

# Centro de Investigación en Alimentación Y Desarrollo, A. C.

CARACTERIZACION BIOQUIMICA PARCIAL DE LA HEMOCIANINA  
DE CAMARON BLANCO (*Penaeus vannamei*)

POR

CIRIA GUADALUPE FIGUEROA SOTO

---

TESIS APROBADA POR LA

DIRECCION DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN NUTRICION Y ALIMENTOS

HERMOSILLO, SONORA.

ENERO DE 1996



## TABLA DE CONTENIDO

	Pag
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS .....	xi
RESUMEN .....	xii
INTRODUCCION .....	1
ANTECEDENTES .....	4
Proteínas de la Hemolinfa .....	4
Hemocianina .....	6
Función de la hemocianina en crustáceos .....	8
Características bioquímicas de la hemocianina .....	9
Hemocianina nativa .....	9
Tipos de subunidades .....	14
Contenido de carbohidratos .....	17
Cambios en las subunidades por sexo y estación del año .....	19
Factores que afectan la síntesis de hemocianina .....	20
MATERIALES Y METODOS .....	22
Aislamiento de la hemocianina de <i>Penaeus vannamei</i> .....	22
Reactivos .....	22
Especímenes .....	25
Colección de hemolinfa .....	25
Ultracentrifugación .....	26
Cromatografía por afinidad con ion metálico inmovilizado (IMAC) .....	28
Producción de Anticuerpos .....	29
Electrotransferencia .....	30
Western Blot .....	31
Determinación del Contenido de Cobre .....	32
Caracterización de la hemocianina de <i>Penaeus vannamei</i> .....	33
Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) y nativas (PAGE) .....	33

	Pag
Detección de carbohidratos asociados .....	35
Enfoque isoelectrico en condiciones nativas .....	36
Composición de aminoácidos y determinación del amino terminal .....	37
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	<b>39</b>
Aislamiento de la hemocianina de <i>Penaeus vannamei</i> .....	39
Obtención de la hemolinfa .....	39
Ultracentrifugación, fraccionamiento y análisis por SDS- PAGE .....	40
Cromatografía por afinidad con ion metálico inmovilizado (IMAC) .....	43
Gradiente de pH .....	44
Producción y caracterización de anticuerpos .....	49
Identificación de hemocianina y apohemocianina por medio de anticuerpos policlonales .....	52
Contenido de cobre .....	59
Caraterización bioquímica parcial de la hemocianina de camarón blanco ( <i>Penaeus vannamei</i> ) .....	62
Tamaño de la hemocianina nativa .....	62
Número y peso molecular de las subunidades de hemocianina .....	64
Punto isoelectrico de la hemocianina nativa .....	66
Identificación de los carbohidratos asociados a hemocianina .....	68
Composición de aminoácidos .....	71
Determinación del amino terminal .....	73
Subunidad de 82 kDa .....	73
Subunidad de 75 kDa .....	75
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>78</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pag
1. Distribución filogenética de las proteínas respiratorias . . . . .	5
2. Representación esquemática de la estructura de la hemocianina de artrópodos . . . . .	13
3. Distribución del patrón inmunológico de las subunidades de hemocianina de crustáceos . . . . .	15
4. Esquema del aislamiento y purificación de la hemocianina de camarón blanco ( <i>Penaeus vannamei</i> ) . . . . .	23
5. Esquema de la caracterización bioquímica parcial de la hemocianina de camarón blanco ( <i>Penaeus vannamei</i> ) . . . . .	24
6. Gradiente de densidad de plasma diluido de camarón blanco ( <i>Penaeus vannamei</i> ) . . . . .	41
7. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gradiente 6-18%, de las fracciones de plasma ultracentrifugado de camarón blanco ( <i>Penaeus vannamei</i> ) . . . . .	42
8. Cromatograma obtenido en la purificación de la hemocianina de camarón blanco, aplicando la técnica IMAC . . . . .	45
9. Análisis electroforético de fracciones provenientes de cromatografía IMAC . . . . .	46
10. Nivel de detección de los anticuerpos policlonales elaborados contra las subunidades de hemocianina de camarón blanco . . . . .	51
11. Identificación de hemocianina nativa y subunidades, utilizando anticuerpos policlonales . . . . .	53

	Pag
12. Análisis electroforético bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras de muestras tomadas a través del tiempo . . . . .	55
13. Análisis electroforético bajo condiciones nativas (PAGE), con muestras de los pasos de purificación . . . . .	63
14. Análisis electroforético bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), con muestras de los pasos de purificación . . . . .	65
15. Determinación del punto isoelectrico de la hemocianina de camarón blanco . . . . .	67
16. Comparación de la secuencia del extremo amino terminal de las subunidades de 82 y 75 kDa de hemocianina de camarón blanco . . . . .	74

## LISTA DE TABLAS

	Pag
1. Composición de subunidades de varios crustáceos. . . . .	10
2. Relación entre el contenido de cobre y proteína, en muestras tomadas a lo largo de la purificación de hemocianina de camarón blanco ( <i>Penaeus vannamei</i> ) . . . . .	61
3. Interacción de lectinas con las subunidades de hemocianina de 82 y 75 kDa del camarón blanco ( <i>Penaeus vannamei</i> ) . . . . .	70
4. Composición de aminoácidos de subunidades de hemocianina en diferentes crustáceos. . . . .	72

## RESUMEN

En la creciente industria de la camaronicultura el encontrar una proteína que funcione como marcador nutricional y/o de salud es de suma importancia. La hemocianina, proteína encargada del transporte de oxígeno en los crustáceos, es una alternativa ha considerar ya que está presente en elevada concentración y cumple una función fisiológica esencial. Hasta el momento no se ha reportado información sobre la hemocianina del camarón blanco (*Penaeus vannamei*), razón por la cual se decidió estudiar esta proteína determinando algunas de sus características bioquímicas. Dentro de los resultados obtenidos en este estudio podemos mencionar lo siguiente, se purificó la proteína en dos pasos: ultracentrifugación en gradiente de densidad y cromatografía por afinidad con ion metálico inmovilizado (IMAC). A la proteína pura se le realizó un análisis electroforético e inmunológico, determinando un peso molecular para la proteína nativa de 400 kDa y encontrando pI de 4.8 y 4.9 bajo estas mismas condiciones. Se logró identificar 2 subunidades con pesos moleculares de 82 y 75 kDa, ambas subunidades son glicociladas con  $\alpha$ -D-manosa,  $\alpha$ -D-glucosa,  $\alpha$ -L-fucosa,  $\beta$ -D-galactosamina y  $\beta$ -D-gal(1-3)D-N-acetil-galactosamina.

Los anticuerpos policlonales producidos contra cada una de las subunidades, reconocieron a la proteína nativa y a ambos polipéptidos,

presentando reactividad cruzada lo que nos indica relación inmunológica. Al determinar la composición de aminoácidos de las subunidades se encontró que los aminoácidos ácidos y sus correspondientes bases representan el 24% del total de aminoácidos, mientras que el que presentó menor contenido fue cisteína. Se logró determinar la secuencia de los extremos terminales amino de ambas subunidades, encontrando para la subunidad de 82 kDa como amino terminal arginina, y la secuencia de 20 de sus aminoácidos presentan un 58.8% de residuos idénticos y un 75% de homología con la subunidad "a" de *Panulirus interruptus*. Para la subunidad de 75 kDa el amino terminal fue el ácido aspártico y se secuenciaron 25 aminoácidos los cuales presentaron un 59.1% de residuos idénticos y un 88% de homología con la subunidad "c" de la hemocianina de *Panulirus interruptus*. Al comparar entre sí las secuencias de las subunidades de 82 y 75 kDa, se encontró un 57.1% de residuos idénticos y un 92.8% de homología; en base a los resultados inmunológicos, así como la comparación entre las secuencias se concluyó, que la subunidad de 82 kDa es de tipo gamma, mientras que la de 75 kDa es tipo alfa.

## INTRODUCCION

El camarón es una especie económicamente importante para México y 75% de su captura es destinada a la exportación. Sin embargo, los volúmenes provenientes de la captura de camarón silvestre en Sonora han disminuido de aproximadamente 19,000 toneladas en 1986, a solo 14,000 toneladas en 1994 (INEGI, 1995).

Esta disminución en la captura ha renovado e incrementado el interés por el cultivo de camarón, con el fin de aumentar los volúmenes de exportación. Las técnicas de cultivo de carácter intensivo son las más utilizadas ya que generan una gran producción, sin embargo, debido a la alta densidad de los organismos es frecuente la presencia de enfermedades, lo que desemboca en grandes pérdidas económicas.

Para poder obtener un cultivo exitoso se debe por lo tanto, incrementar el control de las enfermedades, mejorar las dietas y aumentar el conocimiento básico del camarón (Akiyama y Dominy, 1992). El contar con marcadores nutricionales y de salud adecuados para los organismos de cultivo es por lo tanto

una necesidad imperante. Una fuente potencial de marcadores nutricionales y/o de salud, podrían ser las proteínas contenidas en la hemolinfa o sangre de estos crustáceos.

La hemolinfa contiene una gran cantidad de proteínas las cuales se agrupan en cinco categorías, en donde destaca por su elevada concentración e importancia fisiológica la hemocianina (Depledge y Bjerregaard, 1989).

La hemocianina es la proteína respiratoria de artrópodos y moluscos (van Holde y Miller, 1982), reportándose concentraciones mayores al 60% de la proteína plasmática total. En crustáceos como *Palaemon elegans* y *Penaeus vannamei* esta concentración se eleva hasta un 90 a 95% (Taylor y col, 1985; Chen y Cheng, 1993; Cariolou y Flytzanis, 1993).

La hemocianina además de transportar oxígeno es un importante nutriente de reserva, actúa como osmoregulador e interviene en el transporte y reserva de metales y aminoácidos en condiciones de estrés osmótico (Weeks y Rainbown, 1992).

Como característica bioquímica de la hemocianina, se tiene que el peso molecular de la proteína en condiciones nativas oscila entre 450 a 3900 kDa y las subunidades están agregadas en forma de hexámeros (1x6), presentándose en algunos casos agregados de hasta 8 hexámeros (Herskovits, 1988).

El peso molecular de las subunidades oscila entre 75,000 a 85,000 daltons por cadena polipeptídica, y en cada subunidad se tiene un sitio binuclear de cobre (Brouwer y col., 1978). La hemocianina es una proteína glicosilada, y la composición de los carbohidratos asociados es variable (Stoeva y col., 1995).

Dentro de la región Noroeste de México, una de las especies con mayor productividad y resistencia a las enfermedades y a las condiciones climatológicas es el camarón blanco. Hasta el presente, la hemocianina de esta especie no ha sido estudiada, por lo que el objetivo general de este trabajo fue la caracterización bioquímica parcial de la proteína.

Dentro de lo cual se consideró la estimación del peso molecular de la proteína nativa, punto isoeléctrico, número y peso molecular de las subunidades y detección de carbohidratos en las mismas. También se prepararon anticuerpos policlonales contra cada subunidad, determinándose además la composición de aminoácidos y la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal.

## ANTECEDENTES

### Proteínas de la Hemolinfa

La hemolinfa se distribuye por vía arterial por los tejidos de los crustáceos y retorna al corazón por medio de senos, los cuales son cavidades huecas parecidas a las arterias (Markl, 1986). La hemolinfa contiene proteínas, aminoácidos libres, lípidos, iones, etcétera. Respecto a las proteínas que componen la hemolinfa éstas se agrupan en cinco categorías:

El grupo más abundante contiene a la hemocianina y apohemocianina. La hemocianina es la proteína encargada del transporte de oxígeno en artrópodos y moluscos, como se muestra en la Figura 1 (van Holde y Miller, 1982), y tiene las siguientes características: baja afinidad por el oxígeno, considerable cooperatividad y un gran efecto Bohr. La apohemocianina presente en la hemolinfa permite la rápida síntesis de nueva hemocianina al incorporar al cobre y funciona además como nutriente de reserva (Depledge y Bjerregaard, 1989).

El segundo grupo de proteínas son las encargadas de la coagulación. Dentro de éste, la más importante es el fibrinógeno (también llamado coagulógeno), además participa en el transporte de metales y en el mecanismo de defensa (Martín y col., 1991).

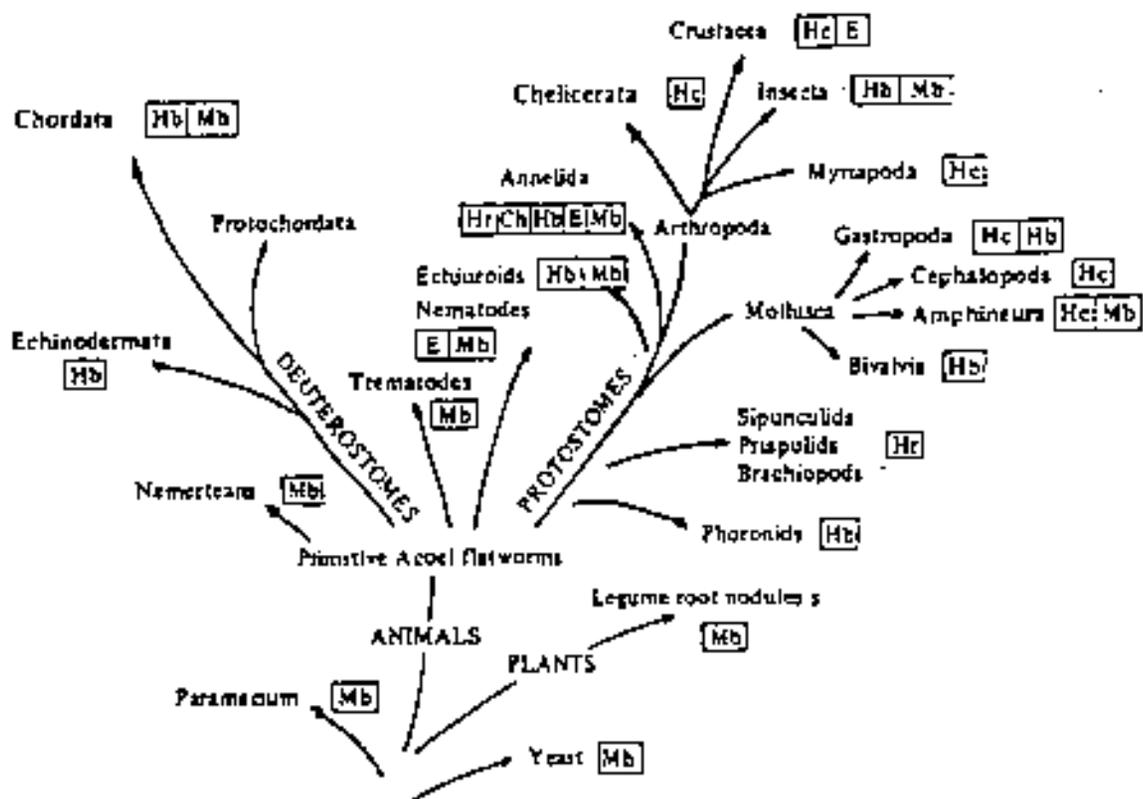


Figura 1: Distribución filogenética de las proteínas respiratorias. Mb, mioglobina; Hb, hemoglobina; E, eritrocronina; Ch, clorocruonina; Hr, hemeritina y Hc, hemocianina (van Holde y Miller, 1982).

El tercer grupo de proteínas presenta una baja concentración, sin embargo tiene mucha importancia en los procesos fisiológicos. En este grupo se encuentran hormonas que regulan el ciclo de muda, reproducción, respiración y actividad cardíaca (Depledge y Bjerregaard, 1989).

El cuarto grupo está constituido por proteínas que pueden inactivar bacterias, protozoarios y virus. En este grupo se encuentran las aglutininas las cuales se asemejan en función a los anticuerpos de los vertebrados (Depledge y Bjerregaard, 1989).

Por último tenemos al grupo de las proteínas ligadoras de metales. Aquí se encuentran los citocromos, catalasas y peroxidasas que unen al hierro, el cual es muy insoluble en la hemolinfa por lo que debe ser enlazado a alguna proteína para su transporte (Depledge y Bjerregaard, 1989).

### Hemocianina

La hemocianina es el mayor constituyente proteico de la hemolinfa de crustáceos (> 60%), en el caso de peneidos se han reportado concentraciones mayores del 90% (*Palaemon elegans*), de 79.69 y 76.39% (♂ y ♀) para *Penaeus japonicus*, mientras que para el camarón blanco (*Penaeus vannamei*)

se reporta una concentración de 80-95% de la proteína contenida en la hemolinfa (Taylor y col, 1985; Chen y Cheng., 1993; Cariolou y Flytzanis; 1993).

La hemocianina no se encuentra incorporada en las células, se distribuye en la hemolinfa ocupando 1/10 partes del volumen y en el caso del camarón *Palaemon adspersus* representa 10 g/100 ml (Hagerman y Weber. 1981). El resto de la hemolinfa lo conforman compuestos como fibrinógeno, apohemocianina, hormonas y lipoproteínas (Donker y col, 1990).

La hemocianina es una proteína pigmentaria, proveniente al igual que otros pigmentos del precursor tirosinasa, con sitios activos entre ambas moléculas muy similares (Markl, 1986; Lorösch y Haase, 1986; Telfer y Kunkel, 1991). En crustáceos la hemocianina está formada por múltiples subunidades con pesos moleculares de entre 75 a 85 Kda, y en donde cada subunidad tiene un sitio binuclear de cobre (Brouwer y col., 1978).

El oxígeno se une directamente a los átomos de cobre, ligando de 1 a 2 moléculas por átomo de cobre, una vez ligado se forma la hemocianina oxigenada que presenta el color azul característico del pigmento (Rainer y Brouwer, 1993).

### Función de la hemocianina en crustáceos

Como ya se mencionó, la función principal de la hemocianina es el transporte de oxígeno. Es además, un importante nutriente de reserva, osmoregulador e interviene en el transporte y reserva de metales y aminoácidos liberados por la célula durante el choque hipo-osmótico (Weeks y Rainbow, 1992).

Hemocianina contribuye a enriquecer el contenido de aminoácidos requeridos como efectores osmóticos durante estrés hiper-osmótico (Depledge y Bjerregaard, 1989). En el caso de *Carcinus maenas* se reporta un incremento en la proporción dodecámero:hexámero cuando son expuestas a un medio hipo-osmótico, posiblemente como una forma de adaptación para mantener constante la presión osmótica coloidal (Chan y Weeks, 1992).

En el cangrejo *Callinectes sapidus* se reporta la disminución en la concentración de las subunidades 3, 5 y 6, y un aumento en la concentración de hemocianina circulante de  $0.031 \text{ g/ml}^{-1}$  después de 25 días bajo hipoxia moderada, aumentando en conjunto la afinidad de la proteína por el oxígeno (deFur et. al., 1990 citado por Burnett, 1992).

La afinidad por el oxígeno puede verse afectada por compuestos orgánicos como el lactato y también por el pH,  $\text{CO}_2$ , calcio, NaCl y temperatura entre

otros, los cuales en conjunto proporcionan la habilidad de tener cambios adaptativos en el transporte de oxígeno cuando el sistema está estresado (Brouwer y col., 1978; Burnett, 1992). Estos compuestos afectan en forma similar a la hemoglobina, la proteína de vertebrados con función análoga (Burnett, 1992).

### Características bioquímicas de la hemocianina

#### **Hemocianina nativa:**

Las hemocianinas de crustáceos tienen un peso molecular en el rango de 450 a 3900 Kda y las subunidades pueden estar agregadas en forma de cubos hexaméricos (1x6) con un coeficiente de sedimentación de 16S. También se encuentran hexámeros múltiples de 12 subunidades (2x6) con 24S y de 24 subunidades (4x6) con 37S. La hemocianina puede llegar a contener agregados de hasta 36 ó 48 subunidades (6x6, 8x6) (Herskovits, 1988). Los arreglos más comunes para decápodos y peneidos son de 6 ó 12 subunidades (1x6 y 2x6) como se muestra en la Tabla 1 (Chan y Weeks, 1992).

Tabla 1: Composición de subunidades de varios crustáceos. Tipo de oligómero de la hemocianina nativa y número de subunidades diferentes, detectadas por electroforesis en disociación alcalina y SDS/ $\beta$ -mercaptoetanol.

ESPECIE	OLIGOMERO	SUBUNIDADES (kDa)	Ref.
<i>Penaeus monodon</i>	Hexámero 470 kDa	3 (70, 77, 89)	c, d
<i>Penaeus setiferus</i>	Hexámero	2 (77, 82)	b, c
<i>Panulirus japonicus</i>	Hexámero	4 (79, 84, 88, 90)	a, c
<i>Panulirus interruptus</i>	Hexámero 450 kDa	4 (71, 73, 79, 80)	c, d
<i>Homarus americanus</i>	Dodecámero 830 kDa	5 (76, 78)	c, d
<i>Janus edwardsii</i>	Hexámero 490 kDa	3 (84, 96, 116)	c
<i>Callinassa californiensis</i>	Dodecámero 940 kDa Hexámero 450 kDa	4 (68, 72, 76, 79)	c, d
<i>Carcinus maenas</i>	Dodecámero	4 (25, 50, 75, 77)	c, d

a: Markl y col., 1979. b: Klarman y col., 1981.  
c: van Holde y col., 1982. d: Herskovits, 1988

El hexámero es la forma básica de hemocianina y está constituido por 2 capas de 3 subunidades unidas una sobre la otra como se muestra en la Figura 2; estas subunidades son heterogéneas y en la mayoría de las especies presentan 4 o mas cadenas polipeptídicas electroforéticamente diferentes. La disociación de hexámeros y di-hexámeros sugiere interacciones polares y iónicas que estabilizan a la estructura hexamérica y también a la unión de hexámero con hexámero (Herskovits, 1988).

De acuerdo a su masa molecular el hexámero 8x6 (48 subunidades) de la hemocianina, excede 50 veces el tamaño de la hemoglobina humana, midiendo 25 nanómetros de largo y correspondiendo al tamaño de un ribosoma. Esta subunidad está conformada por aproximadamente 620 aminoácidos mientras que la hemoglobina solo contiene 140 aminoácidos por cadena polipéptida (Markl, 1986).

Respecto a la capacidad para al ligar oxígeno, la hemoglobina es la mas eficiente, de ahí que se cree que la hemocianina es una forma menos evolucionada. Las razones por las cuales los crustáceos tienen hemocianina en vez de hemoglobina son aún desconocidas, se cree que la hemocianina por contar con varios tipos de subunidades es mas versátil y flexible, lo que la hace mas adaptable a los cambios ambientales (Markl, 1986).

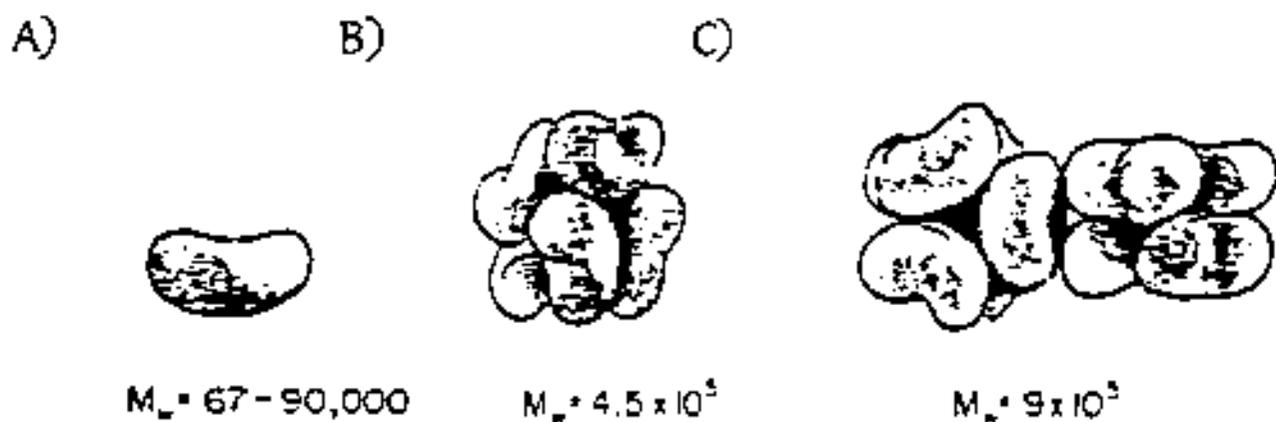


Figura 2: Representación esquemática de la estructura de la hemocianina de artrópodos. A) Monómero, B) hexámero, c) dodecámero (Herkskovits, 1988).

## **Tipos de subunidades**

Cada especie de crustáceos tiene hemocianina con un arreglo específico de subunidades. En forma general se ha encontrado que pueden tener de 3 a 8 subunidades diferentes, como se muestra en la Tabla 1.

Las subunidades se han clasificado de acuerdo a sus características inmunológicas, movilidad electroforética y la participación en el ensamblaje de la proteína; en 3 tipos o categorías: subunidad tipo alfa, subunidad tipo beta y subunidad tipo gamma (Markl y col., 1986). En la Figura 3 se muestra la distribución inmunológica para los diferentes tipos de subunidades en crustáceos, se indica también con cuadros los estados de agregación de la proteína nativa.

La subunidad tipo alfa está presente en todos los crustáceos, con poca variación entre una especie y otra, por lo que se considera filogenéticamente conservada (Markl, y col., 1986). La sola presencia de subunidades tipo alfa es suficiente para la formación del hexámero de hemocianina (Chan y Weeks, 1992).

La subunidad tipo beta no se encuentra relacionada con las otras subunidades. Esta subunidad difiere grandemente entre una especie y otra, o está ausente; ejemplos de especies que la contienen son *Ocypade spp* y *Ucca urvillei*.

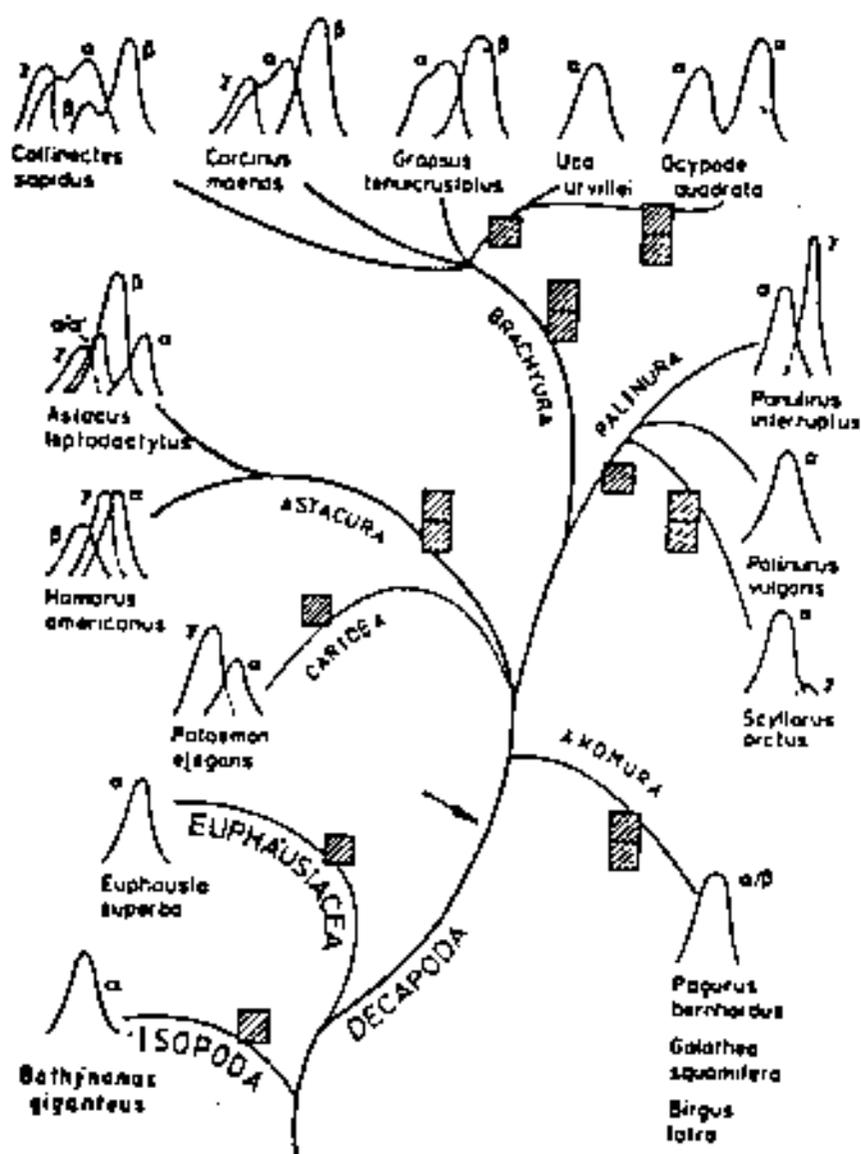


Figura 3: Distribución del patrón inmunológico de las subunidades de hemocianina de crustáceos. Se muestran patrones de inmuno-electroforesis cruzada de las subunidades y los estados de agregación de la proteína nativa (los cuadros son hexámeros; 1x6, 2x6) (van Holde y Miller, 1982).

Las subunidades tipo beta están relacionadas necesariamente con la formación del dodecámero (Neuteboom, 1989; Markl y col., 1986).

La subunidad gamma está inmunológicamente relacionada con la subunidad tipo alfa, aunque difieren entre sí en composición dependiendo de la familia en la que se localiza.

En el caso de la langosta *Panulirus interruptus*, se conoce que la hemocianina tiene 3 subunidades llamadas a (94 kDa), b (90 kDa), y c (80 kDa); de las cuales a y b son muy similares, con tan solo 2.7% de diferencias en la secuencia de aminoácidos, mientras que entre las subunidades a y c, solo se encontró un 59% de residuos idénticos (Jekel y col., 1988). Las relaciones inmunológicas entre las subunidades de *Panulirus interruptus* son explicadas en base a la existencia de un gen antecesor común (Rochu y Fine, 1984).

Con respecto a las interacciones entre las subunidades pueden ser covalentes, puentes bisulfuros o no covalentes (Neuteboom y col., 1989). Las hemocianinas de artrópodos por lo general presentan varios tipos de subunidades con diferentes características inmunológicas o de estructura primaria. La heterogeneidad de las subunidades de la hemocianina de *Androctonus* y *Limulus* (24-mer y 48-mer) por ejemplo, parece ser necesaria para el ensamblaje de la hemocianina nativa.

Esta diversidad podría ser útil para proveer flexibilidad a la hemocianina durante los cambios ambientales, como por ejemplo cambios en la salinidad o presión de oxígeno (Callicot y Mangum, 1993). Otra posibilidad es que algunas subunidades sirvan como reguladores que unan y respondan a efectores alostéricos de cationes divalentes y protones (Makino y Kimura, 1988).

Por otro lado, también se ha encontrado en hemocianinas hexaméricas como la de algunas langostas (*Panulirus*), que las subunidades heterogénicas parecen ser innecesarias ya que las subunidades que las conforman son iguales en su estructura tridimensional. Hasta el momento la diversidad de las subunidades así como su utilidad, son fuente de gran controversia.

#### **Contenido de carbohidratos:**

Las hemocianinas de los artrópodos generalmente tienen las características de las proteínas extracelulares y, entre otros aspectos, cuentan con carbohidratos en su estructura.

El contenido de carbohidratos en la hemocianina de crustáceos es del 2 al 9% (peso/peso) y la composición de los monosacáridos es muy variable (Stoeva y col., 1995). Dentro de los carbohidratos más comúnmente detectados

se encuentran la fucosa, manosa, glucosamina y trazas de galactosamina (van Holde y Miller, 1982).

Esta composición variable puede ser la fuente de la microheterogeneidad en las diferentes subunidades de hemocianina. Para la langosta *Panulirus interruptus* la mayor diferencia entre las subunidades a y c, consiste en la proporción de carbohidratos, la función de esta diferencia no ha sido explicada, pero se especula que tiene gran importancia en el ensamblaje de la proteína (Neuteboom y col., 1992).

La presencia de carbohidratos unidos a la cadena polipeptídica tiene un papel importante en la conformación y plegamiento de la proteína, además intervienen en la estabilización durante la desnaturalización y proteólisis (Stoeva y col., 1995).

Las cadenas de carbohidratos son formadas por la acción de glicosiltransferasas y la estructura final de la cadena es determinada por la especificidad de cada enzima. Las diferencias en la glicosilación están relacionadas con las glicosiltransferasas presentes en la membrana de Golgi para las diferentes especies, esto puede explicar la existencia de la heterogeneidad de las cadenas de carbohidratos de la hemocianina. La glicosilación de las proteínas está probablemente ligada a las diferentes etapas evolutivas (Stoeva y col., 1995).

### Cambios en las subunidades por sexo y estación del año

Belleli y colaboradores en 1988, reportaron la presencia de una subunidad específica para hembras y ausente en machos en *Palinurus elephas*, y esta diferencia no repercute en la cantidad de oxígeno ligado.

Se encontró un aumento en el número de subunidades en verano y en la cantidad de oxígeno ligado. En contraste, la hemocianina de *Palinurus mauritanicos* no presentó cambios por sexo o estación del año (Belleli y col., 1988).

En un estudio posterior, se investigó el efecto del habitat sobre el comportamiento de hemocianina. La langosta *Palinurus mauritanicos* aclimatada en acuario, presentó variabilidad en la composición de las subunidades de hemocianina, comportamiento que no se encontró en la langosta silvestre. Al parecer ambas especies (*Palinurus elephas* y *Palinurus mauritanicos*) tienen mecanismos de adaptación que permiten la variación en la composición de las subunidades de hemocianina de acuerdo al medio en que se encuentre (Condo y col., 1991).

### Factores que afectan la síntesis de hemocianina

Existen muchos factores que pueden afectar la síntesis de hemocianina, los más importante son: la capacidad de síntesis, el volumen de la hemocianina y la tasa de pérdida y utilización del pigmento.

La capacidad de síntesis no se ha podido determinar ya que existe mucha controversia acerca del sitio o sitios en donde puede ser sintetizada. Se ha especulado que en algunas especies la síntesis puede llevarse a cabo por células cianocitas localizadas a lo largo del dorso o bordes laterales del animal (Depledge, 1989).

En la especie *Homarus americanus* la hemocianina es aparentemente sintetizada en el hepatopáncreas, ya que este órgano tiene la mayor cantidad de cobre, metal indispensable en la estructura. Este es también el caso con camarón *Penaeus semisulcatus*, ya que se logró sintetizar hemocianina *in vitro* por el hepatopáncreas y posteriormente ser identificada por electroforesis (Khayat y col., 1994).

La capacidad de síntesis depende del contenido de cobre disponible, por lo que bajas concentraciones de Cu en el alimento y/o agua podrán disminuir la síntesis del pigmento (Depledge y Bjerregaard, 1989). El volumen, la velocidad de utilización y pérdida de hemocianina, dependen del crecimiento y del estado

nutricional del crustáceo, encontrando marcados cambios en la concentración del pigmento durante la muda y en periodos de agotamiento de alimentos (Depledge, 1989).

Debido a la importancia fisiológica de la hemocianina, se consideró importante el estudio de algunas de las características bioquímicas de la proteína. Se utilizó como modelo de estudio al camarón blanco (*Penaeus vannamei*), ya que esta especie es una de las más explotadas por el sector acuícola y representa una fuente de ingresos importantes en la región y a nivel mundial.

## MATERIALES Y METODOS

El procedimiento experimental se dividió en dos fases: aislamiento y purificación de la hemocianina y la posterior caracterización (Figuras 4 y 5, respectivamente).

### Aislamiento de la hemocianina de *Penaeus vannamei*

#### **Reactivos:**

La acrilamida, N,N,N',N'tetrametiletilendiamina (TEMED), N'-metilbisacrilamida (BIS), y estándares de peso molecular para electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) se compraron a Bio-Rad (Richmond CA, USA). Los estándares para la electroforesis en condiciones nativas fueron comprados a Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Suecia). El fosfato mono y dibásico de sodio, TRIZMA-Base, glicina, cloruro de sodio, persulfato de amonio, ácido acético glacial, azul de Coomassie R y G, negro de sudán, dianisidina, amido black, glicerol, 2-mercaptoetanol, n-etil maleimida (NEM), dodecilsulfato de sodio (SDS), etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTA), bromuro de potasio, azida de sodio, imidazol, acetato de sodio, etilen glicol, glutatión, diisopropilfosforidato (DFP), fluoruro de fenilmetilsulfonilo

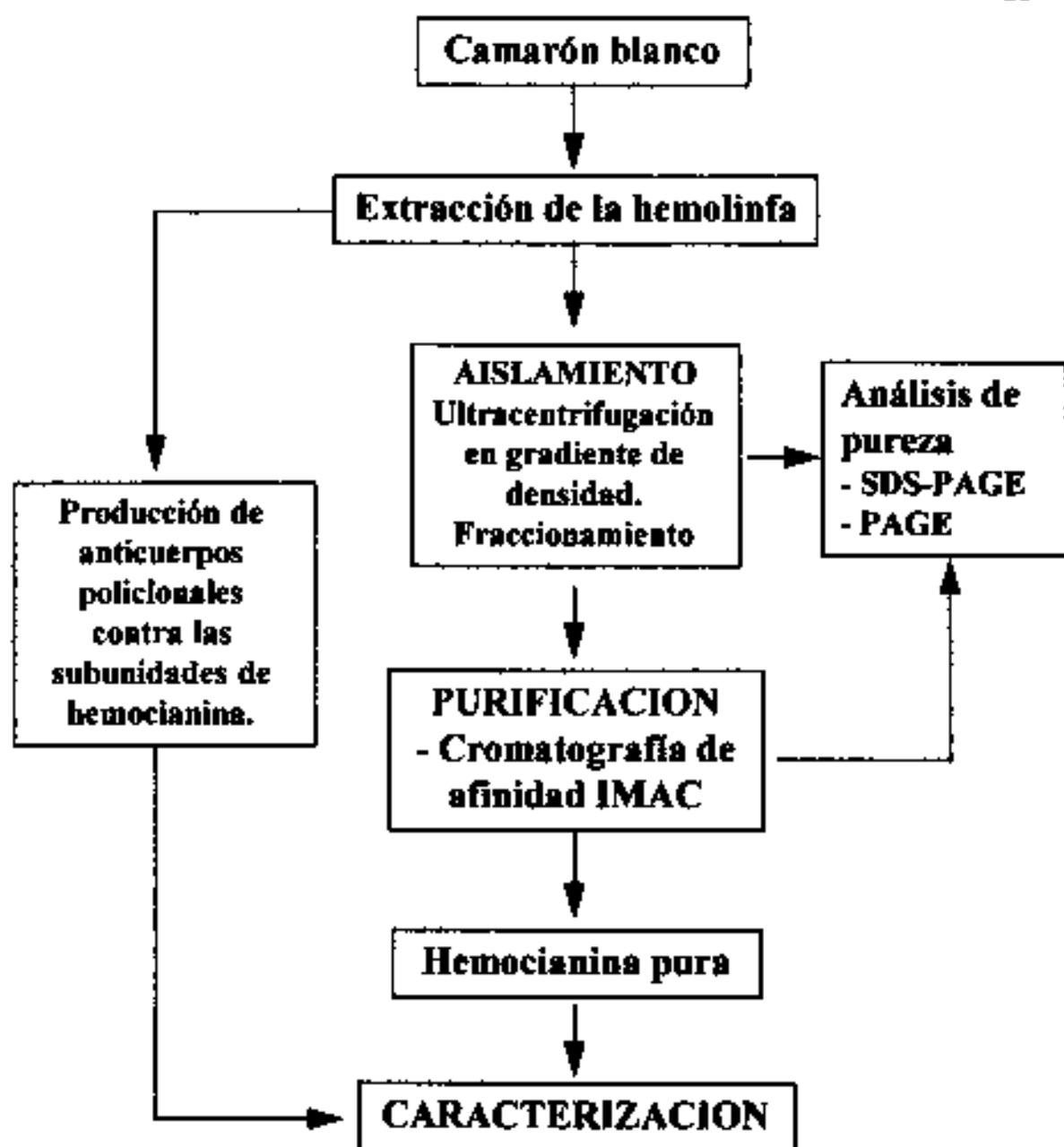


Figura 4: Esquema del aislamiento y purificación de la hemocianina de camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

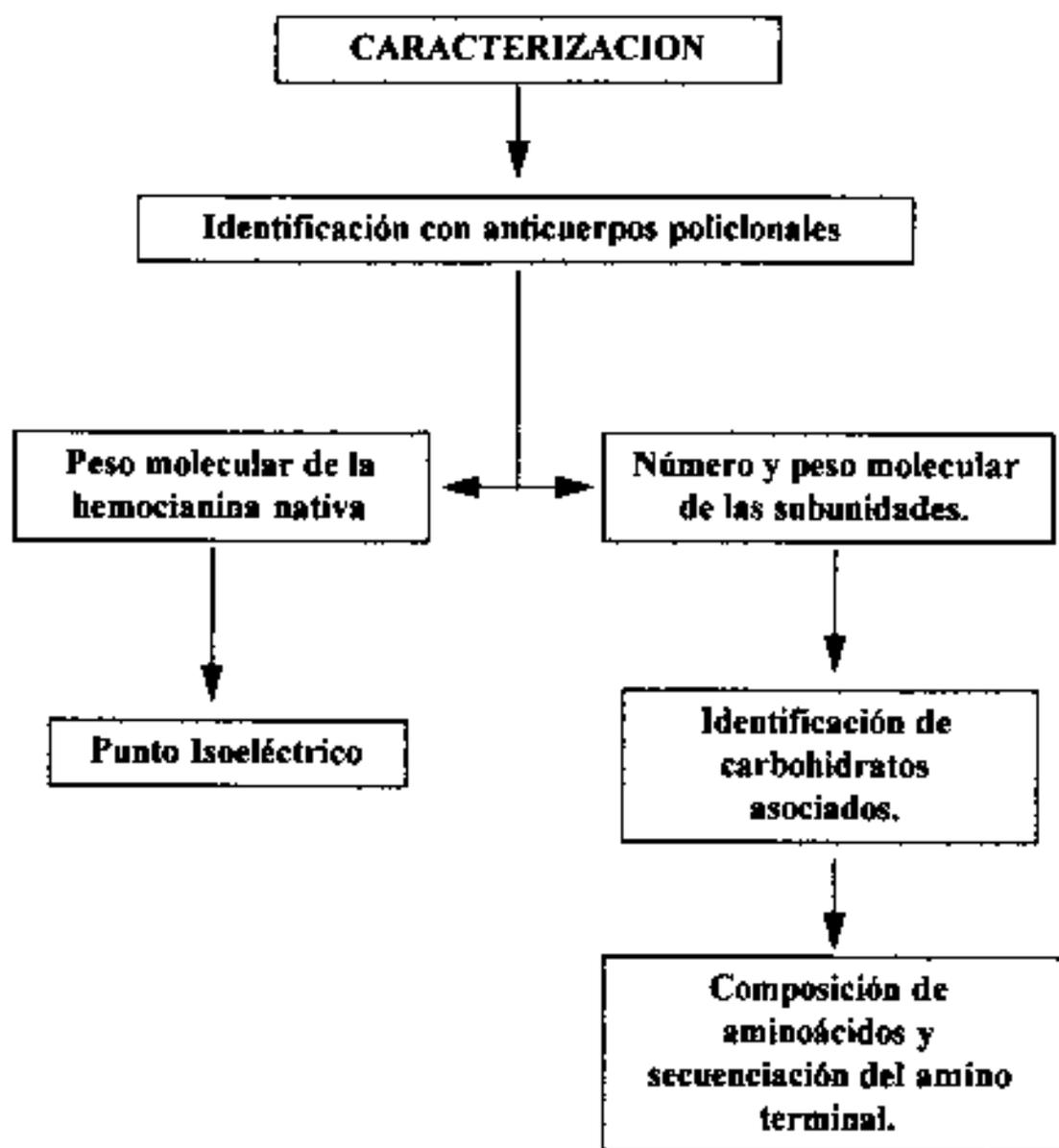


Figura 5: Esquema de la caracterización bioquímica parcial de la hemocianina de camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

(PMSF), peróxido de hidrógeno, pepsatina, quimiostatina, antipaina, estándares para punto isoeléctrico, adyubante completo e incompleto, nitrato de plata y Tween-20 fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). La membrana de nitrocelulosa se compró a Hofer Scientific (San Francisco CA, USA). El metanol, etanol y ácido acético glacial fueron de Merck, México (Naucalpan de Juárez, Edo. de México). La membrana de diálisis fue adquirida de Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA). Las lectinas biotiniladas se adquirieron a Pierce (Chemical) Company, IL, USA).

#### **Especímenes:**

Se utilizó camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en estadio juvenil y de  $12.58 \pm 2.4$  gr, los cuales fueron proporcionados por la Unidad Experimental Kino del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, México. Estos organismos fueron capturados vivos, transportados al laboratorio con aireación y se conservaron en agua de mar.

#### **Colección de hemolinfa:**

Una vez que los camarones fueron sexados, se extrajo la hemolinfa realizando una punción entre el cefalotórax y el primer segmento abdominal, se

inyectaron aproximadamente 50  $\mu$ l del anticoagulante N-etil maleimida 0.2 M (NEM) 0.3% NaCl, para inmediatamente después realizar la extracción.

La hemolinfa se mantuvo en hielo y se le adicionó en proporción 1:1 hemolinfa-buffer salino de fosfatos (PBS)  $\text{PO}_4$  0.1 M, NaCl 0.15 M, azida de sodio 0.2%, pH 7. El buffer de fosfatos contenía además EDTA 10 mM y una mezcla de inhibidores compuesta de glutatión 10 mM, dietil fosfluoridato (DFP) 5 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1  $\mu$ g/ml y 5  $\mu$ g/ml de antipaina, pepstatina y quimostatina.

Se centrifugó la hemolinfa a 1000 x g durante 10 min para separar los hemocitos y el material grueso. El sobrenadante obtenido se sometió a ultracentrifugación.

### **Ultracentrifugación.**

La mezcla de hemolinfa-PBS fue llevada al 44% (p/v) con bromuro de potasio (KBr) para obtener una solución de alta densidad (1.35 g/ml). Un ml de esta mezcla de alta densidad se colocó en el fondo de un tubo QuickSeal (Beckman Instruments, Palo Alto CA, USA) agregando también 1 ml de buffer PBS con inhibidores y cuidando de que no se mezclaran las fases, estos tubos fueron sellados y ultracentrifugados a 100,000 rpm (400,000 x g) a 7°C, en un

rotor vertical TLV-100 (Beckman Instruments, Palo Alto CA, USA), y siguiendo el método recomendado por Yepiz-Plascencia y col. (1995).

Los tubos una vez ultracentrifugados, fueron fraccionados utilizando un equipo Auto DensiFlow II (Labeconco, Kansas City MO, USA), obteniéndose 4 fracciones con densidad ascendente. Los criterios utilizados para este fraccionamiento fueron, por un lado, el seguimiento de una lipoproteína previamente teñida con negro de sudán (fracción II) y por otro lado el color azul característico de hemocianina (fracción IV). En el siguiente paso de purificación se trabajó con la fracción de alta densidad (fracción IV) ya que esta contenía la mayor cantidad de hemocianina. A todas las fracciones se les determinó la concentración de proteína por el método del ácido bicinonínico BCA (Pierce Chemical Company, II. USA).

La fracción IV fue desalada utilizando una columna PD-10 (Bio-Rad, Richmond CA, USA), cuya matriz es Sephadex G-25M con tamaño de poro de 50-100 micras. La proteína se eluyó con el buffer de corrida para IMAC (NaCl 0.5 M, Tris 0.05 M, pH 7.5), con el fin de dejar la muestra preparada para el siguiente paso de purificación.

### **Cromatografía por afinidad con ion metálico inmovilizado (IMAC):**

Para la corrida cromatográfica se empleó una columna de 1 x 15 cm (Bio-Rad, Richmond CA, USA) la cual se empacó con 3 ml de la matriz IDA. Esta matriz consiste en sefarosa 6B la cual tiene unida en forma covalente el quelante iminodiacetato (IDA) que es el soporte de un metal, el cual interacciona con la proteína (Porath y col., 1983). La matriz IDA fue cortésmente proporcionada a través de la Dra. Luz Vazquez por el Dr. Porath del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Arizona.

Para el acoplamiento del metal se realizó una incubación por 1 hora de la matriz Sefarosa 6B-Iminodiacetato con 0.1 M de  $\text{Ni}_2\text{SO}_4$ , se lavó con 6 volúmenes de agua y se equilibró con el buffer de corrida.

El proceso analítico utilizado fue el siguiente: se aplicaron 4.5 mg de proteína a la columna (IV fracción del gradiente de densidad), y posteriormente se lavó extensamente con NaCl 0.5 M, Tris 0.05 M, pH 7.5. Para la remoción de las proteínas adsorvidas se aplicó un gradiente descendente de pH, aplicando 30 ml de acetato de sodio 0.5 M (pH 7.5 a 4), y NaCl 0.5 M. Finalmente se aplicó solución de etilen glicol al 40%, Tris 0.05 M, pH 7.5 para extraer la proteína remanente en la columna.

La velocidad de flujo fue de 1 ml/min regulado por una bomba peristáltica P-1 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala Suecia); y se recolectaron fracciones de 2 ml con la ayuda de un fraccionador Frac-100 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala Suecia). Se obtuvieron los cromatogramas monitoreando la elusión de proteína a 280 nm con un graficador REC-1 y un monitor UV-1 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala Suecia). A estas fracciones se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976), para determinar el porcentaje de recuperación.

Las fracciones provenientes de la ultracentrifugación y las de cromatografía IMAC se analizaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras según Laemmli (1970).

### **Producción de Anticuerpos.**

Se prepararon anticuerpos policlonales contra las 2 subunidades de hemocianina. Para esto, las bandas con peso molecular aproximado de 82 y 75 kDa (subunidades de hemocianina), se cortaron de geles preparativos SDS-PAGE, se lavaron extensamente con PBS y se homogenizaron agregando 0.5 ml del adyuvante completo (primera inmunización) e adyuvante incompleto de Freund's para las siguientes inyecciones (Jurd y Bog-Hansen, 1990).

La emulsión se inyectó subcutáneamente en diversos sitios del conejo, repitiendo este procedimiento 6 veces con intervalos de 15 días entre inmunizaciones. La sangre extraída de los conejos se incubó a 37°C por 30 min, se centrifugó a 3,000 x g por 15 min a 4°C en una centrifuga Beckman J2-M1 (Beckman Instruments, Palo Alto CA, USA), decantándose el suero el cual contiene los anticuerpos. A estos anticuerpos policlonales se les denominó anti-82 y anti-75.

#### **Electrotransferencia.**

Los geles nativos y los de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa de 0.22 micras (MSI, Micron Separation Inc.). La electrotransferencia se realizó con un equipo Trans Blot Semi dry (Bio-Rad, Richmond CA, USA), a 20 volts/45 min (límite de corriente de 5.5 mA/cm<sup>2</sup>). El gel se preequilibró por 15 min con el buffer de transferencia Bjerrum y Schafer-Nielsen el cual contiene Tris 48 mM, glicina 39 mM y 20% de metanol, pH 9.2 (Bio-Rad, Richmond CA, USA).

### **Western Blot.**

Las proteínas inmovilizadas en membrana de nitrocelulosa se usaron para la identificación de hemocianina nativa y de sus subunidades. Para ello se emplearon los anticuerpos policlonales mencionados anteriormente (anti-82 y anti-75).

El procedimiento en general fue el siguiente: se bloqueó la membrana conteniendo las proteínas por 4 horas en el buffer TBST (Trizma base 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5, 0.05% Tween-20) con 5% de leche descremada. A continuación se incubó por 2 horas con el anticuerpo primario (anticuerpos policlonales anti-82 y anti-75), posteriormente se realizaron 5 lavados con TBST.

Una vez lavada la membrana se incubó por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo desarrollado en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina en una dilución 1:3000 (Bio-Rad, Richmond CA, USA), y se lavó de nuevo 5 veces. La reacción de color se llevó a cabo al agregar los reactivos A (Cloruro de tetrazolio en 70% de dimetilformamida) y B (Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3 indolil en dimetilformamida; Bio-Rad, Richmond CA, USA) en el buffer para desarrollo de color (Tris 0.1 M, pH 9.5).

Para la determinación del título del anticuerpo se probaron las diluciones 1:500; 1:1000; 1:5000; 1:10,000 y 1:20,000 en ensayo de manchas. Para los ensayos con las membranas y nivel de detección se utilizó una dilución 1:500 para el anticuerpo anti-82 y 1:1000 en el caso del anticuerpo anti-75.

### **Determinación del Contenido de Cobre:**

A lo largo de la purificación se tomaron alícuotas de las diferentes fases para determinar el contenido de cobre y relacionarla con la concentración de proteína de cada una de las muestras. Para la determinación de Cu se llevó a cabo una digestión de las muestras en un horno de microondas, seguido de la cuantificación por medio de absorción atómica utilizando un detector de flama en un espectrofotómetro AA20 (Varian, Malgrave, Australia) de acuerdo a García-Rico y Jara-Marini (en impresión). Las muestras analizadas fueron camarón completo, plasma de camarón, IV fracción del gradiente de densidad y las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad (IMAC).

### Caracterización de la hemocianina de *Penaeus vannamei*

#### Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) y nativas (PAGE):

Las fracciones con mayor cantidad de proteína provenientes de la cromatografía IMAC fueron dializadas con una solución de fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 15 mM, pH 7.5 a 4°C por 1 hr, empleando una membrana con tamaño de exclusión de 12-14 kDa (VWR Scientific, San Francisco CA, USA).

Con el fin de determinar el número y tamaño de las subunidades de hemocianina, se aplicaron 25 µg de proteína por pozo en un gel discontinuo 6-18% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Laemmli, 1970).

Se utilizó un gel de separación con pH de 8.8 y 6 a 18% de poliacrilamida, para obtener este gradiente se empleó un formador de gradiente (GIBCO BRL, Gaithersburg MD, USA). El gel superior o concentrador empleado contenía 4% de poliacrilamida y pH de 6.8%. Las corridas cromatográficas se llevaron a cabo en una cámara vertical V16 (Gibco BRL,

Gaithersburg MD, USA). El buffer de corrida fue Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1 %, pH 8.3.

La muestra se preparó añadiendo un volumen igual de buffer muestra 2X (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, pH 6.8). Los estándares de proteína empleados fueron miosina, 200 kDa;  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, 116.25 kDa; fosforilasa b de músculo de conejo, 97.4 kDa; albúmina de suero bovino, 66.2 kDa; albúmina de huevo, 45 kDa; anhidrasa carbónica bovina, 31 kDa; inhibidor de tripsina de soya, 21.5 kDa y lisozima de clara de huevo de 14.4 kDa (Bio-Rad, Richmond CA, USA). Tanto la muestra como los estándares de peso molecular fueron calentadas a 100°C por 8 min.

Se realizó también electroforesis en condiciones nativas de acuerdo a Laemmli (1970). Las soluciones de corrida, cámara y muestra fueron las descritas anteriormente, solo se omitió el agente desnaturizante (SDS) y el reductor  $\beta$ -mercaptoetanol. En el caso de los geles nativos los estándares de peso molecular fueron tiroglobulina 669 kDa, ferritina 440 kDa, catalasa 232 kDa, lactato deshidrogenasa 140 kDa y albúmina de suero bovina 67 kDa (Pharmacia LKB Biothecnology, Uppsala Suecia).

Los geles se corrieron utilizando una fuente de poder BRL 500 (Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA), en el caso de SDS-PAGE a 20 volts constantes

por 15 horas y para geles nativos se usó 20 mA por 18 horas. Como solución de tinción se empleó Coomassie blue R al 0.25%, ácido acético 10% y metanol al 40% durante 12 horas. Los geles fueron desteñidos con la solución antes citada pero sin el colorante.

Con el fin de identificar la presencia de hemocianina en geles nativos, se tiñó con una solución al 0.1% de dianisidina, 10% acetato de sodio 0.6 M, pH 5.7 y 30% etilen glicol (Manwell y Baker; 1963). La dianisidina reacciona con el cobre presente en la estructura proteica, dando como resultado un color café claro.

#### **Detección de carbohidratos asociados:**

La detección de carbohidratos asociados se realizó en geles SDS PAGE y nativos utilizando la tinción de PA/S de acuerdo al método de Zacharis modificado (Strömqvist y Gruffman, 1992). La identificación del tipo de carbohidratos asociado a cada una de las subunidades de hemocianina se realizó con lectinas biotiniladas. En este caso se probaron 7 diferentes lectinas: concanavalina A, *Dolichos biflorus*, *Arachis hypogea*, aglutinina de soya, *Ulex europaeus* y aglutinina de germen de trigo.

Las membranas con proteína inmovilizada fueron incubadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de la lectina en buffer TBS (Trizma base 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5) por 2 horas, después de 5 lavados por 5 min con el buffer TBST (TBS con 0.05% de Tween-20) se aplicó un amplificador de la señal agregando 2 gotas de los reactivos A (solución de avidina DH) y B (peroxidasa de rábano como enzima biotinilada) de Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA). Posteriormente para la reacción de color se utilizó 4-cloro-1-naftol al 0.05%, metanol 16%, 0.5% de peróxido de hidrógeno en TBS, incubándose las membranas de 15-30 min hasta la aparición de la señal (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA).

#### **Enfoque isoeléctrico en condiciones nativas.**

Para la determinación del punto isoeléctrico se utilizó el equipo Phast System Separation (Pharmacia, LKB Biotechnology, Uppsala Suecia), el cual emplea geles de poliacrilamida homogéneos (5%T, 3%C) conteniendo 2.6% de anfolitos. Al aplicar un voltaje de 540 volts/cm genera un gradiente de pH de 3 a 9, estable y lineal (Pharmacia, LKB Biotechnology, Uppsala Suecia).

La corrida del gel se llevó a cabo en tres pasos: precorrida del gel, entrada de la muestra y por último la corrida de la muestra. En estos tres pasos

permanece constante la corriente, la potencia y la temperatura (2.5 mA, 3.5 w y 15°C), y varía el voltaje aplicado (1000, 200 y 2000 respectivamente para cada paso) (Pharmacia, LKB Biotechnology, Uppsala Suecia).

La muestra fue dializada extensivamente contra agua desionizada y destilada de alta pureza por 24 horas a 5°C. Los estándares de punto isoelectrico empleados fueron una mezcla en el rango de pI 3.6 a 9.3 que incluía: amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* con pI 3.6, inhibidor de tripsina de soya con pI de 4.6,  $\beta$  lactoglobulina A de leche de bovino con pI de 5.1, anhidrasa carbónica II y I de eritrocitos de humano con pI de 5.9 y 6.6, mioglobina de corazón de caballo con pI de 6.8 y 7.2, lectina de *Lens culinaris* con pI de 8.2, 8.6 y 8.8, tripsinógeno de páncreas de bovino con pI de 9.3 (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA). El gel obtenido se tiñó con nitrato de plata (técnica 210, Phast System manual; Pharmacia, LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia).

#### **Composición de aminoácidos y determinación del amino terminal.**

Un gel preparativo SDS-PAGE homogéneo de 7.5% y conteniendo 200  $\mu$ g de proteína fue electrotransferido a membrana PVDF. La transferencia se realizó aplicando 20 volts por 45 min, las subunidades se tiñieron con una

solución de amido black 0.1%, ac. acético 10% y metanol al 40%, y se analizaron en la División de Biotecnología de la Universidad de Arizona, Tucson Arizona, USA.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Aislamiento de la hepcocianina de *Penaeus vannamei*

#### **Obtención de la hemolinfa:**

Se extrajo la hemolinfa de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en estadio juvenil. Los datos que se presentan corresponden a una preparación obtenida de 197 camarones, correspondiendo a 97 machos y 100 hembras (aunque se realizaron otras extracciones para obtener muestra con las cuales montar las técnicas de purificación). El peso promedio de los organismos fue de  $12.28 \pm 2.4$  gr, obteniendo un volumen de hemolinfa extraída por camarón de  $279.3 \pm 80$   $\mu$ l.

Los volúmenes totales obtenidos fueron de 27.4 ml para machos y 26.8 ml para hembras. A esta hemolinfa se le añadió un volumen igual de PBS conteniendo inhibidores, para posteriormente ser centrifugada a baja velocidad para remover los hemocitos. Este plasma diluido fue mantenido en refrigeración (por un máximo de 5 días), hasta el momento de ser utilizado.

### **Ultracentrifugación, fraccionamiento y análisis por SDS-PAGE.**

El primer paso para la purificación fue ultracentrifugación en gradiente de densidad, siguiendo lo recomendado por Yepiz-Plascencia y col. (1995). Se procedió posteriormente al fraccionamiento, obteniendo 4 fracciones con densidad ascendente (Figura 6). Al determinar la concentración de proteína se estimó un 96% de recuperación, distribuyéndose en las fracciones de la siguiente manera: 0.47, 4.84, 3.14 y 87.7%, la IV fracción presentaba color azul.

Se tomaron alícuotas que contenían 30 µg de proteína de cada una de las fracciones de hemolinfa de machos y se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Figura 7).

En los carriles 1 y 2 de la figura (correspondientes a las fracciones I y II de la ultracentrifugación) se detecta un barrido de proteína de alto peso molecular (aproximado a los 200 kDa), que corresponde a agregados lipoprotéicos previamente reportados (Yepiz Plascencia y col.: 1995).

Tanto en el carril M que contiene a la hemolinfa completa (plasma), como en los carriles 3 y 4 (fracciones III y IV) se pueden apreciar claramente dos bandas con pesos moleculares de 82 y 75 kDa, además de un barrido de proteína que abarca desde los 70 kDa hasta 30 kDa.

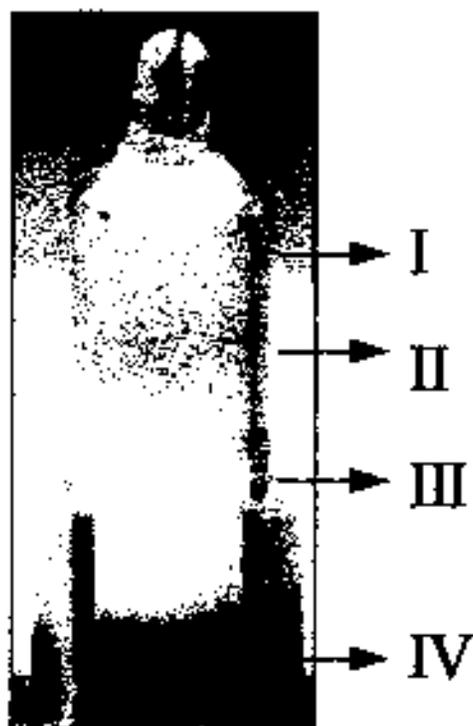


Figura 6: Gradiente de densidad de plasma diluido de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Con número se señalan cada una de las fracciones

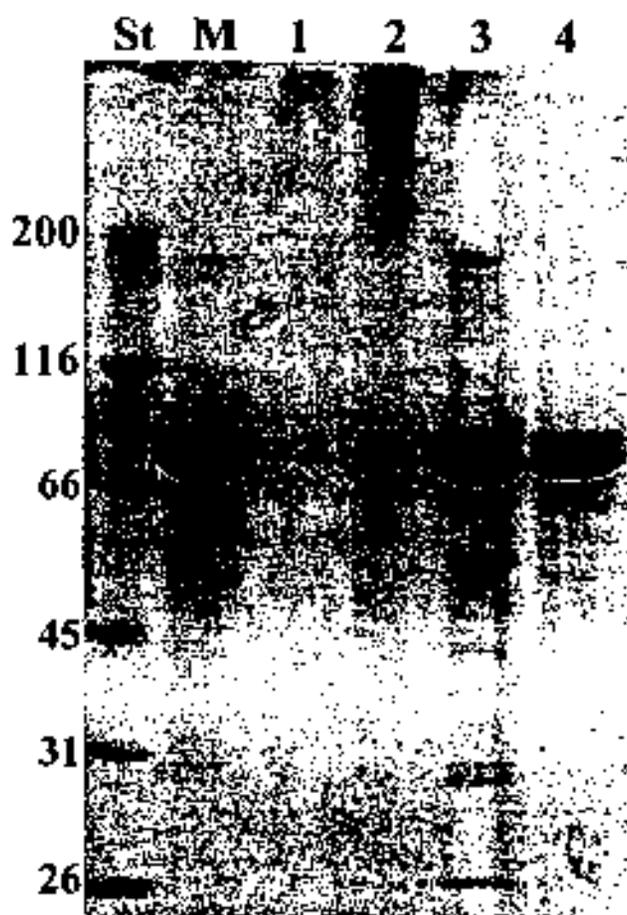


Figura 7: Análisis electroforético en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gradiente 6-18%, de las fracciones de plasma ultracentrifugado de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). En el carril M se aplicó plasma completo; carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a las fracciones I, II, III y IV del gradiente de densidad.

Considerando que en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) la hemocianina representa del 80 al 95% de la proteína de la hemolinfa (Cariolou y Flytzanis; 1993), y presenta un color azul al oxigenarse (Rainer y Brouwer; 1993), se concluyó que la IV fracción, la cual presenta ambas características, era la indicada para continuar con la purificación.

#### **Cromatografía por afinidad con ion metálico inmovilizado (IMAC).**

La cromatografía IMAC basa su especificidad y eficiencia en la formación de un enlace de coordinación entre los residuos de histidina expuestos y los átomos de metal inmovilizado en la matriz (Porath y col., 1993; Nanak y col., 1992; Holmes y col., 1992). Para romper esta unión y lograr la elusión de la proteína de interés se puede utilizar un gradiente de pH o la adición de un competidor como imidazol.

En este estudio se probaron ambos métodos, se empleó un gradiente de imidazol de 0.1 a 0.01 M, encontrando como resultado una elusión menos específica ya que se detectó en las fracciones proteínas no relacionadas a hemocianina. Por otro lado, al emplear un gradiente de pH se obtuvieron resultados satisfactorios, como se muestra a continuación.

**Gradiente de pH:** En la Figura 8 se muestra el cromatograma obtenido al emplear para la elusión un gradiente de pH. El pico A corresponde a la proteína no enlazada a la columna, y representa al 2.7 % de la proteína aplicada a la columna; el 87.3 % restante se eluyó con el gradiente de pH (pico B). El porcentaje de recuperación obtenido fue del 90%, y se tomaron alícuotas de las fracciones representativas para análisis por medio de electroforesis SDS-PAGE y PAGE.

Bajo condiciones nativas se utilizó la tinción con dianisidina para la localización de hemocianina. Esta tinción aprovecha las propiedades de la hemocianina como peroxidasa y se desarrolla un color naranja-café, esto siempre y cuando esté presente el cobre en la estructura ya que funciona como cofactor de la reacción (Chan y Weeks, 1992; Gould y Karolus, 1975).

En el panel A de la Figura 9 se muestra el gel en condiciones nativas. En el carril 1 se aplicó muestra antes de la cromatografía con el fin de utilizarla como control, en el carril 2 se encuentra la proteína no enlazada a la columna, los carriles del 3 al 6 corresponden a las fracciones eluidas con el gradiente de pH correspondientes a las fracciones 15 a 18 que se muestran en el cromatograma de la Figura 8.

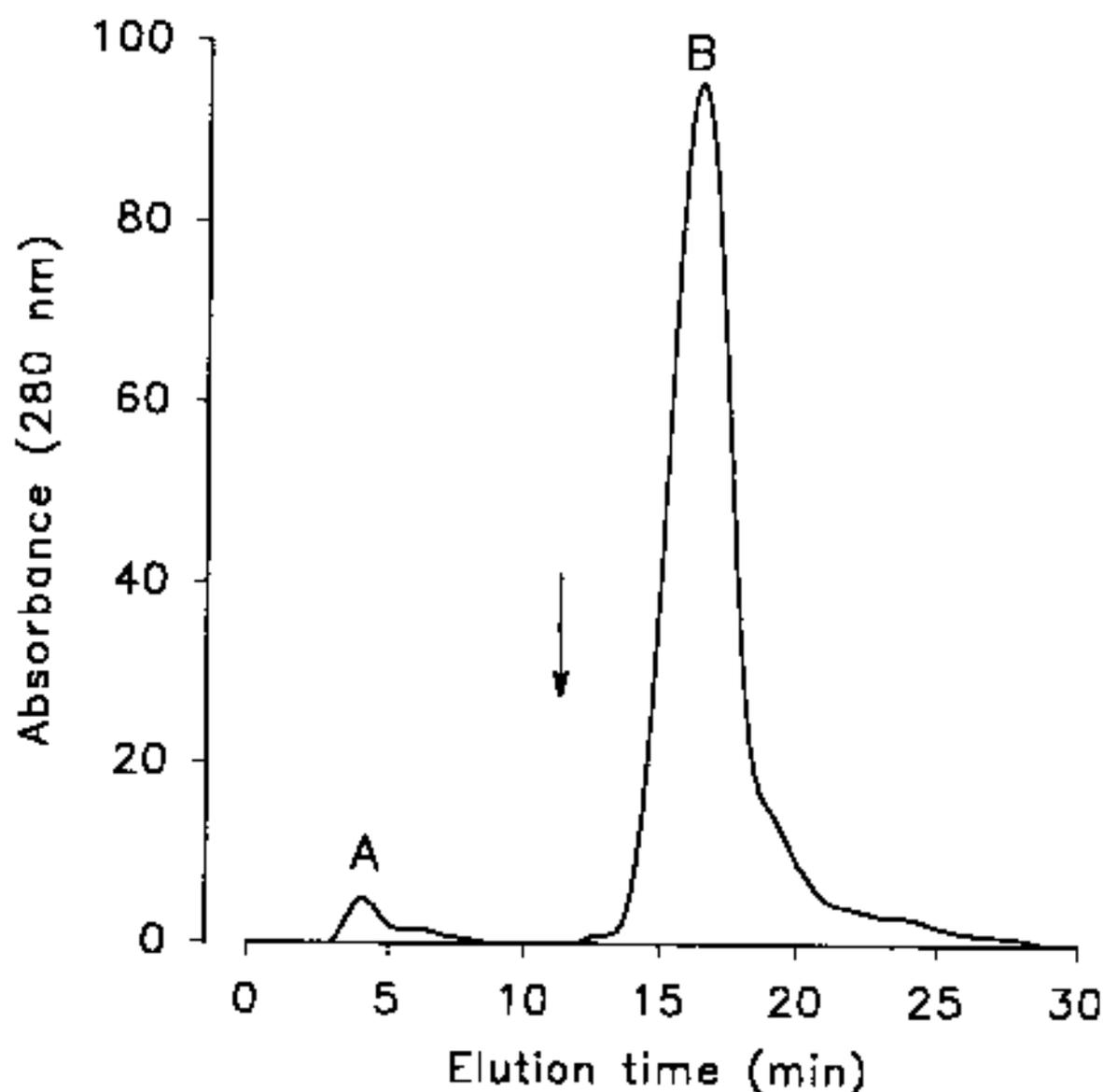


Figura 8: Cromatograma obtenido en la purificación de la hemocianina de camarón blanco, aplicando la técnica IMAC. Pico "A", proteína no enlazada a la columna; pico "B", proteína eluída con el gradiente de pH. La absorbancia está expresada en porcentaje, y con una flecha se señala el punto de aplicación del gradiente de pH.

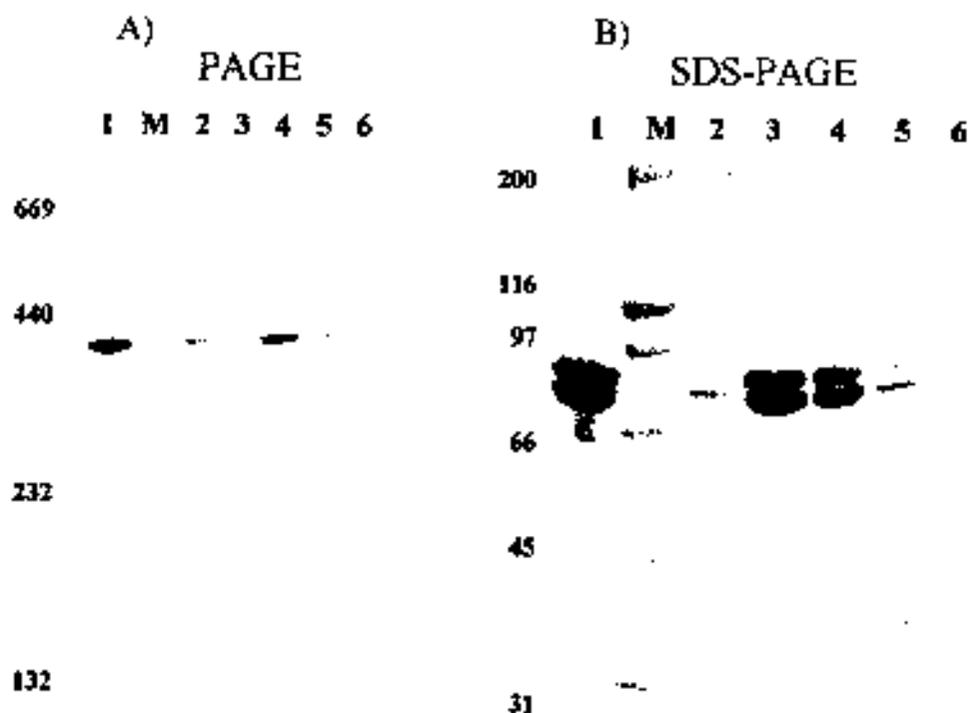


Figura 9: Análisis electroforético de fracciones provenientes de cromatografía IMAC. Panel A, estudio en condiciones nativas (PAGE) y panel B, bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE); carril 1, proteína antes de la cromatografía (IV fracción del gradiente de densidad); carril 2, proteína no enlazada a la columna; carriles del 3 al 6 fracciones eluidas al aplicar el gradiente de pH.

En todos los carriles, destaca una banda de 400 kDa, identificada con la solución de dianisidina y cuya movilidad relativa coincide con la hemocianina de *Penaeus monodon* (Ellerton y col., 1981). En los carriles 4 y 5 se observa una banda con peso molecular cercano a los 90 kDa, esta banda podría tratarse de unidades libres de hemocianina.

La Figura 9, panel B muestra el análisis bajo condiciones desnaturalizante y reductoras. En todos los carriles se pueden ver 2 bandas de 82 y 75 kDa, el peso molecular coincide con los reportados para las subunidades de hemocianina de *Penaeus setiferus* y *monodon* (Brouwer y col., 1978; Ellerton y col.; 1981).

En el carril 1 de ambos paneles, se observa una banda que no está presente en las fracciones eluidas con el gradiente de pH, y el peso molecular en cada caso es de 600 y 200 kDa (PAGE y SDS-PAGE respectivamente). Esta proteína podría ser fibrinógeno ya que tiene subunidades con peso molecular de 180 y 205 kDa (Martín y col.; 1991). Esta proteína cuya función es importante en el sistema de defensa, representa menos del 10% de la hemolinfa de crustáceos (Djangmah, 1970; Depledge y Bjerregaard, 1989).

Al analizar las Figuras 7 y 9, destaca el barrido de proteína que abarca desde 70 kDa hasta 30 kDa, este barrido presente en la muestra de hemolinfa sin tratamiento, y también después de los análisis de ultracentrifugación y

cromatográfico IMAC, podría tratarse de degradación de hemocianina o bien de una contaminación.

Después de analizar las fracciones provenientes de la cromatografía, se encontraron bandas protéicas en geles PAGE y SDS-PAGE, que coinciden con las reportadas para hemocianinas de otras especies de crustáceos. Para poder definir las posibles relaciones entre estas bandas, se realizaron detecciones con los anticuerpos preparados a partir de las bandas de 82 y 75 kDa. Al elaborar estos anticuerpos se consideró el alto potencial antigénico de hemocianina debido principalmente al alto contenido de carbohidratos y la variedad de su composición (Stoeva S. y col., 1995). Los objetivos a alcanzar con este análisis son:

1. Caracterización de ambos anticuerpos, determinando el título, nivel de detección y especificidad.
2. Establecer la posible relación de las subunidades de 82 y 75 kDa, respecto a las bandas de 400 y 90 kDa. Esto indicaría cual es la banda de la hemocianina nativa y cuales son subunidades libres de la misma.
3. Determinar la posible relación entre las bandas de 82 y 75 kDa y el barrido de proteína; lo cual indicaría que este barrido está relacionado con hemocianina y que podría ser producto de la degradación de la holoproteína.

### **Producción y caracterización de anticuerpos.**

Para la producción de estos anticuerpos se corrieron geles preparativos en condiciones desnaturalizantes y reductoras, utilizando para ello proteína de camarón blanco de machos, proveniente de la IV fracción del gradiente de densidad. Se tuvo el cuidado de obtener las bandas lo mas separadas posible en el gel para cortarlas e inmunizar con ellas a los conejos.

En total se realizaron 6 inmunizaciones con intervalos de 15 días entre las inyecciones. Una vez pasado este tiempo se extrajo la sangre, se dejo coagular y se centrifugó a baja velocidad para obtener finalmente el suero que contiene los anticuerpos policlonales.

Para la determinación del título de los anticuerpos, se realizaron ensayos de inmunodetección tipo western blot provenientes de geles en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Se probaron diferentes diluciones de los anticuerpos, desde 1:500 hasta 1:20,000, determinándose que en el caso del anticuerpo policlonal anti-82 el título fue 1:500 y para el anticuerpo anti-75 el título fue de 1:1000.

En la Figura 10 se presentan los resultados obtenidos respecto al nivel de detección. En este caso se corrió un gel en condiciones desnaturalizantes y reductoras, conteniendo diferentes concentraciones de proteína correspondiente a la IV fracción de plasma de macho. Se aplicaron concentraciones de 10, 1 (carril 1), 0.1 (carril 2), 0.01 y 0.001  $\mu\text{g}$  de proteína, posteriormente se electrotransfirió la proteína a membrana de nitrocelulosa.

Se obtuvo como resultado para ambos anticuerpos policlonales (anti-82 y anti-75) un nivel mínimo de detección de 0.1  $\mu\text{g}$  de proteína con dilución de los anticuerpos de 1:500 y 1:1000 respectivamente. Ambos anticuerpos reconocieron las bandas de 82 y 75 kDa y además el barrido de proteína con pesos moleculares de 70 a 30 kDa (en la figura solo se muestra el resultado obtenido con el anticuerpo anti-82).

En la figura se aprecia una tercera banda entre las subunidades de 82 y 75 kDa, a esta banda adicional se le determinó la composición de aminoácidos y secuencia de aminoácidos del termino amino, los resultados obtenidos son iguales a los detectados para la subunidad de 82 kDa. Esto nos indica que se trata posiblemente de una degradación de esta subunidad o bien del desprendimiento de carbohidratos o deglicosilación lo que provoca un ligero cambio en su peso molecular.



Figura 10: Nivel de detección de los anticuerpos policlonales elaborados contra las subunidades de hemocianina de camarón blanco. En ambos carriles se aplicó proteína proveniente de la IV fracción del gradiente de densidad, correspondiendo a la concentración de 1 y 0.1  $\mu\text{g}$  (carriles 1 y 2 respectivamente), la inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti-75 kDa.

En este mismo ensayo se puede detectar reactividad cruzada, ya que el anticuerpo anti-82 reconoce la banda de 75 kDa y el anticuerpo anti-75 reconoce la banda de 82 kDa.

### **Identificación de hemocianina y apohemocianina por medio de anticuerpos policlonales.**

En la Figura 11 se muestra los resultados obtenidos de un ensayo de inmunodetección con proteína en condiciones desnaturalizantes y reductoras, así como nativa (paneles A y B). El arreglo en ambos casos fue el mismo y se aplicó 30  $\mu$ g de proteína de hemolinfa completa (carril 1), y proteína pura obtenida de la cromatografía IMAC en gradiente de pH (carril 2). Como resultado se identificó positivamente tanto de las bandas de 82 y 75, así como el barrido de proteína con ambos anticuerpos (panel A).

También se puede apreciar que los anticuerpos no reconocieron a la proteína de 600 (PAGE) y 200 kDa (SDS-PAGE) presentes en el carril 1 de ambos paneles, por lo tanto la reacción de identificación es específica. En el caso de la proteína nativa (panel B) se detectó con ambos anticuerpos por separado la banda de 400 y 90 kDa.

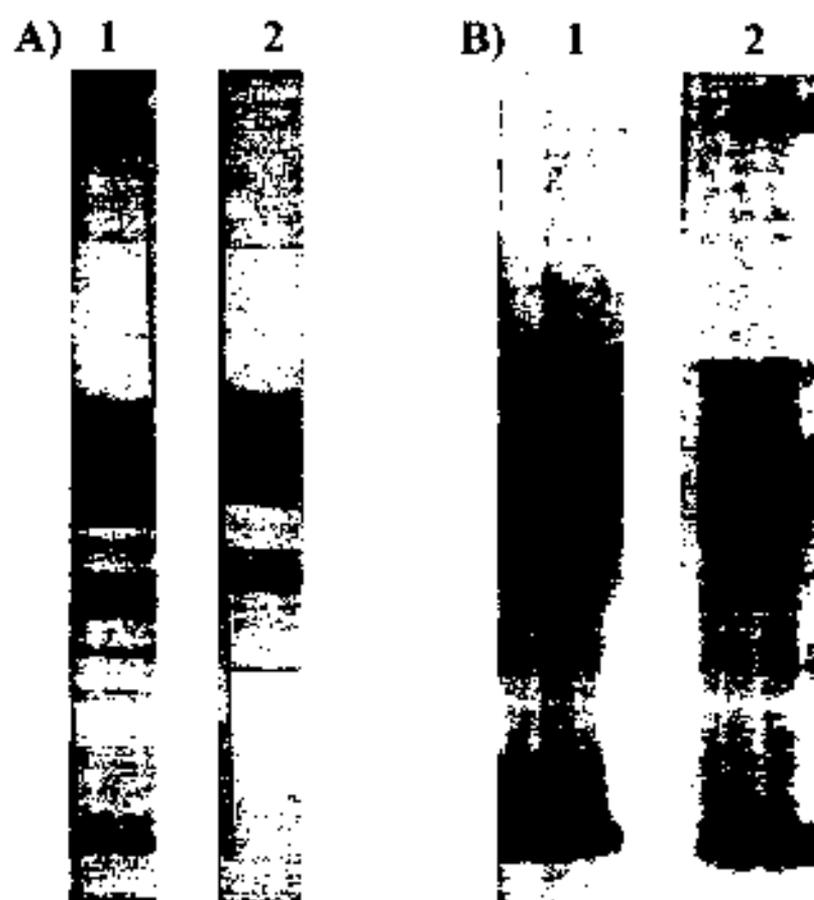


Figura 11: Identificación de hemocianina nativa y subunidades, utilizando anticuerpos policlonales. Panel A, análisis bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) y panel B, condiciones nativas (PAGE). Carril 1, hemolinfa completa; carril 2, fracción de cromatografía IMAC.

Si relacionamos los resultados obtenidos en los ensayos con los anticuerpos podemos concluir que la banda de 400 kDa, está relacionada inmunológicamente con las bandas de 82, 75 y el barrido de 70 a 30 kDa detectados en geles en condiciones desnaturizantes y reductoras. La utilización de anticuerpos es una herramienta muy poderosa que nos ayuda a confirmar la relación de unas bandas protéicas con otras, sin embargo no nos ayuda a entender totalmente la presencia del barrido de proteína que de alguna manera está ligado con hemocianina.

Para esclarecer este punto se realizó un análisis electroforético en condiciones desnaturizantes y reductoras, en el cual se aplicó 15 µg por pozo de IV fracción de muestreos realizados en diferentes fechas.

En la Figura 12 se muestra los resultados obtenidos con este análisis, se aplicó en los carriles del 1 al 8 muestras tomadas en los meses de marzo, abril, y junio de 1995, septiembre de 1994, mayo, junio, octubre y noviembre de 1993. Algunas de las muestras provienen de camarón silvestre y otras de camarón cultivado, y además diferentes anticoagulantes utilizados para la extracción de la muestra y varios sitios de captura.

Como resultado se obtuvo un patrón de bandas muy consistente, encontrando en todos los carriles las bandas de 82, 75 kDa, y el barrido de 70

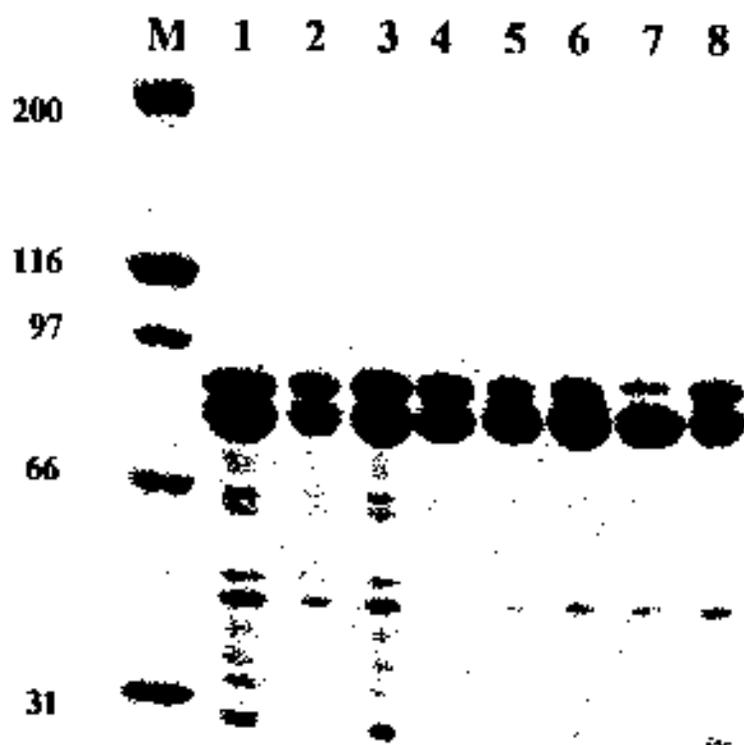


Figura 12: Análisis electroforético bajo condiciones desnaturizantes y reductoras de muestras tomadas a través del tiempo. Carriles del 1 al 8, IV fracción del gradiente de densidad de los meses de marzo, abril y junio de 1995; septiembre de 1994; mayo, junio, octubre y noviembre de 1993.

a 30 kDa. Se encontró un número igual de bandas en cada uno de los pozos, las diferencias detectadas se relaciona principalmente con la concentración de algunas de ellas.

Uno de los factores que podría influir en la aparición de estas bandas es el hecho de que las muestras analizadas provienen de la extracción de hemolinfa de varios camarones, pero esto es poco probable. Investigaciones de Miller y col. (1977) sobre hemolinfa de *Callinassa californiensis*, concluyen que la aparición de las múltiples bandas no obedecen al conjunto de hemolinfa de una población heterogénea, sino a la existencia de múltiples genes que codifican para subunidades de hemocianina diferentes o bien productos de modificaciones post-traduccionales de un solo gen (Miller y col., 1977).

También se realizó un estudio en dos especies de langostas muy cercanas *Homarus americanus* y *gammarus*, donde se encontró que la temperatura y dieta utilizada para el cultivo del crustáceo no afecta la aparición de las múltiples bandas (Mangum, 1993).

Numerosos estudios en hemocianina de diferentes crustáceos muestran diferencias en las subunidades ya sea en su movilidad electroforética, inmunogenicidad, topología oligomérica, estructura primaria y su función como ligadora de oxígeno (Markl y col., 1986; van Holde y Herskovits, 1988; Salvato

y Beltramini, 1990). Se reporta que la subunidad base para crustáceos tiene un coeficiente de sedimentación de 5S y aproximadamente 75 kDa, especulándose de 5 hasta 12 posibles subunidades heterogéneas por especie, detectadas en geles SDS-PAGE (van Bruggen y col., 1982).

Un ejemplo de esta microheterogeneidad se tiene en la hemocianina de la especie *Limulus polyphemus*, la cual está constituida por 8 subunidades inmunológicamente diferentes con pesos moleculares muy cercanos a 73 kDa (Magnus y col., 1991).

Este comportamiento de la proteína no tiene hasta el momento una explicación convincente, se especula sobre la influencia del pH de las soluciones utilizadas, pequeñas diferencias en la movilidad de la proteína debido a los carbohidratos asociados o bien el tener aminoácidos no convencionales en la estructura (Soeter y col., 1986).

Otra de las posibles explicaciones sería que estas pequeñas diferencias en la composición de estas unidades heterogéneas sean indispensables para el ensamblaje de la proteína a su estado nativo (Brenowitz y col., 1981). Sin embargo, esta misma heterogeneidad podría explicar la presencia de algunas de las bandas, pero la existencia de tantas y con pesos moleculares tan cercanos podría ser indicador de un factor adicional.

En la bibliografía se especula sobre la existencia de una cadena polipeptídica básica de muy bajo peso molecular (25 kDa para moluscos y 35 kDa para crustáceos) (Ghiretti-Magaldi y col., 1966). Esto coincide con el estudio de la hemocianina de *Carcinus maenas* en donde se identificaron 3 subunidades de 25, 50 y 75 kDa, sin embargo en este estudio tampoco queda claro si los componentes de menor peso molecular representan una apreciable porción de la proteína, si es un componente menor o bien si se trata de un artefacto producto de la técnica (Salvato y col., citado en Carpenter y van Holde, 1973).

Al realizar mapas peptídicos con la hemocianina de *Homarus americanus*, destacó la presencia de péptidos de una sola cadena de 35 kDa. En la hemocianina de *Homarus pomatia* se encontraron bandas de 25 y 50 kDa en geles SDS-PAGE reductor cuando la proteína fue tratada con ácidos fuertes (Carpenter y van Holde, 1973).

Sin embargo, estos resultados no siempre son reproducibles y dependen del tiempo y la temperatura del tratamiento efectuado. De cualquier forma, esta evidencia ha propiciado la teoría de que estas bandas de bajo peso molecular son inducidas por la hidrólisis ácida que afectan uniones peptídicas especialmente sensibles (Carpenter y van Holde, 1973).

En este estudio, solo se puede decir que el bandeo de 70 a 30 kDa es consistente, y probablemente se trate de péptidos que están relacionados con hemocianina. Si algunas de estas bandas son subunidades diferentes, o bien producto del tratamiento dado a la muestra o de degradación no se puede determinar en este momento, se recomienda el estudio de cada una de las bandas, su aislamiento y la reconstitución de la proteína funcional para esclarecer este punto.

#### **Contenido de cobre:**

Se le dio seguimiento a la purificación determinando el contenido de cobre en muestras tomadas a lo largo del proceso. Este metal está presente en la proteína y es el encargado de ligar al oxígeno, se estima que del total de Cu en crustáceos del 40 al 85% se encuentra en la hemolinfa (Depledge M.H., 1989). En la especie *Carcinus maenas* solo el 2.2% de Cu contenido en la hemolinfa no está ligado a hemocianina (Truchot J.P. y Boitel F., 1992)

Las muestras analizadas fueron: homogenizado de varios camarones, plasma completo, IV fracción del gradiente de densidad, y fracciones del gradiente de pH. Los análisis se realizaron por triplicado, determinándose el contenido de cobre por medio de absorción atómica.

La concentración de cobre se relacionó con el contenido de proteína de las muestras, estos resultados se muestran en la Tabla 2, encontrando similitud entre machos y hembras en los resultados obtenidos. Cabe hacer notar que a lo largo de la purificación se aumenta la relación Cu:proteína, y uno de los pasos en donde esta relación aumenta mas drásticamente, es al pasar de plasma a gradiente de densidad (IV fracción), purificándose 3 veces por la eliminación de compuestos como lipoproteínas entre otros. Se aumentó el grado de pureza hasta 6.3 veces partiendo del plasma completo a las fracciones de la cromatografía IMAC.

Tabla 2: Relación entre el contenido de cobre y proteína, en muestras tomadas a lo largo de la purificación de hemocianina de camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

Pasos de la purificación	Machos*	Hembras*	No. P**
Camarón completo	0.0016	0.00155	—
Plasma o hemolinfa	0.45	0.42	1
Gradiente de densidad (IV Fracción)	1.37	1.24	3
IMAC (Gradiente de pH)	2.76	2.86	6.3

\* unidades  $\mu\text{g Cu/mg}$  de proteína.

\*\* No. P: Número de veces que se purificó, a partir del plasma

Caracterización bioquímica parcial de la hemocianina de  
camarón blanco (*Penaeus vannamei*)

**Tamaño de la hemocianina nativa.**

Para estimar el tamaño de la hemocianina nativa se realizó un análisis electroforético de las fracciones en condiciones nativas (Figura 13). En este estudio se aplicó aproximadamente 40 µg de proteína por pozo, y las muestras analizadas fueron alícuotas de cada uno de los pasos de purificación. En el carril 1, hemolinfa completa; carril 2, IV fracción de ultracentrifugación y en el carril 3 proteína eluida de la columna de IMAC con gradiente de pH.

Al teñir con la solución de Coomassie 0.25 %, se encontró en cada uno de los carriles una proteína de aproximadamente 400 kDa. Esta banda presentó reacción positiva con dianisidina y con los anticuerpos policlonales contra las 2 subunidades de hemocianina.

Todas estas evidencias nos indican que el peso molecular de la hemocianina de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) estimado por electroforesis en condiciones nativas, es de aproximadamente 400 kDa y relacionándola con lo reportado para *Penaeus monodon* y *setiferus*, podemos especular de la presencia de un solo hexasmero (Mangum, 1983; Ellerton y Anderson, 1981).

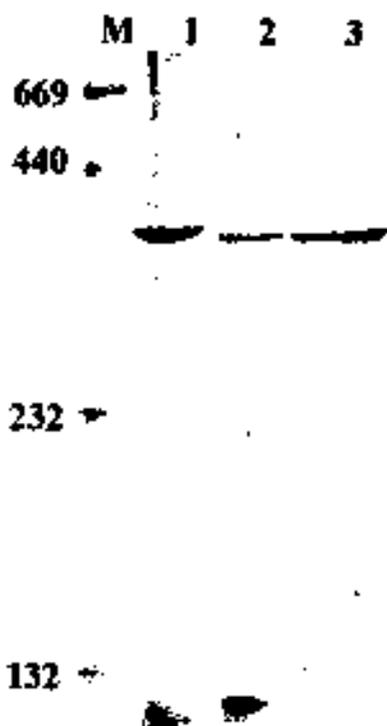


Figura 13: Análisis electroforético bajo condiciones nativas (PAGE), con muestras de los pasos de purificación. Carril 1, plasma completo; carril 2, IV fracción del gradiente de densidad; carril 3, fracción eluida de IMAC con gradiente de pH, la tinción se realizó con azul de coomassie.

### Número y peso molecular de las subunidades de hemocianina.

En la Figura 14 se muestra los resultados obtenidos en un estudio en el mismo formato que en la figura anterior, de nuevo se aplicó 30 µg de proteína en cada pozo. En todas las muestras se encontró de forma consistente 2 bandas muy cercanas y con abundante cantidad de proteína. Estas bandas tienen un peso molecular aproximado a 82 y 75 kDa, lo cual coincide con lo reportado para otros crustáceos, entre los que se incluyen langostas *Panulirus interruptus*, *Palinurus vulgaris*, cangrejos *Limulus polyphemus*, *Cancer magister* (Guzmán-Casado y col., 1990; Neuteboom y col., 1989; Magnus y col., 1991; Carpenter y col., 1973).

En particular, los reportes sobre las subunidades de pencidos presentan pesos mas cercanos, incluyendo las subunidades del camarón *Penaeus monodon* de 70, 77 y 86 kDa (van Holde y Miller, 1982),  *Palaemon elegans* de 72 y 75 kDa (Taylor y col., 1985) y las de *Penaeus setiferus* con subunidades de 82 y 77 kDa.

Además se reportó para *Penaeus setiferus* una relación entre las subunidades de 1:2.6 (Ellerton y Anderson, 1981), esto es cercano también a la proporción de nuestras bandas, ya que se calculó una relación de 1:1.5 entre la

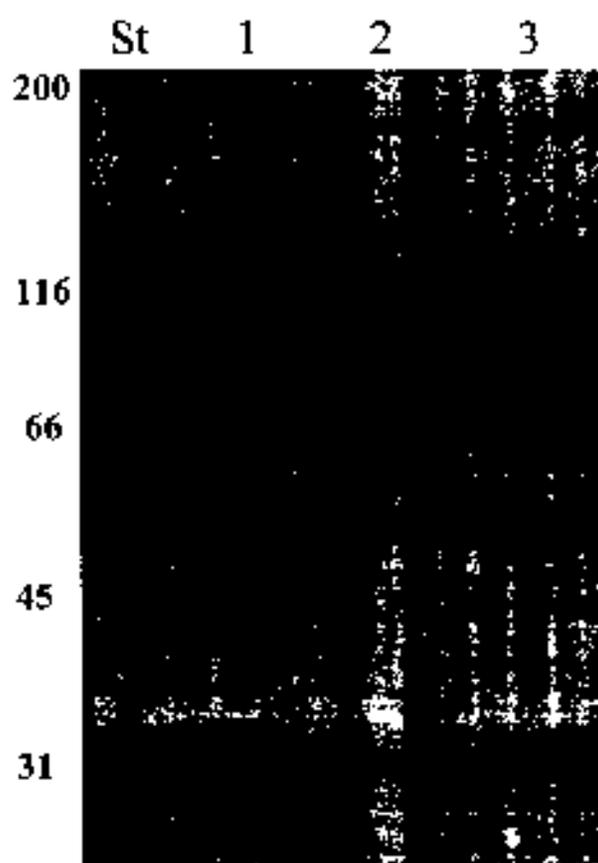


Figura 14: Análisis electroforético bajo condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE), con muestras de los pasos de purificación. Carril 1, plasma completo; carril 2, IV fracción del gradiente de densidad; carril 3, fracción eluida de IMAC con gradiente de pH.

subunidad de 82 y 75 kDa. Esta relación fue calculada realizando un barrido óptico de geles SDS-PAGE y relacionando la intensidad de tono de las bandas con la concentración de la proteína. El análisis de integración se realizó en una hoja de cálculo aplicando un programa estadístico diseñado por Alfonso Aguilar, en esta institución.

#### **Punto isoelectrico de la hemocianina nativa.**

Los resultados obtenidos en la determinación del punto isoelectrico se muestran en la Figura 15. En el carril 1 se aplicó muestra de la IV fracción y en el carril 2 una fracción eluida de IMAC con gradiente de pH.

Se pueden observar en el gel 2 bandas muy cercanas con pI de 4.8 y 4.9, y además se detectó otra banda con pI de 5.4 en el carril 1. Posiblemente la banda con pI de 5.4 provenga de la banda no identificada de 600 kDa, y presente en la IV fracción del gradiente de densidad.

Respecto a las bandas con pI de 4.8 y 4.9 posiblemente correspondan a hemocianina ya que además de ser las más intensas, están presentes en todas las muestras analizadas. Los pI son muy cercanos a los reportados para hemocianinas de otros artrópodos como la del molusco *Octopus tehuelchus* con

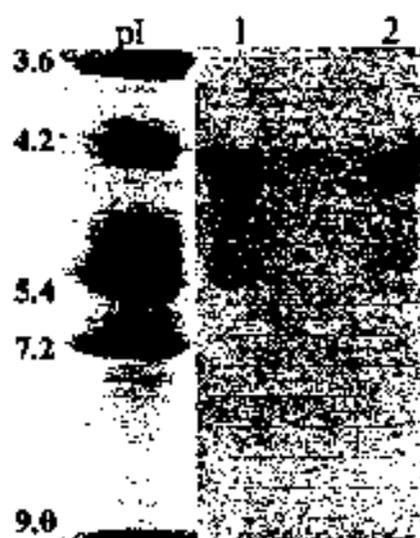


Figura 15: Determinación del punto isoelectrico de la hemocianina de camarón blanco. En el carril 1, IV fracción del gradiente de densidad; carril 2, fracción eluída de la columna IMAC con gradiente de pH.

pI de 5.1 (Heras y col., 1992), y con los pI de las 4 subunidades de cangrejo *Palunirus japonicus*, de 5.38 (79 kDa), 5.06 (84 kDa), 5.11 (88 kDa) y 5.10 (90 kDa) (Makino y col., 1988).

La presencia de las dos bandas en electroenfoque (4.8 y 4.9), coinciden con el hexámero de hemocianina y subunidades libres presentes en geles nativos (400 y 90 kDa), estas proteínas fueron además detectadas con los anticuerpos en el mismo sistema.

#### **Identificación de los carbohidratos asociados a hemocianina.**

La presencia de carbohidratos hemocianina se determino en geles nativos y desnaturalizantes y reductoras por medio del la reacción de Schiff's, el cual identifica carbohidratos en general. En estos geles se presentó reacción positiva en las bandas de 400 kDa (en geles nativos), 82, 75 y el barrido de 70 a 30 kDa, esto coincide con lo reportado en la bibliografía la cual menciona una concentración alta de carbohidratos, de un 8 a 10% en la hemocianina de crustáceos. Los carbohidratos constituyentes que se han detectado son fucosa, manosa, glucosamina, glucosa y galactosamina (van Holde y Miller, 1982).

Para identificar el tipo de carbohidrato asociado a las subunidades de hemocianina (bandas de 82 y 75 kDa), se corrió un gel SDS-PAGE y se aplicó

muestra de la IV fracción del gradiente de densidad. Posteriormente este gel fue electrotransferido a membrana de nitrocelulosa para realizar el análisis con las lectinas biotiniladas.

En la Tabla 3 se muestran las lectinas biotiniladas utilizadas, tipo de carbohidrato afin y resultado obtenido con el ensayo. Para ambas bandas (82 y 75 kDa) se presentó reacción positiva con lectinas específicas para los carbohidratos:  $\alpha$ -D-manosa,  $\alpha$ -D-glucosa,  $\alpha$ -L-fucosa,  $\beta$ -D-galactosamina y  $\beta$ -D-gal(1-3)D-N-acetil-galactosamina.

La presencia de manosa y glucosa coincide con lo reportado para la subunidad "a" (94 kDa) y la subunidad "c" (80 kDa) de la hemocianina de *Panulirus interruptus*, estas dos subunidades solo difieren en la posición y contenido de los carbohidratos (Vereijken y col., 1982; Neuteboom y col., 1992).

Los carbohidratos de las bandas de 75 y 82 kDa de la hemocianina de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), coinciden con los carbohidratos detectados en la hemocianina de *Rapana thomasi* incluyendo a manosa, galactosa y fucosa, con técnicas de cromatografía gas-líquida en esta especie se detectó además xylosa, 3-O-methylgalactosamina y N-acetilglucosamina (Stoeva y col., 1995).

Tabla 3: Interacción de lectinas con las subunidades de hemocianina de 82 y 75 kDa del camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

Lectina	Carbohidrato afín	Identificación (82 y 75 kDa)
ConA	$\alpha$ -D-manosa $\alpha$ -D-glucosa	Positiva
UEA I	$\alpha$ -L-fucosa	Positiva
WGA	(D-N-acetil-glucosamina) <sub>2</sub>	Negativa
SBA	D-N-acetil-galactosamina	Negativa
DBA	$\alpha$ -D-N-acetil-galactosamina	Positiva
PNA	$\beta$ -D-gal-(1-3) D-N-acetil-galactosamina	Positiva
RCA	$\beta$ -D-galactosamina	Negativa

### Composición de aminoácidos.

Con el fin de obtener mas información sobre las bandas de 82 y 75 kDa, se procedió a determinar la composición de aminoácidos y la secuencia de aminoácidos del extremo terminal amino de ambas bandas.

Se corrió un gel preparativo SDS-PAGE, aplicando 200 µg de proteína de machos de una de las fracciones eluidas de IMAC con el gradiente de pH y se enfatizó la perfecta separación de las bandas. El gel se transfirió a membrana PVDF, se tiñó con anido black al 0.5 % y se cortaron las bandas para posteriormente ser analizadas.

Los resultados obtenidos sobre composición de aminoácidos se muestran en la Tabla 4, en total se reportan 17 aminoácidos analizados.

Al comparar la composición de aminoácidos de las bandas de 82 y 75 kDa con las reportadas para subunidades de hemocianina de 75 kDa aisladas de otros crustáceos, como lo son *Penaeus monodon*, *Panulirus interruptus* y *Cancer magister* (Ghiretti-Malgaldi, 1966; Kuiper y col., 1975; Ellerton y Anderson, 1981), destaca la elevada concentración del ácido aspártico + asparagina y ácido glutámico + glutamina que representan el 24% del total de aminoácidos.

Tabla 4: Composición de aminoácidos de subunidades de hemocianina en diferentes crustáceos. Las columnas 1 y 2 corresponden a las subunidades de hemocianina de camarón blanco (82 y 75 kDa), expresadas en mol %.

Aminoácido	82 kDa	75 kDa	<i>Penaeus monodon</i>	<i>Panulirus interruptus</i>	<i>Cancer magister</i>
ASX	12.8	14.71	14.87	14.52	14.07
GLX	11.01	10.74	11.30	11.64	11.27
Serina	4.77	4.97	3.16	4.07	4.05
Glicina	11.31	9.75	3.47	3.64	2.90
Histidina	4.09	4.57	6.33	7.31	7.20
Arginina	4.83	5.14	7.99	6.85	6.22
Treonina	3.72	4.19	5.08	4.61	4.71
Alanina	7.43	6.35	4.18	3.32	3.46
Prolina	5.28	5.06	5.26	3.89	3.92
Tirosina	2.98	3.73	3.86	6.18	6.14
Valina	7.40	6.39	6.53	5.03	6.09
Metionina	0.85	0.77	0.78	2.78	2.65
Cisteina	0.10	0.18	0.57	0.72	0.42
Isoleucina	4.61	4.49	4.64	5.43	4.31
Leucina	8.00	7.63	7.61	8.00	7.07
Fenilalanina	5.55	5.88	6.89	7.57	7.33
Lisina	5.41	5.64	8.20	5.14	5.24

ASX: Acido aspártico + asparagina.

GLX: Acido glutámico + glutamina.

*P. monodon* (EBerton y Anderson, 1981).

*P. interruptus* y *C. magister* (Kuiper y col, 1975).

El menor contenido correspondió al aminoácido cisteína con 0.1% y metionina con 0.85%, éstas tendencias son características en este tipo de proteínas (Carpenter y van Holde, 1973; van Holde y Miller, 1982).

Desafortunadamente la concentración de glicina fue sobrestimada debido a la utilización de una solución conteniendo glicina para la electrotransferencia, esta contaminación afecta de igual manera la determinación del resto de los aminoácidos por lo que solo se discuten las tendencias.

#### **Determinación del amino terminal.**

Respecto a la determinación de la secuencia de aminoácidos del amino terminal, los resultados obtenidos para ambas subunidades se muestran en la Figura 16.

Subunidad de 82 kDa. Se logró secuenciar 20 aminoácidos de la subunidad de 82 kDa, teniendo como aminoácido terminal a la arginina, al igual que las subunidades de hemocianina del camarón *Penaeus monodon* (Fillerton y col; 1981).

Al comparar esta secuencia con otras reportadas utilizando el método FASTA (Lipman y Pearson, 1985), se encontró un 58.8% de residuos idénticos

A)

82 kDa: R A G G E S D A Q K Q H D V N F L L H K  
 Cd Mi: D S G G A S D A Q K Q H D V N Y L L F K  
 Cm 3: S P G G A S D A Q K Q H D V N S L L X K  
 Pi a: D A L G T G N A Q K Q Q D I N H L L D K

B)

75 kDa: D V Q Q Q K D V I Y L L N K I Y G D I Q D G D L D  
 Pi c: L A Q K Q H D V N Y L V Y K L Y G D I R D D H L K

C)

82 kDa: R A G G E S D A Q K Q H D V N F L L H K  
 75 kDa: D V Q Q Q K D V L Y L L N K

Figura 16: Comparación de la secuencia del extremo amino terminal de las subunidades de 82 y 75 kDa de hemocianina de camarón blanco. Panel A y B, comparación de la subunidades de 82 kDa y 75 kDa respecto a subunidades de *Cherax destructor* (Cd Mi); *Carcinus maenas* (Cm 3) y *Panulirus interruptus* (Pi, subunidad a y c). Panel C, se comparan las secuencias de las subunidades de 82 y 75 kDa, entre si. Los aminoácidos encerradas en cuadros señalan secuencias iguales.

y homología (considerando la sustitución de aminoácidos en forma conservada) del 75% respecto a la parte amino de la subunidad "a" tipo alfa de la hemocianina de la langosta *Panulirus interruptus* (Neuteboom y col., 1989).

También se comparó la secuencia de aminoácidos de la banda de 82 kDa con otras reportadas para las subunidades de hemocianina del cangrejo *Cherax destructor*, encontrando un porcentaje de residuos idénticos del 70% y 90% de homología. En el caso de la subunidad de hemocianina del cangrejo *Carcinus maenas*, se encontró un 60% de residuos idénticos y un 89% de homología (Neuteboom y col., 1989). Esto indica que muy posiblemente la subunidad de 82 kDa sea del tipo alfa, que se encuentra en todos los crustáceos con poca variación entre las mismas (Markl y col., 1986).

Subunidad de 75 kDa. Respecto a la subunidad de 75 kDa, se logró secuenciar 25 aminoácidos (Figura 16), determinándose que el aminoácido terminal fue ácido aspártico, este aminoácido es también el amino terminal de las subunidades 80 y 70 kDa de la hemocianina de cangrejo *Cancer magister* (Carpenter y van Holde, 1973).

Al comparar esta secuencia con otras reportadas destacó la homología respecto a la subunidad "c" tipo gama de la hemocianina de *Panulirus interruptus*, el porcentaje de residuos idénticos fue del 59.1% mientras que el de homología fue del 88%. Considerando que existe reactividad cruzada entre las dos subunidades, se puede pensar que esta subunidad de 75 kDa sea del tipo gamma, ya que presentan relación inmunológica, aunque varía su composición de aminoácidos (Markl, 1986).

Confirmando lo anterior, existen reportes en otra especie de camarón  *Palaemon elegans*, cuya hemocianina presenta dos subunidades 72 y 75 kDa (alfa y gamma), y los anticuerpos muestran reactividad cruzada (Taylor y col., 1985; Markl y col., 1986).

Una de las características para identificar una subunidad tipo gama, es la presencia de una extensión de 6 residuos aminoácidos respecto a la subunidad alfa (Neutchoom y col., 1992). Al comparar las dos subunidades dejando 6 residuos libres en el amino terminal de la subunidad de 82 kDa, se obtuvo un 57.1% de residuos idénticos y un 92.8% de homología como se muestra en la Figura 16.

Por estar las subunidades de 82 y 75 kDa inmunológicamente relacionadas, por presentar alta similitud con las secuencias de aminoácidos de otros crustáceos y debido a la presencia de la extensión de 6 residuos aminoácidos en la subunidad de 82 kDa, podemos considerar que la subunidad de 75 kDa sea tipo alfa, mientras que la subunidad de 82 será tipo gamma.

## CONCLUSIONES

1.- El sistema de purificación propuesto consistente en ultracentrifugación y cromatografía de afinidad con ion metálico inmovilizado (IMAC), fue adecuado para el aislamiento de la hemocianina de camarón blanco.

2.- La matriz de iminodiacetato con níquel (IDA-Ni), utilizado en IMAC enlazó a la hemocianina. Para la elusión de esta proteína la mayor especificidad se logró con el gradiente de pH.

3.- La relación entre el contenido de Cu y proteína de muestras tomadas a la largo de la purificación nos indica una purificación de 6.9 veces, partiendo del plasma completo (hemolinfa) a las fracciones eluidas con gradiente de pH en la cromatografía de afinidad IMAC.

4.- No se encontró diferencia en las características bioquímicas de la hemocianina asociada al sexo, en camarón en estadio juvenil.

5.- La movilidad relativa de la hemocianina en geles nativos fue aproximada a los 400 kDa, además se encontró una banda de 90 kDa, que posiblemente se trate de subunidades libres de apo-hemocianina. Bajo este mismo sistema se encontraron dos puntos isoelectricos de 4.8 y 4.9.

6.- Se identificaron 2 subunidades de hemocianina con pesos moleculares de 82 y 75 kDa en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras. En estos geles además se presentó un bandeo de 70 a 30 kDa el cual es independiente del tipo de camarón (silvestre o cultivado), del anticoagulante utilizado para la extracción de la muestra o del sitio de captura.

7.- Los anticuerpos policlonales producidos contra las bandas de 82 y 75 kDa por separado, presentaron reactividad cruzada. Ambos anticuerpos tienen un nivel mínimo de detección de 0.1  $\mu$ g de hemocianina, con diluciones de 1:1000 y 1:500, en otras palabras el título es de 1:1000 y 1:500 para los anticuerpos anti-82 y anti 75 respectivamente.

8.- Ambos anticuerpos identificaron las bandas de 400, 90 (en condiciones nativas), 82, 75 y el bandeo de 70 a 30 kDa (en condiciones desnaturalizantes y reductoras); por lo que se confirma que todas estas bandas están relacionadas con la hemocianina de camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

9.- Las subunidades de 82 y 75 kDa se encuentran glicosiladas, y se identificaron como carbohidratos enlazados:  $\alpha$ -D-manosa,  $\alpha$ -D-glucosa,  $\alpha$ -L-fucosa,  $\beta$ -D-galactosamina y  $\beta$ -D-gal(1-3)D-N-acetil-galactosamina.

10.- Para las subunidades de 82 y 75 se encontró que el ácido aspártico + asparagina representa el 24% del total de aminoácidos. mientras que el que presentó menor contenido fue cisteína con 0.1% y de metionina con 0.84%.

11.- Para la subunidad de 82 kDa se secuenciaron 20 aminoácidos y el aminoácido terminal es arginina, lo cual concuerda con lo reportado para el camarón *Penaeus monodon* (Ellerton y col., 1981). Esta subunidad presenta un 58.8% de residuos idénticos y un 75% de homología con la subunidad "a" tipo alfa de *Panulirus interruptus*. Un 70% de residuos idénticos y un 90% de homología en el caso de la subunidad de 82 kDa de *Cherax destructor*, y para *Carcinus maenas*, se encontró un 60% de residuos idénticos y un 89% de homología (Neutchoom y col., 1989).

12.- Para la subunidad de 75 kDa se secuenciaron 25 aminoácidos y el aminoácido terminal fue ácido aspártico, similar a las subunidades de 80 y 70 kDa de *Cancer magister* (Carpenter y van Holde, 1973). La secuencia del amino terminal de la subunidad de 75 kDa tiene un 59.1% de residuos idénticos y un 88% de homología con la subunidad "c" tipo gamma de la hemocianina de *Panulirus interruptus* (Markl, 1986).

13.- Al comparar las secuencias de las subunidades de 82 y 75 kDa entre sí, se encontró un 57.1% de residuos idénticos y un 92.8% de homología. La

homología entre ambas subunidades se presenta solo si se dejan 6 residuos libres en el amino terminal de la subunidad de 82 kDa, esta es una característica de las subunidades tipo gamma, por lo que se concluye que la subunidad de 82 kDa posiblemente sea de este tipo. Mientras que la subunidad de 75 kDa posiblemente se trata de una subunidad tipo alfa; ya que estos tipos de subunidades están relacionadas inmunológicamente.

## BIBLIOGRAFIA

- Akiyama D.M. y Dominy W.G.** 1992. Penaeid Shrimp for the Commercial Feed Industry. American Soybean Association. 1-48.
- Belleli A., Giardina B., Corda M., Pellegrini M.G., Cau A., Condo S.G. y Brunori M.** 1988. Sexual and Seasonal Variability of Lobster Hemocyanin. Comparative of biochemistry and physiology. 91A:443-449.
- 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.
- Brenowitz M., Bonaventura C., Bonaventura J. y Gianazza E.** 1981. Subunit composition of a high molecular weight oligomer: *Limulus polyphemus* hemocyanin. Archives of biochemistry and biophysics. 210(2):748-761.
- Brouwer M., Bonaventura C. y Bonaventura J.** 1978. Analysis of the effect of three different Allosteric Ligands on Oxygen binding by Hemocyanin of the Shrimp, *Penaeus setiferus*. Biochemistry. 17:2148-2154.
- Burnett L.E.** 1992. Integrated function of the respiratory pigment hemocyanin in crabs. American zoology. 32:438-446.
- Busselen P.** 1970. The electrophoretic heterogeneity of *Carcinus maens* hemocyanin. Archives of biochemistry and Biophysics. 137:415-420.
- Callicott K.A. y Mangum C.P.** 1993. Phenotypic variation and lability of the subunit composition of the hemocyanin of *Uca pugilator*. Journal of experimental marine biology and ecology. 165:143-159.
- Cariolou M.A. y Flytzanis C.N.** 1993. Sex-specific gene expression in tissues distinct of the shrimp *Penaeus vannamei*. Comparative of biochemistry and physiology. 106B(3):705-716.

- Carpenter D.E. y Van Holde K.E.** 1973. Amino acid composition, amino-terminal analysis, and subunit structure of *Cancer magister* hemocyanin. *Biochemistry*. 12(12):2231-2238.
- Chan H.M. y Weeks J.M.** 1992. The subunit structural composition of amphipod haemocyanin (Crustacea; amphipoda; talitridae). *Comparative of biochemistry and physiology*. 101B(4):567-572.
- Chen J. C. y Cheng S.Y.** 1993. Studies on haemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. *Comparative of biochemistry and physiology*. 106B(2):293-296.
- Chung B.H., Segrest. J.P., Ray M.J., Bruznell J.D., Hokanson J.E., Krauss R.M., Beaundrie K. y Cone J.T.** 1986. Single Vertical Spin Density Gradient Ultracentrifugación. "Methods in Enzimology". Vol. 128. Academic Press, Inc. Orlando FL, USA.
- Condo S.G., Pellegrini M.G., Corda M., Sanna M.T., Cau A. y Giardina B.** 1991. Lobster Haemocyanin. Influence of acclimatization on subunit composition and functional properties. *Biochemistry Journal*. 277:419-421.
- Depledge M.H. y Bjerregaard P.** 1989. Haemolymph protein composition and copper levels in decapod crustaceans. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*. 43:207-223.
- Depledge M.H.** 1989d. Studies on copper and iron concentrations, distributions and uptake in the brachyuran *Carcinus maens* following starvation. *Ophelia* 30(3):187-197.
- Depledge M.H.** 1989b. Re-evaluation of metabolic requirements for copper and zinc in Decapod Crustaceans. *Marine Environmental Research*. 27:115-126.
- Djangmah J.S.** 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). *Comparative of biochemistry and physiology*. 32:709-731.

- Donker M.H., Koevoets P., Verkleij J.A.C. y van Straalen N.M.** 1990. Metal binding compounds in hepatopancreas and haemolymph of *Porcellia scaber* (Isopoda) from contaminated and reference areas. Comparative of biochemistry and physiology. 97C(1):119-121.
- Ellerton H.D. y Anderson D.M.** 1981. Subunit structure of the hemocyanin from the prawn *Penaeus monodon*. Invertebrate oxygen-binding proteins. Structure, active site and function. 159-165.
- Ghiretti-Magaldi A., Nuzzolo C. y Ghiretti F.** 1966. Chemical studies on hemocyanins. I. Amino acid composition. Biochemistry. 5(6):1943-1951.
- Gould E. y Karolus J.J.** 1975. A new stain for copper-protein complexes, its use with crustacean hemocyanins. Analytical Biochemical. 67:515-519.
- García-Rico L., Jara-Marín M.** Aplicación de microondas en la digestión de hígado de bovino para cunatificación de metales pesados. International journal of enviromental pollution (in press).
- Griffith O.M.** 1986. Techniques of Preparative, Zonal and Continuous Flow Ultracentrifugacion. Aplicacions Research Dept. Spinco Div. Beckman Instruments. Inc.
- Guzman-Casados M., Parody-Morreale A., Mateo P.L. y Sanchez-Ruiz J.M.** 1990. Differential scanning calorimetry of lobster haemocyanin. European journal of biochemistry. 188:181-185.
- Hagerman L. y Weber R.E.** 1981. Respiratory rate, haemolymph oxygen tension and haemocyanin level in the shrimp *Palaeomon adspersus* Rathke. Journal of experimental marine biology and ecology. 54:13-20.
- Heras H. y Pollero R.** 1992. Hemocyanin as an apolipoprotein in the hemolymph of the cephalopod *Octopus tewelchus*. Biochimica et biophysica acta. 1125:245-250.
- Herskovits T.T.** 1988. Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins. Comparative of biochemistry and physiology. 91B(4):597-611.

- Holmes L.D., Serag A.A., Plunkett S.D., Todd R.J. y Arnold F.H.** 1992. Metal-affinity electrophoresis of histidine-containing proteins. *Methods: A companion to methods in enzymology*. 4:103-108.
- INEGI.** 1995. Anuario Estadístico del Estado de Sonora. Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática. Ed. Gobierno del Estado de Sonora. 276-282.
- 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. *Comparative of biochemistry and physiology*. 73B(4):983-990.
- Jeker 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 behavior of subunit a and b and polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS. *European journal of biochemistry*. 178:403-412.
- Jurd R.D. y Bog-Hansen T.C.** 1990. Production of polyvalent antibodies for immunoelectrophoresis. *Gel electrophoresis of proteins. The practical approach series*. D. Rickwood & B.D. Harris (eds). IRL Press. 366-376.
- Khayat M., Shenker O., Funkenstein B., Tam M., Lubzens E y Tietz A.** 1994. Fat transport in the penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* (De Haan). *The Israeli journal of aquaculture-Bamidgeh*. 46(1):22-32.
- Klarman A. y Daniel E.** 1981. Structural basis of subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. *Comparative of biochemistry and physiology*. 70B:115-123.
- Kuiper H.A., Gaastra W., Beintema J.J., van Bruggen E.F.J., Schepman A.M.H y Drenth J.** 1975. Subunit composition, X-ray diffraction, amino acid analysis and oxygen binding behaviour of *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Journal of molecular biology*. 99:619-629.
- Laemmli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.

- Lipman D.J. y Pearson W.R.** 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*. 227:1435-1441.
- Lorösch J. y Haase W.** 1986. Cobalt(II)-hemocyanin: A model for the cuprous deoxy protein giving evidence for a bridging ligand in the active site. *Biochemistry*. 25:5850-5857.
- Magnus K.A., Lattman E. E., Volbeda A. y Hol W.G.J.** 1991. Hexamers of subunit II from *Limulus* hemocyanin (a 48-mer) have the same quaternary structure as whole *Panulirus* hemocyanin molecules. *Protein*. 9:240-247.
- Mangum C.P.** 1983. Oxygen transport in the blood. The biology of crustacea. In internal anatomy and physiological regulation. 5(7):373-429. Academic Press, Inc. New York.
- Mangum C.P.** 1993. Hemocyanin subunit composition and oxygen binding in two species of the lobster genus *Homarus* and their hybrids. *Biol. Bull.* 184:105-113.
- Manwell C. y Baker C. M. A.** 1963. Starch gel electrophoresis of sera from some marine arthropods: studies on the heterogeneity of hemocyanin and on a "Ceruloplasmin-like protein". *Comparative of biochemistry and physiology*. 8:193-208.
- Markl J.** 1986. Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from Arthropods. *Biol. Bull.* 171:90-115.
- Markl J., Stöcker W., Runzler R. y Precht E.** 1986. Immunological correspondences between the hemocyanin subunits of 86 arthropods: Evolution of a multigene Protein family. *Invertebrate Oxygen Carriers*. 281-291. Ed. Bernd Linzen. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Markl J., Hofer A., Bauer G., Markl A., Kempter B., Brenzinger M. y Linzen B.** 1979. Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: II Crustacea. *Journal of comparative and physiology*. 133:167-175.
- Makino N. y Kimura S.** 1988. Subunits of *Panulirus japonicus* hemocyanin. I. Isolation and properties. *European journal of biochemistry*. 173:423-430.

- Martin G.G., Hose J.E., Omori S. y Chong C.** 1991. Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comparative of biochemistry and physiology*.100(3): 517-522.
- Miller K. I., Eldred N.W., Arisska F. y Van Holde K.E.** 1977. Structure and function of hemocyanin from *Thalassinid* Shrimp. *Journal of comparative and physiology*. 115:171-184.
- Nanak E., Abdul-Nour J. y Vijayalakshmi M.A.** 1992. Metal affinity electrophoresis: An analytical tool. *Methods*. 4:97-102.
- Neuteboom B., Dokter W., Van Gijsen J., Rensink H., de Vries J. y Beintema J.J.** 1989. Partial amino acid sequence of a hemocyanin subunit from *Palinurus vulgaris*. *Comparative of biochemistry and physiology*. 94B(3):593-597.
- Neuteboom B., Sierdsema S.J. y Beintema J. J.** 1989. The relationship between N-Terminal sequences and immunological characterization of crustacean hemocyanins. *Comparative of biochemistry and physiology*. 94B(3):587-592.
- Neuteboom B., Jekel P.A. y Beintema J.J.** 1992. Primary structure of hemocyanin subunit c from *Panulirus interruptus*. *European journal of biochemistry*. 206:243-249.
- Osterman L.A.** 1984. *Methods of Protein and Nucleic Acid Research*. Vol 1. Cap. 1. Springer-Verlang, Berlin, Alemania.
- Porath J. y Olin, B.** 1983. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*. 3(4):263-281.
- Rainer J. y Brouwer M.** 1993. Hemocyanin synthesis in the Blue Crab *Callinectes sapidus*. *Comparative of biochemistry and physiology*. 104B(1):69-73.

- Rochu D. y Fine J.M.** 1984. *Cancer pagurus* hemocyanin: subunit arrangement and subunit evolution in functional polymeric forms. *Comparative of biochemistry and physiology*. 78B(1):67-74.
- Salvato B. y Beltrantini M.** 1990. Hemocyanins: molecular architecture, structure and reactivity of the binuclear copper active site. *Life chemistry reports*. 8:1-47.
- Socter N.M., Beintema J.J., Jekel P.A., Bak H.J., Vereijken J.J y Neuteboom.** 1986. Invertebrate oxygen carriers (Linzen. D. ed.). Springer-Verlag, Berlin y Heidelberg, 153-163.
- Sotelo-Mundo R.R.** 1993. Aislamiento y caracterización parcial de la lipoproteína en la hemolinfa del camarón blanco (*Penaeus vannamei* Boone). Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora. México.
- Strömqvist M y Gruffman H.** 1992. Period Acid/Schiff staining of glycoproteins immobilized on a blotting matrix. *Biotechniques*. 13(5):744-746.
- Stoeva S., Rachev R., Severov S., Voelter W. y Genuv N.** 1995. Carbohydrate content and monosaccharide composition of *Rapana thomasiana grosse* (Gastropoda) hemocyanin and its structural subunit. Comparison with gastropodan hemocyanin. *Comparative of biochemistry and physiology*. 110B(4):761-765.
- Spicer J.I. y McMahon B.R.** 1990. Haemocyanin oxygen binding and the physiological ecology of a range talitroidean amphidops (Crustacea) I. pH, temperature and L-lactate sensitivity. *Journal of comparative biochemistry*. 160:195-200.
- Taylor A.C., Morris S. y Bridges C.R.** 1985. Modulation of haemocyanin oxygen affinity in the prawn, *Palaemon elegans* (Rathke) under environmental salinity stress. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 94:167-180.

- Telfer W.H. y Kunkel J.G.** 1991. The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 205-228.
- Truchot J.P. y Boitel F.** 1992. *In vitro* and *in vivo* effects of copper on haemocyanin-O<sub>2</sub> binding in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comparative of biochemistry and physiology.* 103C(2):339-343.
- van Holde K.E. y Miller K.I.** 1982. Haemocyanins. *Quarterly reviews of biophysics.* 15(1):1-129.
- van Bruggen E.F.J. Schutter W.G., van Breemen J.F.L., Bijholt M.M.C. y Winchertjest.** 1982. Arthropodan and Molluscan haemocyanins. *Electron Microscopy Proteins.* 1:1-38.
- Verijken J.M., Schwander E.H., Sueter N.M. y Beintema J.J.** 1982. Limited proteolysis of the 94 000-dalton subunit of *Panulirus interruptus* hemocyanin; the carbohydrate attachment site. *European journal of biochemistry.* 123:283-289.
- Weeks J.M. y Rainbow P.S.** 1992. The effect of salinity on copper and Zinc concentrations in three species of Talitrid amphipods (crustacea). *Comparative of biochemistry and physiology.* 101(2):399-405.
- Yepiz-Plascencia G.M., Sotelo-Mundo R., Vazquez-Moreno L., Ziegler R. y Higuera-Ciapara I.** 1995. A non-sex specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization. *Comparative of biochemistry and physiology.* 111B:181-189.