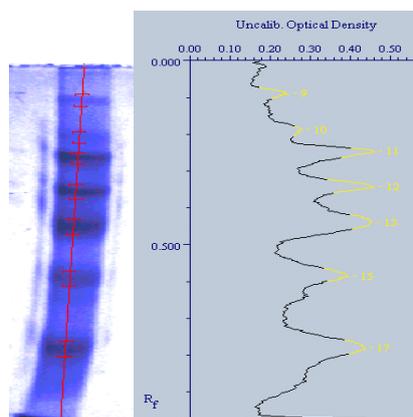
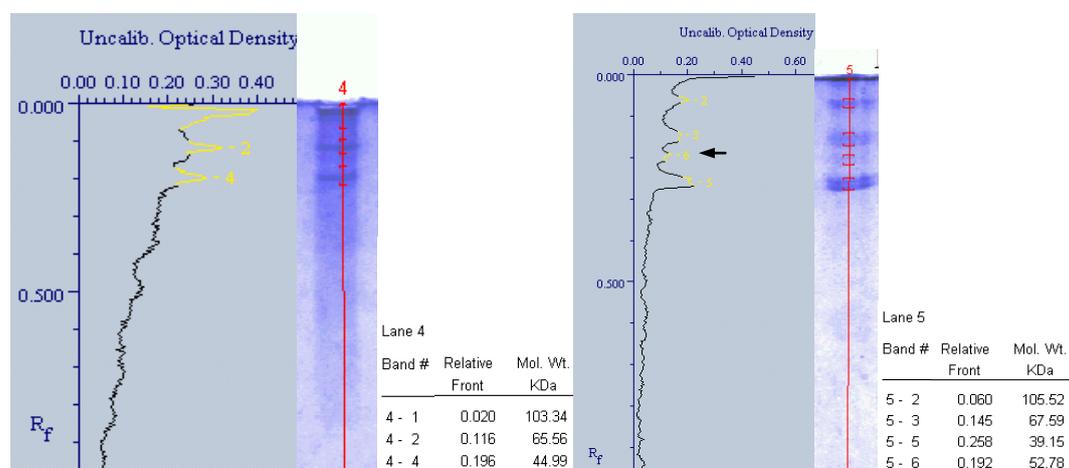


Figura 41. Perfil electroforético del Marcador Sigma VII-L (14-66 kDa).

Tabla 11. Proteínas del marcador Sigma VII-L y detalles del perfil electroforético.

Proteína	Número de banda en el densitograma	Movilidad relativa (Rf)	Peso molecular (kDa)
Albúmina bovina.	9	0.089	66
Inhibidor de tripsina de soya.	10	0.187	45
Tripsinogeno bovino y dimetilsulfanilamida tratada (DMSE) bovina.	11	0.246	36
Anhidrasa carbónica bovina.	12	0.341	29
Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa.	13	0.439	24
Albúmina de huevo.	15	0.585	20
α -Lactoalbúmina bovina.	17	0.78	14.2



Electroforesis desnaturalizante y no desnaturalizante de muestras extraídas de los podios de *I. fuscus*.

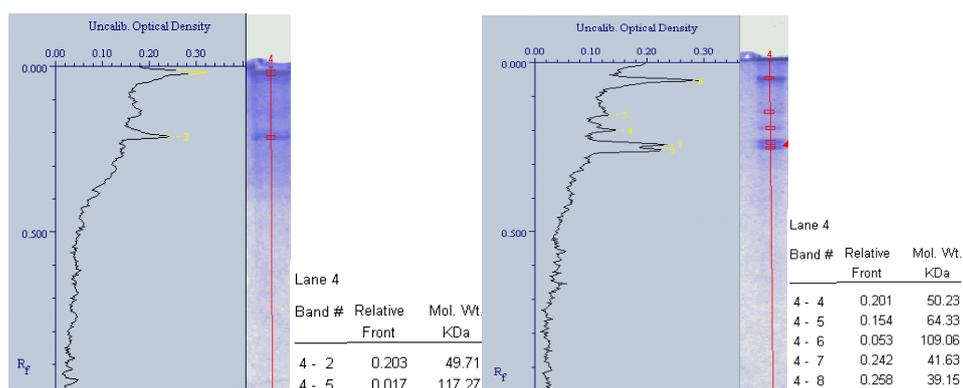


Figura 43. Electroforesis desnaturalizante y no desnaturalizante de muestras extraídas del tracto digestivo de *I. fuscus*.

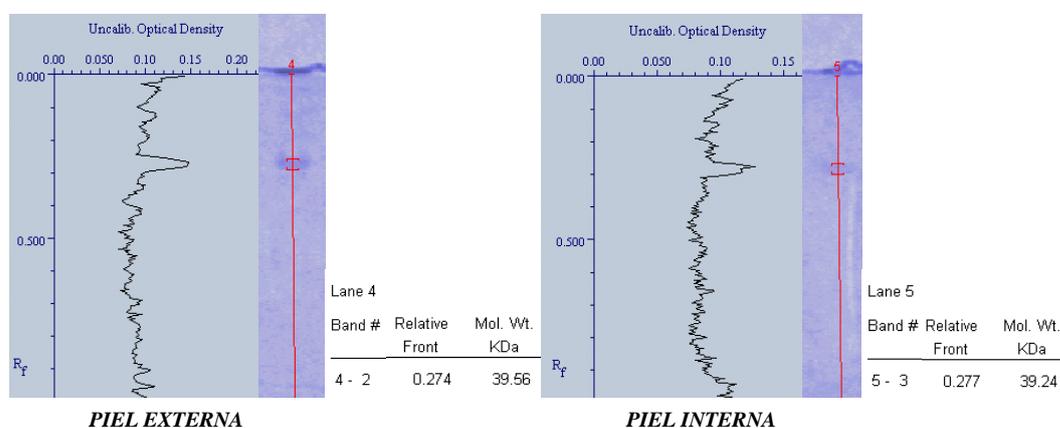


Figura 44. Electroforesis no desnaturalizante de muestras extraídas de la piel externa e interna de *I. fuscus*.

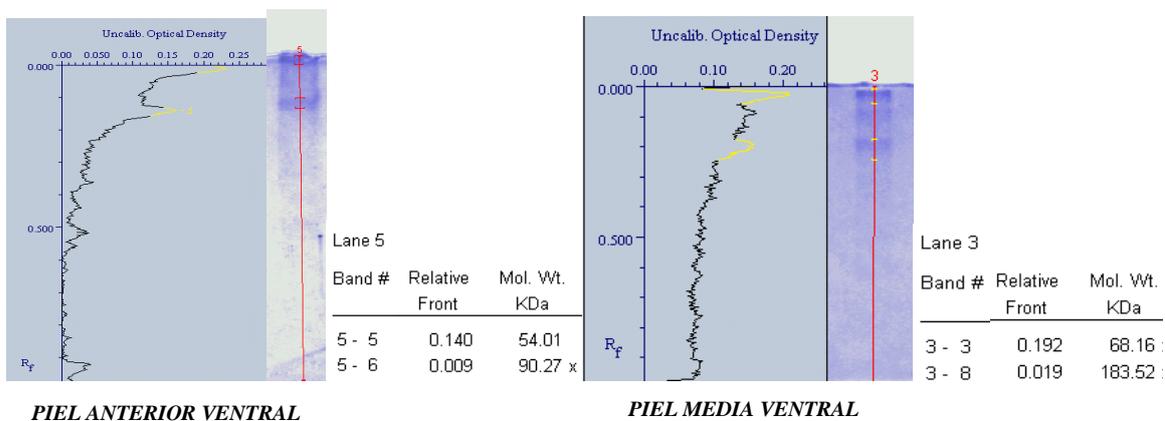


Figura 45. Electroforesis desnaturalizante de muestras extraídas de las diferentes regiones de la piel de *I. fuscus*.

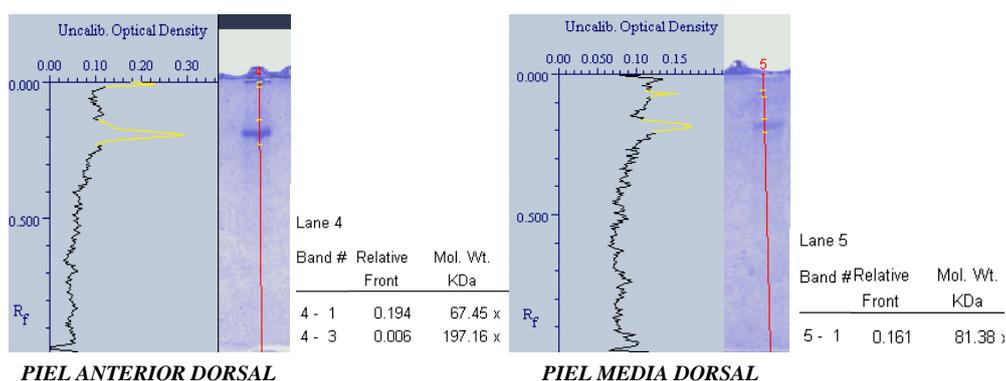


Figura 45. Electroforesis desnaturante de muestras extraídas de las diferentes regiones de la piel de *I. fuscus*.

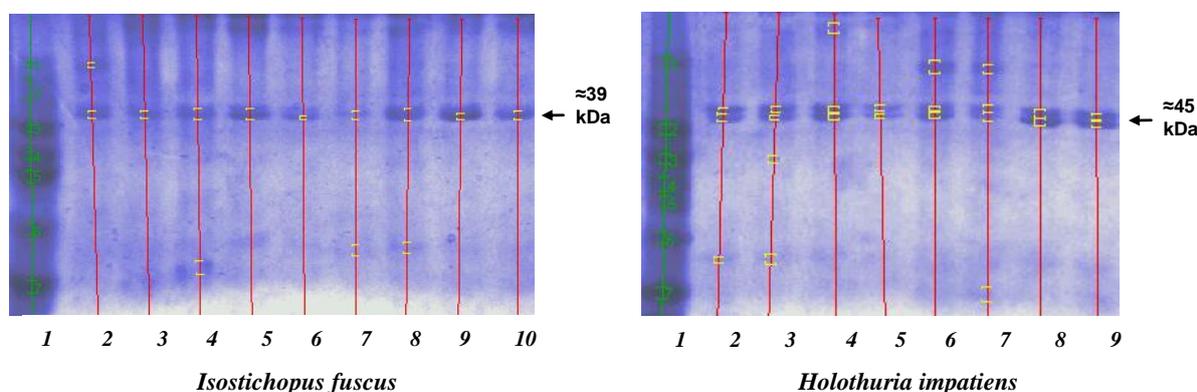


Figura 46. Electroforesis no desnaturante de muestras extraídas de diferentes partes anatómicas u órganos de *I. fuscus* y *H. impatiens*.

Tabla 12. Muestras de extractos enzimáticos de *I. fuscus* y *H. impatiens* inyectadas en los geles de electroforesis no desnaturante y los valores estimados de pesos moleculares.

<i>Isostichopus fuscus</i>			<i>Holothuria impatiens</i>		
Carril	Muestra	P.M. estimado (kDa)	Carril	Muestra	P.M. estimado (kDa)
1	Marcador	66-14	1	Marcador	66-14
2	Podios	39.0 y 65.04	2	Piel 1 Ventral	51.3, 48.8 y 24.2
3	Tubo Respiratorio	39.37	3	Piel 2 Ventral	66, 45, 36 y 29
4	Túbulos Internos	16.32 y 38.94	4	Piel Externa	72.1 y 45.3
5	Piel Externa	38.88	5	Piel Interna	88.4 y 59.3
6	Piel Interna	38.6	6	Podios	84.6 y 56.9
7	Tracto Digestivo	17.90 y 39.40	7	Tracto Digestivo	84.2, 60.6 y 25.6
8	Piel 1 Ventral	18.00 y 39.18	8	Piel 1 Dorsal	65.9 y 44.7
9	Piel 1 Dorsal	39.34	9	Piel 2 Dorsal	55.3 y 44.2
10	Piel 2 Dorsal	39.46			

8.2.4 Detección de actividad proteolítica.

Los zimogramas se realizaron como se menciona en la metodología. Sin embargo, no se obtuvieron las zonas bioactivas de las enzimas proteolíticas de los pepinos de mar *I. fuscus* y *H. impatiens*, por lo que en este caso, es necesario concentrar los extractos proteicos. Así mismo, no fue posible detectar la presencia de posibles enzimas diferentes a las proteasas identificadas por medio de las electroforesis realizadas.

Por lo tanto, en estudios posteriores más detallados se pueden realizar purificaciones de los extractos enzimáticos empleando técnicas de separación de macromoléculas, por ejemplo, técnicas cromatográficas como la cromatografía de intercambio iónico, para la posterior realización de zimogramas para identificar las distintas fracciones con actividad proteolítica presentes en cada extracto.

8.2.5 Detección de enzimas traza.

Se realizaron tinciones con plata en las electroforesis para detectar enzimas en concentraciones de nanogramos (0.3-10 ng). Sin embargo, no fue posible visualizar las bandas de las proteínas en los geles electroforéticos ya que el extracto enzimático primario no fue lo suficientemente puro. Es necesario concentrar el extracto proteico.

9. CONCLUSIONES.

- ❖ La caracterización histológica de los órganos de los pepinos de mar *Isostichopus fuscus* y *Holothuria impatiens* permitió identificar diferentes estructuras celulares, lo que contribuye a ampliar el conocimiento básico sobre estas especies.
- ❖ En este trabajo se pudo identificar gran cantidad de tejido conjuntivo; agregados de células con actividad digestiva y los epitelios de estas regiones digestivas; un tipo de inclusiones con tinción basófila (inmersas en tejido conjuntivo y en agregados) que sugieren la acción de defensa de hemocitos contra agentes externos al organismo; se pudo ver la posible acción de uno de los mecanismos de defensa llamado *formación de nódulos*. También se observaron los túbulos intestinales, la presencia de un parásito y residuos de alimento (posiblemente algas).
- ❖ En particular, los tejidos observados al microscopio que presentaron una evidente cantidad de células con actividad digestiva, fueron: podios o tentáculos, túbulos internos, tubo respiratorio y la piel dorsal.
- ❖ En cuanto a la concentración de proteína se observó que los túbulos internos, la piel interna, piel anterior dorsal y los podios poseen una concentración estadísticamente significativa con respecto a las demás partes anatómicas u órganos de *I. fuscus*. Para *H. impatiens* no se obtuvo diferencia significativa entre las concentraciones de las muestras estudiadas.
- ❖ Los resultados enzimáticos mostraron que los órganos de los pepinos de mar a valores de pH ácido tienen baja actividad proteolítica comparada con los valores de actividad a pH básico.

- ❖ Se encontró que la actividad proteolítica en los podios es significativamente ($p \leq 0.002$) mayor y en particular, para *H. impatiens*, a pH 2 (27 ± 14 UAP/mg) y a pH de 6 a 10 (hasta 81 ± 3 UAP/mg). Así mismo los tentáculos presentaron alta concentración de proteína (> 5.5 mg/mL).
- ❖ También, se observó que la piel externa a pH 10 y pH de 2 a 4 (hasta 68 ± 36 UAP/mg), y la piel ventral a pH 10 (61 ± 35 UAP/mg), para *I. fuscus*, así como la piel ventral a pH 4 y 7, para *H. impatiens*, tienen actividades significativamente ($p \leq 0.005$) mayores con respecto a las actividades de las otras muestras.
- ❖ Por otro lado, posiblemente el tipo de familia (*Stichopodidae* o *Holothuriidae*) de los pepinos de mar puede influir en la actividad enzimática por sus diferencias metabólicas.
- ❖ La relación entre el estudio histológico y enzimológico, con respecto a la presencia de ciertas inclusiones con actividad digestiva, sugiere que estos posibles hemocitos al llevar a cabo el método de defensa que los caracteriza tienen acción de proteólisis ácida ó básica contra agentes extraños, de ahí la presencia de actividad digestiva en todo el cuerpo del pepino de mar. Además de que se sugiere un mecanismo de digestión alterna para que estos organismos sobrevivan durante el tiempo que se regeneran sus órganos expulsados (3 a 4 semanas) a causa de estrés o como mecanismo de defensa.
- ❖ Se encontraron proteínas de alto peso molecular de entre 30 a 120 kDa en la mayoría de los órganos estudiados de las dos especies. En general, en la mayoría de los órganos del pepino de mar *I. fuscus* se encontraron proteínas de peso molecular estimado de 39 kDa y para *H. impatiens* proteínas de 45 a 66 kDa.
- ❖ Los podios de la cavidad oral los cuales manifestaron la mayor actividad proteolítica, mostraron proteínas de aproximadamente de 39.1, 44.99, 65.56, 103.34 kDa para *I. fuscus*, y en *H. impatiens* se encontraron proteínas de peso molecular mayor, su peso estimado fue de 84.64 y 56.87 kDa.

10. CONCLUSIÓN GLOBAL.

Los resultados obtenidos mostraron que los órganos y partes anatómicas de *I. fuscus* y *H. impatiens* tienen gran cantidad de tejido conjuntivo y agregados de células con actividad digestiva, además de un tipo de inclusiones que sugieren la acción de defensa de hemocitos contra agentes externos al organismo. También, que pueden existir dentro de estos organismos parásitos y residuos de algas usadas como alimento. Los tejidos que presentaron una evidente cantidad de células con actividad digestiva fueron los podios o tentáculos, túbulos internos, tubo respiratorio y la piel dorsal, los cuales presentaron alta concentración de proteína (> 5.5 mg/mL).

Los resultados del estudio enzimológico complementaron el estudio histológico. Estos mostraron que en general, los órganos de los pepinos de mar, *I. fuscus* y *H. impatiens*, tuvieron menor actividad enzimática a pH ácido comparada con la actividad a pH básico.

Al analizar los resultados de actividad de los diferentes órganos dentro de cada especie, se encontró que la actividad proteolítica en los podios fue mayor, siendo estadísticamente significativa a pH de 6 a 10, sugiriendo la presencia de serín proteasas y a pH 2 la presencia de proteasas aspárticas. Así mismo, se observó que los extractos de piel externa (pH 2-4 y 10), y los de piel ventral (pH 10) de *I. fuscus*, así como los extractos de piel ventral de *H. impatiens* (pH 4 y 7) tienen actividades significativamente mayores que otros órganos, posiblemente por el contacto que la piel tiene con el medio ambiente. Además, sugiere que las diferencias metabólicas entre el tipo de familia (*Stichopodidae* o *Holothuriidae*) de los pepinos de mar influye en la actividad proteolítica.

Se encontraron proteínas de alto peso molecular, entre 30 a 120 kDa, en la mayoría de los órganos estudiados de las dos especies. En general, en la mayoría de los órganos del pepino de mar *I. fuscus* tuvieron proteínas de peso molecular estimado de 39 kDa, mientras que en *H. impatiens* las proteínas fueron de 45 a 66 kDa. En los tentáculos se identificaron proteínas de alrededor de 39, 45, 66 y 103 kDa para *I. fuscus*, determinándose una alta concentración de proteína mayor a 5.5 mg/mL.

En el extracto enzimático de los podios de *H. impatiens* se encontraron proteínas de peso molecular mayor a las de *I. fuscus*, su peso estimado fue de 84.64 y 56.87 kDa.

La relación entre el estudio histológico y enzimológico, con respecto a la presencia de ciertas inclusiones con actividad digestiva, sugiere que estos posibles hemocitos tienen acción de proteólisis ácida ó básica, de ahí la presencia de actividad digestiva en todo el cuerpo del pepino de mar. Además de que se sugiere un mecanismo de digestión alterna para estos organismos.

Finalmente, el conocimiento de las enzimas digestivas podría aclarar la bioquímica nutricional y la fisiología de los pepinos de mar, ayudando a determinar sus capacidades digestivas. Por lo que demostrar las características *sui generis* de las proteasas presentes en estas especies y su relación con determinados tejidos contribuirá al conocimiento básico de la actividad y función de estas enzimas, esperando sentar las bases para posteriores estudios estructurales y posibles aplicaciones bioquímicas.

11. RECOMENDACIONES PARA LA CONTINUACIÓN DEL PRESENTE ESTUDIO.

11.1 Histología.

- ❖ En la fijación de los tejidos se pueden utilizar formaldehído, glutaraldehído, o tetróxido de osmio como fijadores ya que son algunos de los agentes más efectivos que permiten mantener el aspecto de la célula.

- ❖ En la inclusión en parafina, el alcohol y el xileno extraen las grasas y el calentamiento de la inclusión inactiva muchas enzimas; además a menudo el tejido se contrae de modo perceptible. Para evitar estos problemas, se puede efectuar un corte por congelamiento de tejido fijado o no. El tejido congelado tiene la consistencia suficiente para ser cortado en un crióstato (-10 a -20°C). La técnica de congelación es tan rápida que se pueden obtener secciones en pocos minutos. Además, los cortes por congelación se pueden tratar con las soluciones acuosas de las tinciones inmediatamente después de ser seccionados. El método de congelación-deseccación intenta lograr que la variación estructural y la extracción química sean las mínimas posibles para conservar la actividad enzimática.

- ❖ En cuanto a la tinción, para un estudio más detallado donde se requiera evidenciar la estructura particular de las proteínas, puede realizarse un estudio histoquímico utilizando una tinción específica para proteínas como la reacción de Millon, la cual da como resultado positivo una tinción rosa a rojo ladrillo cuando las proteínas poseen el aminoácido tirosina.

11.2 Enzimología.

- ❖ Ampliar el rango de pH de 1 a 14 para la determinación de actividad proteolítica de las enzimas del pepino de mar ya que está reportado un trabajo donde se mide actividad a pH de 13.5 (X. Fu y col., 2005).
- ❖ Realizar pruebas microbiológicas a los pepinos de mar para descartar el efecto de alta actividad enzimática en la piel externa y ventral, por acción de la interacción ó presencia de microorganismos en el pepino de mar.
- ❖ En el estudio de estimación del peso molecular de las proteasas del pepino de mar por medio de electroforesis, se recomienda realizar antes del estudio, concentraciones de los extractos enzimáticos de cada parte anatómica u órgano de interés, con sulfato de amonio para precipitar las proteínas y realizar una diálisis para eliminar estas sales e impurezas presentes.

12. BIBLIOGRAFÍA.

- Aguilar Ibarra A., Ramírez Soberón G. 2002. Economic reasons, ecological actions and social consequences in the Mexican sea cucumber fishery. SPC Beche-de-Mer Information Bulletin, 17:33–26.
- Anderson S.J., Lall S.P., Anderson D.M., McNiven M.A., 1993. Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assays. Aquacul. 115:305-325.
- Alarcón F.J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: caracterización y aplicaciones prácticas (Serie Tesis Doctorales). Universidad de Almería. Almería, España.
- Alarcón F.J., Díaz, M., Moyano, F.J., Abellán, E. 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). Fish. Physiol. Biochem. 19: 257-267.
- Aleander, S.C.C., Roshada, H., Lee, C.Y., 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aquaculture 203, 321– 333.
- Alunchalam, K., Haard, N.F., 1985. Isolation and characterization of pepsin from Polar cod, *Boreogadus saida*. Comp. Biochem. Physiol. 80B, 467-473.
- Anggawati A.M., Heruwati E.J. 1990. The use of hydrolyzed protein concentrate in practical diets for *Penaeus monodon* juveniles. Research Institute for Fish Technology, Palmerath, Jakarta.
- Anson M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 22:79-89.
- Aoki H., Ahsan M. N., Matsuo K., Hagiwara T., Watabe S., 2003. Purification and characterization of collagenolytic proteases from the hepatopancreas of northern shrimp (*Pandalus eous*). J. Agric. Food Chem. 51, 777-783.
- Barel C.D., Kramer P.G. 1977. A survey of the echinoderm associates of the north-east Atlantic area. Zoologische Verhandelingen. Leiden, Bélgica.
- Battaglione S.C. 1999. Culture of tropical sea cucumbers for stock restoration and enhancement. NAGA, the ICLARM Quarterly 22(4):4–11.
- Battaglione S.C., Seymour J.E., Ramofafia C. 1999. Survival and growth of cultured juvenile sea cucumbers *Holothuria scabra*. Aquacult. 178(3/4):293–322.

- Becker P. 2002. La maladie de la tache blanche chez l’holothurie comestible commercialisée *Holothuria scabra*. Master thesis. Université de Mons-Hainaut, Belgique.
- Bhakuni D.S., Rawat D.S. 2005. Bioactive Marine Natural Products. Springer, New York, USA with Anamaya Publishers, New Delhi, India.
- Bjellqvist B., 2000. Pharmacia Biotech AB, assignee. Buffer system for electrophoresis and use thereof. US patent. 6 090 252. 2000 July 18.
- Bohinski R. C., 1991. Bioquímica. Quinta edición. Massachusetts, EU. Addison Wesley Iberoamericana S. A. 175 p.
- Calva L. 2002. Hábitos Alimenticios de Algunos Equinodermos. Parte 2: Erizos de mar y Pepinos de mar. Laboratorio de Ecosistemas Costeros, Departamento de Hidrobiología. UAM-Iztapalapa.
- Caso M. E., 1961. Los equinodermos de México. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de México. 388 p.
- Castro L.R.S. 1995. Management options of the commercial dive fisheries for sea cucumbers in Baja California, Mexico. SPC Beche-de-Mer Information Bulletin 7: 20.
- Castro L.R.S. 1997. Review of recent developments in the Baja California, Mexico, *Isostichopus fuscus*, *Holothuria impatiens* and *Parastichopus parvimensis* fisheries. SPC Beche-de-Mer Information Bulletin, 9: 26–27.
- Chakrabarti I., Gani M. A., Chaki K. K., Sur R., Mistra K. K., 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. Comp. Biochem. Physiol. 112A:167-177.
- Chaplin M.F., Bucke C. 1990. Enzyme Technology. Cambridge University Press. Cambridge University, Inglaterra.
- Claeys, E., Uytterhaegen, L., Buts, B. y Demeyer, D. 1995. Quantification of Beef Myofibrillar Proteins by SDS-PAGE. Meat Sci. 39:177-193.
- Clark J., MacDonald N.L., Stark J.R. 1985. Metabolism in marine flatfish: II. Protein digestion in Dover sole (*Solea solea* L.). Comp. Biochem. Physiol. 81:217– 222.
- DeMoor S., Waite J.H., Jangoux M., Flammang P. 2003. Characterization of the adhesive from Cuvierian Tubules of the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, *Holothuroidea*). Marine Biotechnol. 5:45-57.
- Diario Oficial de la Federación. 2004. Carta Nacional Pesquera. Lunes 15 de Marzo de 2004. SAGARPA, CONAPESCA.

- Dimes L.E., García Carreño F.L., Haard N.F. 1994. Estimation of protein digestibility: III. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A:349-360.
- Dolmatova L.S., Eliseika M.G., Romashina V.V. 2004. Antioxidant enzymatic activity of coelomocytes of the far east sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 40:126-135.
- Endean R. 1957. The Cuvierian tubules of *Holoturia leucospilota*. *Quart J. Microscop. Sci.* 98: 455-472.
- Eshel A., Lindner P., Smirnoff P., Newton S., Harpaz S. 1993. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the european sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. *Comp. Biochem. Physiol.* 106:627-634.
- Essed Z., Fernández I., Alarcón F. J. y Moyano F. J., 2002. Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Bol. Instituto Español de Oceanografía.* 18 (1-4). 99-107.
- Estrada Flores E., Peralta Z. L., Rivas Manzano O., 1982. *Manual de Técnicas Histológicas.* Editorial AGT. México D.F.
- Fajardo León M.C., Michel Guerrero E., Singh Cabanillas J., Vélez Barajas J.A., Massó Rojas A. 1995. Estructura poblacional y ciclo reproductor del pepino de mar *Isostichopus fuscus* en Santa Rosalia, B.C.S., México. *Cien. Pesquer.* 11: 45-53.
- Fennema R., Danson, M.J. 1993. *Química de los alimentos.* Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Fish J. D., 1967. The digestive system of the holothurian, *Cucumaria elongata*. I. Structure of the gut and hemal system. *Biol. Bull.*, 132: 337-353.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. *Advances in Sea Cucumber aquaculture and management.* Lovatelli A. (comp./ed.), Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J. F., Mercier A. (eds.). *FAO Fisheries Technical Paper.* No. 463. Rome, Italy. 425p.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. *Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade.* Toral-Granda V.; Lovatelli A.; Vasconcellos M. (eds). *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper.* No. 516. Rome, Italy. 317 p.

- Fu-Yan X., Hu-Xue C., Chun-Miao B., Jie-Li Z., Gao X., Wen-Ge Y. 2005. Characterization of proteases from the digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): High alkaline protease activity. *Aquaculture* 246: 321-329.
- García Barrientos R., 2001. Efecto de las enzimas endógenas sobre las propiedades fisicoquímicas y estructurales de carne de bovino durante la maduración. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM. México D.F.
- García Carreño F.L. 1992. Protease inhibition in theory and practice, *Biotech. Edu.* 3:145–150.
- García Carreño F.L., Dimes L., Haard N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analyt. Biochem.* 214: 65-69.
- García Pérez M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico. La Habana, Cuba.* Vol. 1(2):31-4.
- Geneser F. 2002. *Histología. Sobre bases biomoleculares.* Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Gildberg, A., Raa, J., 1983. Purification and characterization of pepsins from Arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 75A, 337–342.
- Gobierno del Estado de Baja California Sur. Secretaría de Planeación Urbana, Infraestructura y Ecología. XI Sesión del Órgano Técnico del Ordenamiento Ecológico Marino del Golfo de California. 14 de julio de 2009, La Paz, B.C.S.
- Godfrey T., Reichelt J. 1983. *Industrial Enzymology.* The Nature Press. Surrey, Inglaterra.
- Goo S-Y., Guo Z., Chen B-Y., Guo Q., Ni S-W., Wang X-C. 2003. Urea induced inactivation and unfolding of arginine kinase from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, *Biochem.* 68:1267- 1271.
- Guerrero Olazarán M., Cab Barrera E., Galán Wong L. J., Viader Salvadó J. M. 2004. Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la aplicación en Acuicultura. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora. México.
- Guillaume J. y Choubert G., 1999. Physiologie digestive et digestibilité des nutriments chez les poissons. En: *Nutrition et Alimentation des Poissons et Crustacées.* J. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot y R. Métailler (eds.). INRA-IFREMER. Versailles, Francia: 489 pp.

- Guo Q., Zhao F., Guo Z., Wang X. 2004. Intermediates in the inactivation and unfolding of dimeric arginine kinase induced by GdnHCl. *J. Biochem.* 136: 49-56.
- Gustato G., Villari A. and Villani G., 1979. Ulteriori dati sul comportamento di *Carapus acus* (Gadiformes, Ophidiodei). *Bollettino Società Naturalisti di Napoli* 88:535-547.
- Gutierrez García A., 1999. Potential culture of sea cucumber in Mexico. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin* 11: 26–29.
- Haard N.F, Helbig N., Feltham L. 1981. The temperature characteristics of pepsin from two stocks of American smelt (*Osmerus mordax*). *Proceedings Workshop on the Labrador Coasting Offshore Region, Newfoundland Institute of Cold Ocean Science, St. Johns. Terranova, Canadá.*
- Haard N.F., Simpson B.K. 2000. *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality.* Ed. Marcel Dekker. New York, USA. 681 pp.
- Haard N.F, Simpson B.K. 1994. Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. En: *Fish Process: Biotechnological Applications.* A.M. Martin, (editor). Chapman & Hall, Londres, Inglaterra.
- Haard N.F. 1998. Specialty enzymes from marine organisms. *Food Technol.* 52(7):64–67.
- Hatakeyama H., Matsuo N., Shiba K., Nishinohara S., Yamasaki N., Sugawara H., Aoyagi H., 2002. Aminoacid sequence and carbohydrate-binding analysis of the N-acetyl-D-galactosamine- specific C-type lectin, CEL-I, from the holothuroidea *Cucumaria echinata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 157-163.
- Hatakeyama T., Kohzaki H., Nagatomo H., Yamasaki N., 1994. Purification and characterization of four Ca²⁺-dependent lectins from the marine invertebrate *cucumaria echinata*, *J. Biochem.* 116: 209-214.
- Herrero Pérezrul M.D., Reyes Bonilla H., García Domínguez F., Cintra Buenrostro C.E. 1999. Reproduction and growth of *Isostichopus fuscus* (Echinodermata: Holothuroidea) in the southern Gulf of California, Mexico. *Marine Biol.* 135:521–532.
- Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267-283.
- Himeshima T., Hatakeyama T., Yamasaki N. 1994. Aminoacid sequence of a lectin from the sea cucumber, *Stichopus japonicus*, and its structural relationship to the C-type animal lectin family. *J. Biochem.* 115: 689-692.

- Howaida R.G., Ahmed A.I., Hanafy M.H., Lawrence A.J., Ahmed M.I., El-Etreby S.G. 2004. Mariculture of sea cucumber in the Red Sea - the Egyptian experience. FAO. Roma, Italia.
- Huiling S., Mengqing L., Jingping Y., Bijuan., C. 2004. Nutrient requirements and growth of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 463. Rome, Italy. 327p.
- Hultin H.O. 1980. Enzymes from organisms acclimated to low temperatures. En: Enzymes. The Interface Between Technology and Economics. J.P Danehy y B. Wolnak (editors). Marcel Dekker, Nueva York.
- Jangoux M. 1990. Diseases of Echinodermata. En: Disease of Marine Animals, Vol. 3. O. Kinne (editor). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburgo, Alemania.
- Jonas E., Ragyanski M., Olah J., Borros L. 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis*, L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix*, VAL) and omnivorous (*Cyprinus carpio*, L.) fishes. *Aquacul.* 30: 145-154.
- Kristjansson M. M., Gudmundsdottir S., Fox J. W., Bjarnason J. B., 1995. Characterization of collagenolytic serine proteinases from the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 101B, 247–253.
- Kunitz M. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. *J. Gen. Physiol.* 30:291-310.
- Lan C. C., Pan B. S. 1993. *In vitro* digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodom*). *Aquacul.* 109:59-70.
- Lehninger L. A. 1991. Bioquímica. 2ª Edición. Editorial Omega. Barcelona España.
- Lomonte V. B. & G. Rojas. 1996. Manual de laboratorio de inmunología general. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Capítulo 13. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida. p. 92-101.
- Low P. S., Bada J. L., Somero G.N. 1973. Temperature adaptation of enzymes: Roles of free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70:430–432.
- Markle D. F., Olney J.E. 1990. Systematics of the Pearlfish (*Pisces: Carapidae*). *Bull. Marine Sci.* 47(2):269-410.
- Mathews K. E., van Holde, G. Ahern. A. 2002. Bioquímica. Editorial Pearson Addison Wesley. Barcelona, España.

- Matsubara H., Nakamura-Tsukata, S., Hirabayashi, J., Jimbo, M., Kamiya, H., Ogawa, T., Muramoto, K. 2007. Diverse sugar-binding specificities of the marine invertebrate C-type lectins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(2):513-519.
- McLachan J., Craigie J. S. 1964. Glycerol as a photosynthetic product in *Dunaliella tertioleicta* Butcher. *Can. J. Bot.* 42: 777-778.
- Merril C.R., Dunau M.L., Goldman D. 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 110(1):201-207.
- Merril C.R., Pratt M.E. 1986. A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes or thin layer plates. *Anal Biochem.* 156(1):96-110.
- Moyano F.J., Alarcón, F.J., Díaz, M. 1999. Comparative biochemistry of fish digestive proteases applied to the development of in vitro digestibility assays. *Trends Biochem.* 5:135-143.
- Müller W.E.G., Zahn R.K., Schmid K. 1972. The adhesive behaviour in Cuvierian tubules of *Holothuria forskali*: biochemical and biophysical investigations. *Cytobiologie* 5:335-351.
- Murria G., García Arrarás J.E. 2004. Myogenesis during holothurian intestinal regeneration. *Cell Tissue Res* 318:515-524.
- Murray G., Ginette C.A., File S.K., García Arrarás J.E. 2006. Contribution of mesenterial muscle dedifferentiation to intestine regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberiana*. *Cell Tissue Res.* 325:55-65.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9(6), 255-62.
- Notsu K. and Shiratori M., inventors. 1997. Daiichi Pure Chemicals Co., assignee. Method for drying polyacrylamide gel after electrophoresis, US patent 5 635 046. 1997 june 3.
- Oakley B.R., Kirsch D.R., Morris N.R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 105(2):361-3.
- Oda T., Tsuru M., Hatakeyama T., Nagatomo H., Muramatsu T., Yamasaki N. 1997. Temperature and pH dependent cytotoxic effect of the hemolytic lectin CEL III from the marine invertebrate *cucumaria echinata* in various cell lines. *J. Biochem.* 121:560-567.

- Odintsova N.A., Dolmatov I., Mashanov V.S. 2005. Regenerating holothurian tissues as a source of cells for long-term cell cultures. *Marine Biol.* 146:915-921.
- Ouali, A.N. y Valin C. 1980. Effects of muscle lysosomal enzymes and calcium activated neutral proteinase on myofibrillar ATPase activity: relationship with ageing changes. *Meat Sci.* 5-233.
- Park Y.W., Juárez M., Ramos M., Haenlein G.F.W., 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68. 88–113.
- Parmentier E. 2003. Contribution à l'étude des relations entre des poissons de la famille des Carapidae et leurs hôtes invertébrés: une approche multidisciplinaire. PhD thesis. Université de Liège, Belgique.
- Pawson D.L. 1995. Echinoderms of tropical island Pacific: status of their systematic and notes on their ecology and biogeography. En: *Marine and coastal biodiversity in the tropical island Pacific region*. Vol. I. J.E. Maragos (editor.). Pacific Science Association/Berenice P. Bishop Museum, Honolulu, Hawaii.
- Rabilloud T. 1990. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* 10:785-94.
- Rabilloud T. 1999. Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol.* 112:297-305.
- Ramamurthy V.D., Krishnamurthy S. 1967. The antibacterial properties of marine blue-green alga *Trichodesmium Erythraeum* (EHR.). *Curr. Sci.* 36, 524-525.
- Rao M.B., Aparna M.T., Monhini S.G., Deshpande V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 62: 597-635.
- Reyes Bonilla H., Herrero Pérezrul M.D. 2003. Population parameters of an exploited population of *Isostichopus fuscus* (*Holothuroidea*) in the southern Gulf of California, Mexico. *Fish. Res.* 59:423–430.
- Roy P., Colas B., Durand P. 1996. Purification, kinetical and molecular characterization of a serine collagenolytic protease from greenshore crac (*Carcinus maenas*) digestive gland. *Comp. Biochem. Physiol.* 115B:87-95.
- Salgado C. L. 1994. Propuesta de las opciones de manejo de las pesquerías de pepinos de mar en las costas oriental y occidental de Baja California, México. Febrero 1994. CRIP Ensenada. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca (inédito).

- San Miguel Ruiz J. E. and García Arrarás J. E. 2007. Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. BMC Dev. Biol. 7:115-123.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. Process Biochem. 40, 2689-2694.
- Schägger H, Von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. Analytical Biochemistry; 166, 368-379.
- Sharon N., Lis H., 1989. Lectins as cell recognition molecules. Science, Vol 246, Issue 4927, 227-234.
- Sheer D. G., Yamane D. K., Hawke D. H., Pau-Miau Yuan. 1990. The use of micro preparative electrophoresis of protein/peptide isolations for primary structure determinations. Peptide Research. 3 (2).
- Shen S.C., Yeh H.S., 1987. Study on Pearlfishes (*Ophidiiformes: Carapidae*) of Taiwan. J. Taiwan Museum 40(2):45-56.
- Shimada S. 1969. Antifungal steroid glycoside from sea cucumber. Science, 163(3874):1462.
- Simpson B. K., Haard N. F. 1987. Cold adapted enzymes from fish. En: Food Biotechnology D. Knorr (editor). Marcel Dekker. Nueva York, USA.
- Simpson B. K., 2000. Digestive Proteases from Marine Animals. In: Haard, N. F., Simpson, B. K. (Eds.), Seafood Enzymes. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 191-213.
- Smith C.L. 1964. Some Pearlfishes from Guam, with notes on their ecology. Pacific Sci. 18:34-40.
- Strausberg R. L., Link R. P. 1990. Protein based medical adhesives. Trends Biotechnol. 8:53-57.
- Suzuki T., Kamidochi M., Inove N., Kawamichi H., Yazawa Y., Furukohri T., Ellington W.R. 1999. Arginine kinase evolved twice: evidence that echinoderm arginine kinase originated from creatine kinase. Biochem. 340: 671-675.
- Switzer R.C., Merrill C.R., Shifrin S. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 98(1):231-7.

- Taylor S.W., White J.H. 1997. Marine adhesives: from molecular dissection to application. En: Protein-Based Materials. K. McGrath K., D. Kaplan (editores) Birkhauser. Boston, Estados Unidos.
- Toral Granda M. V., 2005. The use of calcareous spicules for the identification of the Galápagos sea cucumber *Isostichopus fuscus* in the international market. SPC Beche-de-mer 22: 3-5.
- Toral Granda M. V., 2007. Biological and trade status of sea cucumbers in the families *Holothuridae* and *Stichopodidae*. CITES CoP14 Doc. 62, 33pp. <http://www.cites.org>. Annex 1. Islas Galapagos.
- Trott L. B., Trott E.B. 1972. Pearlfishes (*Carapidae: Gadiforme*) collected from Puerto Galera, Minobra, Philippines. Copeia. 1972:839-843.
- Trott L. B. 1981. A general review of the pearlfishes (*Pisces, Carapidae*). Bull. Marine Sci. 31(3):623-629.
- Valledor de Lozoya A. 1994. Envenenamientos por animales. Animales venenosos y urticantes del mundo. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España.
- Vanden Spiegel D., Jangoux M. 1987. Cuvierian tubules of the holothuroid *Holothuria forskali* (Echinodermata); a morphofunctional study. Marine Biol. 96:263-275.
- Vanden Spiegel D., Jangoux M., 1989. La symbiose entre poissons *Carapidae* et *Holothuridae* autour de l'île de Laing (Mer de Bismarck, Papouasie Nouvelle Guinée). Indo-Malayan Zoology 6:223-228.
- Voet D. and Voet J. 2000. Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona, España.
- Wang F. G. 1997. Nutrient analysis of frozen sea cucumber (*Acaudina molpadioides*). East China Sea Marine Science, 15(4):65-67.
- Wang Pinhong, Chang Yaqing, Yu Jinhai, Li Chunyan, Xu Gaorong. 2007. Acute peristome edema disease in juvenile and adult sea cucumbers *Apostichopus japonicus* (Selenka) reared in North China. Journal of Invertebrate Pathology 96:11-17.
- Wang Y. G., Zhang C.Y., Rong X. J., Chen J. J., Shi C. Y., Sun H. L. & Yan J. P. 2004. Diseases of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in China. In: *Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper*. No. 463. Rome, Italy. 297 p.
- Whitaker J.R. 1994. Classification and Nomenclature of Enzymes. En: Principles of Enzymology for the Food Sciences. Marcel Dekker. Nueva York.

- Yamada A., Takano K., Kamoi I., 1993. Purification and properties of protease from tilapia stomach. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 1903-1908.
- Yamaguchi T., Yashita Y., Takeda I. y Kiso H. 1983. Proteolytic enzymes in green asparagus kiwi fruit and miut: Occurrence and partial characterization. *Agric. Bio.Chem.* 46(8): 1983-1986.
- Yoshinaka R., Sato M., Tanaka H., Ikeda S., 1986. Distribution of pancreatic elastase and metalloprotease in vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B:45-49.
- Yoshinaka R., Sato M., Yamashita M., Itoko M., Ikeda S., 1987. Specificity of the collagenolytic serine proteinase from the pancreas of the catfish (*Parasilurus asotus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 88B, 557-561.
- Zahn R.K., Müller W.E.G., Michaelis M. 1973. Sticking mechanism in adhesive organs from a Holothuria. *Res. Mol. Biol.* 2:47-88.
- Zefirova O. N., Mamaeva A. V., Chupov V. V., Valuev L. L., Plate N. A., 1996. Synthesis and properties of immobilized collagenolytic protease from hepatopancreas of the king crab (*paralithoides camtschatica*). *Appl. Biochem. Microbiol.* 52, 46-464.
- Zetina Moguel C., Ríos Lara G., Hernández Herrera I., Guevara Ortiz M., Ortiz Avilés E., Pool Gómez J. 2002. Catálogo de especies de pepino de mar comercializables del Estado de Yucatán. Editorial Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán.
- Zhonghua Yaohai. 1993. *Encyclopaedia of Herb Medicines of China*. Ran X. D. (Ed.). Ha-Er-Bin Publishing House. China. 1542pp.

13. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Sistema de Centros Públicos CONACYT.

http://www.cibnor.mx/servicios/dat/labs/elabmu.php?LAB_CLAVE=10044&FUNC=INFO_GEN#middle

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. Advances in Sea Cucumber aquaculture and management. Rome, Italy.

http://books.google.com.mx/books?id=0dge3Xh6EjUC&pg=PA349&lpg=PA349&dq=sea+cucumber+Rhodomonas,+Dunaliella&source=bl&ots=WVMBNSeVls&sig=igJ8T6NGmrMnU6HNAgOrMSaKTHA&hl=es&ei=FQu4SvSsHtS0tgf1zKGVdW&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1#v=onepage&q=&f=false

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fishery Information Data and Statistics Unit. 2003. Databases: Capture production 1950-2001. Fisheries commodities production and trade 1976-2001. En: Fishstat Plus (Universal software for fishery statistical time series) version 2.30.

<http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/fishplus.asp>

Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa. La Ciencia para Todos.

http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/063/htm/sec_10.html

Instituto Nacional De Pesca. Pepino de mar *Isostichopus fuscus*.

<http://www.inapesca.gob.mx>

Universidad Autónoma de Madrid. España.

http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/BiologiaCCAA/Guiones/Practica1.htm

Universidad Autónoma de Yucatán. Catálogo de especies de pepino de mar comercializables del Estado de Yucatán.

<http://books.google.com.mx/books?id=3TfhsFIjfnAC&pg=PA55&dq=pepino+de+mar+mexico#v=onepage&q=&f=false>

ANEXO 1.

Composición de dietas para pepino de mar y contenido de proteína.

Components	Composition of diet (%)			
	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
<i>Sargassum thumbergii</i>	45	39	30	23
Fish meal	0	6	15	22
Lees	20	20	20	20
Mud	15.5	15.5	15.5	15.5
Kelp powder	7	7	7	7
Yeast	3	3	3	3
Vitamin	0.5	0.5	0.5	0.5
Mineral	0.5	0.5	0.5	0.5
Soybean meal	5	5	5	5
Bran	3	3	3	3
Chromium oxide (Cr ₂ O ₃)	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>Protein content</i>	14.7	17.7	19.1	21.5

ANEXO 2.

Comparación de los elementos principales en pepinos de mar.

Item	Protein (%)	Fat (%)	Moisture (%)	Carbohydrate (%)	Ash (%)
Fresh body wall of AM ¹	11.52	0.03	87.83	0.38	0.99
Dried AM	68.53	0.55	8.25	--	7.56
Fresh body wall of TA ²	16.64	0.27	76.97	2.47	1.60
Dried TA	69.72	3.70	8.55	--	9.51
Dried AJ ³	55.51	1.85	21.55	--	21.09

Source: Wang F. G., 1997; modified by Chen J. X. 1 = *Acaudina molpadioides*; 2 = *Thelionota ananas*; 3 = *Apostichopus japonicus*.

ANEXO 3.

Comparación de los niveles de aminoácidos en pepinos de mar.

Amino acid	A	B	C	D	E	F	G
Non-essential amino acids							
Asp	3.69	6.59	5.20	3.26	3.50	4.84	5.78
Ser	1.31	2.91	2.53	1.33	1.48	2.16	2.07
Glu	6.43	11.13	9.82	5.72	6.75	8.30	7.86
Pro	3.08	3.32	4.57	2.40	3.35	4.11	1.03
Gly	8.09	17.08	10.02	4.50	7.32	8.43	10.03
Ala	4.10	8.41	5.54	2.69	4.10	4.80	5.02
Cys	0.46	-	0.49	0.52	-	1.17	-
Tyr	0.99	1.65	1.55	1.12	1.06	1.70	1.41
Phe	1.15	1.45	1.78	1.40	1.12	1.99	1.67
Sub-total	29.30	52.54	41.50	22.94	28.68	37.50	34.87
Essential amino acids							
Lys	0.64	1.02	1.59	0.38	1.09	1.45	0.92
His	0.17	0.37	0.45	2.82	0.24	0.42	0.40
Arg	3.40	6.80	4.95	1.63	3.45	4.23	4.46
Val	1.59	2.64	2.23	1.09	1.78	2.50	2.43
Met	0.89	1.03	1.40	1.21	0.90	1.49	0.86
Ile	0.76	1.39	1.45	1.93	0.98	1.51	1.64
Leu	1.49	2.64	2.64	1.74	1.75	2.63	2.59
Thr	1.68	3.44	2.68	-	1.89	2.48	2.58
Sub-total	10.62	19.13	17.39	10.80	12.08	16.75	15.88
Total	39.92	71.67	58.89	33.74	40.76	54.25	50.75

A: *H. (Metriartyia) scabra*; B: *H. (Microthela) nobilis*; C: *H. (Thymiosycia) impatiens*; D: *H. (Lessonothuria) insignis*; E: *H. (Lessonothuria) multipilula*; F: *Actinopyga echinites*; G: *Thelionota ananas*.

ANEXO 4.

Cantidad de elementos inorgánicos en pepinos de mar (ppm).

Element	A	B	C	D	E	F	G
Ba	2.0	6.4	1.7	1	2.9	3.6	2
Co	0.4		0.2	0.4	1.7	0.7	0.4
Cr	10.1	12.9	15.3	9.3	4.4	11.5	10.1
Cu	6.1	1.3	5.9	2	2.5	1.8	6.1
Li	2.0	1.2	1.7	1	1.9	1.4	2
Mn	19.1	2.6	4.1	5.8	11.6	36.1	4.1
Ni	2.9	2.5	5	2.3	1.9	2.1	5
Si	110	12.9	170	11.5	77.6	65	46.6
Sr	616	181	119	57.8	874	64	162
V		0.51	0.51	0.34	0.97	0.72	1.01
Zn	28.6	7.77	40.9	10.4	9.71	26	70.9

A: H. (*Metriatyla*) *scabra*; B: H. (*Microthele*) *nobilis*; C: H. (*Thymiosycia*) *impatiens*; D: H. (*Lessonothuria*) *insignis*; E: H. (*Lessonothuria*) *multiplihula*; F: *Actinopyga* *echinites*; G: *Thelenota* *ananas*.

ANEXO 5.

Peces de la familia *Carapidae* asociados a holoturoideos (Parmentier, 2003).

Carapidae	Host	Author
<i>Carapus acus</i>	H <i>Stichopus regalis</i> (*)	Arnold (1953, 1957), Gustato et al. (1979), Vitturi & Catalano (1988), Kloss & Pfeiffer (2000)
	H <i>Holothuria tubulosa</i> (*)	Arnold (1953, 1956, 1957), Gustato et al. (1979), Vitturi & Catalano (1988), Kloss & Pfeiffer (2000)
	H <i>Holothuria poli</i>	Arnold (1956, 1957)
	H <i>Holothuria helleri</i>	Arnold (1956, 1957)
<i>Carapus bermudensis</i>	H <i>Actinopyga agassizi</i> (*)	Arnold (1956), Smith & Tyler (1969), Van Meter & Ache (1974), Trott (1970), Smith et al. (1981), Tyler et al. (1992)
	H <i>Isostichopus badionotus</i>	Smith and Tyler (1969)
	H <i>Astichopus multifidus</i>	Trott (1970)
	H <i>Holothuria glaberrima</i>	Trott (1970)
	H <i>Holothuria princeps</i>	Dawson (1971)
	H <i>Holothuria lentiginosa</i>	Miller & Pawson (1979), Valentine & Goetze (1983)
<i>Carapus mourlani</i>	H <i>Culcita novaeguineae</i>	Mortensen (1923), Petit (1934), Schultz (1960), Smith (1964), Trott (1970), Trott & Trott (1972), Meyer-Rochow (1977, 1979), Meyer-Rochow & Tiang (1978), Machida (1989)
	H <i>Stichopus variegatus</i>	Markle & Olney (1990)
	H <i>Stichopus chloronotus</i>	Markle & Olney (1990)
	H <i>Bohadschia argus</i>	Trott (1970), Meyer-Rochow (1977), Machida (1989), Markle & Olney (1990)
	H <i>Actinopyga mauritania</i>	Markle & Olney (1990)
	H <i>Holothuria scabra</i>	Markle & Olney (1990)
<i>Carapus homei</i>	H <i>Bohadschia argus</i> (*)	Smith (1964), Branch (1969), Trott (1970), VandenSpiegel & Jangoux (1989), Markle & Olney (1990)
	H <i>Stichopus chloronotus</i> (*)	Smith (1964), Branch (1969), Trott (1970), Trott & Garth (1970), Trott & Trott (1972), Seymour & McCosker (1974), Markle & Olney (1990)
	H <i>Stichopus variegatus</i>	Trott (1970), Meyer-Rochow (1977)
	H <i>Thelenota ananas</i>	Markle & Olney (1990)
	H <i>Actinopyga echinites</i>	Markle & Olney (1990)
<i>Carapus boreborensis</i>	H <i>Holothuria ocellata</i>	VandenSpiegel & Jangoux (1989)
	H <i>Thelenota ananas</i>	Smith (1964), Trott (1970), Meyer-Rochow (1977), VandenSpiegel & Jangoux (1989), Markle & Olney (1990)
	H <i>Bohadschia argus</i>	Smith (1964), Markle & Olney (1990), VandenSpiegel & Jangoux (1989)
	H <i>Stichopus chloronotus</i>	Markle & Olney (1990)
	H <i>Pearsonothuria graeffei</i>	VandenSpiegel & Jangoux (1989)
<i>Encheliophis sagamiensis</i>	H <i>Thelenota anax</i>	Ballard (1991) - Parmentier et al. (2002)
	H <i>Holothuria mertensiothuria</i>	Tanaka (1908), Arnold (1956)
<i>Encheliophis vermicularis</i>	H <i>Holothuria koflersteinii</i>	Trott (1970)
	H <i>Holothuria leucospilota</i>	Murdy & Cowan (1980), Masuda et al. (1984)
	H <i>Holothuria lubrica</i>	Steinbeck & Ricketts (1941)
	H <i>Thelenota ananas</i>	Markle & Olney (1990)
	H <i>Holothuria atra</i>	Schultz (1960)
H <i>Holothuria scabra</i>	Murdy & Cowan (1980)	

<i>Encheliophis gracilis</i>	H	<i>Holothuria scabra</i>	Arnold (1956)
	H	<i>Thelenota ananas</i>	Shen & Yeh (1987), Markle & Olney (1990)
	H	<i>Holothuria atra</i>	Strasburg (1961), Schultz (1960)
	H	<i>Acynopyga crassa</i>	Markle & Olney (1990)
	H	<i>Bohadschia vitiensis</i>	Markle & Olney (1990)
	H	<i>Bohadschia argus</i>	Smith (1964), Trott (1970), Machida (1989), Markle & Olney (1990)
	H	<i>Stichopus chloronotus</i>	Smith (1964)
	H	<i>Holothuria chilensis</i>	Trott (1970)
	H	<i>Stichopus sp.</i>	Markle & Olney (1990)
<i>Encheliophis chardealli</i>	H	<i>Acinopyga mauritania</i>	Parmentier (2003)

(*) Hospederos más comunes.

ANEXO 6.

Exportaciones de pepino de mar de los principales exportadores en US\$'000 (1991-2001).

	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
China, Hong Kong SAR	13 244	11 158	13 820	13 978	15 403	18 169	20 115	18 055	16 126	30 128	22 669
Sri Lanka	553	683	415	955	2 028	2 936	6 352	4 260	2 547	-	1 936
Taiwan Province of China	77	239	140	212	812	1 028	844	1 044	1 229	1 525	1 823
Solomon Islands	2 816	3 555	993	783	509	354	664	853	393	253	1 749
China	...	758	490	1 203	-	296	98	99	209	612	845
Thailand	5	-	1	1	48	56	129	160	320	857	432
Yemen	138	-	-	-	-	374
Cuba	452	351
Seychelles	247
Kiribati	466	559	281	602	199	31	61	79	116
Vanuatu	-	-	-	-	-	123	121	130	33	-	102
Korea, Republic of	237	125	39	33	21	60	47	59	116	165	92
Malaysia	186	144	55	97	142	49	136	1	11	5	84
Mozambique	...	26	-	-	-	116	-	24	20	5	34
Fiji Islands	2 797	3 483	1 169	1 580	3 978	4 071	2 791	1 171	1 379	-	32
Tonga	-	-	-	-	911	719	-	-	-	-	7
Korea, Dem. People's Rep	-	20	-	-	-	15	-	100	3	-	3
United Arab Emirates	19	70	-	3	161	1
New Caledonia	-	-	925	1 233	1 300	930	593	1 170	...
Papua New Guinea	5 070	5 005	3 112	1 836	-	-	3 861	-	3 332	-	-
Philippines	3 560	3 216	3 986	4 120	4 803	4 827	4 505	-	3 653	-	-
Maldives	2 003	799	594	431	707	646	728	346	407
Tanzania, United Rep. of	374	416	502	788	359	438	685	201	262
Madagascar	1 559	1 497	1 016	2 093	1 254	751	452	-	-	-	-
Marshall Islands	432	312	-	-	-	-
Viet Nam	-	1 000	-	139	-	-	-	-	-
Singapore*	8 998	8 141	6 582	10 689
Others	-	4	46	77	81	128	34	19	13	-	13
Total	41 479	39 269	34 351	41 668	32 637	37 042	42 143	26 553	30 710	35 412	30 910

*Data provided from 1995 are based on a different classification which does not identify trade on sea cucumbers separately. Source: FAO, Fishstat Plus (v. 2.3), Commodities trade and production 1976-2001.

ANEXO 7.

Importaciones de pepino de mar de los principales importadores en US\$'000 (1991-2001).

	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
China, Hong Kong SAR	35 481	32 378	29 959	35 461	40 898	43 376	38 147	39 565	33 571	55 533	50 430
Taiwan Province of China	5 771	6 817	5 714	5 237	5 792	5 327	5 291	4 549	4 735	4 514	3 979
China	...	1 367	689	380	-	49	3	30	265	793	1 229
Thailand	18	54	37	55	102	90	446	282	417	528	504
Korea, Republic of	4 275	265	327	24	128	154	302	23	68	127	400
Japan	1 324	1 263	635	613	799	350	134	163	121	141	81
China, Macao SAR	40	35	23	33	28	33	-	-	25	22	36
Malaysia	1 176	1 081	761	688	755	564	4	8	34	24	16
Korea, Dem. People's Rep	-	5	-	-	-	91	-	13
Viet Nam	7	13
Brunei Darussalam	-	-	-	-	-	5	-	-	4	-	5
Mali	4
Syrian Arab Republic	4
United Arab Emirates	4
Nepal	2
Sudan	2
Djibouti	2	-
Fiji Islands	47	196	9	-	-	38	-	-	-	-	-
Marshall Islands	1	-	-	-	-	-
Singapore*	10 555	10 976	6 886	11 148
Total	58 687	54 432	45 040	53 639	48 507	49 987	44 327	44 620	39 331	61 691	56 722

*Data provided from 1995 are based on a different classification which does not identify trade on sea cucumbers separately. Source: FAO, Fishstat Plus (v. 2.3), Commodities trade and production 1976-2001.

ANEXO 8.

Importaciones de pepino de mar, fresco/congelado/deshidratado/salmuera (1995-2001) (Q= toneladas; V= US\$'000).

Country		1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
China PR	Q	-	49	1	9	139	186	2 059
	V	-	49	3	30	265	793	1 229
Hong Kong (China)	Q	5 789	5 020	4 523	3 975	2 922	4 759	4 382
	V	40 898	43 376	38 147	39 565	33 571	55 533	50 430
Japan	Q	25	10	5	5	4	3	3
	V	799	350	134	163	121	141	81
Korea, Rep.	Q	7	36	16	2	10	29	51
	V	128	154	302	23	68	127	400
Malaysia	Q	521	358	-	18	21	32	2
	V	755	564	4	8	34	24	16
Singapore	Q	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	-	-	-	-	-	-
Taiwan PC	Q	1 273	1 079	1 014	859	899	887	676
	V	5 792	5 327	5 291	4 549	4 735	4 514	3 979
Thailand	Q	32	32	71	78	75	133	115
	V	102	90	446	282	417	528	504
World total (incl. others)	Q	7 653	6 597	5 630	4 946	4 079	6 040	7 299
	V	48 507	49 987	44 327	44 620	39 331	61 691	56 722

Source: FAO FISHDAB, 2003.

ANEXO 9.

Precios medios de importación (US\$/kg) de pepino de mar en Hong Kong (2001-2003).

Country	2001	2002	January-June 2003
Australia	28.05	30.25	41.62
Indonesia	4.12	4.07	4.02
Papua New Guinea	9.73	13.27	14.34
Philippines	6.85	6.45	7.23
Singapore	9.54	9.97	6.86
Sri Lanka	7.36	7.48	6.39
Madagascar	11.10	7.55	5.08
South Africa	4.28	2.50	2.20
Mozambique	28.21	11.46	9.94
Tanzania	10.71	7.61	5.17
Fiji	10.11	10.02	7.41
Solomon Islands	7.35	6.19	4.41
India	25.86	22.82	-
Maldives	7.19	3.64	5.54

Source: Agriculture, Fisheries and Conservation Dept., China Hong Kong SAR.

ANEXO 10.

Tendencia de precios de pepino de mar deshidratado (2000-2005).

Product	Price (USD/kg) 1 October 2003	Price (USD/kg) 17 October 2005	Price reference & market area	Origin
White teatfish (skin-on), <i>H. fuscogilva</i>				
3-5 pcs/kg (Grade A)	23	45	Southeast Asian ports	South Pacific
4-8 pcs/kg Grade B	13	35	Southeast Asian ports	South Pacific
Prickly redfish, <i>T. ananas</i>				
6-15 pcs/kg	15	-	Southeast Asian ports	South Pacific
6-20 pcs/kg	-	25	Southeast Asian ports	South Pacific
Black teatfish, <i>H. whitmaei</i>				
3-5 pcs/kg (Grade A)	18	-	Southeast Asian ports	Australia
Grade B	10	-	Southeast Asian ports	Australia
4-15 pcs/kg (Grade A)	-	30	Southeast Asian ports	South Pacific
Stonefish, <i>H. lecanora</i>				
10-30 pcs/kg	18	28	Singapore Southeast Asian ports	Indonesia South Pacific
30-55 pcs/kg	-	20	Southeast Asian ports	South Pacific
Sandfish, <i>H. scabra</i>				
Grade A	48	-	Singapore	Indonesia
10-30 pcs/kg	56	-	Singapore	South Pacific
15-40 pcs/kg	40	-	Singapore	South Pacific
10-30 pcs/kg	-	66	Southeast Asian ports	South Pacific
30-55 pcs/kg	-	40	Southeast Asian ports	Indonesia
50-90 pcs/kg	-	30	Southeast Asian ports	Indonesia
Greenfish, <i>S. chloronotus</i>				
50-120 pcs/kg	25	-	Singapore	South Pacific
50-200 pcs/kg	-	35	Southeast Asian ports	South Pacific
Surf redfish, <i>A. mauritiana</i>				
15-35 pcs/kg	11	-	Singapore	South Pacific
15-30 pcs/kg	-	20	Southeast Asian ports	South Pacific
30-50 pcs/kg	-	15	Southeast Asian ports	South Pacific
Tigerfish, <i>B. argus</i>				
25-55 pcs/kg	3	-	Singapore	South Pacific
20-50 pcs/kg	-	10	Southeast Asian ports	South Pacific
Brown sandfish, <i>B. marmorata</i>				
25-100 pcs/kg	5	-	Singapore	South Pacific
	-	10	Southeast Asian ports	South Pacific
Curryfish, <i>S. variegatus</i>				
	19	-	Singapore	South Pacific
	-	20	Southeast Asian ports	South Pacific
Elephant trunkfish, <i>H. fuscopunctata</i>				
3-8 pcs/kg	5	-	Singapore	South Pacific
3-8 pcs/kg	-	15	Southeast Asian ports	South Pacific
Lollyfish, <i>H. atra</i>				
	1.50	-	Singapore	South Pacific
	-	3	Southeast Asian ports	South Pacific
Chinese Liao fish (farmed)				
50-100 pcs/kg	-	120	Wholesale China	China
100-250 pcs/kg	-	100	Wholesale China	China

Source: INFOFISH Trade News.

ANEXO 11.

Producción de pepino de mar por especie y ciudad en toneladas (1991-2001) y en porcentaje (2001).

	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	
												2001
Japanese sea cucumber (<i>Stichopus japonicus</i>)												38.3
Japan	6 591	6 072	5 996	6 106	6 602	7 226	7 160	6 952	6 662	6 957	7 229	43.1
Korea, Republic of	2 027	1 583	2 068	2 117	1 892	1 979	2 217	1 439	1 204	1 419	900	
<i>Total</i>	8 618	7 655	8 064	8 223	8 494	9 205	9 377	8 391	7 866	8 376	8 129	17.2
Sea cucumbers nei (Holothuriidae)												9.6
Indonesia	2 465	2 113	2 364	3 132	2 562	2 443	3 138	3 058	2 617	3 041	3 250	7.7
United States of America	<0.5	481	472	2 141	729	1 779	-	2 406	3 732	4 583	1 804	4.4
Papua New Guinea	1 746	1 893	1 440	627	1 335	1 788	1 515	2 037	1 185	1 824	1 453	4.2
Fiji Islands	589	447	191	400 F	835	850	790	400	880	800 F	824	2.7
Philippines	3 535	3 679	3 109	1 497	2 062	2 123	1 191	830	849	730	791	2.6
Madagascar	600	423	450	1 800	1 800	1 800	1 800	482	500	500	500	2.6
New Caledonia	1 240	1 090	777	798	480	776	565	402	493	615	489 F	1.8
Mexico	-	-	-	-	-	-	-	271	234	426	481	1.2
Tanzania, United Rep. of	426	535	980	1 591	1 460	1 644	1 527	1 800	189	372	340	0.7
Maldives	405	119	72	66	94	145	318	85	54	205	226	0.6
Egypt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	139	0.6
Sri Lanka	65	65	65	92	100	150	272	203	170	145	120	0.3
Chile	-	237	13	4	106	115	1	30	108	1 510	107	0.3
Kiribati	-	-	-	-	-	-	136	154	89	64	60	0.3
Solomon Islands	622	715	316	285	219	113	203	253	376	48	50 F	0.1
Vanuatu	50 F	39 F	40 F	40 F	50 F	0.1						
Ecuador	29	152	12	12	12	12	15	15	15	15	15	0.1
Kenya	78	277	14	41	55	15	41	38	15	30	13	0.0
Mozambique	5	-	<0.5	<0.5	6	54	7	2	8	12	12	0.0
Spain	-	-	-	-	-	4	4	4	1	9	4	0.0
New Zealand	-	-	-	-	4	1	<0.5	-	-	-	2	-
Tonga	-	-	-	-	-	86	80	90	<0.5	<0.5	<0.5	-
Palau	5	6	6	6	6	6	7	7	6 F	-	-	-
Yemen	140	48	-	102	-	-	-	-	1	-	-	56.9
Iceland	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Total</i>	12 000	12 319	10 321	12 634	11 917	13 954	11 660	12 617	11 572	14 999	10 730	100.0
Grand total	20 618	19 974	18 385	20 857	20 411	23 159	21 037	21 008	19 438	23 375	18 859	

Source: FAO, *Fishstat Plus* (v. 2.3), *Capture Production 1950-2001*.

ANEXO 12.

Especies de pepino de mar de importancia comercial en China, Taiwán, Hong Kong SAR, Japón, Malasia, Tailandia, Indonesia, Filipinas, Vietnam, Singapur e Islas Spratly.

	China	Taiwan PC	China HK SAR	Japan	Malaysia	Thailand	Indonesia	Philippines ¹	Viet Nam	Singapore	Spratly
O: Aspidochirotida											
F: Holothuriidae											
<i>Actinopyga lecanora</i>	x	x			x	x	x	x		x	x
<i>Actinopyga mauritiana</i>	x	x		x	x	x	x	x			x
<i>Actinopyga echinites</i>	x	x			x	x	x	x			
<i>Actinopyga miliaris</i>	x				x	x	x	x			
<i>Bohadschia argus</i>	x	x		x	x	x	x	x	x		x
<i>Bohadschia graeffei</i>					x	x	x	x			x
<i>Bohadschia marmorata</i>	x	x			x	x	x	x	x		
<i>Bohadschia similis</i>								x			
<i>Bohadschia vitiensis</i>						x	x		x		
<i>Bohadschia tenuissima</i>							x				
<i>Bohadschia bivittata</i>				x					x		
<i>Holothuria atra</i>	x	x		x	x	x	x	x	x		
<i>Holothuria coluber</i>					x	x	x	x			
<i>Holothuria rigida</i>						x	x	x			
<i>Holothuria pulla</i>								x			
<i>Holothuria edulis</i>	x			x	x	x	x	x	x		
<i>Holothuria pardalis</i>	x	x	x		x	x	x				
<i>Holothuria cinerascens</i>	x	x				x					
<i>Holothuria moebii</i>	x	x	x		x	x					
<i>Holothuria whitmaei</i>	x	x			x	x	x	x	x		
<i>Holothuria fuscogilva</i>	x				x		x	x	x		
<i>Holothuria difficilis</i>		x				x		x			
<i>Holothuria arenicola</i>	x	x				x	x				
<i>Holothuria hilla</i>		x			x	x	x	x			
<i>Holothuria impatiens</i>	x	x			x	x	x				
<i>Holothuria leucospilota</i>	x	x	x		x	x	x	x	x		x
<i>Holothuria pervicax</i>	x	x			x		x				
<i>Holothuria conusalba</i>						x	x				
<i>Holothuria scabra</i>	x		x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Holothuria scabra versicolor</i>					x		x	x			
<i>Holothuria similis</i>							x				
<i>Holothuria fuscopunctata</i>					x	x	x	x	x		
<i>Holothuria ocellata</i>					x	x	x				
<i>Holothuria fuscocinerea</i>	x	x	x		x	x		x			
<i>Holothuria vagabunda</i>							x				
<i>Holothuria vatiensis</i>							x				
<i>Pearsonothuria graeffei</i>		x			x		x				
O: Aspidochirotida											
F: Stichopodidae											
<i>Stichopus chloronotus</i>	x			x	x	x	x	x	x		x
<i>Stichopus sp.</i>					x						
<i>Stichopus horrens</i>	x	x			x		x	x	x		
<i>Stichopus herrmanni</i>	x	x			x	x	x	x	x		
<i>Stichopus vastus</i>					x		x				
<i>Stichopus quadrifaciatus</i>							x				
<i>Parastichopus nigripunctatus</i>				x							
<i>Thelenota ananas</i>	x	x		x	x	x	x	x	x		x
<i>Thelenota anax</i>	x				x		x	x			x
<i>Apostichopus japonicus</i>	x			x							
O: Dendrochirotida											
F: Cucumariidae											
<i>Mensamaria sp.</i>	x										
<i>Cucumaria frandosa japonica</i>				x		x					
<i>Pentacta quadragulis</i>						x			x		
O: Moldavia											
F: Caudinidae											
<i>Acaudina leucoprocta</i>	x										
O: Molpadida											
F: Molpadiidae											
<i>Paracaudina sp.</i>					x						
No. of commercial species	27	0	0	11	19	8	35	26	11	0	0

¹ A more complete list for the Philippines is available in Table 1 in the hotspot paper (this document).

ANEXO 13.

Volumen total de pepino de mar importado por China (Hong Kong SAR) de América Latina y países del Caribe (1996-2005) (Kg de peso seco).

Country	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	Total
Brazil	1 600	--	--	--	--	444	50	--	--	--	2 094
Chile	--	--	--	--	22 318	7 599	2 906	527	4 485	5 123	42 958
Colombia	--	--	--	--	--	540	--	--	--	1 646	2 186
Costa Rica	--	--	--	108	664	325	--	7	164	--	1 268
Cuba	--	--	--	2920	19 023	13 941	3 800	7 648	5 080	8 641	61 053
Dominican Republic	--	--	--	--	--	--	2 562	45	--	--	2 607
Ecuador	120	--	--	24 567	15 285	991	10 130	3 026	11 322	13 248	78 689
Haiti	--	--	--	--	--	--	1 000	9 680	--	--	10 680
Mexico	405	500	--	--	150	1 818	3 302	1 270	4 294	2 378	14 117
Nicaragua	--	--	--	--	--	--	--	252	--	--	5 826
Panama	--	--	--	--	--	--	--	--	281	408	689
Peru	137	2 364	376	4 170	7 331	3 881	1 828	8 354	19 906	31 002	79 349
Puerto Rico	--	--	--	--	--	--	1 300	--	--	256	1 556
Venezuela	--	--	--	--	--	--	--	--	--	456	456
Total- countries from the region¹	2 242	2 864	376	31 765	64 771	29 539	26 878	30 809	45 532	68 984	303 780
Total- world wide²	5 021 828	4 524 832	3 977 324	2 924 331	4 760 719	4 384 273	4 419 356	4 675 043	5 071 839	4 480 643	44 240 188
% from Region³	0.05	0.06	0.01	1.09	1.36	0.67	0.61	0.66	0.90	1.54	0.69

Source: Hong Kong Census and Statistics Department.

¹ Sum of kg for the countries from the region.

² Sum of kg of the total of sea cucumber imported into China Hong Kong SAR from all countries worldwide.

³ Percentage of the imports from the region in comparison from those worldwide.

ANEXO 14.

Volumen total de pepino de mar importado por China (Hong Kong SAR) de Chile, Ecuador, México y Nicaragua. Reportado por la FAO (toneladas).

Year	Mexico	Chile	Nicaragua	Ecuador	Total in the region	World harvest total	Percentage from region
1988	--	--	--	3	3	19 905	0.02
1989	--	--	--	10	10	17 467	0.05
1990	--	--	--	12	12	19 976	0.06
1991	--	--	--	29	29	21 790	0.15
1992	--	237	--	152	389	20 892	1.95
1993	--	13	--	12	25	19 348	0.13
1994	--	4	--	12	16	24 505	0.08
1995	--	106	--	12	118	24 050	0.59
1996	--	115	--	12	127	26 795	0.64
1997	--	1	--	15	16	24 672	0.08
1998	271	30	--	15	316	22 004	1.59
1999	234	108	--	15	357	20 462	1.79
2000	426	1510	--	15	1 951	24 509	9.80
2001	481	107	--	15	603	20 431	3.03
2002	290	106	--	15	411	23 445	2.06
2003	285	307	--	15	607	28 085	3.05
2004	265	234	--	15	514	27 540	2.58
2005	312	153	51	15	531	26 002	2.67
Total	2 564	3 031	51	389	6 035	411 878	1.46

Source: FAO Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service 2007.

ANEXO 15.

Predios de Propiedad Federal en Baja California registrados para el aprovechamiento extractivo del pepino de mar *Isostichopus fuscus*.

PREDIOS PROPIEDAD FEDERAL (PPF)	MUNICIPIO	SUPERFICIE
EL BOLEO	Mulegé	23,457 Has
SAN BRUNO	Mulegé	29,369 Has
LIGUI	Loreto	9,941 Has
AGUA VERDE	Loreto	35,278 Has
LORETO	Loreto	12,561 Has
SAN NICOLAS	Loreto	150,000 has
LA PAZ	La Paz	330,333 Has
PICHILINGUE	La Paz	1,976 Has

ANEXO 16. SOLUCIONES PARA TINCIÓN CON PLATA EN GELES DE ELECTROFORESIS.

1. **Solución fijadora:** 50 % de metanol ó etanol, 12 % de ácido acético, 0.05 % de formaldehído.
Para hacer 1 litro, añadir 120 ml de ácido acético glacial en 500 ml de etanol al 96 % y 500 µl de 35 % de formaldehído (nota: el formol comercial es de 35 % de formaldehído). Completar al volumen final con agua desionizada. Conservar a temperatura ambiente.

2. **Solución de tiosulfato:** Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) al 0.02 % (w / v).
Para hacer 1 litro y añadir 200 mg de tiosulfato de sodio anhídrido a un pequeño volumen de agua desionizada, mezclar bien y llevar al volumen final de 1 litro.

3. **Solución de impregnación:** 0.2 % (w/v) de nitrato de plata (AgNO_3), 0.076 % de formaldehído.
Para hacer 1 litro, añadir 2 g de AgNO_3 a una pequeña cantidad de agua desionizada. Añadir 760 µl de formaldehído 35%. Disolver y llevar a volumen final con agua desionizada. Tiene que prepararse en el momento y debe ser enfriada a 4 ° C antes de usar.

4. **Solución desarrolladora:** 6 % (w/v) de carbonato de sodio (Na_2CO_3), 0.0004 % (w/v) de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 0.05 % de formaldehído.
Para hacer 1 litro agregar 60 g de Na_2CO_3 a una pequeña cantidad de agua desionizada y se disuelven. Añadir 4 mg de tiosulfato de sodio anhídrido a un pequeño volumen de agua desionizada y se disuelven. Mezclar las dos soluciones, añadir 500 µl de formaldehído 35 % y llevar al volumen final. También, se puede omitir el formaldehído en la solución y agregar 10 µl al momento de ser utilizada (se usa sólo lo necesario de la solución desarrolladora para cubrir 1 gel electroforético). Conservar a temperatura ambiente.

5. **Ácido cítrico 2.3 M:**
Colocar 24.1667 g en 50 ml de agua desionizada y homogeneizar.

ANEXO 17.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS EXTRAÍDAS DE *Isostichopus fuscus* y *Holothuria impatiens*.

1) Concentración de Proteína.

ANOVA.

Análisis de Varianza de los valores de concentración de proteína de cada parte anatómica u órgano seleccionado de *Isostichopus fuscus*.

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organo	11	115.758	10.52345	21.50	0.000003*	1.000000
S(A)	12	5.872928	0.4894106			
Total (Adjusted)	23	121.6309				
Total	24					

* Term significant at alpha = 0.05

ANÁLISIS DE DUNCAN.

Análisis de Duncan de los valores de concentración de proteína de cada parte anatómica u órgano seleccionado de *Isostichopus fuscus*.

Concentración de proteína (mg/mL)			
Parte Anatómica u Órgano	1	2	3
Podios		6	
Tracto Digestivo		4.74	
Tubo Respiratorio		5.82	
Tubulos Internos			8.59
Piel Externa		4	
Piel Interna			9.86
Piel 1 Ventral		5.25	
Piel 1 Dorsal			10.41
Piel 2 Ventral		4.9	
Piel 2 Dorsal		4.23	
Piel 3 ventral		3.51	
Piel 3 dorsal		5.81	

ANOVA.

Análisis de Varianza de los valores de concentración de proteína de cada parte anatómica u órgano seleccionado de *Holothuria impatiens*.

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organo	10	44.44212	4.444212	2.35	0.088168	0.637861
S(A)	11	20.7682	1.888019			
Total (Adjusted)	21	65.21033				
Total	22					

* Term significant at alpha = 0.05

2) Actividad de las enzimas extraídas.

ANOVA.

Análisis de Varianza de los valores de actividad enzimática de cada parte anatómica u órgano seleccionado de *I. fuscus* a pH de 2 a 10.

pH 2

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organos	7	0.2013768	2.876811E-02	63.11	0.000002*	1.000000
S(A)	8	0.003647	4.55875E-04			
Total (Adjusted)	15	0.2050238				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 3

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organos	7	0.467322	6.676029E-02	77.27	0.000001*	1.000000
S(A)	8	0.006912	0.000864			
Total (Adjusted)	15	0.474234				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 4

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organos	7	0.3142039	4.489628E-02	38.67	0.005244*	0.964735
S(A)	8	0.0473645	5.920562E-03			
Total (Adjusted)	15	0.3615685				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 5

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organos	7	0.079164	1.130914E-02	4.06	0.033816*	0.759841
S(A)	8	0.022285	2.785625E-03			
Total (Adjusted)	15	0.101449				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 6

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organos	7	0.4150599	5.929428E-02	38.67	0.000015*	1.000000
S(A)	8	0.0122665	1.533312E-03			
Total (Adjusted)	15	0.4273264				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 7

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organos	7	0.253809	3.625843E-02	52.15	0.000005*	1.000000
S(A)	8	0.005562	6.9525E-04			
Total (Adjusted)	15	0.259371				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 8

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organos	7	0.2139294	3.056135E-02	18.11	0.000258*	0.999971
S(A)	8	0.0135025	1.687813E-03			
Total (Adjusted)	15	0.2274319				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 9

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organos	7	0.312536	0.044648	71.71	0.000001*	1.000000
S(A)	8	0.004981	6.22625E-04			
Total (Adjusted)	15	0.317517				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 10

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organos	7	0.2492189	0.0356027	9.64	0.002371*	0.990132
S(A)	8	0.0295345	3.691813E-03			
Total (Adjusted)	15	0.2787534				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

ANÁLISIS DE DUNCAN.

Análisis de Duncan de los valores de actividad enzimática de cada parte anatómica u órgano seleccionado de *I. fuscus* a pH de 2 a 10.

Parte Anatómica u Órgano	Actividad enzimática promedio (UAP/mL) ± D.E.								
	pH								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Podios	160 ± 6	147 ± 7	57 ± 7	92 ± 51	304 ± 28	282 ± 8	276 ± 17	290 ± 25	258 ± 8
Tracto Digestivo	96 ± 1	51 ± 23	64 ± 6	70 ± 8	166 ± 8	163 ± 1	166 ± 3	154 ± 2	160 ± 0
Tubo Respiratorio	114 ± 2	140 ± 17	102 ± 8	80 ± 11	154 ± 8	139 ± 1	140 ± 6	137 ± 4	144 ± 5
Túbulos Internos	131 ± 5	126 ± 3	110 ± 3	112 ± 0	206 ± 20	214 ± 14	208 ± 0	200 ± 0	196 ± 6
Piel Externa	179 ± 18	272 ± 0.6	224 ± 79	132 ± 17	263 ± 16	229 ± 21	238 ± 3	246 ± 8	243 ± 18
Piel Interna	68 ± 6	84 ± 17	30 ± 14	68 ± 6	114 ± 1	118 ± 2	140 ± 5	119 ± 7	116 ± 6
Piel 1 Ventral	98 ± 8	121 ± 10	122 ± 3	128 ± 28	192 ± 1	182 ± 3	214 ± 20	172 ± 0	204 ± 40
Piel 1 Dorsal	62 ± 8	65 ± 4	76 ± 6	82 ± 3	154 ± 25	150 ± 3	150 ± 8	150 ± 3	178 ± 48
Piel 2 Ventral	52 ± 6	65 ± 10	82 ± 31	64 ± 6	124 ± 11	150 ± 8	150 ± 20	126 ± 3	116 ± 6
Piel 2 Dorsal	61 ± 4	71 ± 5	68 ± 6	71 ± 1	130 ± 8	140 ± 17	166 ± 31	164 ± 0	154 ± 20

ANOVA.

Análisis de Varianza de los valores de actividad enzimática de cada parte anatómica u órgano seleccionado de *H. impatiens* a pH de 2 a 10.

pH 2

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organo	7	0.3106357	4.437654E-02	4.32	0.028460*	0.788686
S(A)	8	0.082116	0.0102645			
Total (Adjusted)	15	0.3927518				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 3

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organo	6	0.1820839	3.034731E-02	40.30	0.000044*	1.000000
S(A)	7	0.005271	0.000753			
Total (Adjusted)	13	0.1873549				
Total	14					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 4

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organos	6	1.172276	0.1953793	65.92	0.000008*	1.000000
S(A)	7	0.0207475	2.963929E-03			
Total (Adjusted)	13	1.193023				
Total	14					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 5

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organo	7	0.4092999	5.847142E-02	10.07	0.002051*	0.992472
S(A)	8	0.0464685	5.808563E-03			
Total (Adjusted)	15	0.4557684				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 6

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organo	7	0.439354	6.276486E-02	5.49	0.014315*	0.884060
S(A)	8	0.091491	1.143637E-02			
Total (Adjusted)	15	0.530845				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 7

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organos	7	0.6891379	9.844828E-02	10.92	0.001551*	0.995688
S(A)	8	0.0721005	9.012562E-03			
Total (Adjusted)	15	0.7612385				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 8

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organo	7	0.4567904	6.525578E-02	31.20	0.000034*	1.000000
S(A)	8	0.0167315	2.091438E-03			
Total (Adjusted)	15	0.4735219				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 9

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organo	7	0.1376809	1.966871E-02	11.13	0.001453*	0.996243
S(A)	8	0.0141335	1.766687E-03			
Total (Adjusted)	15	0.1518144				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

pH 10

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Organo	7	0.364146	5.202086E-02	24.25	0.000088*	1.000000
S(A)	8	0.017165	2.145625E-03			
Total (Adjusted)	15	0.381311				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

ANÁLISIS DE DUNCAN.

Análisis de Duncan de los valores de actividad enzimática de cada parte anatómica u órgano seleccionado de *H. impatiens* a pH de 2 a 10.

<i>Holothuria impatiens</i> Parte Anatómica u Órgano	Actividad enzimática promedio (UAP/mL) + D.E.								
	pH								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Podios	125 ± 63	188 ± 26	164 ± 0.3	153 ± 1	274 ± 3	260 ± 1	370 ± 14	158 ± 2	161 ± 9
Tracto Digestivo	164 ± 10	191 ± 0.3	124 ± 42	118 ± 45	175 ± 51	174 ± 19	216 ± 25	201 ± 8	223 ± 0.3
Túbulos Internos	178 ± 2	-----	73 ± 1	-----	238 ± 3	138 ± 3	149 ± 2	133 ± 1	213 ± 1
Piel Externa	93 ± 2	86 ± 2	-----	111 ± 12	169 ± 1	165 ± 2	162 ± 2	145 ± 2	164 ± 0.3
Piel Interna	11 ± 0.3	-----	21 ± 1	65 ± 1	88 ± 1	118 ± 2	137 ± 1	113 ± 1	112 ± 0.3
Piel 1 Ventral	178 ± 43	119 ± 8	417 ± 1	291 ± 66	222 ± 23	368 ± 46	237 ± 5	214 ± 6	255 ± 2
Piel 1 Dorsal	195 ± 48	139 ± 9	126 ± 12	130 ± 15	118 ± 8	302 ± 95	222 ± 15	235 ± 6	302 ± 47
Piel 2 Ventral	83 ± 5	75 ± 5	105 ± 37	133 ± 24	121 ± 12	128 ± 7	187 ± 40	191 ± 46	132 ± 22
Piel 2 Dorsal	131 ± 75	80 ± 1	100 ± 6	87 ± 12	194 ± 9	182 ± 1	167 ± 1	179 ± 7	168 ± 3

ANEXO 18.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (UAP/mL) A pH 2-10 DE LAS PROTEASAS DE *I. fuscus* Y *H. impatiens*.

1) Actividad proteolítica de las proteasas de *Isostichopus fuscus*.

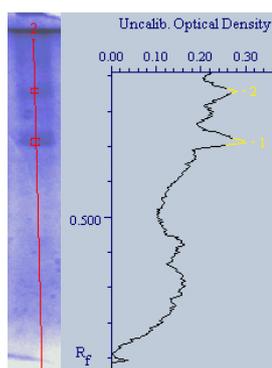
<i>Isostichopus fuscus</i>	Actividad enzimática promedio (UAP/mL) \pm D.E.								
	pH								
	Parte Anatómica u Órgano	2	3	4	5	6	7	8	9
Podios	160 \pm 6	147 \pm 7	57 \pm 7	92 \pm 51	304 \pm 28	282 \pm 8	276 \pm 17	290 \pm 25	258 \pm 8
Tracto Digestivo	96 \pm 1	51 \pm 23	64 \pm 6	70 \pm 8	166 \pm 8	163 \pm 1	166 \pm 3	154 \pm 2	160 \pm 0
Tubo Respiratorio	114 \pm 2	140 \pm 17	102 \pm 8	80 \pm 11	154 \pm 8	139 \pm 1	140 \pm 6	137 \pm 4	144 \pm 5
Túbulos Internos	131 \pm 5	126 \pm 3	110 \pm 3	112 \pm 0	206 \pm 20	214 \pm 14	208 \pm 0	200 \pm 0	196 \pm 6
Piel Externa	179 \pm 18	272 \pm 0.6	224 \pm 79	132 \pm 17	263 \pm 16	229 \pm 21	238 \pm 3	246 \pm 8	243 \pm 18
Piel Interna	68 \pm 6	84 \pm 17	30 \pm 14	68 \pm 6	114 \pm 1	118 \pm 2	140 \pm 5	119 \pm 7	116 \pm 6
Piel 1 Ventral	98 \pm 8	121 \pm 10	122 \pm 3	128 \pm 28	192 \pm 1	182 \pm 3	214 \pm 20	172 \pm 0	204 \pm 40
Piel 1 Dorsal	62 \pm 8	65 \pm 4	76 \pm 6	82 \pm 3	154 \pm 25	150 \pm 3	150 \pm 8	150 \pm 3	178 \pm 48
Piel 2 Ventral	52 \pm 6	65 \pm 10	82 \pm 31	64 \pm 6	124 \pm 11	150 \pm 8	150 \pm 20	126 \pm 3	116 \pm 6
Piel 2 Dorsal	61 \pm 4	71 \pm 5	68 \pm 6	71 \pm 1	130 \pm 8	140 \pm 17	166 \pm 31	164 \pm 0	154 \pm 20

2) Actividad proteolítica de las proteasas de *Holothuria impatiens*.

<i>Holothuria impatiens</i>	Actividad enzimática promedio (UAP/mL) \pm D.E.								
	pH								
	Parte Anatómica u Órgano	2	3	4	5	6	7	8	9
Podios	125 \pm 63	188 \pm 26	164 \pm 0.3	153 \pm 1	274 \pm 3	260 \pm 1	370 \pm 14	158 \pm 2	161 \pm 9
Tracto Digestivo	164 \pm 10	191 \pm 0.3	124 \pm 42	118 \pm 45	175 \pm 51	174 \pm 19	216 \pm 25	201 \pm 8	223 \pm 0.3
Túbulos Internos	178 \pm 2	-----	73 \pm 1	-----	238 \pm 3	138 \pm 3	149 \pm 2	133 \pm 1	213 \pm 1
Piel Externa	93 \pm 2	86 \pm 2	-----	111 \pm 12	169 \pm 1	165 \pm 2	162 \pm 2	145 \pm 2	164 \pm 0.3
Piel Interna	11 \pm 0.3	-----	21 \pm 1	65 \pm 1	88 \pm 1	118 \pm 2	137 \pm 1	113 \pm 1	112 \pm 0.3
Piel 1 Ventral	178 \pm 43	119 \pm 8	417 \pm 1	291 \pm 66	222 \pm 23	368 \pm 46	237 \pm 5	214 \pm 6	255 \pm 2
Piel 1 Dorsal	195 \pm 48	139 \pm 9	126 \pm 12	130 \pm 15	118 \pm 8	302 \pm 95	222 \pm 15	235 \pm 6	302 \pm 47
Piel 2 Ventral	83 \pm 5	75 \pm 5	105 \pm 37	133 \pm 24	121 \pm 12	128 \pm 7	187 \pm 40	191 \pm 46	132 \pm 22
Piel 2 Dorsal	131 \pm 75	80 \pm 1	100 \pm 6	87 \pm 12	194 \pm 9	182 \pm 1	167 \pm 1	179 \pm 7	168 \pm 3

ANEXO 19. GELES DE ELECTROFORESIS DE LAS PROTEASAS EXTRAÍDAS DE *I. fuscus* Y *H. impatiens*.

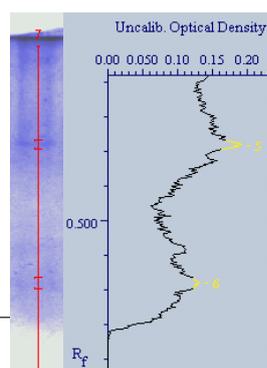
Electroforesis no desnaturalizante de muestras extraídas de diferentes partes anatómicas u órganos de *Isostichopus fuscus*.



PODIOS

Lane 2

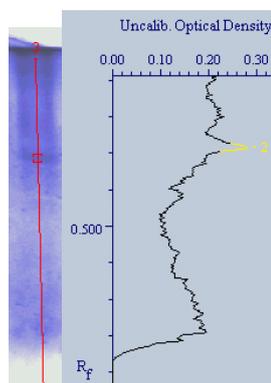
Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
2 - 1	0.289	39.00
2 - 2	0.146	65.04



TRACTO DIGESTIVO

Lane 7

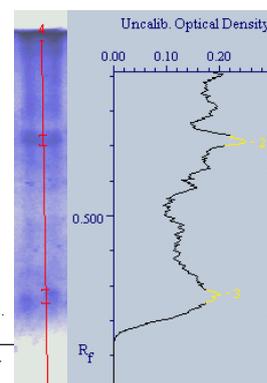
Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
7 - 5	0.284	39.40
7 - 6	0.679	17.90



TUBO RESPIRATORIO

Lane 3

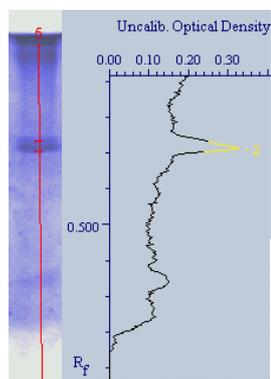
Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
3 - 2	0.285	39.37



TÚBULOS INTERNOS

Lane 4

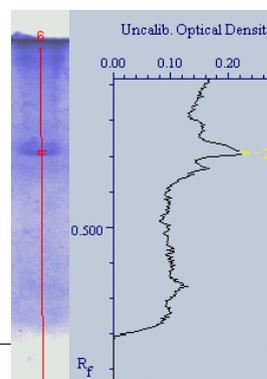
Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
4 - 2	0.290	38.94
4 - 3	0.723	16.32



PIEL EXTERNA

Lane 5

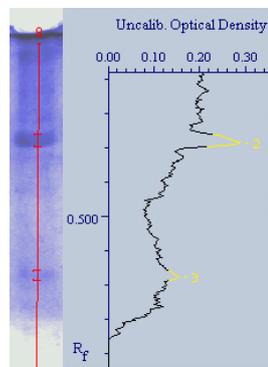
Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
5 - 2	0.291	38.88



PIEL INTERNA

Lane 6

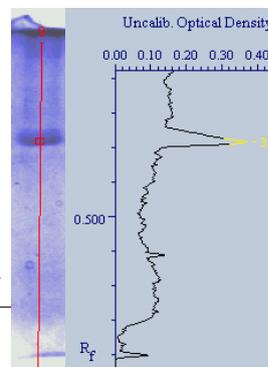
Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
6 - 2	0.294	38.60



Lane 8

Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
8 - 2	0.287	39.18
8 - 3	0.676	18.00

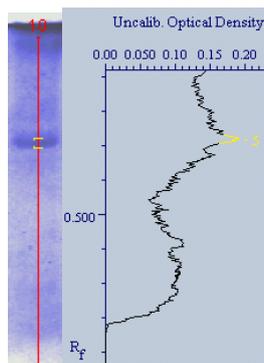
PIEL ANTERIOR VENTRAL



Lane 9

Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
9 - 3	0.285	39.34

PIEL ANTERIOR DORSAL

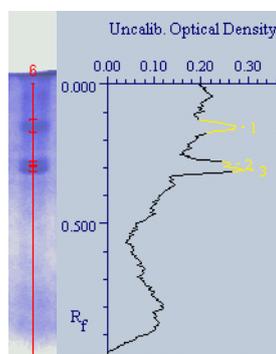


Lane 10

Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
7 - 5	0.283	39.46

PIEL MEDIA DORSAL

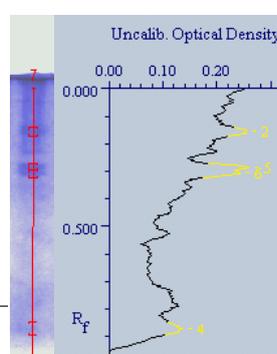
Electroforesis no desnaturalizante de muestras extraídas de diferentes partes anatómicas u órganos de *Holothuria impatiens*.



PODIOS

Lane 6

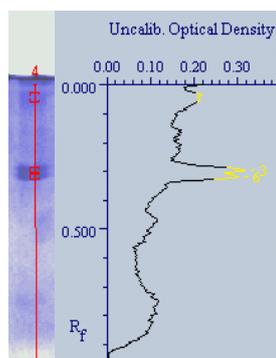
Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
6 - 2	0.287	84.64 x
6 - 3	0.310	56.87



TRACTO DIGESTIVO

Lane 7

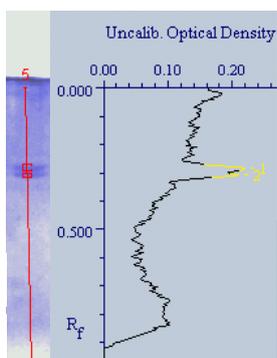
Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
7 - 4	0.873	25.62
7 - 5	0.287	84.20 x
7 - 6	0.306	60.65



PIEL EXTERNA

Lane 4

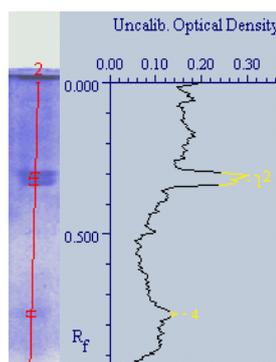
Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
4 - 3	0.297	72.14 x
4 - 6	0.322	45.35



PIEL INTERNA

Lane 5

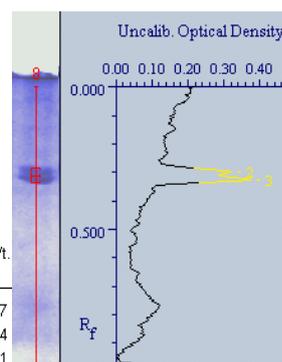
Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
5 - 1	0.285	88.38 x
5 - 2	0.307	59.33



PIEL ANTERIOR VENTRAL

Lane 2

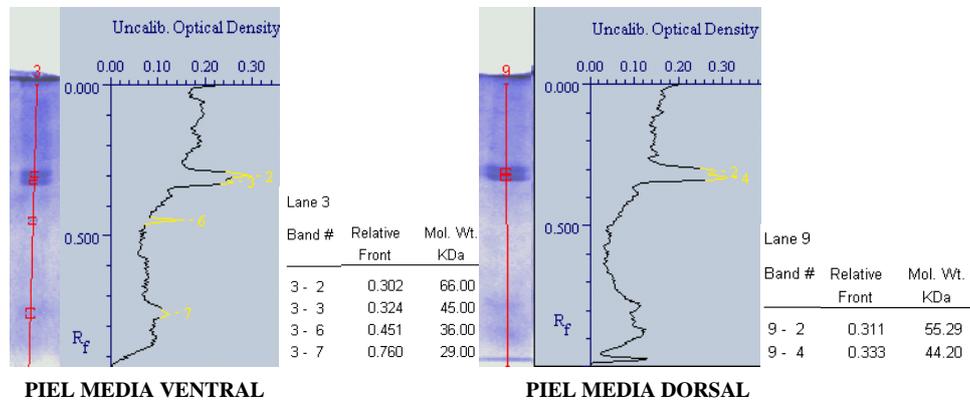
Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
2 - 1	0.324	48.77
2 - 2	0.309	51.34
2 - 4	0.767	24.21



PIEL ANTERIOR DORSAL

Lane 8

Band #	Relative Front	Mol. Wt. KDa
8 - 2	0.301	65.87
8 - 3	0.327	44.68



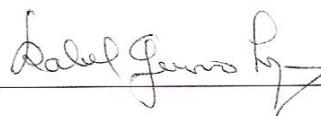
El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis que presentó

Arisaí del Carmen Hernández Sámano

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DEL PEPINO DE
MAR

El día 26 de Enero de 2010

Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Directora de la tesis



Jurado

Dra. Xóchitl Guzmán García
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Asesora



Dra. Raquel García Barrientos
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Asesora



Dra. Araceli Tomasini Campocosío
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa



Dr. Carlos Regalado González
Universidad Autónoma de Querétaro

