



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S. C.

---

---

**Programa de Estudios de Posgrado**

**CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA ACTIVIDAD  
DE FENOLOXIDASA DE LA HEMOCIANINA  
DE *Penaeus vannamei***

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

Presenta

**Abdiel Keni Cota Ruiz**

**La Paz, Baja California Sur, Noviembre de 2007**

## ***DEDICATORIA***

A mis padres, por su gran amor y apoyo

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, mi soporte y guía espiritual.

A mis padres y hermanos, de los cuales atesoro su amor y dedicación. Gracias por el esfuerzo para formar día con día una mejor familia. Me siento muy orgulloso de ustedes.

A mi director de tesis, al Dr. Fernando Luis García Carreño, y a mis co-tutores, al Dr. Manuel Díaz López y al Dr. Julio Humberto Córdova Murueta, así como también a la Dra. Martha Patricia Hernández Cortés, a la técnico del laboratorio Ann y a la Dra. Lourdes Mariana Díaz Tenorio. A todos ellos por su notable empeño en la consecución de este trabajo a través de sus atinados consejos y comentarios.

A mi amor, por toda la paciencia e inigualable apoyo. Tú has sido la motivación por excelencia que me ha permitido luchar constantemente por mis ideales. Por todo lo vivido, por nuestros logros, por todo nuestro amor... Gracias Marcela.

A mis amigos de toda la vida: Jesús, Pachón, Félix, Villegas, Nehemias y Javier. Han sido un ejemplo de verdadera entrega y de enorme influencia en mi vida. Los respeto y los admiro mucho.

A dos grandes amigos que disfrutaron este fruto tanto como yo. Por todas las experiencias/enseñanzas compartidas y la generación de muchos momentos para recordar. Gracias Yorsh, gracias Yosef.

A posgrado, me llevo gratas impresiones por el trato tan amable y voluntarioso recibido.

A Gracia, por ser ejemplo y guía a la vez. Por su genuino interés en mi formación plasmado a través de sus valiosos consejos.

A Roberto †, gracias Doc por el apoyo siempre incondicional, por esa mano amiga, por las gratas vivencias.

Al Dr. Profesor Heinz Decker y al Dr. Elmar Jaenicke por su accesibilidad y apoyo brindados. También por sus valiosas sugerencias en la interpretación de los resultados obtenidos.

A la Dra. Gloria Yépiz Plascencia por la donación de una cantidad considerable de hemocianina de camarón.

Al Técnico Arturo Sierra por su valiosa ayuda en la etapa de purificación de la hemocianina.

A Tony, un amigo invaluable. Gracias por tu calidad y calidez humana.

Al Dr. Reinhard Saborowski por su ayuda y facilidades ofrecidas en su laboratorio.

Se agradece a CONACyT así como también al proyecto proyecto SEP-CONACyT: P46000-Z, cuyo título es: Factores Bioquímicos, Enzimológicos y Genéticos Involucrados en la Formación Post mortem de Melanina en Camarón.

A Pau, Are, Pedro, Nika, Fercho, Mau, Kalín, Esther, Hugo, Cris, Cristy, Vero, Luzali, Erika, Mario, Perla, Laura y al Rocha por las amenas pláticas y los buenos acontecimientos.

A las personas que de una forma u otra se vieron involucradas en mi formación y en la obtención de esta incalculable meta.

# CONTENIDO

Pág.

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	iii
<b>Lista de Tablas y figuras</b> .....	iv
<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Antecedentes</b> .....	4
2.1 Metaloproteínas; un enfoque hacia las proteínas con cobre.....	4
2.2 Evolución de las COPs.....	10
2.3 Melanosis.....	12
2.3.1 Rol fisiológico de la melanosis.....	13
2.3.2 Oscurecimiento post mortem.....	14
2.3.3 El papel de la fenoloxidasa; tirosinasa y catecoloxidasa.....	15
2.3.4 El sistema de activación de la proPO en invertebrados.....	17
2.4 La hemocianina en moluscos y artrópodos.....	20
2.4.1 La hemocianina en artrópodos.....	21
2.4.2 Estructura.....	22
2.5 Funciones de la hemocianina.....	24
2.6 Actividad de fenoloxidasa en hemocianinas.....	24
2.7 Mecanismo enzimático de activación de la Hc.....	25
<b>3. Hipótesis</b> .....	28
<b>4. Justificación</b> .....	29
<b>5. Objetivos</b> .....	31

	Pág.
5.1 Objetivo General.....	31
5.2 Objetivos particulares.....	31
<b>6. Materiales y Métodos.....</b>	<b>32</b>
6.1 Animales.....	32
6.2 Químicos.....	32
6.3 Aislamiento y purificación.....	32
6.4 Purificación de los agregados.....	33
6.5 Ensayo para medir la actividad de PO de la Hc.....	33
6.6 Efecto de los activadores en la Hc.....	34
6.7 Efecto de los sustratos.....	34
6.8 Cuantificación de proteína.....	35
6.9 SDS PAGE y PAGE nativa.....	35
6.10 Efecto del pH en la actividad de PO de la Hc.....	35
6.11 Efecto de la temperatura en la actividad de PO de la Hc.....	36
6.12 Termoestabilidad.....	36
6.13 Parámetros cinéticos.....	36
6.14 Preparación del lisado de hemocitos.....	37
6.15 Efecto del contenido de hemocitos en la conversión de Hc en HcPO.....	38
6.16 Efecto del contenido de la glándula digestiva en la conversión de Hc.....	38
6.17 Análisis estadísticos.....	38
<b>7. Resultados.....</b>	<b>40</b>
7.1 Purificación de la Hc.....	40
7.2 Conversión de Hc en HcPO.....	41

	Pág.
7.3 Efecto de sustratos en la actividad de HcPO.....	43
7.4 Efecto del HLS en la activación de Hc.....	45
7.5 Efecto de la GD en la conversión de Hc.....	46
7.6 Purificación de los agregados de la Hc.....	47
7.7 Efecto del SDS en la conversión de Hc.....	48
7.8 Propiedades bioquímicas.....	50
7.8.1 Estabilidad bajo congelamiento.....	50
7.8.2 Efecto de la temperatura en la actividad de HcPO.....	51
7.8.3 Termoestabilidad.....	51
7.8.4 Efecto del pH.....	52
7.9 Parámetros Cinéticos: $K_m$ y $V_{max}$ .....	53
<b>8. Discusión.....</b>	<b>55</b>
8.1 Purificación de la Hc y agregados.....	55
8.2 Análisis electroforético.....	57
8.3 Efecto de los activadores.....	61
8.4 Efecto de los sustratos en HcPO.....	64
8.5 Efecto del HLS y de la GD.....	65
8.6 Propiedades bioquímicas; implicaciones en melanosis post mortem.....	67
8.7 Relaciones estructurales y de función entre Hcs y PO.....	71
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>73</b>
<b>10. Recomendaciones.....</b>	<b>75</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>77</b>

## RESUMEN

La melanosis post mortem es un problema que va en detrimento de las propiedades sensoriales de los crustáceos. El desarrollo de melanina parece depender de fenoloxidasas endógenas sintetizadas en los hemocitos, sin embargo, una proteína más abundante, la hemocianina (Hc), podría estar involucrada y ser más importante. Se investigó la actividad de fenoloxidasa (PO) de la Hc, así como también el mecanismo de conversión y propiedades catalíticas. La Hc del plasma del camarón blanco, *Penaeus vannamei*, fue purificada y convertida en una proteína con actividad de PO (HcPO) utilizando agentes tanto químicos como enzimáticos; el tratamiento con SDS fue el que generó una mayor conversión. Por su parte, la quimotripsina fue el activador enzimático que mayor tasa de conversión generó. Utilizando electroforesis preparativa, los agregados 6-mer y 12-mer de la Hc fueron purificados, el último agregado fue el que presentó actividad de fenoloxidasa, indicando que la actividad depende también de la forma cómo se conforman las subunidades a nivel cuaternario. La HcPO puede utilizar tanto sustratos difenólicos como monofenólicos. La HcPO presenta óptimos de temperatura (45 °C) y pH (7.6) similares a los que despliegan fenoloxidasas de artrópodos. Tiene una  $K_m$  de 1.48 mM y una  $V_{max}$  (x 1000) de 30.5 U/mg cuando se utiliza L-DOPA como sustrato. La Hc es estable al congelado y descongelado a -20 °C, condiciones a las cuales se sigue observando el desarrollo de melanina. Adicionalmente, la cantidad de potenciales moléculas con actividad de



fenoloxidasas derivadas de la hemocianina sugieren que esta proteína puede ser un inductor clave en melanosis post mortem.

## ABSTRACT

Melanosis is a major concern in prolonging the shelf life of crustaceans. This kind of discoloration appears to depend on endogenous polyphenol oxidases (PO) located in hemocytes; however, a more abundant protein, hemocyanin (Hc), may be involved. The PO activity of Hc, the mechanism of conversion and the catalytic properties were investigated. The pure Hc was converted into phenoloxidase-like enzyme (HcPO) using chemical and enzymatic treatments. The SDS treatment was the most potent converter. Additionally, chymotrypsin treatment was the major enzymatic converter of Hc. Using preparative electrophoresis, pure 6-mer and 12-mer aggregates were obtained, with the latter aggregate the only one with phenoloxidase activity. This demonstrated that the activity depends on the way how subunits are aggregated at quaternary level. This novel enzyme can use mono and diphenolic substrates to generate melanin and has a similar biochemical pattern compared with crustaceans POs. HcPO possesses a  $K_m$  value of 1.48 mM and a  $V_{max}$  value (x 1000) of 30.5 U/mg when L-DOPA is used as substrate. Hc is stable when frozen and thawed at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and its amount in hemolymph is three orders of magnitude higher than PO. These results suggest that this protein is key inductor of black spots in shrimp.

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura	Nombre	Página
Figura 1	Esquema de las reacciones que cataliza la fenoloxidasa	3
Figura 2	Modelos de varios sitios que contienen cobre	9
Figura 3	Sitio activo de las COPs	12
Figura 4	Reacciones de la tirosinasa y de la catecoloxidasa	16
Figura 5	Sistema de activación de la proPO en artrópodos	18
Figura 6	Estructura representativa de la hemocianina en artrópodos	22
Figura 7	Mecanismo de activación hipotético en hemocianinas de artrópodos	26
Figura 8	Sitio activo de la hemocianina de <i>Limulus polyphemus</i>	27
Figura 9	Purificación de la hemocianina mediante filtración en gel	40
Figura 10	Análisis SDS-PAGE de la hemocianina purificada de <i>Penaeus vannamei</i>	41
Figura 11	Cinética de la formación de melanina	42
Figura 12	Conversión de la hemocianina en HcPO utilizando diferentes activadores	42
Figura 13	Medición de la generación de dopacromo por la HcPO ante diferentes sustratos	44
Figura 14	Cinética de formación de producto para diferentes sustratos	44
Figura 15	Efecto del lisado de hemocitos en la conversión de Hc	45
Figura 16	Efecto de la glándula digestiva en la conversión de Hc	46
Figura 17	Análisis PAGE nativo y SDS PAGE de la hemocianina y los agregados	48
Figura 18	Efecto del SDS sobre la conversión de Hc	49

Figura 19	Estabilidad de la Hc bajo congelamiento	50
Figura 20	Efecto de la temperatura en la actividad de HcPO	51
Figura 21	Medición de la termoestabilidad de la Hc con el transcurso del tiempo	52
Figura 22	Efecto del pH sobre la actividad de la HcPO	53
Figura 23	Determinación de $K_m$ y $V_{max}$ de acuerdo con el modelo Lineweaver-Burk	54
Figura 24	Secuencia de aminoácidos de la Hc deducidos a partir del cDNA del hepatopáncreas de <i>Penaeus vannamei</i>	60
Figura 25	Alineación de las secuencia de aminoácidos de los dos sitios de unión al cobre (A y B) en la proPO y Hc de camarón	72

<b>Tabla</b>	<b>Encabezado</b>	<b>Página</b>
Tabla I	Propiedades cinéticas de la HcPO	54
Tabla II	Características moleculares de la hemocianina de <i>Penaeus vannamei</i>	61
Tabla III	Comparación de la $K_m$ para PO en diferentes crustáceos	69

## 1. INTRODUCCIÓN

La hemocianina es una proteína transportadora de oxígeno que se encuentra presente en la hemolinfa de los moluscos y casi todos los artrópodos en forma de oligómeros de elevado peso molecular (Beltramini et al., 2005). En crustáceos, esta proteína se sintetiza en la glándula digestiva y es transportada en elevadas concentraciones en el plasma, donde alcanza concentraciones del 90 al 95 % del total de proteínas (van Holde y Miller, 1995). La hemocianina de los crustáceos se asocia formando agregados desde 6 (1 x 6) hasta 48 (8 x 6) subunidades, resultando en proteínas con masas moleculares desde 450 hasta 3 900 kDa (Herskovits, 1988). Los arreglos más comunes para los decápodos son en hexámeros o dodecámeros (1 x 6 y 2 x 6) (Chan y Weeks, 1992). Los hexámeros, con una masa molecular de  $4.5 \times 10^5$  Da, son la forma predominante de la mayoría de los crustáceos primitivos tal como *Penaeus setiferus* (Brouwer et al., 1978) o *Penaeus monodon* (Ellerton et al., 1981). La hemocianina ha sido objeto de muchos estudios debido a su importancia fisiológica, a características bioquímicas y multifuncionalidad. Esta proteína puede actuar como fenoloxidasas cuando es expuesta a diversos agentes, por ejemplo: el perclorato, la tripsina y el SDS (Zlateva et al., 1996; Decker y Rimke, 1998; Salvato et al., 1998; Adachi et al., 2001; Decker et al., 2001), así como por moléculas endógenas involucradas en el mecanismo de defensa como lo son los factores de la coagulación y péptidos antibacterianos (Nagai y Kawabata, 2000; Nagai et al., 2001), lo que tiene

consecuencias considerables debido a que la fenoloxidasa es la enzima responsable de un tipo de coloración oscura que aparece en los camarones durante su almacenamiento conocido como melanosis (Kim et al., 2000). Además, los crustáceos marinos son vulnerables a desarrollar melanosis post mortem, fenómeno que denota deterioro del producto, haciéndolo inaceptable por los consumidores y reduciendo su valor en el mercado.

La fenoloxidasa es una enzima oxidoreductasa (EC 1.14.18.1), que contiene cobre y cataliza la oxigenación de monofenoles a *o*-difenoles y la oxidación de estos en sus correspondientes quinonas (Fig. 1) (Mason, 1965). Básicamente, esta enzima es responsable de llevar a cabo dos reacciones; utilizando el oxígeno molecular cataliza la hidroxilación en la posición *orto* de un grupo hidroxilo sobre un sustrato monofenólico, la segunda reacción consiste en la oxidación de un difenol a benzoquinona, misma que es oxidada hasta formar melanina (productos de color café) generalmente por reacciones no enzimáticas (Kim et al., 2000). Se sintetiza como proenzima y su activación es llevada a cabo por el sistema de activación de la proPO (el sistema proPO) (Cerenius y Söderhäll, 2004).

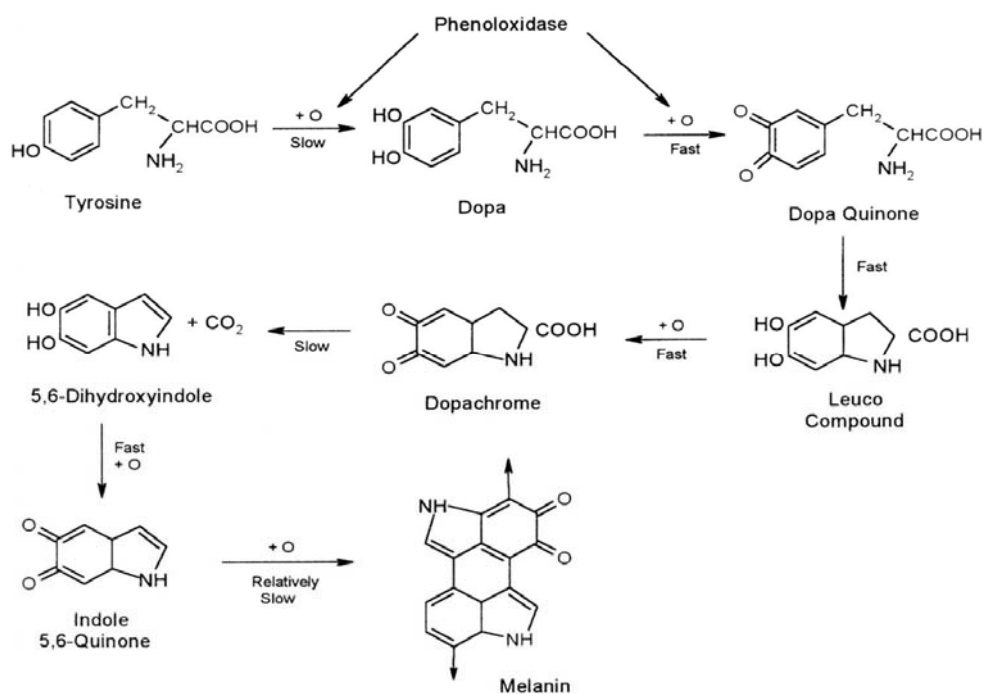


Fig. 1. Esquema de las reacciones que cataliza la fenoloxidasasa

Hace más o menos una década se aceptaba que la fenoloxidasasa era la única proteína involucrada en las reacciones anteriormente descritas. Sin embargo, recientes investigaciones han demostrado que la hemocianina posee un sitio activo estructuralmente similar al de las fenoloxidasas (Ling et al., 1994; Magnus et al., 1994). Asimismo, también se ha demostrado que al menos una hemocianina de camarones puede actuar como fenoloxidasasa (Adachi et al., 2001). Estas recientes evidencias, acompañadas de la ausencia de reportes que describan sus propiedades enzimáticas han sido el motivo para aislar la hemocianina de *Penaeus vannamei*, analizar su carácter enzimático y su potencial participación en melanosis post mortem.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Metaloproteínas; un enfoque hacia las proteínas con cobre

Las proteínas constituyen la mayor cantidad de masa seca en una célula. Las proteínas no solo son los sillares mediante los cuales se construyen las células, sino que también ejecutan virtualmente todas las funciones celulares (Alberts et al., 2002). Por ejemplo, son responsables de: movimiento celular, catálisis, estabilización estructural, transporte de moléculas, traducción de señales y regulación.

Se ha estimado que cerca de una tercera parte de todas las proteínas tienen como grupo prostético a uno o más iones metálicos (Tepper, 2005). Muchas de estas proteínas contienen metales como el magnesio y calcio, mismos que regularmente tienen roles en la estabilización estructural. Una parte significativa de todas las metaloproteínas contienen iones metálicos de transición tales como el hierro, el cobre, el zinc, el molibdeno y el vanadio, lo que les confiere capacidad REDOX debido a que pueden presentarse en diversos estados de oxidación. Las proteínas que contienen estos metales regularmente se encuentran involucradas en procesos donde se intercambian electrones, estos metales se enlazan a la matriz proteínica a través de interacciones con los residuos de aminoácidos tales como His, Asp, Asn, Cys y Met (Tepper, 2005).



Por otro lado, existe un área muy importante dentro de la química que nos permite entender y conocer cómo los complejos metálicos son construidos, esta es la química de la coordinación. Un complejo metálico consiste en un ion metálico, con frecuencia referido como el “átomo central”, el cual se une a varios iones y/o moléculas, llamados ligandos. Usualmente la química de la coordinación es considerada dentro del campo de la química inorgánica debido a que la coordinación es tradicionalmente inorgánica (iones metálicos) (Lundberg, 2006). La coordinación geométrica del ion metálico es determinada por la posición y orientación de los residuos de aminoácidos dentro de la matriz proteínica y a su vez por la misma preferencia del ion metálico. Asimismo, la esfera de coordinación del metal es preorganizada, la cual regularmente lleva a una geometría de coordinación del metal lejos del mínimo de energía. Más aun, la matriz proteínica juega un rol esencial en el reconocimiento intermolecular entre dos proteínas que se transfieren electrones o una enzima y su sustrato durante la catálisis. Las propiedades del metal coordinado pueden ser moduladas por la matriz proteínica, por ejemplo mediante un cambio en las condiciones de la solución (como el pH) o el enlace ante ciertas moléculas señal. Por lo que las proteínas que contienen metales pueden llevar a cabo un amplio repertorio de funciones, a la vez que cada metaloproteína está estructurada para realizar su función de una manera selectiva y altamente específica (Tepper, 2005).

El sitio de unión de una proteína a un metal consiste en el ión metálico y la cadena de aminoácidos con la cual interactúa, así como ligandos terminales que definen la esfera de coordinación de cada ión metálico. Semejantes sitios se pueden clasificar en cinco grupos básicos con sus funciones respectivas: a) Estructural: configuración terciaria o cuaternaria de la proteína; b) Almacenamiento: absorción, enlace o liberación de metales en forma soluble; c) Transferencia de electrones: absorción, liberación y almacenamiento de electrones d) Enlace con el oxígeno molecular: coordinación y descoordinación del metal con  $O_2$  y e) Catalítica: unión con el sustrato, activación y número de recambio (Holm et al., 1996).

Refiriéndonos ahora a las metaloproteínas que contienen cobre, éstas llevan a cabo cuatro funciones básicas: 1) Almacenamiento de metales, transporte y absorción; 2) Transferencia de electrones; 3) Almacenamiento de oxígeno molecular, absorción y transporte; 4) Catálisis. La presencia de cobre en las proteínas les provee ciertas características espectroscópicas. Basados en estas características, este tipo de proteínas han sido históricamente clasificadas en diferentes clases. Inicialmente, la subdivisión consistía en tres tipos, no obstante, la disponibilidad de mas estructuras revelan un incremento en el repertorio, requiriéndose de definiciones para mas tipos. La actual clasificación se basa en siete diferentes clases, a continuación se comentan brevemente las características de sus sitios activos:

Tipo 1: las proteínas que contienen este tipo de sitio transfieren electrones, tal es el caso de la plastocianina, azulina, pseudoazurina y amicianina. Debido a su intenso color azul en la forma oxidada (Cu II), estas proteínas han sido apodadas “proteínas azules”. Estos sitios se encuentran también en enzimas oxidoreductasas, por ejemplo, en la nitrito reductasa y en las oxidasas que contienen más de un sitio de unión al cobre (Ejemplo, ascorbato oxidasa, lacasa). La esfera de coordinación del cobre se forma por dos átomos de nitrógeno provenientes del amino ácido His, un átomo de azufre de Cis y un átomo de azufre débil de metionina. Se han encontrado en algunos casos glutamina y leucina sustituyendo a la metionina.

Tipo 2: el sitio de estas proteínas se compone de cuatro átomos ya sea de nitrógeno o de oxígeno conformándose en un plano cuadrado o en forma de tetraedro distorsionado. Estas proteínas son esencialmente incoloras y su espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR por sus siglas en inglés) se distingue de las del tipo I. Las proteínas del tipo 2 están más involucradas en catálisis, ejemplo de proteínas con este sitio son la galactosa oxidasa y la Cu-Zn superóxido dismutasa.

Tipo 3: el sitio de estas proteínas consiste en dos iones de cobre coordinados cada uno por tres residuos de histidina. Estas proteínas no dan señal EPR en su forma oxidada debido a la unión antiferromagnética entre los iones de cobre (II).

Estas proteínas están involucradas en el transporte de oxígeno. Ejemplos de las mismas son la hemocianina, catecoloxidasa y tirosinasa.

Tipo 4: el sitio de estas proteínas puede ser visto como una mezcla de la composición del sitio 2 y 3, juntos formando un grupo trinucleado. Este sitio está presente en proteínas que catalizan reacciones de oxidación como la lacasa o la ascorbato oxidasa. Los tres átomos de cobre están ligados por residuos de 8 His. Frecuentemente, estas proteínas contienen un centro adicional del tipo 1, designándose como oxidasas multicúpricas u oxidasas azules.

Cu<sub>A</sub>: este sitio es dinuclear. Los dos átomos de cobre son sujetos en forma de puentes por dos átomos de azufre de Cis. Cada átomo de cobre es ligado adicionalmente por un átomo de nitrógeno de His. Estas proteínas se involucran en la transferencia de electrones, ejemplos de estas proteínas son la citocromomo c oxidasa y la oxido nitroso reductasa. Este sitio muestra un espectro EPR muy característico. En la forma oxidada, cada uno de los átomos de cobre se presentan en un estado donde sus valencias se mezclan, formalmente denotado como Cu (1.5) Cu (1.5). En contraste con la mayoría de los sistemas Cu, el sitio Cu<sub>A</sub> da señales en el espectro de resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés). Esto ha permitido describir detalladamente la estructura electrónica de este sitio.

$Cu_B$ : el sitio  $Cu_B$  es muy similar al átomo de hierro del grupo hemo que se encuentra en la citocromo c oxidasa. El sitio  $Cu_B$  se localiza en configuración trans hacia el ligando axial de la His del grupo hemo ( $a_3$ ) y es coordinado por tres histidinas con una geometría en forma de pirámide trigonal con posición coordinada abierta de los átomos de cobre, mismos que se encuentran orientados hacia la posición coordinada abierta del hierro en el grupo hemo.

$Cu_Z$ : este sitio está presente en la oxido nitroso reductasa, enzima involucrada en la conversión de  $N_2O$  a  $N_2$ . El centro  $Cu_Z$  comprende cuatro iones de cobre arreglados en un tetraedro distorsionado y siete residuos de histidina. Tres átomos de cobre se encuentran ligados por dos histidinas, mientras que el cuarto está ligado solo por una. Adicionalmente, los átomos de cobre dentro del centro se mantienen por un puente procedente de un átomo de azufre inorgánico (Tepper, 2005).

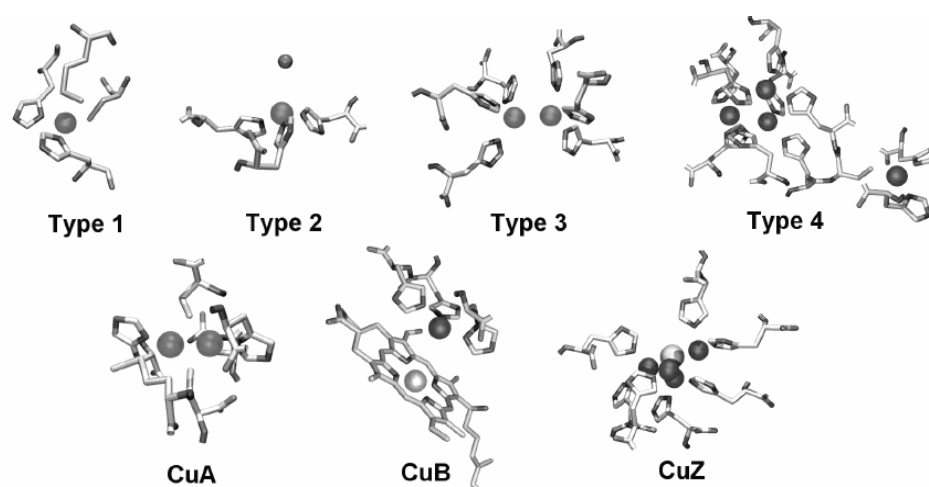


Fig. 2. Modelos de varios sitios que contienen cobre. Para la descripción de cada uno ver el texto. Tomado de Tepper, 2005.

## 2.2 Evolución de las COPs

La atmósfera de la tierra cambió de un ambiente anaerobio a uno aerobio a medida que los organismos fotosintéticos aparecieron. De esta manera, los organismos desarrollaron diferentes estrategias para manejar el producto final de la fotosíntesis, el oxígeno molecular ( $O_2$ ), así como sus derivados altamente reactivos: aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Varias enzimas, tales como la superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa, evolucionaron para proteger a los organismos. Una clase particular de proteínas, las proteínas con cobre que enlazan oxígeno (COPs por sus siglas en inglés), son de especial interés, debido a que los organismos utilizan estas proteínas para manejar el oxígeno. Las COPs primitivas eventualmente desarrollaron múltiples funciones (Decker y Terwilliger, 2000), por ejemplo, hoy sabemos que la evolución de nuevas proteínas, que son resultado de la duplicación de genes y subsecuentes mutaciones, es un proceso importante en la habilidad adaptativa de los organismos (Terwilliger et al., 2005). En este sentido, las COPs primitivas vinieron a actuar como fenoloxidasas y así retenían el oxígeno y mantenían la concentración de oxígeno molecular baja. A medida que los organismos llegaron a ser más complejos, las COPs junto con las proteínas que contienen un grupo hemo evolucionaron para transportar el oxígeno, almacenarlo y transportarlo desde sitios de elevada concentración a lugares de baja concentración. Por lo tanto, los organismos utilizaron COPs tanto para protegerse del oxígeno molecular

altamente reactivo como para emplearlo como aceptor final de electrones en el proceso de generación de energía (Decker y Terwilliger, 2000).

El suplemento de oxígeno a las células es un proceso esencial y requiere que proteínas especializadas lo lleven a cabo. Las hemocianinas (COPs) de Mollusca y Arthropoda, realizan dicho proceso. Estas proteínas son características debido a que se asocian en estructuras cuaternarias pudiendo alcanzar varios millones de daltons (Markl y Decker, 1992; van Holde y Miller, 1995). En cuanto al phylum Arthropoda se refiere, la hemocianina ha sido estudiada a gran detalle en Chelicerata y Malacostraca, mientras que se ha identificado en todos los subphyla de artrópodos, incluyendo el Myriapoda (Mangum et al., 1985; Jaenicke et al., 1999b) y Hexapoda (Sánchez et al., 1998). En años recientes, otras proteínas han sido descubiertas dentro del phylum Artropoda que manifiestan ciertas estructuras y secuencias similares a la hemocianina pero con diferentes funciones (Beintema et al., 1994; Burmester y Scheller, 1996).

Varias secuencias de fenoloxidasas (EC 1.14.18.1) de artrópodos han sido publicadas y se ha revelado que estas enzimas están relacionadas con las hemocianinas de artrópodos (Aspán et al., 1995; Fujimoto et al., 1995). Pero, ¿Qué tienen en común estos dos grupos de COPs?, Se ha demostrado por espectroscopia RAMAN (Ling et al., 1994) y a través de la estructura por difracción de rayos X de la forma oxy de la hemocianina de *Limulus polyphemus* (Magnus et

al., 1994) que ambas proteínas comparten un sitio activo similar mediante el cual el  $O_2$  se enlaza con los dos átomos de cobre (CuA y CuB) (Fig. 3).

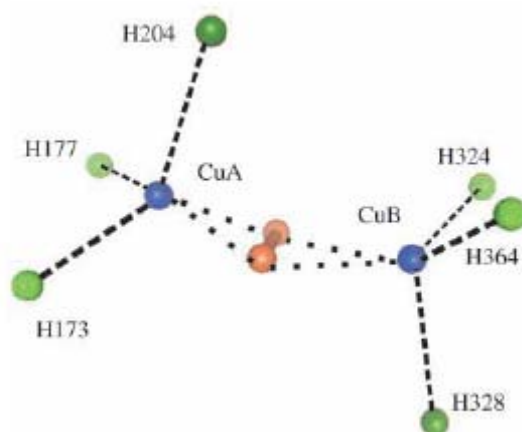


Fig. 3. Sitio activo de las COPs. El  $O_2$  se enlaza a los dos átomos de cobre (CuA y CuB) de acuerdo a las estructuras de rayos X de la forma oxy de la hemocianina de *Limulus polyphemus* (Magnus et al., 1994) y de un compuesto sintético (Kitakima y Morooka, 1994). Modelo tomado de Decker y Terwilliger, 2000.

### 2.3 Melanosis

En los invertebrados, daños físicos o la presencia de agentes externos tales como parásitos o microorganismos resulta en la aparición de melanina alrededor del tejido dañado o del objeto extraño. La melanina bloquea físicamente al agente intruso y de esta manera previene o retarda el crecimiento de los mismos, pero quizás el hecho más importante que el propio proceso de formación de melanina, es que compuestos altamente reactivos y quinonas tóxicas son producidas (Cerenius y Söderhäll, 2004). La forma activa de la fenoloxidasa (PO) es la responsable de catalizar estas reacciones; después de una activación por una



proteólisis limitada de su precursor (proPO), la PO puede catalizar las primeras etapas en la ruta de la generación de melanina (Ashida y Brey, 1998; Söderhäll y Cerenius, 1998). La PO, además de estar involucrada en la respuesta inmune, es también importante para la pigmentación y la esclerotización de tejidos.

Las melaninas son polímeros polifenólicos heterogéneos cuyos colores van desde el amarillo hasta el negro. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, e incluso se encuentran a lo largo de la escala filogenética, desde las bacterias hasta el hombre. La melanogénesis desempeña numerosos roles en diferentes organismos.

### **2.3.1 Rol Fisiológico de la melanosis**

En los invertebrados, además de proveer la pigmentación del cuerpo, la melanina también está involucrada en importantes procesos fisiológicos. Por ejemplo, en reacciones de defensa, cicatrización y esclerotización. Los insectos y otros artrópodos utilizan melanina como un mecanismo de defensa para encapsular organismos invasores. Más aún, el depósito de melanina en una herida previene la pérdida de sangre mientras que a su vez los compuestos cíclicos (polímeros de quinonas) pueden matar a los posibles microorganismos invasores. En las reacciones de esclerotización se emplean catecolaminas que son compuestos similares a los precursores de la melanina. Durante este proceso, las N-catecolaminas se convierten en quinonas y éstas, junto con otros metabolitos muy

reactivos, intervienen en la formación de la cutícula. En camarones, la PO se sintetiza en los hemocitos en forma de su precursor (proPO) y actúa a lo largo de varias fases de la vida del organismo (Sugumaran, 1996; Söderhäll et al., 1996; Ashida y Brey, 1997; Tepper, 2005).

La polifenoloxidasa cataliza los pasos iniciales que conducen hacia la polimerización de los compuestos fenólicos en sus correspondientes quinonas, las cuales finalmente generan los polímeros de nombre melaninas. Como se mencionó anteriormente, la melanina es un polímero de color negro que posee propiedades antimicrobianas y se cree que a crustáceos e insectos les confiere resistencia a enfermedades (Cerenius y Söderhäll, 2004). Los componentes microbianos de la pared celular tales como la laminarina inician la conversión de la proPO en su forma activa, esto gracias al sistema proPO, el cual será explicado en el apartado 2.3.4.

### **2.3.2 Oscurecimiento post mortem**

Cuando los crustáceos mueren, inicia el desarrollo de manchas negras. Este tipo de coloración es llamada también oscurecimiento enzimático y es consecuencia de la oxidación enzimática de compuestos fenólicos por la fenoloxidasa (Simpson et al., 1987; Ferrer et al., 1989; Yan et al., 1989, 1990; Yan y Taylor, 1991; Ali et al., 1994a,b; Taylor, 1995). Aunque la melanina es un compuesto no tóxico, su

aparición denota deterioro en el producto marino si se obtiene como producto alimenticio (Kim et al., 2000).

Hasta el momento, poco se conoce acerca del mecanismo de conversión post mortem de la proPO en PO, no obstante se presume que ocurre de la misma manera como se observa en los organismos vivos, hecho que finalmente lleva a la generación de melanina. Lo que sí es bien sabido es que una vez que cesa el transporte de oxígeno hacia los tejidos, causado naturalmente por la muerte del organismo, éstos se lisan y liberan su contenido. Algunas células como los hemocitos liberan enzimas proteolíticas del tipo serino que son responsables de la conversión de la proPO en PO (Cerenius y Söderhäll, 2004). De forma análoga, esta clase de enzimas son capaces de convertir la hemocianina en HcPO (Decker y Rimke, 1998). Este último hecho sugiere una alternativa tentativa, la cual refiere a que la melanosis no solo puede ser catalizada por la proPO que se sintetiza en los hemocitos, sino también puede estar mediada por la proteína transportadora de oxígeno en crustáceos (Adachi et al., 2001).

### **2.3.3 El papel de la fenoloxidasas; tirosinasa y catecoloxidasas**

La tirosinasa y la catecoloxidasas generalmente son nombradas como fenoloxidasas. La tirosinasa inicia la síntesis de melanina, esta enzima cataliza dos reacciones tal como se observa en la figura 4: la hidroxilación y oxidación de monofenoles en sus respectivas *o*-quinonas (actividad de monofenoloxidasas, EC

1.14.18.1) y la oxidación de los *o*-difenoles a sus respectivas *o*-quinonas (actividad de difenoloxidasas, EC 1.10.3.1), por su parte, la cresolasa o catecoloxidasas solo cataliza la última reacción (Decker y Tuczec, 2000; García-Borrón y Solano, 2002).

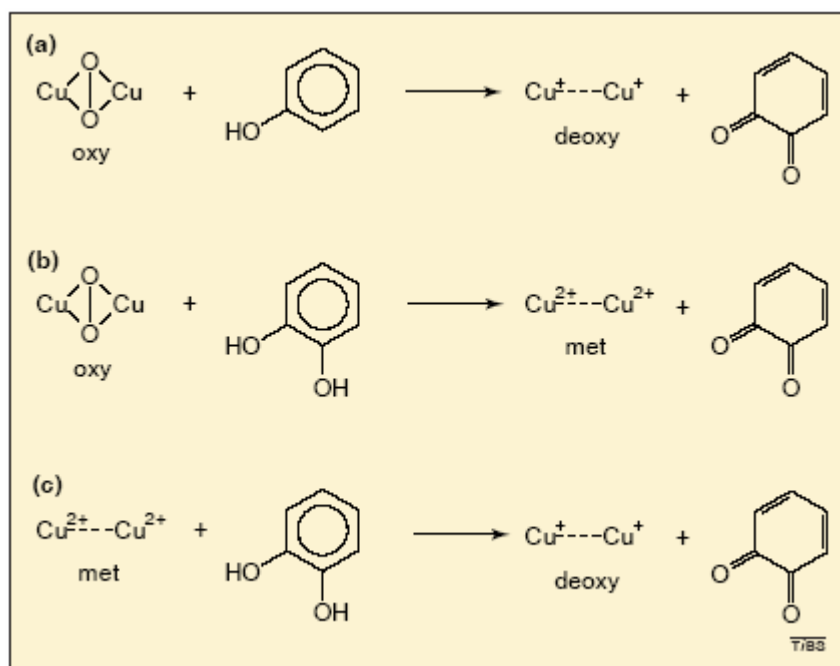


Fig. 4. Reacciones de la tirosinasa y de la catecoloxidasas. (a) Los compuestos monofenólicos son hidroxilados para formar *o*-difenoles y oxidados a *o*-quinonas por la tirosinasa (actividad de cresolasa). (b), (c) Los *o*-difenoles son oxidados para formar *o*-quinonas por la catecoloxidasas y la tirosinasa (actividad de catecoloxidasas). Esta actividad es regulada por la forma oxy (el cobre en estado II enlazado con el oxígeno) (b), y la forma meta (El cobre en estado II sin enlazarse al oxígeno) de estas enzimas (c), respectivamente. Tomado de Decker y Tuczec, 2000.

No solo los sustratos fisiológicos como la tirosina y el L-DOPA son convertidos por la tirosinasa en sus correspondientes difenoles y quinonas, sino también otros fenoles y difenoles. En este sentido, la tirosinasa cataliza tanto la *orto* hidroxilación de monofenoles como la oxidación (desprendimiento de dos electrones) de un *o*-difenoil a *o*-quinona. Durante esta reacción enzimática, la fenoloxidasas pasa un

átomo del oxígeno molecular para insertarlo en el monofenol y el otro átomo se reduce con los dos electrones liberados en la oxidación del monofenol para formar agua (Decker y Terwilliger, 2000). Lo anterior se ha descubierto mediante el uso de isótopos marcados.

La tirosinasa contiene dos átomos de cobre que se encuentran dentro de la matriz proteica. La región donde se ligan estos iones, llamados CuA y CuB, se encuentran en todas las tirosinasas (No confundir estos sitios, con los descritos en el apartado 2.1). Cada región contiene tres residuos de histidina bien conservados que están involucrados en la coordinación de los dos átomos de cobre en el sitio activo de la enzima. Es en esta región donde la tirosinasa interactúa tanto con el oxígeno molecular como con el sustrato. Los sitios CuA y CuB comparten una homología muy similar con las regiones correspondientes de las hemocianinas y con las catecoloxidasas. Estas proteínas, la tirosinasa, la hemocianina y la catecoloxidasa, pertenecen a las COPs del tipo 3 (Tepper, 2005).

#### **2.3.4 El sistema de activación de la proPO en invertebrados**

La activación de la fenoloxidasa es llevado a cabo por el sistema de activación de la proPO (Sistema proPO), el cual consiste en: proteínas capaces de enlazarse a polisacáridos y otros compuestos típicamente asociados con microorganismos, proteinasas que se activan ante la presencia de estos productos microbianos y

otros factores que tienen la capacidad de regular el sistema, por ejemplo los inhibidores de proteinasas (Fig. 5) (Cerenius y Söderhäll, 2004).

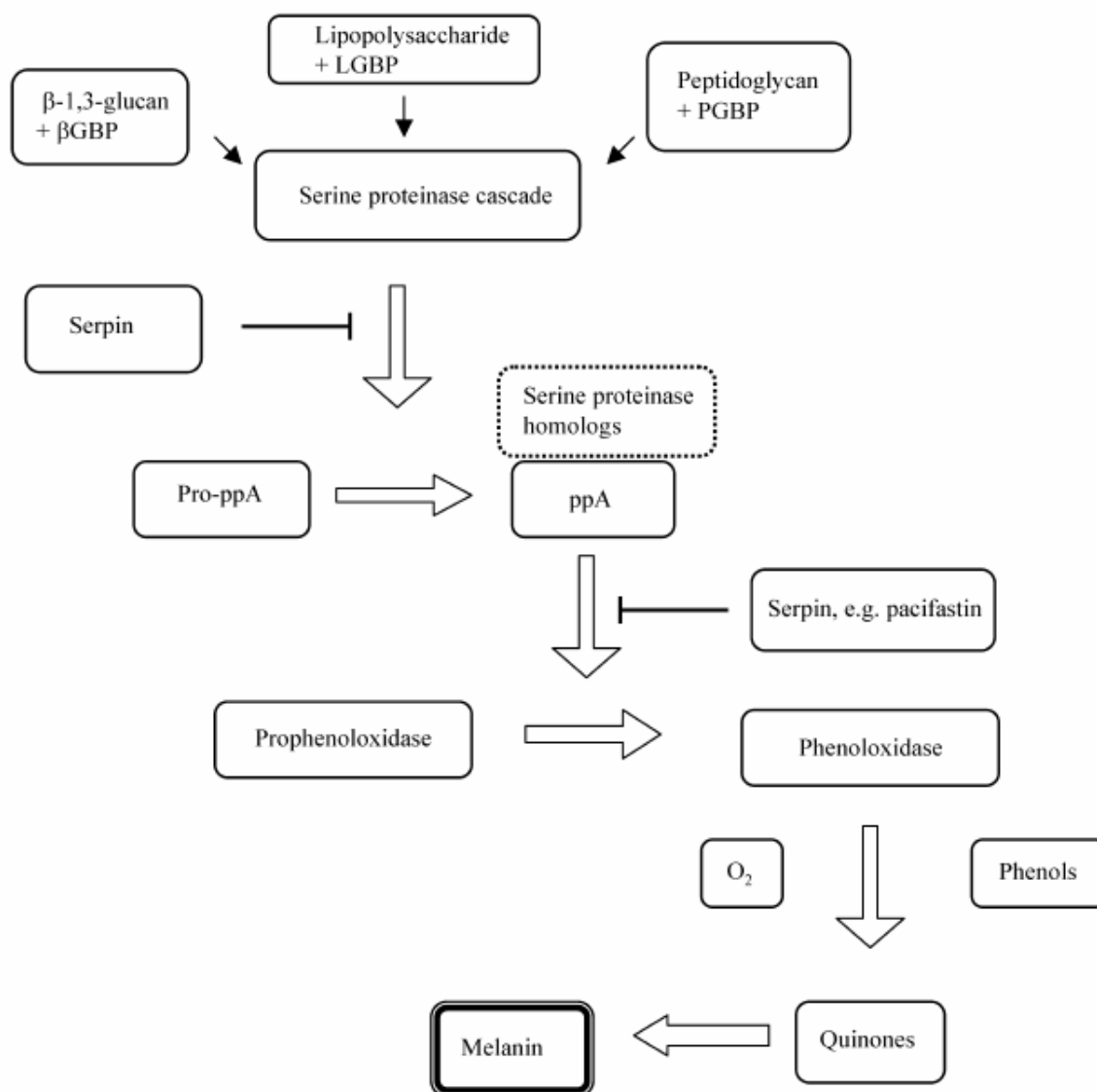


Fig. 5. Sistema de activación de la proPO en artrópodos. El sistema es activado por proteínas capaces de reconocer y enlazarse ya sea a  $\beta$ -1,3-glucanos, lipopolisacáridos, peptidoglicanos o a otros componentes como pueden ser factores endógenos producidos en el tejido dañado. Una cascada de serin proteinasas, las cuales aun no han sido caracterizadas, hidrolizarán la pro-serin-proteinasa (ppA) hacia su forma activa (ppA). El recuadro que contiene los homólogos de serin

proteinasas se establece con línea punteada, esto debido a que algunas ppAs requieren estos homólogos. Algunas ppAs son capaces de convertir la proPO en su forma activa (PO). Tomado de Cerenius y Söderhäll, 2004.

La proPO de crustáceos, es sintetizada en los hemocitos (Cerenius et al., 2003). Una vez que sale de los hemocitos, la proPO puede ser modificada post-transduccionalmente y transportada hacia la cutícula por un mecanismo aún no conocido, como se demostró recientemente en el gusano de la seda (Asano y Ashida, 2001a,b). Estos descubrimientos podrían significar que la proPO puede llegar a otros tejidos por mecanismos de transporte similares, no obstante hay que tomar en cuenta que los hemocitos también se infiltran en otros tejidos.

La activación de la proPO es un evento regulado por una cascada de proteinasas y factores adicionales. La serin proteinasa terminal (ppA) que lleva a cabo la proteólisis del precursor proPO ha sido nombrada varias veces como la proteína o factor activador(a) de la proPO. Esta ppA ya ha sido purificada y clonada en *Bombix mori* (Sato et al., 1999), *Penaeus leniusculus* (Aspán y Söderhäll, 1991; Wang et al., 2001), *Holotrichia diomphalia* (Lee et al., 1998a,b) y *Manduca sexta* (Jiang et al., 1998, 2003). En este último organismo, la ppA se produce como un zimógeno y se puede activar ante la presencia de elicitores tales como los productos microbianos o componentes adicionales del sistema proPO.

El sitio en el cual la ppA hidroliza la proPO se ha determinado en pocos casos (Cerenius y Söderhäll, 2004). En la mayoría de las proPOs analizadas hasta el

momento, la hidrólisis se da entre los amino ácidos arginina (Arg) y fenilalanina (Phe) que da como resultado la remoción de un péptido con cerca de 50 residuos de aminoácidos. Los aminoácidos alrededor de este sitio de hidrólisis están altamente conservados entre las proPO de artrópodos. No obstante, cabe señalar que en la mayoría de los casos aun queda por esclarecerse si una ppA endógena es la que lleva a cabo la hidrólisis (Cerenius y Söderhäll, 2004).

## **2.4 La Hemocianina en moluscos y artrópodos**

Las proteínas con cobre del tipo 3 contienen un sitio el cual es coordinado por seis histidinas, estas proteínas son biológicamente esenciales y están involucradas en funciones diferentes. Dentro de este grupo de proteínas existe una que cobra especial interés para este estudio: la hemocianina. Las hemocianinas han sido identificadas en todos los subphyla de artrópodos, incluyendo Onychophora, Chelicerata, Crustacea, Myriapoda y Hexapoda (Burmester, 2002; Kusche et al., 2002). Esta molécula se ha identificado en muchos moluscos incluyendo cefalópodos, chitones, algunos bivalvos y la mayoría de los gasterópodos (Keller et al., 1999). Esta proteína es una molécula de elevada masa molecular, es extracelular y lleva a cabo una función muy importante en muchas especies de artrópodos y moluscos: el transporte de oxígeno (Markl y Decker, 1992; van Holde y Miller, 1995; van Holde et al., 2001; Beltramini et al., 2005). La función biológica de esta proteína está basada en el cambio de equilibrio entre el estado de baja



afinidad (Hc-desoxi) y el de alta afinidad (Hc-oxi), que depende de la concentración de oxígeno y de los efectores.

Las hemocianinas no son una clase homogénea de proteínas; la similitud de secuencias de aminoácidos entre hemocianinas de artrópodos y sus contrapartes en moluscos es de alrededor del 10% (Salvato y Beltramini, 1990), el hecho de que no estén significativamente relacionadas probablemente sea porque divergieron en su origen (Burmester, 2001; Lieb et al., 2001; van Holde et al., 2001). Además, la arquitectura molecular, organización, tamaño de las subunidades y contenido de metales son muy diferentes en los dos phyla (van Holde y Miller, 1995).

#### **2.4.1 La hemocianina en artrópodos**

En artrópodos, la hemocianina es parte de una superfamilia de multigenes en la cual se incluyen: (1) las fenoloxidasas (descritas previamente); (2) las hexamerinas de insectos, las cuales no contienen cobre ni se enlazan al oxígeno pero funcionan como proteínas de almacenamiento (Burmester 1999a; Telfer y Kunkel, 1991); (3) Las pseudohemocianinas o criptocianinas de crustáceos, las cuales tampoco tienen sitios de unión al oxígeno y se cree que actúan también como proteínas de almacenamiento (Burmester, 1999b; Terwilliger et al., 1999) y, por último, (4) las hexamerinas receptoras (Burmester y Scheller, 1996).

### 2.4.2 Estructura

Las hemocianinas en artrópodos se construyen en múltiplos de hexámeros u oligohexámeros, cada hexámero a su vez se forma de monómeros o subunidades de aproximadamente 75 kDa (Markl y Decker, 1992; van Holde y Miller, 1995). En cada subunidad el oxígeno es enlazado por dos átomos de cobre ( $\text{Cu}^+$ ) los cuales son coordinados por seis residuos de histidina bien conservados en todas las especies analizadas hasta el momento (ver Fig. 3). Un ejemplo de una estructura que contiene cuatro hexámeros se da en la figura 6.

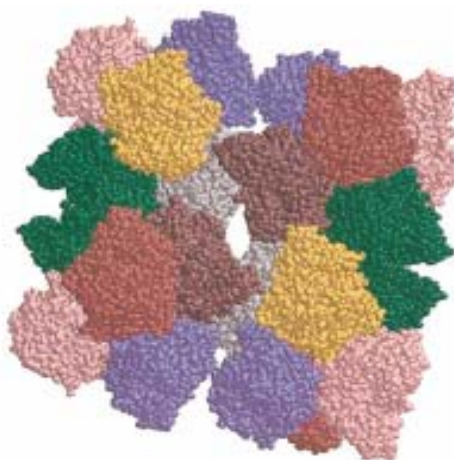


Fig. 6. Estructura representativa de la hemocianina en artrópodos. Se muestra la estructura cuaternaria compuesta por 4 hexámeros (24 subunidades) de la araña *Eurypelma californicum*. Los siete tipos de subunidades son coloreados diferentemente. Tomado de van Holde et al., 2001.

Con base en estudios de diferencias inmunológicas dentro del subphyla Chelicerata, se acepta generalmente que existen siete distintos tipos de subunidades, las cuales se han nombrado desde la a hasta la g (Markl et al., 1983;

Kempter et al., 1985; Markl, 1986). Sin embargo, cabe señalar que Lamy et al., en 1981 disociaron una estructura de 4 X 6 subunidades de escorpión en 8 polipéptidos inmunológicamente distintos. Cada subunidad consta de una cadena polipeptídica que puede contener entre 620 y 650 aminoácidos y estas a su vez se pueden asociar para formar estructuras cuaternarias de hasta 8 X 6 subunidades (Markl y Decker, 1992).

Las subunidades de artrópodos se pliegan en tres dominios, el segundo dominio o dominio central contiene los dos átomos de cobre que están sujetos por seis histidinas, mismas que pertenecen al motivo formado por cuatro  $\alpha$ -hélices antiparalelas (Beltramini et al., 2005). Las estructuras cristalizadas obtenidas por difracción de rayos X de especies como *Panulirus interruptus* (Crustacea) subunidad *a* y *Limulus polyphemus* (Chelicerata) subunidad II han sido resueltas a 3.2 Å y 2.18 Å respectivamente (Volbeda y Hol, 1989; Hazes et al., 1993). Sin embargo, la araña *Eurypelma californicum* (tarántula) es la mejor estudiada, no solo en términos de estructura, sino también en función y evolución (Averdam et al., 2003). En esta especie, el arreglo estructural de 4 x 6 subunidades requiere una asociación estequiométrica de las siete subunidades (4 x *a*, 2 x *b*, 2 x *c*, 4 x *d*, 4 x *e*, 4 x *f*, 4 x *g*), donde cada subunidad ocupa una posición distinta dentro del oligómero (Markl et al., 1982). Es importante señalar que la secuencia de aminoácidos y las secuencias de cDNA de las 7 subunidades de esta hemocianina han sido elucidadas (Voit et al., 2000).

## **2.5 Funciones de la hemocianina**

La hemocianina es una proteína incolora cuando no se encuentra ligada al oxígeno, no obstante, cuando se da la unión, el resultado es una proteína de color azul. La hemocianina es la proteína encargada de proveer de oxígeno a todas las células del organismo. Sin embargo, se ha reportado también que funciona como un almacenador de proteínas, como un osmolito (Paul y Pirow, 1998), como transportadora de ecdisona (Jaenicke et al., 1999a), como precursor de péptidos antifúngicos (Destoumieux-Garzon et al., 2001) y que puede actuar como fenoloxidasas. De este último hecho, se han dado explicaciones a detalle en algunos artrópodos (Decker y Rimke, 1998; Adachi et al., 2001).

## **2.6 Actividad de fenoloxidasas en hemocianinas**

Desde épocas no muy recientes se tenía indicio que la hemocianina podía tener actividad de fenoloxidasas (Bhagvat y Richter, 1938; Nakahara et al., 1983; Salvato et al., 1983; Beltramini et al., 1990). Sin embargo, hoy no solo estamos seguros que estas proteínas multiméricas pueden llevar a cabo dicho proceso, sino que empezamos a indagar sobre su mecanismo de acción; hoy sabemos que la hemocianina es activada por proteólisis o por un desdoblamiento parcial de la estructura en respuesta a tratamientos con sales o SDS. Lo anterior hace que el sitio activo se modifique permitiendo la entrada a sustratos más grandes que el oxígeno, como lo son los sustratos fenólicos (Decker y Terwilliger, 2000).

Como se mencionó previamente, la proPO puede ser activada mediante una proteólisis limitada por enzimas del tipo serino y dependiendo del taxa al cual pertenece la proteína, diferentes partes de la cadena polipeptídica pueden ser atacadas; por ejemplo, en el caso de de las proPOs de artrópodos, la hidrólisis se da por el lado amino terminal de la cadena polipeptídica mientras que en plantas, frutas u hongos el corte se da por el lado carboxilo terminal (Decker y Tuckzec, 2000). En analogía con esto, la hemocianina de *Eurypelma californicum* (la más estudiada hasta el momento), también puede ser activada *in vitro* mediante una proteólisis en el extremo amino (Decker y Rimke, 1998).

## **2.7 Mecanismo enzimático de activación de la Hc**

Una subunidad de la hemocianina en artrópodos posee tres dominios de tamaño similar entre ellos, sin embargo, tienen diferentes motivos. El dominio central o dominio II contiene el sitio activo que encierra los dos átomos de cobre que a su vez son coordinados por seis histidinas. Cuando esta subunidad es expuesta ante una enzima proteolítica del tipo serino, el dominio I es removido (Fig. 7). En este dominio se encuentra el extremo amino terminal (Decker y Tuckzec, 2000).

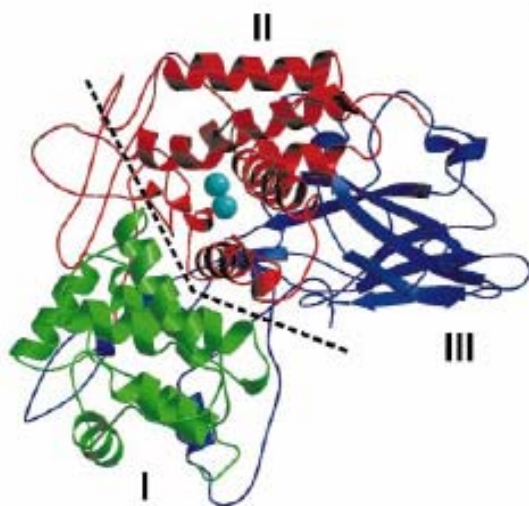


Fig. 7. Mecanismo de activación hipotético en hemocianinas de artrópodos. La hemocianina con sus tres dominios (I: verde; II: rojo; III azul) es hidrolizada por una proteólisis limitada utilizando tripsina o quimotripsina. Cuando el dominio que posee el amino terminal (verde) es removido a lo largo de la línea punteada, se crea un espacio abierto que expone el sitio activo. El dominio II (rojo) contiene los dos átomos de cobre (azul). Tomado de Decker y Tuzcek, 2000.

Después de la hidrólisis del péptido que contiene el amino terminal (dominio I) otro hecho crucial para la activación de la hemocianina es llevado a cabo, el cual consiste en salida o remoción del residuo de fenilalanina situado en la posición 49, el cual es altamente conservado en artrópodos y se encuentra a 3 o 4 Å del sitio activo (Magnus et al., 1994; Cuff et al., 1998). Una vez que sucede este evento el sitio activo acepta la entrada de sustratos no gaseosos. Hay evidencias de que la fenilalanina es el análogo no reactivo que está en el sitio que posteriormente ocuparan los sustratos fenólicos (Decker y Rimke, 1998).

Por otro lado, los residuos de aminoácidos que rodean cada átomo de cobre son altamente conservados. Entre varias hemocianinas de artrópodos se ha

encontrado esta identidad entre el CuA y el CuB; en cada átomo de cobre, dos de las tres histidinas que lo coordinan se localizan en una misma alfa hélice, mientras que la tercera pertenece a otra alfa-hélice (Fig. 8) (Decker y Tuczek, 2000).

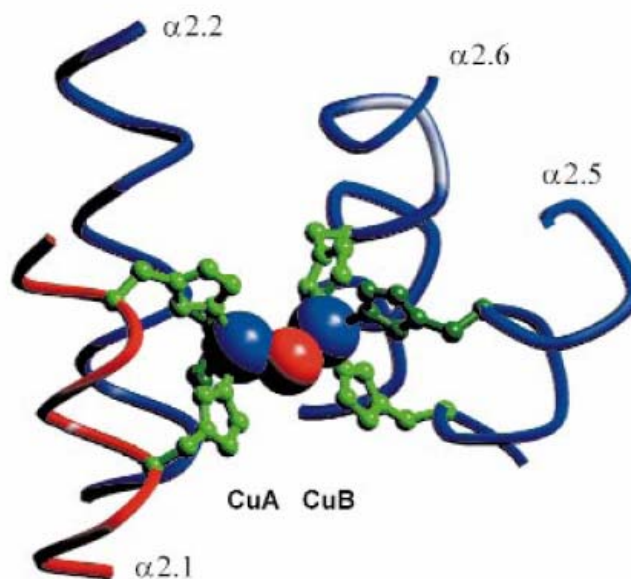


Fig. 8. Sitio activo de la hemocianina de *Limulus polyphemus*. La  $\alpha$ -hélice 2.1 contiene dos histidinas y la  $\alpha$ -hélice 2.2 contiene otra histidina, entre las tres coordinan el CuA. De manera similar, la  $\alpha$ -hélice 2.5 contiene dos histidinas y la  $\alpha$ -hélice 2.6 la otra, estas coordinan el CuB. Tomado de Decker y Tuczek, 2000.

### 3. HIPÓTESIS

Debido a la similitud entre los sitios activos de la PO y la Hc, esta última puede comportarse como PO después de ser tratada enzimática o químicamente. Si la Hc de *Penaeus vannamei* se puede convertir en HcPO mediante factores enzimáticos y/o endógenos, entonces se convierte en un fuerte candidato para regir el proceso de melanización post mortem. El conocimiento de las propiedades bioquímicas y catalíticas de la HcPO debe apoyar la participación de la Hc en dicho fenómeno.



## 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a sus características nutricionales, los recursos marinos tienen gran importancia como fuente de alimentos. Este hecho cobra gran relevancia en México debido a que el país cuenta con una gran extensión costera: alrededor de 11,500 Kilómetros y una gran zona económica exclusiva: tres millones de kilómetros cuadrados. Geográficamente la posición de los mares mexicanos, favorece una gran diversidad de especies entre las que destaca el camarón cuya extracción en los últimos años, junto con otras especies como el atún, la sardina y el calamar, encabeza la lista de capturas (CONAPESCA, 2005).

El camarón es un recurso muy consumido por la población mexicana e incluso muy apreciado por países como Estados Unidos, Japón, Corea y la Unión Europea, por lo que su comercialización reditúa en importantes divisas para la economía mexicana. Sin embargo, después de su muerte, estos crustáceos son propensos a desarrollar un tipo de manchas negras en su cuerpo, las cuales denotan deterioro y ocasionan que los consumidores no acepten el producto, con lo que el valor de mercado de este producto se reduce.

Se ha reconocido que el responsable de este fenómeno es la enzima fenoloxidasas (Kim et al., 2000). No obstante, creemos que existe otra proteína, la hemocianina, que podría estar involucrada en el proceso, e incluso, ser la principal proteína. Lo

anterior debido a que se ha observado que en otras especies la hemocianina despliega similares propiedades catalíticas que la misma fenoloxidasa, además, la hemocianina se encuentra en mayor concentración y es mucho más estable al almacenamiento por debajo de los 4°C que la fenoloxidasa (Adachi et al., 2001), condiciones a la cuales se sigue observando la generación de melanina. Por lo tanto, un estudio como el que aquí se presenta, que demuestre la participación de la hemocianina en el proceso de melanosis post mortem en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*), así como la descripción de sus propiedades catalíticas, acompañado de otros mas donde revelen su estructura y den más evidencias de su carácter enzimático, permitirán utilizar a la hemocianina como modelo de estudio para entender el mecanismo enzimático de la fenoloxidasa y así, a mediano o a largo plazo, se estará en posibilidad de manipular el fenómeno de melanosis.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

- Purificar la hemocianina de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), estudiar los mecanismos de conversión en HcPO, así como caracterizar sus propiedades catalíticas

### 5.2 Objetivos Particulares

- Demostrar la conversión de hemocianina de *Penaeus vannamei* a HcPO utilizando tanto agentes químicos como enzimas de tipo serino
- Evaluar la estabilidad de esta proteína almacenada a -20 °C
- Probar si las enzimas endógenas de los hemocitos convierten la Hc en HcPO
- Comparar el efecto de los métodos de activación en la hemociana
- Probar si la hemocianina tiene actividad de mono y/o difenoloxidasas
- Determinar los parámetros cinéticos:  $K_m$  y  $V_{max}$
- Medir la termoestabilidad, pH y temperatura óptimas de la HcPO

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Animales

Camarón blanco (*Penaeus vannamei*) cuyo peso oscilaba entre 20-25 g fueron aclimatados en tanques de 200 l. El agua contenía en promedio 5-6 mg por litro de oxígeno y la temperatura promedio fue de 26 °C.

### 6.2 Químicos

Tirosina, fenol, tiramina hidroclicorada, L-DOPA, tripsina bovina, quimotripsina bovina, trizma-base, MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> y coomassie brilliant blue R-250 fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.). PMSF y los estándares de proteína se obtuvieron de Amersham Biosciences (Reino Unido).

### 6.3 Aislamiento y purificación

La purificación se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Adachi et al., 2001 con ligeras modificaciones. Aproximadamente 0.5 ml de hemolinfa de camarón blanco fue extraído con una jeringa de 3 ml que contenía 0.5 ml de solución anticoagulante (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA y 10 mM de HEPES, pH 7.3), luego se enfrió a 4 °C. Después de centrifugar a 560 X g, 4 °C

por 3 minutos (Hernández-López et al., 1996), los hemocitos fueron removidos y el plasma se sometió a una ultracentrifugación a 200, 000 X *g*, 4 °C, por 4 h. El sedimento fue inyectado en una columna cromatográfica de filtración en gel usando como matriz sefarosa 6B (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri) (2 cm X 100 cm), la cual fue equilibrada con buffer Tris·HCl 15 mM (pH 7.8) que contenía CaCl<sub>2</sub> 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. La hemocianina eluida fue utilizada para su caracterización. Se detectó mediante la medición de la absorbancia a 340 nm.

#### **6.4 Purificación de los agregados**

La hemocianina obtenida en la etapa cromatográfica fue sometida a una electroforesis nativa (PAGE 4.5 %) y los dos tipos de bandas registradas, que representan agregados estructurales, fueron cortadas horizontalmente en 0.7 cm<sup>2</sup> aproximadamente, posteriormente, la proteína fue obtenida utilizando un electroelutor marca Biorad (Mini Trans-Blot) a 10 mAmp. por 5 h. Los electroeluidos representaron los arreglos hexaméricos y dodecaméricos.

#### **6.5 Ensayo para medir la actividad de PO de la Hc**

La actividad de PO de la Hc fue medida espectrofotométricamente de acuerdo a Adachi et al., 1999; con algunas modificaciones utilizando L-DOPA como sustrato. El ensayo se realizó en microplaca y fue llevado a cabo de la siguiente manera: se mezclaron 50 µl de Hc (300 µg) con 250 µl de buffer Tris·HCl 15 mM (pH 7.8)

que contenía  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y SDS 0.1 %, este último reactivo fue adicionado para convertir la Hc en HcPO. La mezcla fue incubada a 29 °C por 10 minutos, posteriormente se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de L-DOPA 10 mM en agua para iniciar la reacción. Una unidad de enzima fue definida como el cambio en absorbancia de 0.001/min a 490 nm.

### **6.6 Efecto de los activadores en la Hc**

Los activadores químicos se usaron en las siguientes concentraciones: isopropanol 3.33 M, acetona 3.44 M, metanol 6.24 M, y SDS 2.77 mM en un volumen final de 250  $\mu\text{l}$  de buffer Tris·HCl 15 mM (pH 7.8) que contenía  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y 300  $\mu\text{g}$  de Hc. Por su parte, los activadores enzimáticos se añadieron en la siguiente cantidad: tripsina 100  $\mu\text{g}$  y quimotripsina 100  $\mu\text{g}$  en 250  $\mu\text{l}$  de buffer Tris·HCl 15 mM (pH 7.8) que contenía  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y 300  $\mu\text{g}$  de Hc. Después de un período de incubación de 10 min a 29 °C se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de L-DOPA 10 mM en agua para iniciar la reacción.

### **6.7 Efecto de los sustratos**

Un sustrato difenólico y dos mofenólicos fueron probados. El ensayo fue similar al descrito en el apartado 6.5. Los sustratos fueron: tirosina 5 mM, tiramina hidroclicorada 5 mM y L-DOPA 5 mM.

## **6.8 Cuantificación de proteína**

La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina bovina como proteína estándar.

## **6.9 SDS PAGE y PAGE Nativa**

Las electroforesis en condiciones reductoras desnaturizantes (SDS-PAGE) fueron llevadas a cabo de acuerdo con Laemmli (1970), utilizando un gel al 7.5 %. Se utilizaron marcadores de amplio peso molecular de Amersham Biosciences (Reino Unido) (miosina (220 000), alfa-2-macroglobulina (170 000), beta-galactosidasa (116 000), trasferina (76 000) y glutamina deshidrogenasa (53 000)). Para la electroforesis en condiciones nativas (PAGE) se utilizó un gel al 4.5 % y se llevó a cabo de acuerdo a Davis (1964). Se utilizaron dos métodos de tinción: la técnica de tinción con plata y con coomassie brilliant blue R-250.

## **6.10 Efecto del pH en la actividad de PO de la Hc**

El ensayo de actividad a diversos pH fue similar al descrito previamente en el apartado 6.5. El buffer varió para cada ensayo y se prepararon bajo las siguientes condiciones: pH 2.5 y 3.2, 10 mM Glicina·HCl y SDS 0.2 %; pH 3.5, 10 mM citrato·NaOH y SDS 0.2 %; pH 4.3, 10 mM citrato·NaOH y SDS 0.2 %; pH 4.9, 10 mM citrato·NaOH y SDS 0.2 %; pH 5.7, 10 mM citrato·NaOH y SDS 0.2 %; pH 7.0,

10 mM HEPES·NaOH y SDS 0.2 %; pH 7.6, 10 mM HEPES-NaOH y SDS 0.2 %; pH 8.3, 10 mM Tris·HCl y SDS 0.2 % y pH 8.6, 10 mM Tris·HCl y SDS 0.2 %.

### **6.11 Efecto de la temperatura en la actividad de PO de la Hc**

50  $\mu$ l de Hc (300  $\mu$ g) se incubaron en 200  $\mu$ l de buffer Tris-HCl 15 mM pH 7.8 que contenía  $\text{CaCl}_2$  5mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y SDS 0.1 % por 10 minutos a 29 °C. Después la mezcla se sometió a varias temperaturas (desde 15 hasta 70 °C) y se adicionó 50  $\mu$ l de L-DOPA 10 mM (en agua). Se registró el cambio de absorbancia a 490 nm durante cinco minutos.

### **6.12 Termoestabilidad**

El ensayo de termoestabilidad está basado en el descrito previamente. La proteína fue incubada a diferentes tiempos (desde 0 hasta 50 minutos) en varias temperaturas (35, 50, 60 y 70 °C). Se tomaron muestras cada período y se cuantificó la actividad a 29 °C mediante el registro de la absorbancia a 490 nm.

### **6.13 Parámetros cinéticos**

Se incubaron 200  $\mu$ l (4 mg) de hemocianina con 600  $\mu$ l de buffer Tris·HCl 15 mM pH 7.8 que contenía  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\text{CaCl}_2$  5mM y SDS 0.1 % durante 10 minutos a 29°C. La actividad se evaluó adicionando 200  $\mu$ l de diferente concentración (desde



0.1 a 10 mM) de sustrato L-DOPA ajustándose el volumen a 1 ml. La actividad enzimática se cuantificó por el cambio de absorbancia por minuto a 490 nm, en un espectrofotómetro Perkin Elmer (Uberlingen, Alemania). La absorbancia se registró por espacio de 2 minutos. Los resultados en la absorbancia representaron la velocidad inicial los cuales se graficaron contra la concentración de sustrato. Posteriormente se graficaron los inversos de las concentraciones de sustrato contra los inversos de las velocidades de reacción. De acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten y ajustando al modelo gráfico de Lineweaver-Burk, la  $K_m$  y la  $V_{max}$  fueron calculadas.

$$y = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} x$$

#### **6.14 Preparación del lisado de hemocitos**

Se utilizó el pellet celular descartado en la obtención del plasma. Se lavó tres veces con buffer Tris·HCl 15 mM (pH 7.8) que contenía  $\text{CaCl}_2$  5 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM. Posteriormente el mismo pellet fue sonificado por 25 minutos y se centrifugó a 12, 000 X g por 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante obtenido es el lisado de hemocitos (HLS).

### **6.15 Efecto del contenido de hemocitos en la conversión de Hc en HcPO**

El ensayo se realizó utilizando una ligera modificación del método empleado por Horowitz y Shen (1952): 350 µg (50 µl) de Hc y 200 µl de solución HLS (200 µg de proteína) disuelto en Tris·HCl 15 mM (pH 7.8) que contenía CaCl<sub>2</sub> 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM se incubaron a 29 °C por 10 min. Después se añadieron 50 µl de L-DOPA (10 mM en agua) y la absorbancia se registró a 490 nm.

### **6.16 Efecto del contenido de la glándula digestiva en la conversión Hc**

Se recuperó la glándula digestiva de varios camarones (*Penaeus vannamei*), se extrajo en Tris·HCl 15 mM (pH 7.8) que contenía CaCl<sub>2</sub> 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM y se hizo un pull enzimático, este se utilizó como activador de la Hc. El ensayo se realizó de la siguiente manera: se mezclaron 400 µg (50 µl) de proteína de plasma, 200 µl de solución que contenía las enzimas procedentes de la glándula digestiva (400 µg de proteína) y se incubaron a 29 °C por 10 min. Después se añadieron 50 µl de L-DOPA 10 mM (en agua) y la absorbancia se monitoreó a 490 nm.

### **6.17 Análisis estadísticos**

Para determinar diferencias significativas en los experimentos que así lo requirieran se recurrió a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por

un análisis de rangos múltiples de Tukey utilizando el software *Statistica 7.1*. Las diferencias estadísticas se aceptaron con una  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Purificación de la Hc

En la cromatografía de filtración en gel se obtuvo un pico mayor en la fracción 35 (Fig. 9). Se monitoreó la absorbancia a 280 nm y a 340 nm. Esta última es específica para la unión del cobre con el oxígeno. La proteína purificada muestra dos bandas muy cercanas entre sí en SDS-PAGE, sus masas moleculares aproximadas son de 75 y 82 kDa (Fig. 10, letra C), estas bandas corresponden a las subunidades de la hemocianina. Cabe señalar que el número total de subunidades no fue descrito.

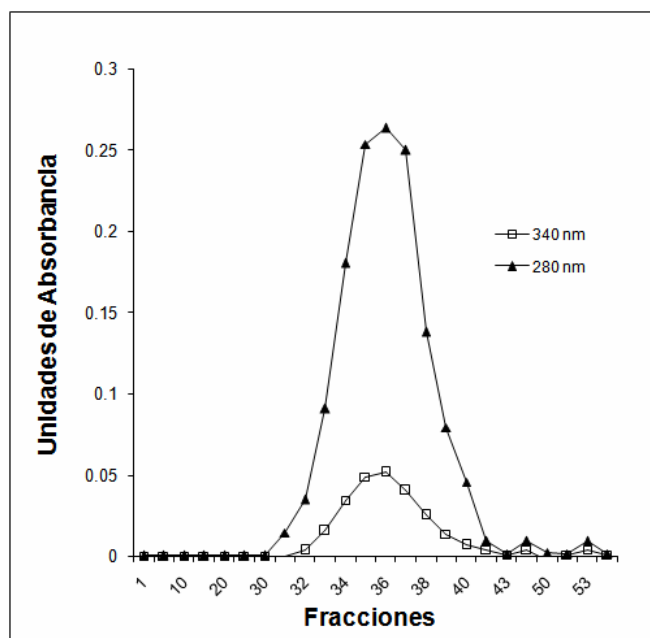


Fig. 9. Purificación de la hemocianina mediante filtración en gel. 5 mg del ultracentrifugado fueron inyectados en la columna empacada con Sefarosa 6B. La proteína fue eluida con Tris-HCl 15 mM

(pH 7.8), que contenía  $\text{CaCl}_2$  5 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM, se utilizó un flujo lineal de 14 cm/h y se colectaron fracciones de 3 ml.

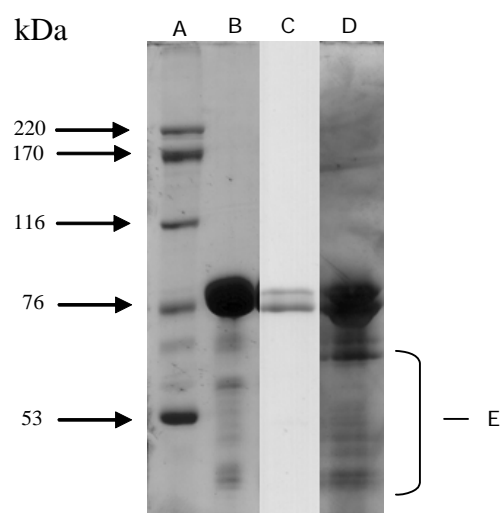


Fig. 10. Análisis SDS-PAGE de la hemocianina purificada de *Penaeus vannamei*. La proteína fue analizada utilizando un gel al 7.5% bajo condiciones reductoras y desnaturalizantes. Línea A: 3 µl de marcadores de elevado peso molecular, línea B: 15 µg de Hc, línea C: 2 µg de Hc, línea D: 5 µg de Hc y línea E: productos de degradación de la hemocianina. Línea A, B, y C fueron teñidas con Coomassie Brilliant Blue R-250, línea D fue teñida con plata.

## 7.2 Conversión de Hc en HcPO

La hemocianina nativa por sí misma no tiene actividad de fenoloxidasa, tal como sucede con la proPO de los hemocitos, no obstante, como se muestra en la figura 11, el tratamiento con SDS convierte la hemocianina en HcPO. Asimismo, existen otras moléculas que llevan a cabo esta activación, sin embargo todos ellos, aún los activadores enzimáticos, son menos efectivos que el propio SDS (Fig. 12).

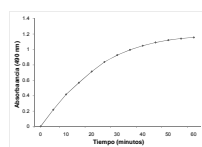
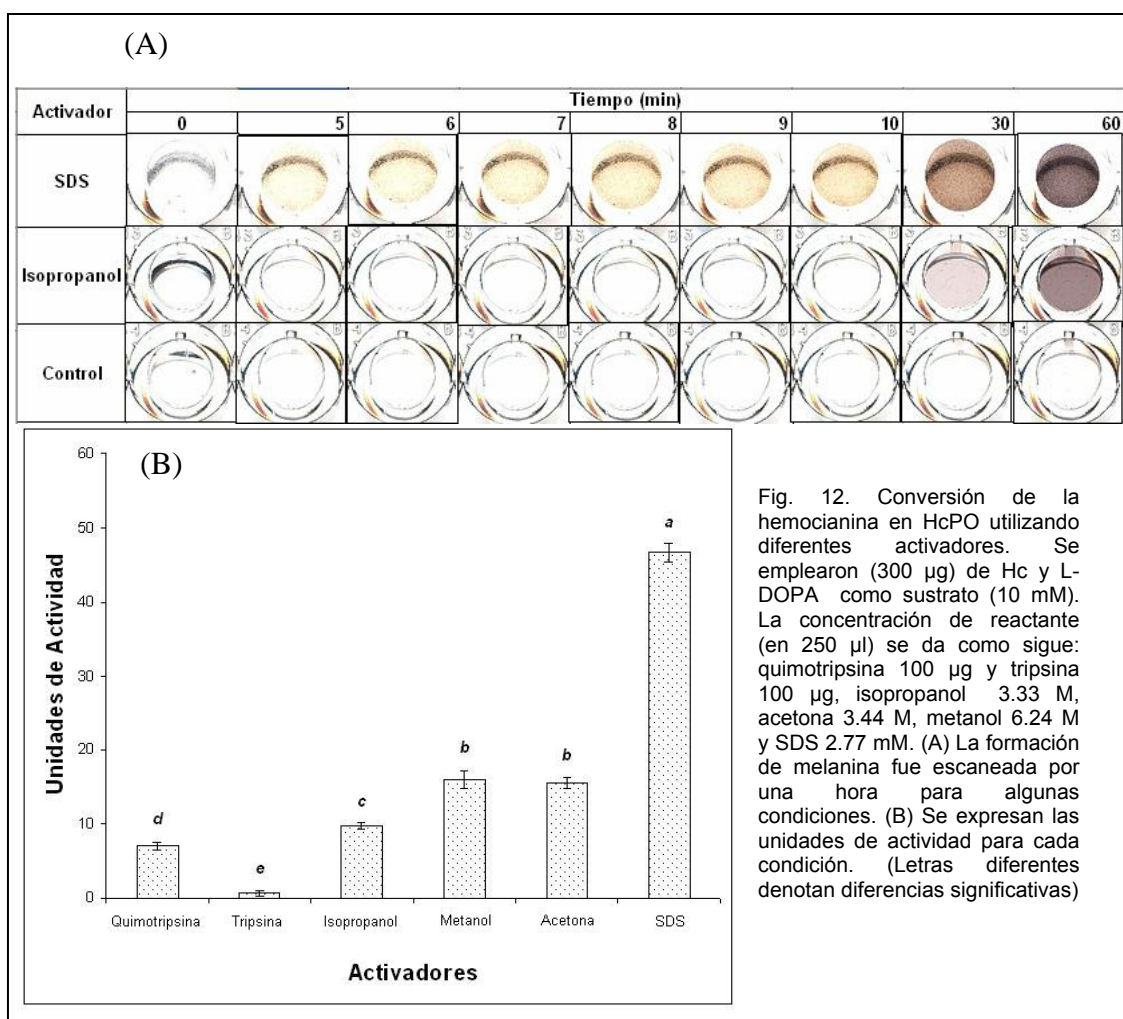


Fig.11. Cinética de la formación de melanina. La hemocianina purificada (300  $\mu\text{g}$ ) se incubó en 200  $\mu\text{l}$  de buffer Tris-HCl 15 mM (pH 7.8) que contenía  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y SDS 0.1 %. Posteriormente se añadió L-DOPA (10 mM en agua) como sustrato.



### 7.3 Efecto de sustratos en la actividad de HcPO

La L-tirosina ha sido reconocida como el sustrato natural empleado en el proceso de melanosis debido a su presencia en los camarones (Simpson et al., 1998). Por su parte, la L-tiramina a pesar que no se encuentra como un constituyente fenólico “natural” en el camarón, esta se puede generar en condiciones post mortem debido a la actividad bacteriana sobre la L-tirosina (Veciana-Nogues et al., 1989; Santos-Buelga et al., 1986). La formación de dopacromo por la HcPO se registró utilizando un sustrato difenólico, L-DOPA; y dos monofenólicos, L-tirosina y tiramina hidroclicorada. En la figura 13 se observa que la actividad de monofenoloxidasas de la HcPO es menor comparada con la actividad de difenoloxidasas. Con los sustratos monofenólicos se observa una larga fase de demora tal como se ha observado con las tirosinasas (Fig. 14), hecho que aún no está bien entendido (Sánchez-Ferrer et al., 1995; Solmon et al., 1996). Aunque la HcPO genera dopacromo más rápido cuando se utiliza L-DOPA como sustrato, la melanina es finalmente generada con cada sustrato.

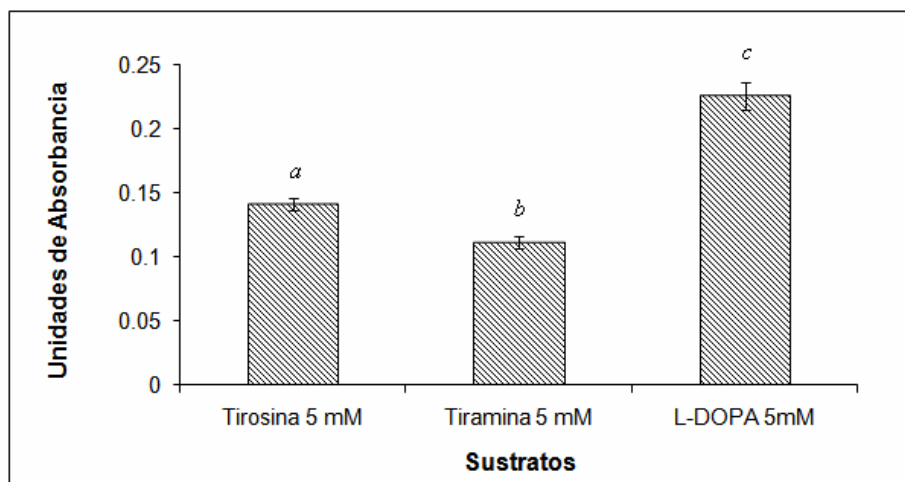


Fig. 13. Medición de la generación de dopacromo por la HcPO ante diferentes sustratos. La Hc pura (300  $\mu$ g) se mezcló con cada sustrato y la absorbancia se registró a los diez minutos de iniciada la aparición de producto. El buffer de activación consistió en 200  $\mu$ l de buffer Tris-HCl 15 mM (pH 7.8) que contenía  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y SDS 0.1 %. (Letras diferentes denotan diferencias significativas).

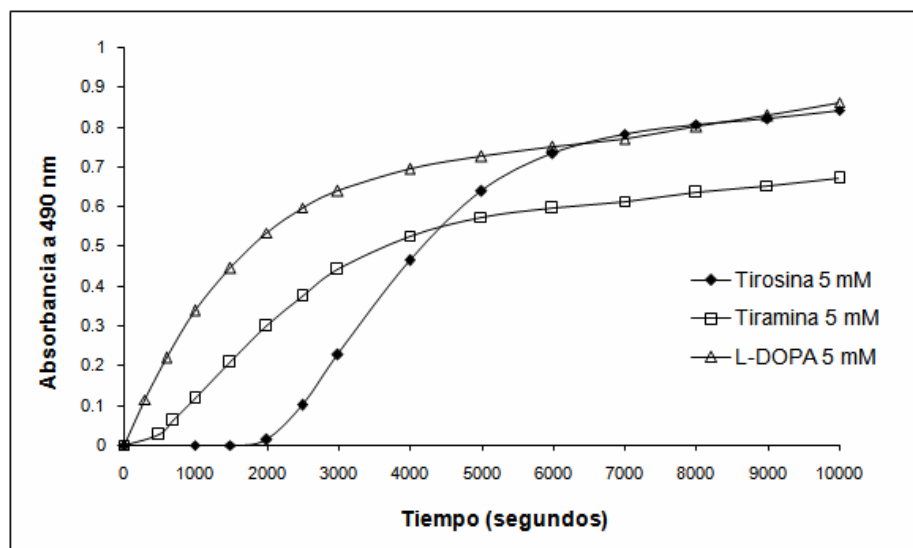


Fig. 14. Cinética de formación de producto para diferentes sustratos. La Hc pura (450  $\mu$ g) se mezcló con cada sustrato y la actividad de fenoloxidasa fue monitoreada. El buffer de activación consistió en 200  $\mu$ l de Tris-HCl 15 mM (pH 7.8) que contenía  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y SDS 0.1 %.



#### 7. 4 Efecto del HLS en la activación de Hc

En condiciones post mortem los tejidos se lisan y las células liberan su contenido. Los hemocitos contienen enzimas proteolíticas del tipo serino (Adachi et al., 2003). Con base en este hecho se investigó el efecto del contenido de los hemocitos en la conversión de Hc. Como se puede observar en la figura 15, el contenido interno de los hemocitos puede convertir la Hc en HcPO, hecho relevante pues simula lo que puede suceder en condiciones post mortem y da una evidencia sobre la participación de la Hc en el proceso de melanosis.

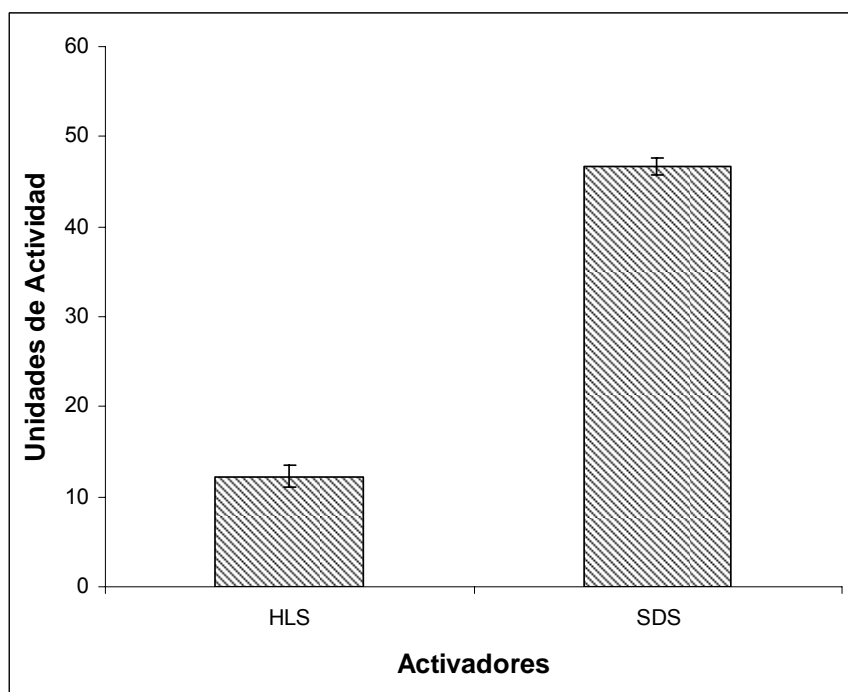


Fig. 15. Efecto del lisado de hemocitos en la conversión de Hc. La Hc se convirtió en HcPO con HLS y SDS. La concentración del activador en el buffer se da como sigue: para HLS, 200  $\mu$ g de proteína; y para SDS, 0.1 %.

## 7.5 Efecto de la GD en la conversión de Hc

La glándula digestiva de *Penaeus vannamei* contiene enzimas involucradas en la hidrólisis de proteínas. Entre ellas, enzimas proteolíticas del tipo serino. Basados en lo anterior se llevó a cabo un experimento para observar si la hemocianina presente en el plasma se puede activar por las enzimas endógenas de este órgano. En la figura 16 se evidencia que la hemocianina puede ser convertida en HcPO.

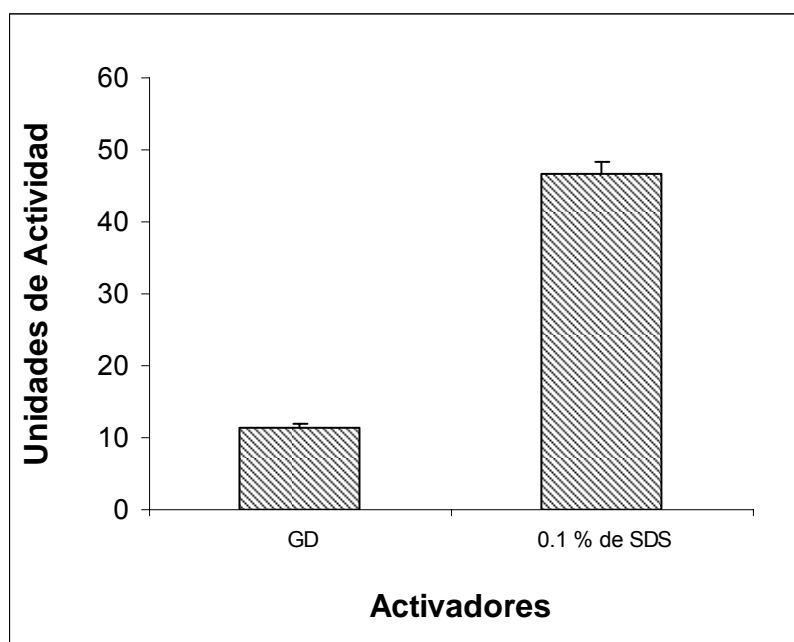


Fig. 16. Efecto de la glándula digestiva en la conversión de Hc. La Hc (en plasma) se convirtió en HcPO con enzimas de la GD y con SDS. La concentración del activador en el buffer se da como sigue: para GD, 400 µg de proteína; y para SDS, 0.1 %.

## 7.6 Purificación de los agregados de la Hc

La hemocianina de crustáceos existe como múltiplos de hexámeros (Zlateva et al., 1996). Dos agregados (probablemente un arreglo hexamérico y un dodecamérico de acuerdo con Adachi et al., 2001) fueron purificados mediante el empleo de electroforesis preparativa y se investigó la actividad de fenoloxidasa. La electroforesis nativa mostró dos bandas características (Fig. 17): línea 1 y 2, descritas como 12-mer y 6-mer respectivamente. Adachi et al., 2001 demuestran en zimograma que las bandas de alta movilidad no poseen actividad enzimática mientras que si existe actividad enzimática en las bandas con baja movilidad. En el presente trabajo se purificaron estas bandas bajo las condiciones descritas en “Materiales y Métodos” y solo el agregado de mayor peso molecular (12-mer) tuvo actividad de *o*-difenoloxidasa utilizando SDS como activador. Estos agregados fueron evaluados en SDS-PAGE y ambos mostraron un patrón similar (Fig. 17, línea E y F).

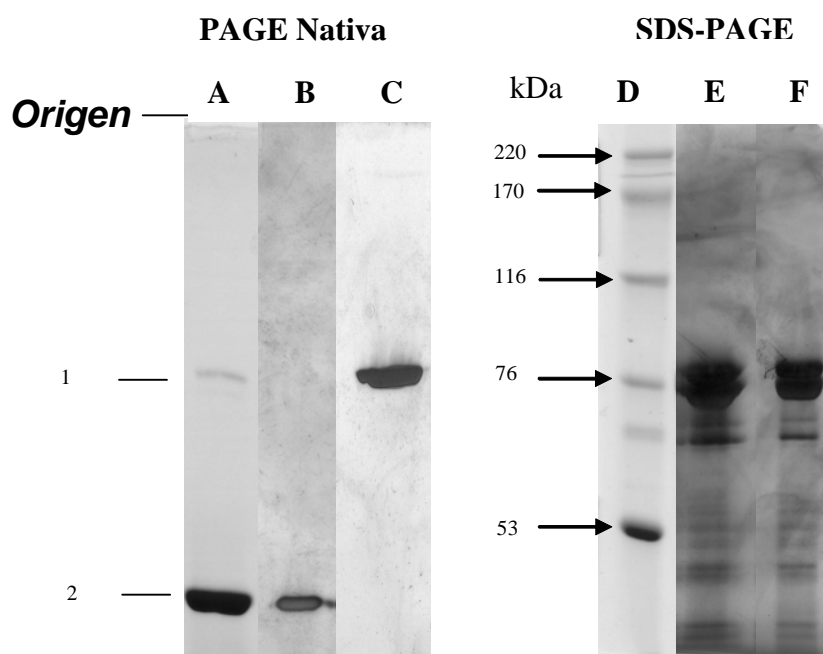


Fig. 17. Análisis PAGE nativo y SDS PAGE de la hemocianina y los agregados. La hemocianina nativa (línea A: 10  $\mu$ g), 6-Mer (línea B: 2  $\mu$ g) y 12-Mer (línea C: 5  $\mu$ g) fueron aplicados a un PAGE nativo, utilizando un gel al 4.5 % y se tiñó con Coomassie Brilliant Blue R-250 (línea A) y plata (línea B y C). 6-Mer (línea E: 5  $\mu$ g) y 12-Mer (línea F: 5  $\mu$ g) fueron aplicados a un SDS-PAGE, utilizando un gel al 7.5 % y fueron teñidos con plata. Línea D está representada por los marcadores de alto peso molecular.

### 7.7 Efecto del SDS en la conversión de Hc

Se evaluó el efecto que tiene la concentración de SDS sobre la conversión de hemocianina en HcPO (Fig. 18). La curva pareciera sigmoïdal, sin embargo, la concentración de SDS en el eje del las X varía en órdenes de magnitud para algunos casos, de tal manera que una gráfica X contra Y no genera una curva de este tipo. Por otro lado, a concentraciones muy pequeñas (de 0.03 a 0.55 mM) se logra activar a la hemocianina ligeramente. No obstante, se observa que cerca del

2.22 mM de SDS es suficiente para activar 300  $\mu\text{g}$  de Hc, el aumento en la concentración de SDS no genera mayor conversión, hecho que se ve reflejado en similar actividad enzimática.

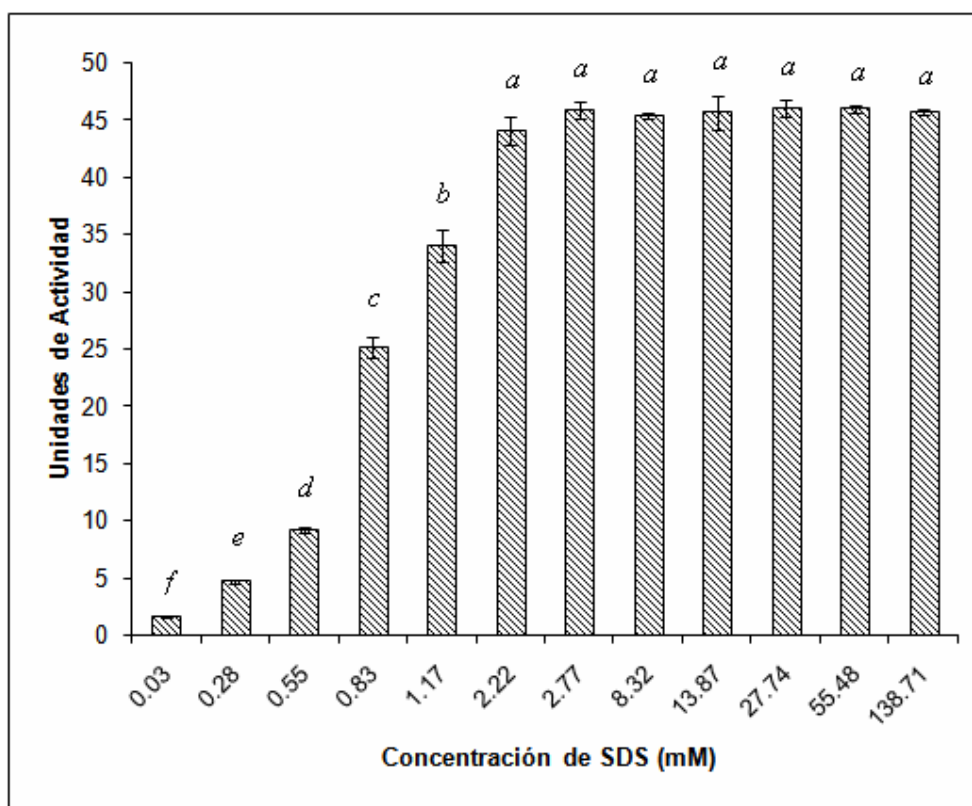


Fig. 18. Efecto del SDS sobre la conversión de Hc. La hemocianina purificada (300  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{l}$ ) se incubó en 200  $\mu\text{l}$  de buffer Tris-HCl 15 mM a pH 7.8, que contenía  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y SDS en las concentraciones respectivas (en un volumen de 250  $\mu\text{l}$ ). Posteriormente se añadió L-DOPA (10 mM en agua, 50  $\mu\text{l}$ ) como sustrato y se registró la absorbancia a 490 nm. (Letras diferentes denotan diferencias significativas).

## 7.8 Propiedades bioquímicas

### 7.8.1 Estabilidad bajo congelamiento

Se examinó la estabilidad de la hemocianina bajo condiciones de almacenamiento (-20 °C), esto, debido a que el desarrollo de melanina procede en camarones que han sido descongelados. Como se muestra en la figura 19, la hemocianina mantiene su actividad enzimática después de ser almacenada por tres meses. Por otro lado, la profenoloxidasas y la fenoloxidasas de *Penaeus japonicus* pierden casi por completo su actividad después de una semana bajo las mismas condiciones de almacenamiento (Adachi et al., 2001).

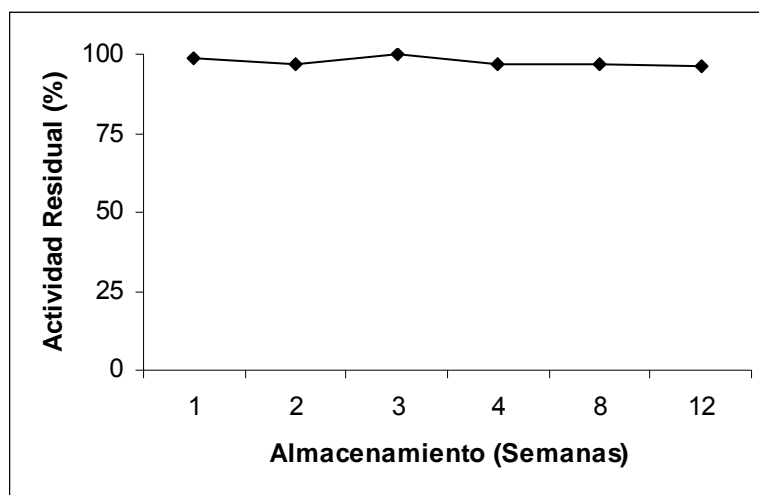


Fig. 19. Estabilidad de la Hc bajo congelamiento. La Hc se congeló a -20°C, después de descongelar la muestra a 4°C se registró la actividad. Los símbolos indican la media de los triplicados (coeficiente de variación menor al 5 %).

### 7.8.2 Efecto de la temperatura en la actividad de HcPO

La temperatura óptima de la HcPO de *Penaeus vannamei* fue alrededor de los 45 °C (Fig. 20). La HcPO de *Penaeus japonicus* tiene una temperatura óptima alrededor de los 40 °C (Adachi et al., 2001), por su parte, fenoloxidasas de otros crustáceos han demostrado temperaturas óptimas entre los 35 y 50 °C.

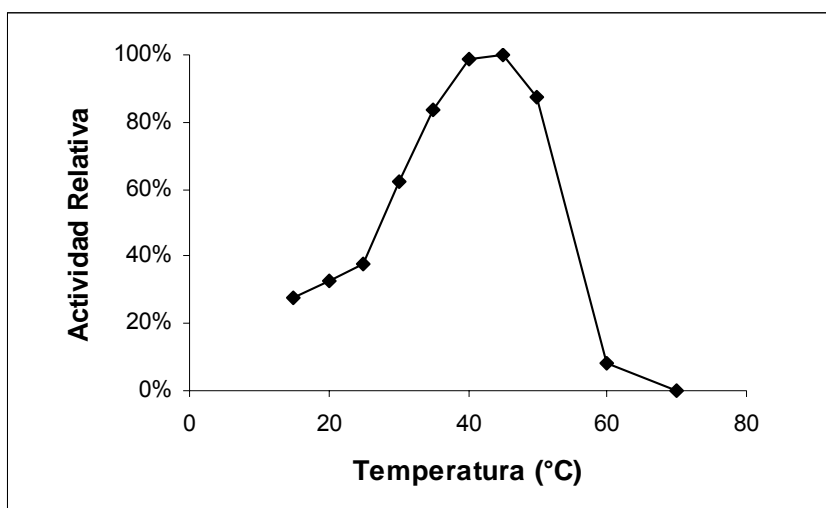


Fig. 20. Efecto de la temperatura en la actividad de HcPO. Previo al ensayo, 300 µg (50 µl) de hemocianina fueron incubados en 200 µl de buffer Tris-HCl 15 mM (pH 7.8) a 29 °C por 10 minutos, que contenía CaCl<sub>2</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y SDS 0.1 %. Se utilizó como sustrato L-DOPA (10 mM, 50 µl).

### 7.8.3 Termoestabilidad

La HcPO es una proteína estable a 35 °C (Fig. 21). Arriba de esta temperatura la proteína se vuelve inestable con el tiempo, registrándose una pérdida de la mitad de su actividad a los veinte minutos de haber sido incubada a 50 grados

centígrados. A temperaturas superiores (60 °C) la proteína pierde por completo su actividad en pocos minutos.

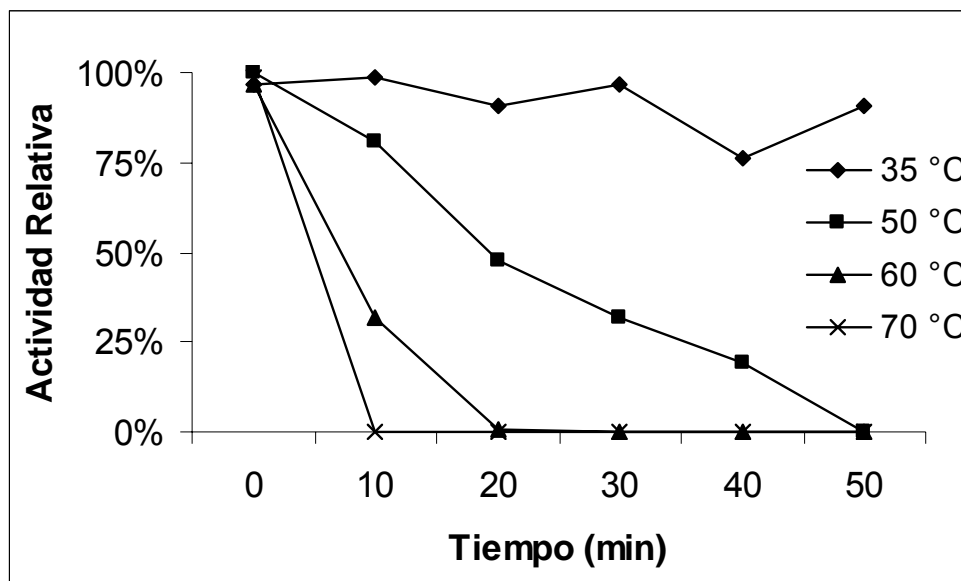


Fig. 21. Medición de la termoestabilidad de la Hc con el transcurso del tiempo. Se evaluaron cuatro temperaturas. Para una descripción más detallada ver la sección de Materiales y Métodos.

#### 7.8.4 Efecto del pH

El pH juega un papel importante en las reacciones enzimáticas. La oxidación del L-DOPA por la HcPO en la figura 22 indica que la reacción ocurre a máxima velocidad entre pH 7.3 y 8.6, con pH óptimo para la HcPO de 7.6. Es importante destacar que esta enzima no exhibe actividad bajo las condiciones ácidas evaluadas.



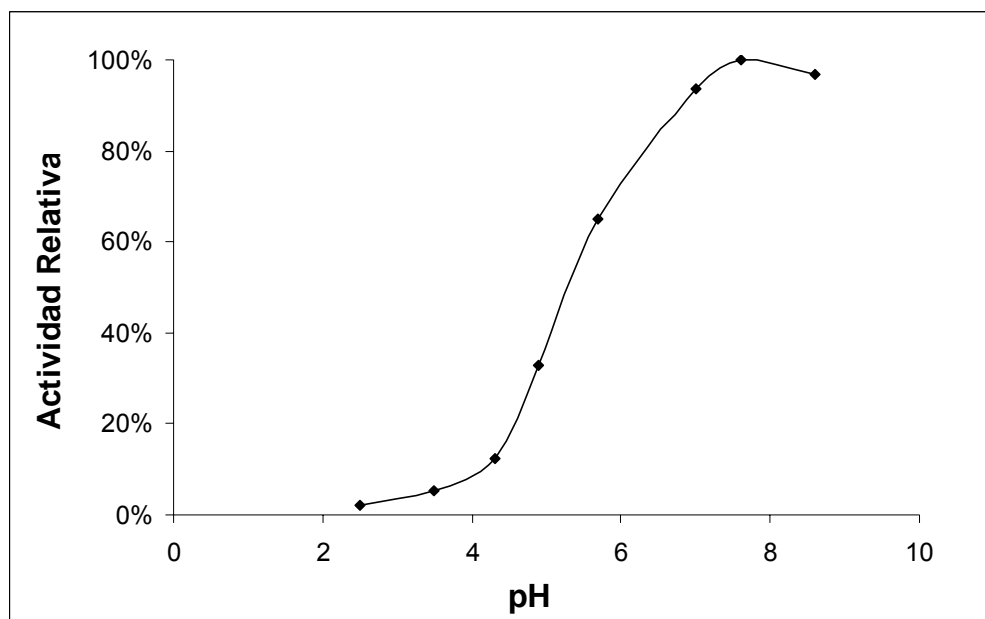


Fig. 22. Efecto del pH sobre la actividad de la HcPO. Los datos utilizados para elaborar esta curva son resultados de triplicados de dos experimentos.

### 7.9 Parámetros cinéticos: $K_m$ y $V_{max}$

Diversos parámetros cinéticos fueron evaluados con la intención de conocer la afinidad de la enzima por el sustrato ( $K_m$ ), el número de recambio del sustrato ( $V_{max}$ ) y la eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ). Los resultados gráficos se presentan en la figura 23 y en la tabla I se resumen los parámetros antes mencionados.

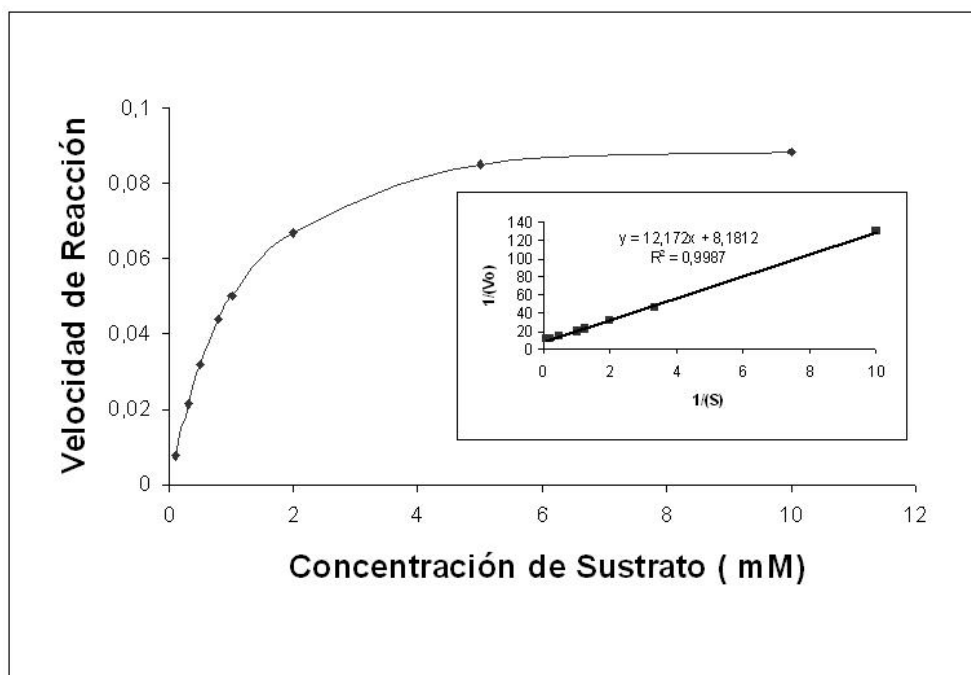


Fig. 23. Determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$  de acuerdo con el modelo Lineweaver-Burk. Se utilizó L-DOPA como sustrato, le velocidad de reacción se expresa como el cambio de absorbancia por minuto. El ensayo se llevó a cabo a 30 °C. Los símbolos indican la media de los triplicados (coeficiente de variación menor al 5 %) de un experimento.

**Tabla I. Propiedades cinéticas de la HcPO**

*Parámetro	Valor
$K_m$ (mM)	1.488
$V_{max} \times 10^3$ (U/mg)	30.5
$V_{max}/K_m \times 10^3$ (U/mg/mM)	20.5

\* $K_m$  y  $V_{max}$  fueron determinados de acuerdo a la ecuación de Lineweaver-Burk. La tasa  $V_{max}/K_m$  es la medida de la eficiencia catalítica y la especificidad de la enzima por el sustrato (Whitaker, 1972; Fullbrook, 1983). Los resultados de este experimento representan la media de tres mediciones para cada concentración de sustrato

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Purificación de la Hc y agregados

La hemocianina se ha purificado en un amplio rango de invertebrados, aprovechando principalmente su abundancia en el plasma así como su elevado peso molecular. La mayoría de los procesos de purificación se centran principalmente en etapas de ultracentrifugación y/o filtración en gel (Makino, 1985; Beltramini et al., 1995; Decker y Rimke, 1998; Jaenicke et al., 1999b; Keller et al., 1999; Molon et al., 2000; Young Lee et al., 2004). De hecho, existen reportes donde con la etapa de ultracentrifugación se logra obtener la hemocianina en forma casi pura (mayor del 95 % de pureza) (Kusche et al., 2003). En el presente trabajo, después de la ultrafiltración también se llevo a cabo una cromatografía de filtración en gel (Adachi et al., 2001) para eliminar cualquier proteína contaminante. Con el procedimiento empleado fue posible obtener cerca de 2 mg de proteína pura por individuo, la pureza de la proteína se puede ver en gel (Fig. 10) y por la razón de absorbancia ( $A_{340/280}$ ) que fue de 0.214 en buffer Tris-HCl 15 mM (pH 7.8), que contenía  $\text{CaCl}_2$  5 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM (Fig. 9), valor que corresponde a los reportados previamente de hemocianinas purificadas en camarón (Adachi et al., 2001) y de cangrejo y langosta (Zlateva et al., 1996).

Por otra parte, en la figura 17, línea A, la hemocianina nativa muestra dos tipos de bandas características (bandas más abundantes, cuando la concentración de Hc se incrementa, pequeñas fracciones se observan cerca de los agregados). Cada agregado muestra cierta movilidad, debido probablemente a la diferencia de sus subunidades (Adachi et al., 2001) y a las condiciones del sistema de electroforesis. Cuando las subunidades se asocian en estructuras más grandes, estas tienen la capacidad de oxidar difenoles, esto fue demostrado al evaluar la capacidad enzimática del dodecámero puro tratado con SDS ante el L-DOPA, este agregado fue capaz de utilizar este compuesto difenólico y oxidarlo a dopacromo, compuesto intermediario en la generación de melanina. En *Penaeus japonicus*, se ha demostrado que la hemocianina en su forma activa forma complejos o agregados aún mas grandes (en gel) que los dodecámeros, los cuales despliegan actividad en los zimogramas (Adachi et al., 2001). Parece ser que el arreglo estructural más grande es un prerrequisito para que las subunidades puedan, después de la activación, presentar actividad de difenoloxidasas. En esta investigación se ha demostrado que esta actividad no se limita a la estructura cuaternaria de la hemocianina, esta característica ha sido observada también en la Hc de *Eurypelma Californicum* donde solo ciertas subunidades despliegan esta actividad después de ser activadas con tripsina (Decker y Rimke, 1998). Además, parece que casi todos los tipos de subunidades de las hemocianinas en crustáceos pueden desplegar actividad de fenoloxidasas después de la activación con SDS (Jaenicke y Decker, 2004). Por su parte, el hecho de que el estado hexamérico de la Hc en *Penaeus vannamei* no despliegue esta actividad, deja ver

que probablemente agregados con menor número de subunidades no tienen el arreglo estructural que les permita a estas exponer el sitio activo ó, lo que es similar, existe un impedimento estérico. No obstante, se requiere de análisis de estructuras para conocer a detalle este fenómeno. Con respecto a la presencia de agregados, es interesante considerar su abundancia en plasma, por ejemplo, en la especie *Paralithodes camtschticae* (crustáceo) se ha encontrado que la hemocianina está presente en la hemolinfa como una mezcla del agregado dodecamérico y hexamérico en proporción 80 y 20 % respectivamente (Molon et al., 2000).

## 8.2 Análisis electroforético

El peso molecular para las dos subunidades concuerda con los valores presentados por Figueroa et al., en 1997 en esta misma especie. No obstante, existen algunos reportes en los que asignan, para esta misma especie, pesos moleculares entre 75 y 73 kDa a estas subunidades (Chan, 1988; Sellos et al., 1997). Figueroa et al., 1997 demostraron que la hemocianina de *Penaeus vannamei* tanto en su conformación nativa como desnaturalizada (subunidades) está glicosilada. Varias subunidades de diferentes especies se han analizado con respecto a esta última característica, por ejemplo, en las hemocianinas de *Rapana thomasi* (Stoeava et al., 1995) y de *Astacus leptodactylus* (Tseneklidou-Stoeter et al., 1995) la presencia de carbohidratos ha sido detectada. También, la presencia de residuos de manosa y glucosa han sido reportados para la

subunidad “a” (94 kDa) (Verijken et al., 1982) y “c” (80 kDa) (Neuteboom et al., 1992) de *Panulirus interruptus* donde estas subunidades difieren en el tipo de glicosilación, en el porcentaje de carbohidratos y en que la subunidad “c” tiene seis aminoácidos extra. Asimismo, Investigaciones sobre la estructura primaria de los aminoácidos en *Panulirus interruptus* indican que la longitud de las cadenas polipeptídicas de las subunidades “a”, “b” y “c” son de alrededor 600 residuos. Cada una de las cadenas contiene enlazada una estructura de carbohidrato con una masa molecular promedio de 1 200 Daltons (Van Kuik et al., 1986), lo cual lleva a una masa molecular promedio por subunidad de 77 000 Da. Sin embargo, las masas moleculares obtenidas por SDS/PAGE son 94, 90 y 80 kDa, respectivamente, para la subunidad a, b y c (Gaykema et al., 1984; Van Eerd y Folkerts, 1981). Solo el valor de la subunidad “c” está en concordancia si se acepta que un carbohidrato con “elevado peso molecular” se le ha unido. Aparentes diferencias en masas moleculares en SDS/PAGE con buffers que contienen Tris también se han observado para otras subunidades de artrópodos que contienen igual peso molecular (Rochu y Fine, 1984).

Aunque la presencia de diferentes tipos de carbohidratos tiene un efecto en la masa molecular total de la subunidad, las notables diferencias observadas en SDS/PAGE para subunidades de parecida masa molecular probablemente se deba más por la distribución de las cargas negativas que por el número absoluto de residuos ácidos con carga. Esto implica que la diferencia en conformación del complejo polipéptido/SDS, debido a una diferente distribución de cargas, puede

causar anomalías en estos casos, interfiriendo con el frente de corrida en el complejo SDS/proteína (Jekel et al., 1988), en algunos casos, se cree que la parte carboxilo terminal de la cadena polipeptídica de la subunidad es la responsable de esta anomalía (Bak et al., 1986; Bak y Beintema, 1987).

En la figura 10, letra E, aparte de la presencia de las dos subunidades antes descritas se observan también productos de degradación bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, este fenómeno también fue observado por Figueroa et al., 1997. Las hemocianinas de un gran número de artrópodos se han analizado y se cree que estas bandas son cadenas polipeptídicas que pertenecen a la hemocianina nativa, por lo que nos podemos referir a ellas como productos de degradación de la hemocianina (Markl et al., 1979; Jeffrey y Tracy, 1982; Mangum, 1983).

La estructura primaria de la hemocianina de *Penaeus vannamei* ha sido ya evidenciada (Fig. 24). La longitud del precursor es de 662 aminoácidos mientras que la proteína madura contiene 648. Las dos subunidades de esta especie difieren solo en que una de ellas posee 6 aminoácidos más (Tabla II), esta característica se explica debido a que el motivo Ala-X-Ala (posición 18-20) en la parte amino terminal de la subunidad mayor, puede ser hidrolizado y generar la otra subunidad (21-662 aminoácidos). Asimismo, las bandas de la figura 10, letra C representan los polipéptidos (estado monomérico) de la hemocianina y sugieren heterogeneidad entre las subunidades (Sellos et al, 1997). Existen evidencias

indicando que la heterogeneidad de las subunidades es un requisito para la formación de moléculas con un grado de organización estructural complejo, de hecho, la heterogeneidad es necesaria para el correcto ensamblaje de la estructura cuaternaria (Molon et al., 2000).

1	11	21	31	41	51	
1	MRVLLVVLGLV AAAAFQVASA	DVQQQKDVLY	LLNKIYGDIQ	DGDLLATANS	FDPVGNLGSY	60
61	SDGGAAVQKL VQDLNDGKLL	EQKHWFSLFN	TRHRNEALML	FDVLIHCKDW	ASFVGNAAAYF	120
121	RQKMNEGEFV YALYVAVIHS	SLAEQVVLPP	LYEVTPHLFT	NSEVIEEAYR	AKQKQTPGKF	180
181	KSSFVTGTTKN PEQRVAYFGE	DIGLNTHHVT	WHMEFPFWWN	DAYGHHLDRK	GENFFWIHHQ	240
241	LTVRFDAERL SNYLDPVGEL	QWNKPIVDGF	APHTTYKYGG	QFPARPDNVK	FEDVDDVARI	300
301	RDMVIVESRI RDAIAHGYIV	DSEGKHIDIS	NEKGIDILGD	IESSLYSPN	VQYYGALHNT	360
361	AHIVLGRQGD PHGKFDLPPG	VLEHFETATR	DPSFFRLHKY	MDNIFKEHKD	NLPPYTKADL	420
421	EFSGVSVEL AVVGELETYF	EDFEYSLINA	VDDAEGIPDV	EISTYVPRLN	HKEFTFRIDV	480
481	ENGGAERLAT VRIFAWPHKD	NNGIEYTFDE	GRWNAIELDK	FWVSLKGGKT	SIERKSTESS	540
541	VTVPDVPSIH DLFAEAEAGG	AGLAKFESAT	GLPNRFLLPK	GNDRGLEFDL	VVAVTDGDAD	600
601	SAVPNLHENT EYNHYGSHGV	YDKRPHGYP	LDRKVPDERV	FEDLPNFKHI	QVKVFNHGEH	660
661	IH					

Fig. 24. Secuencia de aminoácidos de la Hc deducidos a partir del cDNA del hepatopáncreas de *Penaeus vannamei*. La secuencia de aminoácidos se enumera desde la preproteína. El péptido señal se localiza entre la posición 1-14 (MRVLLVVLGLV AAAA), los aminoácidos que corresponden a la subunidad mayor van desde el 15 hasta el 662 y los de la subunidad menor van desde el 21 hasta el 662. El motivo Ala-X-Ala es FQVASA. Tomado de Sellos et al., 1997.

La preproteína contiene un péptido señal hidrofóbico el cual termina con 4 alaninas y que corresponde al motivo Ala-X-Ala; una secuencia consenso en péptidos señal que indica el sitio de hidrólisis (Von Heijne, 1984). La presencia de esta secuencia, ausente en otras hemocianinas de invertebrados, implica que esta hemocianina pasa a través de la membrana del retículo endoplásmico (Sellos et al., 1997), lugar donde puede ser glicosilada.



**Tabla II. Características moleculares de la hemocianina de *Penaeus vannamei***

Polipéptido	Peso molecular (Da)	Num. de a. a.	glicosilación
Precursor	74 981	662	---
Subunidad mayor	73 364.1	648	+
Subunidad menor	72 652.4	642	+

Se presentan datos deducidos a partir de la secuencia de aminoácidos reportada por Sellos et al., 1997. Los datos que se refieren a la glicosilación han sido obtenidos a partir de Figueroa et al., 1997.

### 8.3 Efecto de los Activadores

La conversión de la hemocianina en HcPO ha sido demostrada recientemente mediante el uso de agentes exógenos, ya sea utilizando reactivos químicos (Zlateva et al., 1996; Adachi et al., 2001; Decker et al., 2001) o mediante enzimas proteolíticas (Decker y Rimke, 1998; Adachi et al., 2003; Lee et al., 2004). En crustáceos se ha demostrado que, al menos, hemocianinas de 13 especies pueden tener actividad de fenoloxidasa (Zlateva et al., 1996; Salvato et al., 1998; Decker et al., 2001; Jaenicke y Decker, 2004; Young Lee et al, 2004).

Cuando una subunidad de la hemocianina se expone ante enzimas proteolíticas del tipo serino, estas pueden hidrolizar una parte de la cadena situada en el lado amino terminal (dominio I) y de esta manera se crea un espacio abierto que expone el sitio activo; hasta hoy no se ha evidenciado cual es el sitio de hidrólisis en una subunidad de *Penaeus vannamei*. Por su parte, en la proPO de esta especie se ha demostrado que la hidrólisis ocurre en el extremo amino terminal de

la cadena, entre la Arg90 y Asp91 (dominio I). Asimismo, cuando las subunidades de la hemocianina son expuestas ante detergentes aniónicos, sales aniónicas de la serie Hofmeister y solventes también pueden desplegar actividad de fenoloxidasa. Para este último hecho queda demostrado que la activación no se da por ruptura de la cadena polipeptídica, más bien la activación se debe a un cambio en la estructura de la molécula, lo cual ocasiona que el sitio activo quede accesible a la entrada de sustratos (Decker y Rimke, 1998).

En la figura 12 B, se aprecia que el SDS es el activador que genera mayor conversión, tanto si lo comparamos con los activadores químicos y/o enzimáticos. Lai et al., 2005 observaron que la tripsina y el SDS son los mayores activadores (no difieren significativamente) de la proPO en *Penaeus vannamei* y sugieren que la tripsina es el análogo de la ppA en el sistema de activación de la proPO. Sin embargo, en esta tesis se demostró que la tripsina activó a la hemociana solo débilmente, en una cantidad casi despreciable si la comparamos con el SDS. Adachi et al., 2003 sugieren que los factores involucrados en la activación de la hemocianina no son idénticos a aquellos del sistema proPO involucrados en la conversión de la proPO. Asimismo, en la figura 12 B, se observó que la quimotripsina puede activar la hemocianina aunque en una tasa 6.5 veces menor comparada con el SDS. De estos hechos se puede asumir que estas proteasas del tipo serino están hidrolizando el dominio I de un cierto número de subunidades en la hemocianina ocasionando con esto que el L-DOPA entre al sitio activo y sea posteriormente oxidado. Sin embargo, la baja actividad de esta hemocianina al ser

tratada enzimáticamente no es exclusiva para esta especie, este fenómeno se extiende a las hemocianinas de crustáceos. Esta baja actividad, que se incrementa en hemocianinas de quelicerados, puede ser explicada en base a estructuras elucidadas mediante estudios de difracción de rayos X (Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994). Estos análisis han revelado que, aunque los sitios activos de hemocianinas pertenecientes a estos dos subphylum son altamente conservados, la Thr-351 que pertenece al sitio activo de la hemocianina de *Limulus polyphemus* (Quelicerado) es reemplazada por un aminoácido estructuralmente mas grande, Fenilalanina-371, en la hemocianina de *Panulirus interruptus* (Crustáceo), con lo cual, aun después de la remoción del dominio I, estéricamente se impide la entrada a sustratos mayores al oxígeno debido a la cercanía de este aminoácido con el sitio activo (Decker y Rimke, 1998). Recientemente se reportó que la tripsina y la quimotripsina no han tenido efecto en la conversión de la Hc en *Penaeus japonicus* (Adachi et al., 2001).

Por otra parte, el empleo de solventes polares produjo una conversión de la hemocianina en HcPO significativamente mayor a la generada por los factores enzimáticos pero menor comparada con el SDS (Fig. 12 B). Muy probablemente estos compuestos producen un ligero cambio conformacional en la estructura nativa de la hemocianina permitiendo con esto la entrada de los sustratos al sitio activo. Por su parte, el isopropanol, un potente activador de la proPO en *Penaeus japonicus*, solo pudo activar a la Hc en una cantidad ligeramente superior que la quimotripsina. La acetona fue añadida en casi la misma cantidad que el

isopropanol y causó un mayor efecto significativo en la conversión de la Hc pero igual que el metanol.

#### **8.4 Efecto de los sustratos en HcPO**

La mayoría de los reportes sobre la capacidad enzimática de la hemocianina se centran en el análisis de su actividad de *o*-difenoloxidasas. No obstante que la Hc de *Penaeus vannamei* presenta esta actividad, también se analiza su actividad de monofenoloxidasas.

La hemocianina de *Penaeus vannamei* es capaz de utilizar compuestos monofenólicos y *o*-difenoles como sustratos después de haber sido activada con SDS. Su actividad de monofenoloxidasas experimenta una fase lag (Fig. 14), fenómeno también observado en la hemocianina de *Eurypelma californicum* después de haber sido activada con tripsina (Decker et al., 2001). Sin embargo, este comportamiento no es exclusivo para hemocianinas, se ha demostrado que fenoloxidasas de crustáceos presentan esta característica. Además, el tiempo de esta fase varía dependiendo del sustrato y la PO, pudiendo tener una duración de hasta dos horas (Rolle et al., 1990). El período lag es un fenómeno típico de tirosinasas que resulta de la lenta conversión del estado met de los sitios activos, el cual es predominante en estas enzimas inactivas, en el estado oxy, responsable de exhibir actividad de monofenolasa (Sánchez-Ferrer et al., 1995). Sin embargo,

la actividad de monofenoloxidasas no está presente en las hemocianinas de *Limulus polyphemus* y *Cancer magister*, estas parecen comportarse como catecoloxidasas después de ser activadas con SDS (Decker et al., 2001).

Por otro lado, la actividad de difenoloxidasas de hemocianinas está muy restringida a sustratos hidroxilados en la posición *orto*, los compuestos hidroxilados en la posición *meta* o *para* no son oxidados por estas moléculas (Salvato et al., 1998). Por su parte, la HcPO de *Penaeus vannamei* es capaz de oxidar el L-DOPA hasta su correspondiente *o*-quinona. A pesar que el sitio activo es idéntico al empleado para la actividad de monofenoloxidasas, la actividad de *o*-difenoloxidasas de la hemocianina de *Penaeus vannamei* no tiene fase lag (Fig. 14). Para la actividad de difenoloxidasas, la conversión del estado met no es necesaria, debido a que ambas formas (met y oxy) del sitio activo poseen esta actividad catalítica específica (Sánchez-Ferrer et al., 1995). Aquí, la cercana relación entre hemocianinas y fenoloxidasas de artrópodos es también demostrada por la forma similar en la que oxidan compuestos fenólicos.

### **8.5 Efecto del HLS y de la GD**

La conversión de la hemocianina en HcPO por factores endógenos ha sido demostrada solo en el subphylum Chelicerata (en el cangrejo cacerola) y en un crustáceo, *Penaeus japonicus* (Adachi et al., 2003). Nuestro intento por demostrar una estimulación endógena es pionero en crustáceos y el único en esta especie.

En el cangrejo cacerola se ha reportado que la hemocianina es activada por factores de la coagulación (Nagai y Kawabata, 2000) y péptidos antibacterianos (Nagai et al., 2001). En la figura 15 se evaluó el efecto que tiene el contenido de los hemocitos en la conversión de la Hc, se observa que sí existe una activación por parte de estos; probablemente algunos componentes del sistema proPO (Adachi et al., 1999; Söderhäll et al., 1996) son fuertes candidatos para llevar a cabo este proceso. Cabe señalar que una evidencia conclusiva para demostrar que existe actividad de fenoloxidasa *in vivo* por parte de la hemocianina es aún deficiente, no obstante, es evidente que en condiciones post mortem la hemocianina puede actuar como fenoloxidasa debido a la acción de los componentes de los hemocitos los cuales, bajo estas condiciones, se lisan y liberan su contenido celular.

Por otro lado, por experimentos previos (información no publicada) se ha observado que la melanosis post mortem en *Penaeus vannamei* inicia en la parte del cefalotórax (lugar donde se localiza la glándula digestiva) y después se extiende hacia el resto del cuerpo. Tomando como referencia este hecho y sabiendo de la presencia de enzimas proteolíticas tipo serino en la glándula digestiva, se evaluó el efecto en la conversión de la hemocianina contenida en el plasma. Los resultados se muestran en la figura 16 y reflejan que la hemocianina puede ser convertida en HcPO ante la presencia de las enzimas propias de esta glándula. Probablemente, en condiciones post mortem, enzimas proteolíticas, entre ellas quimotripsina, que es una de las enzimas más activas en

hepatopáncreas (Van Wormhoudt et al., 1992), están involucradas en esta conversión.

### **8.6 Propiedades bioquímicas; Implicaciones en melanosis post mortem**

Hasta hace poco la fenoloxidasa que se sintetiza en los hemocitos era aceptada como la enzima responsable del proceso de melanosis post mortem. Sin embargo, Adachi et al., 1999 demostraron que esta enzima es una proteína muy inestable, la cual se agrega fácilmente y es inactivada en pocos días, aún bajo condiciones de refrigeración por debajo de los 4 °C. Por otro lado, el desarrollo de melanina en camarones se sigue observando bajo esas condiciones e incluso en camarones que han sido congelados y descongelados. Por ello, se cree que la fenoloxidasa de hemocitos es una enzima que está lejos de ser un factor clave en melanosis post mortem.

En esta investigación se ha demostrado que la hemocianina puede desplegar actividad de fenoloxidasa. No obstante también se evaluó su estabilidad al congelado y descongelado a -20 °C. En la figura 19 queda demostrado que la hemocianina es una proteína muy estable a las condiciones antes descritas e indica que la HcPO es factor en la generación de melanina. Asimismo, existen diversos hechos que revelan que la hemocianina juega un rol importante en este fenómeno, el primero es que la HcPO despliega un perfil de temperatura óptima (Ver figura 20) similar a: la HcPO y la PO de *Penaeus Japonicus* (Adachi et al.,

2001), a la PO de *Penaeus Monodon* (Rolle et al., 1990), a las isoenzimas POII y POIII de *Homarus americanus* (Opoku y Simpson, 1993) y a la PO de *Penaeus duodarum* y de *Penaeus setiferus* (Simpson et al., 1988). De la misma forma, también tiene un perfil de pH óptimo similar a: la PO de *Penaeus duodarum* y *Penaeus setiferus* (Simpson et al., 1988), a la PO de *Panulirus cygnus* (Chen et al., 1991) y a la PO de *Penaeus californiensis* (Gollas, 1996). En el caso de la HcPO de *Penaeus japonicus* la comparación es más complicada debido a que la hemocianina de esa especie muestra dos pHs óptimos (Adachi et al., 2001), los autores argumentan que este fenómeno se debe a los dos tipos de subunidades: una se activa a pH 8 y la otra a pH 5. En lo que se refiere a parámetros cinéticos para la HcPO, son escasos los reportes que se tienen al respecto; en peneidos es la primera vez que se presentan estos parámetros. Por otra parte, para fenoloxidasas se han reportado valores de variables cinéticas en diferentes especies de crustáceos, incluyendo peneidos, en la tabla III se pueden apreciar estos datos. El valor de  $K_m$  presentado en esta investigación para HcPO (1.48 mM) es muy parecido a los reportados para diferentes fenoloxidasas, este hecho da otra evidencia de la similar afinidad que tiene la HcPO comparada con la fenoloxidasa por sustratos difenólicos. Zlateva et al., 1996 determinó el valor de  $K_m$  (mM) y  $V_{max}$  ( $mM \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) para la hemocianina de dos crustáceos, *Carcinus Maenas* y *Homarus Americanus*, en diferentes estados de agregación, bajo ciertas condiciones de activación y empleando catecol como sustrato, los valores promedio son:  $K_m=193.33$  y  $V_{max}=0.222$  para *C. maenas*; y  $K_m=218$  y  $V_{max}=0.1176$  para *H. americanus*. Aunque las condiciones de su experimento no fueron



similares a las que se han desarrollado en este trabajo, los rangos de los valores si dan indicio de la afinidad o la eficiencia catalítica que tienen las enzimas por sus sustratos, destacándose la HcPO de *Penaeus vannamei* por tener una mayor afinidad y gran eficiencia catalítica (Ver Tabla I).

**Tabla III. Comparación de la  $K_m$  para PO en diferentes crustáceos.**

Especie	$K_m$ (mM)	Referencia
<i>P. californiensis</i>	2.3	Gollas, 1996
<i>P. setiferus</i>	2.83	Simpson et al., 1988
<i>P. duodarum</i>	1.63	Simpson et al., 1988
<i>P. monodon</i> *	4.45	Rolle et al., 1990
<i>H. americanus</i> PPO I	1.7	Opoku y Simpson, 1993
<i>H. americanus</i> PPO II	1.3	Opoku y Simpson, 1993
<i>H. americanus</i> PPO III	1.1	Opoku y Simpson, 1993

Valores de  $K_m$  para diferentes especies. En todos se utilizó L-DOPA como sustrato a 25 °C. \*Esta determinación fue hecha a 30 °C.

Otro factor que apoya la contribución de la HcPO en melanosis post mortem es que está presente en la hemolinfa en concentraciones muy elevadas; se demostró que es posible encontrar mg de esta proteína en el plasma mientras que la proPO sintetizada en los hemocitos se puede encontrar en una concentración tres órdenes de magnitud menor, es decir, alrededor de  $\mu\text{g}$ . Se observó también que la HcPO tiene un comportamiento similar a la PO cuando se expone ante sustratos monofenólicos (Una fase lag), denotando con esto una similaridad en sus sitios

activos. Además de estos hechos, se ha evidenciado que la hemocianina es una proteína estable a 35 °C por al menos 50 minutos.

Finalmente, se sabe que detergentes aniónicos como el SDS generan un desdoblamiento parcial de la estructura cuaternaria de la hemocianina, este desdoblamiento permite que los sitios activos de la hemocianina (saber cuántos aun es tarea que queda por investigar en *Penaeus vannamei*) queden accesibles a la entrada de sustratos (Decker y Terwilliger et al., 2000). Si bien el SDS produce este cambio conformacional en la molécula, inmediatamente surge una pregunta: ¿Puede afectar la concentración de SDS este cambio conformacional? ¿El SDS está relacionado con la actividad enzimática de esta enzima? Para responder esta interrogante se llevó a cabo un experimento en el cual se evaluó el efecto de la concentración de SDS en la actividad de difenoloxidasa de la Hc. Los resultados de la figura 18 muestran que la concentración de SDS tiene un efecto en el grado de activación. En esta figura se explica que la distorsión causada por el efecto de la concentración del SDS en la molécula de hemocianina, y que permiten este arreglo estructural que le confiere actividad de fenoloxidasa, se limita a cierta cantidad, es decir, concentraciones adicionales de SDS no producen cambio estructural extra que afecte la accesibilidad a los sitios activos. Demostrar esto a nivel estructural aún queda por definir.

## 8.7 Relaciones estructurales y de función entre Hcs y POs

Existen ciertas diferencias estructurales entre las hemocianinas en artrópodos y sus correspondientes fenoloxidasas. Se sabe que las primeras están organizadas en forma de hexámeros o sus múltiplos mientras que las fenoloxidasas exhiben una amplia variedad de ensamblados, pudiendo formar dímeros, trímeros o múltiplos más elevados (Jiang et al., 1997). La comparación de las estructuras primarias entre fenoloxidasas y hemocianinas de artrópodos revelan bajo porcentaje de similaridad, a pesar de que catalizan la misma reacción (para una revisión ver van Gelder et al., 1997). No obstante, las fenoloxidasas y hemocianinas comparten la misma estructura del sitio activo, con dos átomos de cobre siendo enlazados. Este hecho se ha demostrado mediante estudios espectroscópicos (Solomon et al., 1994, 1996). Asimismo, estudios de difracción de rayos X han mostrado que dos hemocianinas de artrópodos (Magnus et al., 1994; Volbeda y Hol., 1989) y una catecoloxidasa (Klabunde et al., 1998) exhiben un alto grado de similaridad en el arreglo espacial de las histidinas que coordinan los átomos de cobre en el sitio activo.

Las estructuras cuaternarias de la fenoloxidasa y la hemocianina en *Penaeus vannamei* aún no han sido resueltas pero se puede apreciar que las seis histidinas que sostienen el cobre están altamente conservadas en estas dos proteínas (Fig. 25). A pesar de estas similaridades, estas dos proteínas, en general, muestran obvias diferencias con respecto a sus funciones biológicas y mecanismos

químicos. Mientras que la hemocianina transporta oxígeno molecular, la fenoloxidasa usa un átomo de oxígeno de esta molécula para llevar a cabo una reacción química (Decker y Terwilliger, 2000). Por otro lado, el grado de similitud en la estructura primaria de hemocianinas y fenoloxidasas de artrópodos sugieren que existió una subunidad precursora común con tres dominios que incluía un sitio activo con cobre (Terwilliger, 1998). Esto pudo haber sucedido debido a una presión evolutiva sobre ambas funciones: actividad de fenoloxidasa y transporte de oxígeno. En este sentido, las COPs de artrópodos han evolucionado en hemocianinas, donde su función primaria es transportar el oxígeno molecular; y en fenoloxidasas, donde su función principal es incorporar oxígeno en nuevas moléculas esenciales para la defensa y la formación del exoesqueleto (Decker y Terwilliger, 2000).

#### Sitio Cu (A)

PVPPO	EDYGINVHHWHHLIYPPGMG- - -VDRDRKGELFYMHQQIIARYDMERL	245
PVHC	EDI GLNTHHVTWHEFPFWNDAYGHHLDRKGENFFWIHHQLTVRFDAERL	250

#### Sitio Cu (B)

PVPPO	YGDLEHNIGHDILAFSHDPNAHKEEMGVVVDLGTSLRDPVFFRHLKLVD	410
PVHC	YGALHNTAHI VLGRQGDPHGKFDLPPGVLEHFETATRDPSFFRHLKYMD	402

Fig. 25. Alineación de la secuencia de aminoácidos de los dos sitios de unión al cobre (A y B) en la proPO y Hc de camarón. Seis histidinas conservadas se muestran en color gris. PVPPO, proPO de *Penaeus vannamei*; PVHC, hemocianina de *Penaeus vannamei*. Modificado de Lai et al., 2005.

## 9. CONCLUSIONES

Las subunidades de la Hc presentan heterogeneidad. La Hc puede ser convertida a HcPO por agentes químicos y enzimáticos. HcPO cataliza la conversión de L-DOPA en dopacromo, el cual sirve como intermediario en la generación de melanina. El SDS es el mayor activador. La quimotripsina es el mayor activador enzimático, sugiriendo que en la conversión enzimática de la Hc está involucrada una proteasa del tipo serino. La HcPO utiliza también sustratos monofenólicos para generar melanina, con los cuales se observa una fase lag. Por otro lado, existen agregados que tienen actividad (dodecámeros) y otros que no (hexámeros) sugiriendo con esto que un arreglo estructural más grande es esencial para que las subunidades desarrollen actividad de PO. Adicionalmente, la hemocianina es estable al congelado y descongelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y es estable a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  por al menos 50 minutos. Se indica que la Hc no se desagrega con la variación del pH, alcanzando un pH óptimo alrededor de 8. La HcPO tiene una temperatura óptima alrededor de los  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Presenta una afinidad por sustratos difenólicos similar a la observada en PO de crustáceos ( $K_m = 1.48$ ). El SDS no tiene mayor efecto en la activación de  $300\text{ }\mu\text{g}$  Hc después de  $2.22\text{ mM}$ . Finalmente, considerando la estabilidad de esta proteína al congelado y descongelado, su abundancia en el plasma, su activación por enzimas proteolíticas presentes tanto en los hemocitos como en la glándula digestiva y su similaridad en las propiedades bioquímicas con la proPO de otros crustáceos sugieren que esta

proteína es un inductor clave del desarrollo de melanosis post mortem en el camarón *Penaeus vannamei*.

## 10. RECOMENDACIONES

En esta investigación se han dado evidencias que permiten asumir la importancia de la hemocianina en el proceso de melanosis post mortem, asimismo se ha demostrado que la activación *in situ* se debe a factores endógenos, enzimas proteolíticas. No obstante, los componentes del sistema proPO que activan a la hemocianina de *Penaeus vannamei* aun no están esclarecidos. Por otra parte, no se tienen reportes de la caracterización enzimática de la fenoloxidasa de *Penaeus vannamei* que se expresa en los hemocitos. Comparar los perfiles bioquímicos de estas dos proteínas ayudaría a entender más el desarrollo de la melanosis post mortem.

Un estudio donde se revele la estructura de sus subunidades, la organización del centro catalítico y el conocimiento del sitio de hidrólisis en la Hc, arrojará información valiosa para entender los mecanismos de acción y conversión de esta proteína. Por otro lado, se ha demostrado que los agregados con mayor grado de organización (2 x 6 mer) pueden presentar actividad de fenoloxidasa en tanto que los agregados con menor grado (1 x 6) no. ¿Cómo es la estructura cuaternaria de los primeros que le permiten llevar a cabo la oxidación de los difenoles? Ó ¿Qué papel juegan los puentes disulfuro u otro tipo de interacciones en la activación de la Hc? Son preguntas que deben ser respondidas para entender el fenómeno a nivel molecular.

Estas son líneas generales de las cuales se puede obtener conocimiento que permitirá dar evidencias de cómo la hemocianina despliega esta novedosa actividad que la hace partícipe en el proceso de melanosis post mortem.



## 11. REFERENCIAS

- Adachi K, Hirata T, Nagai K, Fujisawa S, Kinoshita M y Sakaguchi M. (1999). Purification and characterization of prophenoloxidase from kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Fisheries Sci*; 65 (6), 919-925.
- Adachi K, Hirata T, Nagai K y Sakaguchi M. (2001). Hemocyanin a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicus* during storage. *J Food Sci*; 66, 1130-1136.
- Adachi K, Hirata T, Nishioka T y Sakaguchi M. (2003). Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *Comp Biochem Physiol B*; 134, 135-141.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Fourth Edition. Garland Science Ed.
- Ali M T, Gleeson R A, Wei C I y Marshall M R. (1994a). Activation mechanism of prophenoloxidase on melanosis development in Florida spiny lobster (*Panulirus argus*) cuticle. *J Food Sci*; 59 (5), 1024-1030.
- Ali M T, Marshall M R, Wei C I y Gleeson R A. (1994b). Monophenol oxidase activity from the cuticle of Florida spiny lobster (*Panulirus argus*). *J Agric Food Chem*; 42 (1), 53-58.
- Asano T y Ashida M. (2001a). Cuticular prophenoloxidase of the silk worm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem*; 276, 11100-11112.

- Asano T y Ashida M. (2001*b*). Transepithelially transported prophenoloxidase in the cuticle of the silk worm, *Bombyx mori*. J Biol Chem; 276, 11113-11125.
- Ashida M y Brey P T. (1997). Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey PT, Hultmark D, editors. Molecular mechanism of immune responses in insects. London: Chapman and Hall. P 135-172.
- Ashida M y Brey P T. (1998). Recent advances on the research of the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey PT, Hultmark D, eds. Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. London: Chapman & Hall, 135-172.
- Aspán A y Söderhäll K. (1991). Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. Insect Biochem; 21, 363-373.
- Aspán A, Huang T S, Cerenius L y Soderhall K. (1995). cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. Proc Natl Acad Sci USA; 92, 939-943.
- Averdam A, Markl J y Burmester T. (2003). Subunits sequences of the 4 x 6 hemocyanin from the golden orb-web spider, *Nephila inaurata*, Intramolecular evolution of the chelicerate hemocyanin subunits. Eur J Biochem; 270, 3432-3439.

- Bak H J y Beintema J J. (1987). *Panulirus interruptus* hemocyanin. The elucidation of the complete amino acid sequence of subunit a. Eur J Biochem; 169, 333-348.
- Bak H J, Soeter N M, Vereijken J M, Jekel P A, Neuteboom B y Beintema J J. (1986). In: Invertebrate oxygen carriers (Linzen, B. ed.), 149-152. SpringerVerlag, Heidelberg, Berlin.
- Beintema J J, Stam W T, Hazes B y Smidt M P. (1994). Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins). Mol Biol Evol; 11, 493-503.
- Beltramini M, Salvato B, Santamaria M y Lerch K. (1990). The reaction of CN<sup>-</sup> with the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: its relevance for a comparison between tyrosinase and hemocyanin active sites. Biochim Biophys Acta; 1040, 365-372.
- Beltramini M, Bubacco L, Casella L, Alzuet G, Gullotti M y Salvato B. (1995). The oxidation of hemocyanin. Kinetics, reaction mechanism and characterization of methemocyanin product. Eur J Biochem; 232, 98-105.
- Beltramini M, Colangelo N, Giomi F, Bubacco L, Di Muro P, Hellman N, Jaenicke E y Decker H. (2005). Quaternary structure and functional properties of *Penaeus monodon* hemocyanin. FEBS J; 272, 2060-2075.
- Bhagvat H y Richter D. (1938). Animal phenolases and adrenaline. Biochem J; 32, 1397-1405.

- Bradford M M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72, 248-254.
- Brouwer M, Bonaventura C y Bonaventura J. (1978). *Biochem*; 17, 2148-2154.
- Burmester T. (1999a). Evolution and function of the insect hexamerins. *Eur J Entomol*; 96, 213-225.
- Burmester T. (1999b). Identification, molecular cloning and phylogenetic analysis of a non-respiratory pseudo-hemocyanin of *Homarus americanus*. *J Biol Chem*; 274, 13217-13222.
- Burmester T. (2001). Molecular evolution of the hemocyanin superfamily. *Mol Biol Evol*; 18, 184-195.
- Burmester T. (2002). Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J Comp Physiol B*; 172, 95-117.
- Burmester T y Scheller K. (1996). Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. *J Mol Evol*; 42, 713-728.
- Cerenius L y Söderhäll K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Inmun Rev*; 198, 116-126.
- Cerenius L, Bangyeekhun E, Keyser P, Söderhäll I y Söderhäll K. (2003). Prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased

resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. Cell Microbiol; 5, 353-357.

- Chan H M y Weeks J M. (1992). The subunit structural composition of amphipod haemocyanin (Crustacea; amphipoda; talitridae). Comp Biochem Physiol B; 101, 567-572.
- Chan S M, Rankin S M y Keeley L L. (1988). Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose. Biol Bull; 175, 185-192.
- Chen J S, Rolle R, Marshall M y Wei C. (1991). Comparison of phenoloxidase activity from Florida spiny lobster and western Australian lobster. J Food Sci; 56 (1), 154-157.
- CONAPESCA-SAGARPA. 2005. Anuario Estadístico de Pesca 2005, en [http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca/planeacion/boletin/INDICADOR\\_DIC\\_IEMBRE.xls](http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca/planeacion/boletin/INDICADOR_DIC_IEMBRE.xls).
- Cuff M E, Miller K I, van Holde K E y Hendrickson W A. (1998). Crystal structure of a functional unit from octopus hemocyanin. J Mol Biol; 278, 855-870.
- Davis B J. (1964). Disk electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. Ann NY Acad Sci; 121, 404-427.
- Decker H y Rimke T. (1998). Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. J Biol Chem; 273, 25889-28892.

- Decker H y Terwilliger N. (2000). Cops and Robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J Exp Biol*; 203, 1777-1782.
- Decker H y Tuczek F. (2000). Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *TIBS Rev*; 392-397.
- Decker H, Ryan M, Jaenicke E y Terwilliger N. (2001). SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *J Biol Chem*; 276, 17796-17799.
- Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P y Bachere E. (2001). Crustacean Immunity. Antifungal peptides are generated from the c terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J Biol Chem*; 276, 47070-47077.
- Ellerton H D y Anderson D M. (1981). In: Lang J, editor. *Invertebrate Oxygen Binding Proteins: Structure, Active Site and Function*. New York: Marcel Dekker, 159-170.
- Ferrer O J, Koburger J A, Otwell W S, Gleeson R A, Simpson B K y Marshall M R. (1989). Phenoloxidase from cuticle of Florida spiny lobster (*Panulirus argus*): Mode of activation and characterization. *J Food Sci*; 54 (1), 63-67.
- Figueroa C, Calderón de la Barca A M, Vázquez L, Higuera I y Yepiz G. (1997). Purification of hemocyanin from white shrimp (*Penaeus vannamei*:

Boone) by immobilized metal affinity chromatography. *Comp Biochem Physiol B*; 117 (2), 203-208.

- Fujimoto K, Okino N, Kawabata S, Iwanaga S y Ohnishi E. (1995). Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92, 7769-7773.
- Fullbrook P D. (1983). Practical applied kinetics. In: *Industrial Enzimology. The application of enzymes in Industry* (T. Godfrey and J. Reichelt, eds.), 8-40. Nature Press, London.
- García-Borrón J C, y Solano F. (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: Beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res*; 15, 162-173.
- Gaykema W, Hol W, Vereijken J, Soeter N, Bak H y Beintema J. (1984). 3.2 Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* haemocyanin. *Nature*; 309, 23-29.
- Gollas T. (1996). Purificación y caracterización parcial de la profenoloxidasas de hemocitos de camarón café (*Penaeus californiensis*). Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, México.
- Hazes B, Magnus K A, Bonaventura C, Bonaventura J, Dauter Z, Kalk K H y Hol W. (1993). Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Sci*; 2, 597-619.

- Hernández-López J, Gollas-Galván T y Vargas-Albores F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp Biochem Physiol C*; 113 (1), 61-66.
- Herskovits T T. (1988). Recent aspects of the subunit organization dissociation of hemocyanins. *Comp Biochem Physiol B*; 91, 597-611.
- Holm R, Kennepohl P y Solomon E. (1996). Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chem Rev*; 96, 2239-2314.
- Horowitz N E y Shen S C. (1952). Neurospora tyrosinase. *J Biol Chem*; 197, 513-520.
- Jaenicke E y Decker H. (2004). Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase. *Micron* 35; 89-90.
- Jaenicke E, Föll R, Decker H. (1999a). Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone. *J Biol Chem*; 274, 34267-34271.
- Jaenicke E, Decker H, Gebauer W, Markl J y Burmester T. (1999b). Identification, structure, and properties of hemocyanins from diplopod Myriapoda. *J Biol Chem*; 274, 29071-29074.
- Jeffrey P D y Treacy G B. (1982). The molecular weights of arthropod hemocyanin subunits. A brief survey with special reference to *Cherax destructor* hemocyanin. *Comp Biochem Physiol B*; 73, 983-990.
- Jekel P A, Bak H J, Soeter N M, Vereijken J M y Beintema J J. (1988). *Panulirus interruptus* hemocyanin: the amino acid sequence of subunit b



and anomalous behaviour of subunits a and b on polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS. *Eur J Biochem*; 178, 403-412.

- Jiang H, Wang Y, Ma C y Kanost M R. (1997). Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: Molecular cloning of subunit ProPO-P1. *Insect Biochem Mol Biol*; 27, 835-850.
- Jiang H, Wang Y y Kanost M R. (1998). Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: A bacteria-inducible protein similar to *Drosophila easter*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95, 12220-12225.
- Jiang H, Wang Y, Yu X Q y Kanost M R. (2003). Prophenoloxidase-activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*. *J Biol Chem*; 278, 3552-3561.
- Keller H, Lieb B, Altenhein B, Gebauer D, Richter S, Stricker S y Markl J. (1999). Abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocyanin type 1 (HtH1): Organization of the {approx} 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units f, g and h. *Eur J Biochem*; 264, 27-38.
- Kempter B, Markl J, Brenowitz M, Bonaventura C y Bonaventura J. (1985). Immunological correspondence between arthropod hemocyanin subunits. II. Xiphosuran (*Limulus*) and spider (*Eurypelma, Cupiennius*) hemocyanin. *Biol Chem Hoppe Seyler*; 366, 77-86.
- Kim J, Marshall M y Wei C. (2000). Polyphenoloxidase. In: Haard, N.F. y Simpson, B.K. *Seafood Enzymes*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, EUA. 271-315.

- Kitajima N y Morooka Y. (1994). Copper–dioxygen complexes. Inorganic and bioinorganic perspectives. *Chem Rev*; 94, 737-757.
- Klabunde T, Eicken C, Sacchettini J y Krebs B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biol*; 5, 1084-1090.
- Kusche K, Ruhberg H y Burmester T. (2002). A hemocyanin from the Onychophora and the emergence of respiratory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99, 10545-10548.
- Kusche K, Hembach A, Hagner-Holler Silke, Gebauer W y Burmester T. (2003). Complete subunit sequences, structure and evolution of the 6 x 6-mer hemocyanin from the common house centipede, *Scutigera coleoptrata*. *Eur J Biochem*; 270, 2860-2868.
- Laemmli U K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*; 227, 680-685.
- Lai C Y, Cheng W y Kuo M. (2005). Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish immunol*; 18 (5), 417-430.
- Lamy J, Bijiholt M, Sizaret P y Van Bruggen E. (1981). Quaternary structure of scorpion (*Androctonus australis*). Localization of subunits with immunological methods and electron microscopy. *Biochem*; 20, 1849-1856.

- Lee S Y, et al. (1998a). In vitro activation of prophenol- oxidase by two kinds of prophenoloxidase-activating factors isolated from hemolymph of coleopteran, *Holotrichia diomphalia* larvae. Eur J Biochem; 254, 50-57.
- Lee S Y, et al. (1998b). Molecular cloning of cDNA for prophenol oxidase activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1, 3-b-glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. Eur J Biochem; 257, 615-621.
- Lee S Y, Lee B K y Söderhäll K. (2004). Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. Biochem Biophys Res Commun; 2 (322), 490-496.
- Lieb B, Altenhein B, Markl J, Vincent A, van Olden E, van Holde K E y Miller K I. (2001). Structures of two molluscan hemocyanin genes: significance for gene evolution. Proc Natl Acad Sci USA; 98, 4546-4551.
- Ling J, Nestor L P, Czernuszewicz R S, Spiro T G, Fraczkiewicz R, Sharma K D, Loehr T M y Sanders-Loehr J. (1994). Common oxygen binding site in hemocyanins from arthropods and molluscs: Evidence from Raman spectroscopy and normal coordinate analysis. J Am Chem Soc; 116, 7682-7691.
- Lundberg D. (2006). The coordination chemistry of solvated metal ions in DMPU: a study of a space-demanding solvent. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Sweden.

- Magnus K A, Hazes B, Ton-That H, Bonaventura C, Bonventura J y Hol W. (1994). Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins Struct Funct Genet*; 19, 302-309.
- Makino N. (1985). An oxygenation-linked dye binding to *Limulus polyphemus* hemocyanin. *Eur J Biochem*; 146, 563-569.
- Mangum C P. (1983). Oxygen transport in the blood. The biology of crustacea. In: Mantel, L.H. (ed). *Internal Anatomy and Physiological Regulation*. New York: Academic Press, 373-429.
- Mangum C P, Scott J, Black R, Miller K y Van Holde K. (1985). Centipedal hemocyanin: its structure and implication for arthropod phylogeny. *Proc Natl Acad Sci USA*; 82, 3721-3725.
- Markl J. (1986). Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol Bull (Woods Hole)*; 171, 90-115.
- Markl J y Decker H. (1992). Molecular structure of the arthropod hemocyanins. *Adv Comp Environ Physiol*; 13, 325-376.
- Markl J, Hofer A, Bauer G, Markl A, Kempter M, Brenzinger M y Linzen B. (1979). Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: II. Crustacea. *J Comp Physiol*; 133, 167-175.
- Markl J, Decker H, Linzen B, Schutter W G y van Bruggen E F. (1982). Hemocyanins in spiders, XV. The role of the individual subunits in the

assembly of *Eurypelma* hemocyanin. Hoppe Seylers Z. Physiol Chem; 363, 73-87.

- Markl J, Stöcker W, Runzler R, Kempter B, Bijlholt M y van Bruggen E. (1983). Subunit heterogeneity, quaternary structure and immunological relationship of arthropod hemocyanins. Life Chem Report Supplement; 1, 39-42.
- Mason H S. (1965). Oxidases. A Rev Biochem; 34, 595-634.
- Molon A, Di Muro P, Bubacco L, Vasilyev V, Salvato B, Beltramini M, Conze W, Hellmann N y Decker H. (2000) Molecular heterogeneity of the hemocyanin isolated from the king crab *Paralithodes camtschaticae*. Eur J Biochem; 267, 7046-7057.
- Nagai T y Kawabata S. (2000). A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. J Biol Chem; 275, 29264-29267.
- Nagai T, Osaki T y Kawabata S. (2001). Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. J Biol Chem; 276, 27166-27170.
- Nakahara A, Suzuki S y Kino J. (1983). Tyrosinase activity of squid hemocyanin. Life Sci Re (Suppl); 1, 319-322.
- Neuteboom B, Jekel P A y Beintema J J. (1992). Primary structure of hemocyanin subunit c from *Panulirus interruptus*. Eur J Biochem; 206, 243-249.

- Opoku-Gyamfua A y Simpson B K. (1993). Purification and characterization of three polyphenol oxidase isozymes from lobster (*Homarus Americanus*). J Food Biochem; 16 (5), 291-306.
- Paul R J y Pirow R. (1998). The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. Zool; 100, 319-327.
- Rochu D y Fine J M. (1984). The molecular weights of arthropod hemocyanin subunits: influence of Tris buffer in SDS-PAGE estimations. Comp Biochem Physiol B; 79, 41-45.
- Rolle R S, Guizani N, Chen J S, Marshall M R, Yang J S y Wei C I. (1990). Purification and characterization of phenoloxidase isoforms from taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus Monodon*). J Food Biochem; 15 (1), 17-32.
- Salvato B y Beltramini M. (1990). Hemocyanin molecular architecture: Structure and reactivity of the binuclear copper site. Life Chem Rep; 8, 1-47.
- Salvato B, Jori G, Piazzese A, Ghiretti F, Beltramini M y Lerch K. (1983). Enzymatic activities of type-3 copper pair in *Octopus vulgaris* haemocyanin. Life Sci Rep (Suppl); 1, 313-317.
- Salvato B, Sanamaria M, Beltramini M, Alzuet G y Casella L. (1998). The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: *o*- diphenol oxidase Activity. Biochem; 37, 14065-14077.
- Sánchez D, Ganfornina M D, Gutiérrez G, y Bastiani M J. (1998). Molecular characterization and phylogenetic relationship of a protein with oxygen-

binding capabilities in the grasshopper embryo. A hemocyanin in insects?  
Mol Biol Evol; 15:415-426.

- Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez J N, Garcia-Canovas F y Garcia-Carmona F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. Biochem Biophys Acta; 1247, 1-11.
- Santos-Buelga C, Marine-Font A y Rivas-Gonzalo J. (1986). Changes of tyramine during storage and spoilage of anchovies. J Food Sci; 51, 512-513.
- Satoh D, Horii A, Ochiai M y Ashida M. (1999). Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. J Biol Chem; 274, 7441-7453.
- Sellos D, Lemoine L y Van W. (1997). Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects. FEBS Lett; 407, 153-158.
- Simpson K B, Marshall M R y Otwell W S. (1987). Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): Purification and some properties. J Agric Food Chem; 35 (6), 918-921.
- Simpson B K, Marshall M R y Otwell W S. (1988). Phenoloxidases from pink and white shrimp: kinetic and other properties J Food Biochem; 12 (3), 205-218.
- Söderhäll K y Cerenius L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr Opin Immunol; 10, 23-28.
- Söderhäll K, Cerenius L y Johansson M W. (1996). The prophenoloxidase activating system in invertebrates. In: Söderhäll K, Iwanaga S, Vasata GR,

editors. New directions in invertebrates immunology. Fair Heaven, New Jersey: SOS Publications, 229-254.

- Solomon E I, Tuzcek F, Root D E y Brown C A. (1994). Spectroscopy of binuclear dioxygen complexes. Chem Rev; 94, 827-856.
- Solomon E I, Sundaram U M y Mackonkin T E. (1996). Multicopper oxygenases and oxygenases. Chem Rev; 96, 2563-2605.
- Stoeva S, Rachev R, Severov S, Voelter W y Genov N. (1995). Carbohydrate content and monosaccharide composition of *Rapana thomasiana grosse* (Gastropoda) hemocyanin and its structural subunit. Comparison with gastropodan hemocyanin. Comp Biochem Physiol B; 110, 761-765.
- Sugumaran M. (1996). Role of the insect cuticle in host defense reactions. In: Söderhäll K, Iwanaga S, Vasata GR, editors. New directions in invertebrates immunology. Fair Heaven, New Jersey: SOS Publications, 355-374.
- Taylor K. (1995). Black spot development in crustaceans: Existing and potential methods of control. In Subiyanto, Watanabe E, editors. Proceedings of the first seminar on the sea food science and technology in tropical area; Semarang, Indonesia: Depongoro University, 221-236.
- Telfer W H y Kunkel J G. (1991). The function and evolution of insect storage hexamers. Annu Rev Entomol; 36, 205-228.



- Tepper A W. (2005). Structure and mechanism of the type 3 copper protein tyrosinase. Thesis. The Netherlands.
- Terwilliger N. (1998). Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *J Exp Biol*; 201, 1085-1098.
- Terwilliger N, Dangott J y Ryan M C. (1999). Cryptocyanin, a crustacean molting protein, and evolutionary links to arthropod hemocyanin and insect hexamerins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96, 2013-2018.
- Terwilliger N, Ryan M y Towle D. (2005). Evolution of novel functions: cryptocyanin helps build new exoskeleton in *Cancer magister*. *J Exp Biol*; 208, 2467-2474.
- Tseneklidou-Stoeter D, Gerwig G, Kamerling J P y Spindler K D. (1995). Characterization of N-linked carbohydrate chains of the crayfish, *Astacus leptodactylus* hemocyanin. *J Biol Chem Hoppe-Seyler*; 376, 531-537.
- Van Eerd J P y Folkerts A. (1981). In *Invertebrate Oxygen-Binding Proteins* (eds Lamy, J. & Lamy, J.) Marcel Dekker, New York, 139-149.
- van Gelder C, Flurkey W y Wicherts H J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochem*; 45, 1309-1323.
- van Holde K E y Miller K I. (1995). Hemocyanins. *Adv Prot Chem*; 47, 1-81.
- van Holde K E, Miller K I y Decker H. (2001) Hemocyanins and invertebrate evolution. *J Biol Chem*; 276, 15563-15566.

- Van Kuik J, Van Halbeek H, Kamerling J y Vliegenthart J. (1986). Primary structure of the neutral carbohydrate chains of hemocyanin from *Panulirus interruptus*. Eur J Biochem; 159 (2), 297-301.
- Van Wormhoudt A, Le Chevalier P y Sellos D. (1992). Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine- protease with chymotrypsic and collagenolytic activities in a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Comp Biochem Physiol B; 103, 675-680.
- Veciana-Nogues M T, Vidal-Carou M y Marine-Font, A. (1989). Histamine and tyramine in preserved and semi-preserved fish products. J Food Sci; 54 (6), 1653-1655.
- Vereijken J M, Schwander E H, Soeter N M y Beintema J J. (1982). Limited proteolysis of the 94 000-dalton subunit of *Panulirus interruptus* hemocyanin; the carbohydrate attachment site. Eur J Biochem; 123, 283-289.
- Voit R, Feldmaier-Fuchs G, Schweikardt T, Decker H y Burmester T. (2000). Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. J Biol Chem; 275, 39339-39344.
- Volbeda A y Hol W. (1989). Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. J Mol Biol; 209:249-279.
- Von Heijne G. (1984). How signal sequences maintain cleavage specificity. J mol Biol; 173, 243-251.

- Wang R, Lee S Y, Cerenius L y Söderhäll K. (2001). Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Eur J Biochem; 268, 895-902.
- Whitaker J R (1972). Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker, New York, 636p.
- Yan X y Taylor K. (1991). Studies of the mechanism of phenolase activation in Norway lobster (*Nephros norvegicus*). Food Chem; 41 (1), 11-21.
- Yan X, Taylor K y Hanson S. (1989). Studies on the mechanism of black spot development in Norway lobster (*Nephros norvegicus*). Food Chem; 34 (4), 273-283.
- Yan X, Taylor K y Hanson S. (1990). Phenolase in Norway lobster (*Nephros Novegicus*): Activation and purification. Food Chem; 36 (1), 19-30.
- Young Lee S, Lee B y Söderhäll K. (2004). Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J Biol Chem; 278, 7927-7933.
- Zlateva T, Muro P, Salvato B y Beltramini M. (1996). The  $\alpha$ -diphenoloxidase activity of arthropod hemocyanin. FEBS Lett; 384, 251-25.